

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΑΓΡΟΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΥΠΟΔΟΜΩΝ Κ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΩΡΓΙΚΗΣ ΖΩΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΕΝΤΟΜΟΛΟΓΙΑΣ**

**Χρήση μοριακών μεθόδων για τον προσδιορισμό και
τη διερεύνηση της γενετικής ποικιλομορφίας ειδών
της οικογένειας Phytoseiidae (Acari: Mesostigmata)**

**Βασιλική Ι. Ευαγγέλου
Γεωπόνος MSc**

Διδακτορική Διατριβή

Επιβλέπων Καθηγητής: Γεώργιος Θ. Παπαδούλης

ΑΘΗΝΑ 2015

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΑΓΡΟΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΥΠΟΔΟΜΩΝ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΩΡΓΙΚΗΣ ΖΩΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΕΝΤΟΜΟΛΟΓΙΑΣ

**Χρήση μοριακών μεθόδων για τον προσδιορισμό και
τη διερεύνηση της γενετικής ποικιλομορφίας ειδών
της οικογένειας Phytoseiidae (Acari: Mesostigmata).**

Βασιλική Ι. Ευαγγέλου
Γεωπόνος MSc

Διδακτορική Διατριβή

Επιβλέπων Καθηγητής: Γεώργιος Θ. Παπαδούλης

ΑΘΗΝΑ 2015

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΑΓΡΟΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΥΠΟΔΟΜΩΝ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΩΡΓΙΚΗΣ ΖΩΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΕΝΤΟΜΟΛΟΓΙΑΣ

Χρήση μοριακών μεθόδων για τον προσδιορισμό και τη διερεύνηση της γενετικής ποικιλομορφίας ειδών της οικογένειας *Phytoseiidae* (Acari: Mesostigmata).

Διδακτορική Διατριβή

Βασιλική Ι. Ευαγγέλου
Γεωπόνος MSc

Τριμελής συμβουλευτική επιτροπή:

Γεώργιος Παπαδούλης, Καθηγητής (Επιβλέπων)

Νικόλαος Εμμανουήλ, Καθηγητής (Μέλος)

Ιωάννης Βόντας, Αναπληρωτής Καθηγητής (Μέλος)

Εξεταστική επιτροπή:

Επαμεινώνδας Παπλωματάς (Καθηγητής)

Ιωάννα Κούρτη (Αναπληρώτρια Καθηγήτρια)

Γεώργιος Μπρούφας (Αναπληρωτής Καθηγητής)

Διονύσιος Περγίκης (Επίκουρος Καθηγητής)

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στις σύγχρονες καλλιέργειες η εφαρμογή τόσο της Ολοκληρωμένης όσο και της Βιολογικής Αντιμετώπισης των εχθρών είναι πλέον κοινή λογική, με τους βιολογικούς παράγοντες που συμμετέχουν να αυξάνονται διαρκώς. Σε αυτούς υπάγονται και τα ακάρεα της οικογένειας Phytoseiidae, τα οποία δίνουν εντυπωσιακά αποτελέσματα ως προς τη μείωση των πληθυσμών των φυτοφάγων οργανισμών, που δημιουργούν προβλήματα στις καλλιέργειες. Τα αρπακτικά ακάρεα υπάρχουν και σε φυσιολογικές συνθήκες σε κάποιες από αυτές τις καλλιέργειες και είναι επιθυμητή η παραμονή τους και η ενίσχυση της παρουσίας τους, ενώ σε άλλες περιπτώσεις έχουν εξαπολυθεί ως σκευάσματα από τους παραγωγούς.

Η γνώση του είδους των αρπακτικών οργανισμών είναι μείζονος σημασίας για την ορθή φυτοπροστασία και τη διάσωση της καλλιέργειας και της τελικής παραγωγής. Η Κλασική Συστηματική Ταξινόμηση δίνει σημαντικές πληροφορίες, οι οποίες τείνουν να συνδυάζονται με τις Μοριακές Τεχνικές, ειδικά σε περιπτώσεις όπου η πρώτη αμφισβητείται. Δύο τέτοιες περιπτώσεις είναι α) περιπτώσεις ειδών ακάρεων που ομοιάζουν πολύ μεταξύ τους μορφολογικά και β) περιπτώσεις όπου η Κλασική συστηματική δε μπορεί να δώσει σαφείς απαντήσεις λόγω ελλিপών στοιχείων, όπως είναι η παρουσία μόνο ατελών σταδίων των ακάρεων και όχι κάποιου ακμαίου και ιδιαίτερα του θηλυκού ατόμου.

Προς διερεύνηση των παραπάνω στην παρούσα διδακτορική διατριβή εξετάζεται το γένος *Typhloseiulus* της οικογένειας Phytoseiidae, στο οποίο για να διακριθούν τα είδη του οι Συστηματικοί χρησιμοποιούν στοιχεία μεταξύ άλλων και της χαιτοταξίας του. Ακόμα, εφαρμόζονται μοριακές τεχνικές στα διάφορα στάδια του είδους *Iphiseius degenerans*, διακεκριμένο βιολογικό παράγοντα, με στόχο την απομόνωση DNA και τον προσδιορισμό τους.

Για την περίπτωση της διάκρισης ειδών εφαρμόστηκαν αρχικά οι κλείδες για το γένος και χρησιμοποιήθηκαν τρεις μοριακοί δείκτες μιτοχονδριακού DNA, οι 12Sr, COI - CJ-NR και COI - Barcode. Η εφαρμογή τους έγινε σε συνολικά εβδομήντα οκτώ πληθυσμούς που συλλέχθηκαν σε φυτά σε τριάντα οκτώ περιοχές της Ελλάδος. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα και οι τρεις δείκτες είναι ικανοί να διακρίνουν είδη του γένους, παράγοντας φυλογενετικά δένδρα με διακριτούς ανά είδος κλάδους. Όμως, υστερούν αρκετά στο επίπεδο διάκρισης των πληθυσμών εντός του είδους. Επιπλέον, οι πληθυσμοί εμφανίζουν μεγάλη παραλλακτικότητα, φτάνοντας τους σαράντα εννέα απλοτύπους για την γονιδιακή αλληλουχία 12Sr.

Η προσπάθεια για προσδιορισμό ενός είδους ακάρεως σε όλα του τα στάδια, ακόμα και σε αυτό του ωού, θεωρείται επιτυχής με το πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε. Σημειώνεται ότι απομονώθηκε γενετικό υλικό σε όλα τα στάδια του *I. degenerans* (ακμαίο θήλυ-άρρεν, δευτερονυμφη, πρωτονύμφη, λάρβα, ωό) με τα αποτελέσματα της καθαρότητας και της ποσότητας του γενετικού υλικού να είναι ανάλογα με το

μέγεθος της πρώτης ύλης. Έτσι, από τα ακμαία απομονώθηκε περισσότερο DNA σε σχέση με τα υπόλοιπα στάδια και η μικρότερη ποσότητα βρέθηκε στο στάδιο του ωού. Η ιδιαιτερότητα του πρωτοκόλλου και η επιτυχημένη του εφαρμογή εγκαινιάζεται στην προσθήκη διαλύματος PBS κατά το στάδιο της λύσης των κυττάρων, διευκολύνοντας την εξαγωγή του γενετικού υλικού από τα κύτταρα του οργανισμού. Επιπλέον, επιτυγχάνεται ορθός προσδιορισμός του είδους του ακάρεως ακόμα και στο στάδιο του ωού, με τις ήδη κατατεθειμένες αλληλουχίες να ταυτίζονται κατά 96%.

Η συγκεκριμένη διατριβή δίνει απαντήσεις στον προσδιορισμό ειδών σε ακάρεα της οικογένειας Phytoseiidae και μάλιστα ακόμα και όταν αυτά δεν ευρίσκονται στο στάδιο του ακμαίου, αλλά και σε οποιοδήποτε άλλο στάδιο. Οι μοριακοί δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν θα πρέπει να αξιοποιηθούν περισσότερο, καθώς φαίνεται ότι έχουν τη δυναμική να δώσουν ακόμα περισσότερες πληροφορίες και για τους πληθυσμούς, αλλά και τη γεωγραφική προέλευσή τους.

Εφαρμογή Μοριακών Τεχνικών σε Ακάρεα.

Λέξεις κλειδιά: Μοριακοί Δείκτες, Ακάρεα, Γενετικό Υλικό, Οικογένεια Phytoseiidae, Βιολογική και Ολοκληρωμένη Αντιμετώπιση Εχθρών Καλλιεργειών

ABSTRACT

Molecular methods used for the species' determination of Phytoseiid mites (Acari: Mesostigmata) and for the investigation of their genetic diversity.

Biological Control and Integrated Pest Management have become more and more applicable in modern times, having the number of the biological agents rapidly increased. Mites of the family Phytoseiidae belong to these agents and they seem to be really effective against various pests' population of certain crops. Those predatory mites often exist naturally at these crops under and their presence desirable. Usually, it is tended to increase their numbers by enhancing their living conditions and in many cases the growers release them on the cultivation.

In all cases, the identity of the biological factor involved, is of paramount importance. Data coming from the Clasical Systematic Taxonomy are engaged with the Molecular Techniques in order to overcome doubts that might be raised, such as a) when mites species are too close morphologically and b) when morphological data are scarce, insufficient or missing. The later is the case where no data on immature stages exist.

By using molecular data, the present study investigates these two aspects a) by trying to discriminate the species of the genus *Typhloseiulus* which till now are separated mainly by their chaetotaxy and b) by extracting DNA from individuals of all life stages of the *Iphiseius degenerans*, a well known biological agent.

For the species determination, two keys based on morphological creteria were used first and then they were compared with those data obtained by three molecular markers, 12Sr, COI - CJ-NR and COI - Barcode. Seventy eight populations collected from thirty eight regions all over Greece, were examined. According to the results, all three markers are capable at various degrees of determining the species of the genus and phylogenetic trees were constructed giving different cluster for each species. The populations of each species were not well discriminated. The populations showed increased variability giving for example forty nine haplotypes for the marker 12Sr.

The protocol for the determination of *Iphiseius degenerans* on all of its several life stages, even at the stage of the egg, was proved successful. DNA was extracted from all of *I. degenerans*' stages (female-male adult, second stage instar, first stage instar, larva, egg) and the measurements for DNA quantity and purity were in accordance to the material size. Adults produced more DNA than all the other stages while lowest quantity was found at the eggs. The successful application of the protocol must be due to the use of the PBS solution which is added at the lysis step

and seems to help the extraction of the DNA from the organism's cells. Moreover, the data deposited at the GENBANK show 96% similarity with the resulted sequences, fact that confirms the correct species' determination, even at the egg's stage.

The present thesis is dealing with the determination and discrimination of Phytoseiid species, at every stage of their life, not only at the adult stage. The molecular techniques and markers used may contribute to further investigate the discrimination of population within species.

Molecular Acarology

Keywords: Molecular markers, Mites, DNA, Family Phytoseiidae, Biological Control, Integrated Pest Management

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε με την καθοριστική συμβολή πολλών ατόμων τους οποίους οφείλω να ευχαριστήσω θερμά.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κο Γεώργιο Παπαδούλη, ο οποίος μου ανέθεσε το θέμα της διατριβής, έδειξε ιδιαίτερη εμπιστοσύνη στο πρόσωπό και τις ιδέες μου και μου παρείχε όποια βοήθεια απαιτήθηκε κατά τη διάρκειά της. Ακόμη, ευχαριστώ τον Καθηγητή κο Νικόλαο Εμμανουήλ και τον Αναπληρωτή Καθηγητή κο Ιωάννη Βόντα για τις χρήσιμες συμβουλές τους, όπως και τον Καθηγητή Επαμεινώνδα Παπλωματά, τους Αναπληρωτές Καθηγητές Ιωάννα Κούρτη και Γεώργιο Μπρούφα και τον Επίκουρο Καθηγητή Διονύσιο Περγίδη, που αφιέρωσαν πολύτιμο χρόνο στην ανάγνωση και διόρθωση της παρούσης.

Θερμές ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στην Δρ Μαρία Μπουγά, επιστημονικός συνεργάτης του Εργαστηρίου, η οποία με μύησε στις μοριακές τεχνικές και με ενέπνευσε να αγαπήσω τον κλάδο αυτό, με την παρουσία της να κρίνεται καθοριστική για την ολοκλήρωση των πειραμάτων, την επεξεργασία των αποτελεσμάτων και τη συγγραφή της παρούσας εργασίας. Ακόμη, τον εκλιπόντα Αναπληρωτή Καθηγητή κο Αναστάσιο Μαρκόγλου με τον οποίο δεν στάθηκα τυχερή ώστε να συνεργαστώ περισσότερο μαζί του σε κάποιες ιδέες που υπήρξαν αρχικά. Παρόλα αυτά, ακόμη και αυτό το μικρό χρονικό διάστημα έδειξε ιδιαίτερο ζήλο και διάθεση για συνεργασία.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω μία σειρά ατόμων για την προσκόμιση δειγμάτων στο Εργαστήριο με στόχο την ανεύρεση ακάρεων που συμμετείχαν στη μελέτη και συγκεκριμένα τους: Ερευνήτρια Γ' ΜΦΙ Ελευθερία Καπαξίδη, Δρ. Ευάγγελο Μπαδιεριτάκη, κο Μανόλη Φουρδουλεράκη και κα Σωτηρία Μήλλα. Ιδιαίτερα, τον υποψήφιο διδάκτορα Θεόδωρο Σταθάκη τόσο για τις δειματοληψίες όσο και για την βοήθειά του ως προς την αναγνώριση των ειδών σύμφωνα με την κλασική συστηματική ταξινόμηση.

Θα ήταν σοβαρή παράλειψη να μην αναφερθώ στους γονείς μου, Γιάννη και Μαρία, και τα αδέρφια μου, Κώστα και Αγγελική, που πέρα από την υλική και πρακτική τους υποστήριξη, η ηθική τους συμπαράσταση ήταν καθοριστική για την ολοκλήρωση και παρουσίαση της προσπάθειας αυτής. Επιπλέον, τους ευχαριστώ θερμά για την συντροφιά τους σε πολλές από τις δειματοληψίες που πραγματοποιήθηκαν. Ακόμα, τις φίλες και συναδέλφους Κωνσταντίνα Αρβανίτη, Δέσποινα Μακρογιάννη και Σταυρούλα Ψαρουδάκη για την ψυχολογική υποστήριξη και τη συμπαράστασή τους όσες φορές αυτή κρίθηκε απαραίτητη.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω το προσωπικό του Εργαστηρίου Γεωργικής Ζωολογίας και Εντομολογίας του Γ.Π.Α. για τη συνεργασία όλο αυτό το διάστημα.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	IV
ABSTRACT	VI
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	VIII
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	1
ΧΡΗΣΗ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΕΙΔΩΝ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ <i>TYPHLOSEIULUS</i> - ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΤΟΥΣ ΠΟΙΚΙΛΟΜΟΡΦΙΑΣ	5
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	6
ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ PHYTOSEIIDAE	6
ΓΕΝΟΣ <i>TYPHLOSEIULUS</i>	9
<i>Typhloseiulus arzakanicus</i>	10
<i>Typhloseiulus calabriae</i>	10
<i>Typhloseiulus carmonae</i>	11
<i>Typhloseiulus eleonorae</i>	11
<i>Typhloseiulus eliahuswirskii</i>	12
<i>Typhloseiulus erymanthii</i>	12
<i>Typhloseiulus peculiaris</i>	13
<i>Typhloseiulus rodopiensis</i>	13
<i>Typhloseiulus simplex</i>	14
<i>Typhloseiulus subsimplex</i>	15
ΦΥΤΑ ΞΕΝΙΣΤΕΣ	16
<i>Acer</i> spp. (Οικογένεια: Sapindaceae)	16
<i>Quercus</i> spp. (Οικογένεια: Fagaceae)	18
ΚΛΑΣΙΚΗ ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ	22
Η οικογένεια Phytoseiidae	22
Το γένος <i>Typhloseiulus</i>	26
ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ	30
Απομόνωση DNA	30
Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης	34

Ηλεκτροφόρηση	39
Προσδιορισμός Γενετικής Αλληλουχίας (Sequencing)	40
Μιτοχονδριακό DNA – mtDNA	42
Πληθυσμιακή Ανάλυση – Υπολογισμός Γενετικών Αποστάσεων	43
Σχεδιασμός Φυλογενετικών Δένδρων	45
ΣΚΟΠΟΣ	48
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	49
ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	49
ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΚΗ ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ – ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΙΔΟΥΣ ΒΑΣΕΙ ΚΛΕΙΔΩΝ	54
ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ DNA	55
ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ	57
ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ	59
ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ	62
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ (SEQUENCING)	64
ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ – ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΔΕΝΔΡΩΝ	65
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	66
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ	83
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΙΔΟΥΣ ΑΠΟ ΟΛΑ ΤΑ ΣΤΑΔΙΑ ΕΝΟΣ ΑΚΑΡΕΩΣ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ	88
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	89
ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΕΧΘΡΩΝ & ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ	89
<i>IPHISEIUS DEGENERANS</i>	91
ΣΚΟΠΟΣ	93
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	94
ΣΥΛΛΟΓΗ – ΕΚΤΡΟΦΗ ΑΚΑΡΕΩΝ	94
ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ DNA	97
ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)	98
ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΠΗΓΜΑΤΟΣ ΑΓΑΡΟΖΗΣ (AGAROSE GEL ELECTROPHORESIS)	100
ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ	101
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ (DNA SEQUENCING)	102

ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ	103
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	104
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ	108
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	114
ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ	129

ΧΡΗΣΗ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΓΙΑ ΤΟΝ

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΕΙΔΩΝ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ

***TYRHOSEIULUS* - ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ**

ΤΟΥΣ ΠΟΙΚΙΛΟΜΟΡΦΙΑΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ PHYTOSEIIDAE

Η οικογένεια Phytoseiidae αποτελεί μία από τις πιο γνωστές οικογένειες αρθροπόδων, καθώς τα ακάρεά της έχοντας αρπακτικές ικανότητες, συμμετέχουν σε πολλά προγράμματα Ολοκληρωμένης ή Βιολογικής Αντιμετώπισης εχθρών (φυτοφάγων εντόμων και ακάρεων) σε καλλιέργειες (Kostianen & Hoy, 1996; McMurtry & Croft, 1997). Βάσει πολλών πειραματικών εργασιών που έχουν λάβει χώρα παγκοσμίως και που τείνουν να αυξάνονται την τελευταία πεντηκονταετία, εμφανίζεται να είναι η πιο πολλά υποσχόμενη ομάδα αρπακτικών, καθώς εντοπίζεται και επιβιώνει σε πολλά και διαφορετικά φυτά ξενιστές, καλλιεργούμενα ή αυτοφυή (Gerson et al., 2003; Bjørnson, 2008; Tixier et al., 2008a).

Σύμφωνα με την βιοοικολογία των ειδών της οικογένειας και τις διατροφικές τους συνήθειες, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως αρπακτικά για την αντιμετώπιση πολλών και διαφορετικών φυτοφάγων εντόμων και ακάρεων. Από τις πιο συνηθισμένες χρήσεις στις καλλιέργειες είναι η εξαπόλυση του είδους *Phytoseiulus persimilis* Athias-Henriot (Mesostigmata: Phytoseiidae) το οποίο εφαρμόζεται για την αντιμετώπιση του *Tetranychus urticae* Koch (Prostigmata: Tetranychidae), ενός εχθρού που αναπτύσσει άμεσα τους πληθυσμούς του και καταστρέφει ταχύτατα την καλλιέργεια που θα βρεθεί (**Εικόνα 1**). Το ίδιο φυτοφάγο άκαρι αντιμετωπίζεται και με τη χρήση του *Amblyseius*(=*Neoseiulus*) *californicus* (McGregor). Ακόμη, τα *Amblyseius* (= *Neoseiulus*) *barkeri* Hughes και *Iphiseius degenerans* (Berlese) έχουν δώσει θετικά αποτελέσματα κατά την εξαπόλυσή τους σε καλλιέργεια προσβεβλημένη από έντομα της τάξης Thysanoptera (θρίπες). Το *Typhlodromus pyri* Scheuten (Acari: Phytoseiidae) χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση του *Panonychus ulmi* (Koch) (Acari: Tetranychidae) σε καλλιέργεια μηλοειδών.

Η σημασία των παραπάνω έχει γίνει κατανοητή από τις εταιρείες, οι οποίες πλέον εμπορεύονται σκευάσματα με τα συγκεκριμένα αρπακτικά ακάρεα και αναγράφουν στην ετικέτα τους σαφείς οδηγίες για τον φυτοπαρασιτικό οργανισμό και την καλλιέργεια στην οποία θα εξαπολυθούν. Αναγνωρίζοντας ορθά τη λεία, επιλέγεται το κατάλληλο αρπακτικό

άκαρι κι εφαρμόζεται το σκεύασμα σε συχνότητα και συνθήκες, ανάλογα με την καλλιέργεια και τα επίπεδα προσβολής.

Η ταξινόμική θέση των αρπακτικών αυτών ακάρεων, που γίνεται αποδεκτή από τη μεγαλύτερη μερίδα των ακαρεολόγων παγκοσμίως είναι η εξής:

Βασίλειο	Animalia
Φύλλο	Arthropoda
Κλάση	Arachnida
Τάξη	Mesostigmata
Υπεροικογένεια	Phytoseioidea
Οικογένεια	Phytoseiidae (Chant & McMurtry, 1994)

Στην οικογένεια αυτή περιλαμβάνονται τα περισσότερα είδη σε σύγκριση με τις υπόλοιπες οικογένειες της τάξης Mesostigmata: συγκεκριμένα έχουν καταγραφεί πάνω από 2.250 είδη (Moraes et al., 2004; Chant & McMurtry, 2007; Tixier et al., 2011a). Αξίζει να αναφερθεί ότι μέχρι το 1951 είχαν καταγραφεί μόνο 61 είδη, ενώ οι καταγραφές έφτασαν τις 165 μέσα σε μία δεκαετία, τις 1.565 στα τέλη του 1980 και περισσότερες των 1.980, που ανήκουν σε 89 γένη, μέχρι το 2012 (Chant & McMurtry, 2005; 2006; Tixier et al., 2008b; Tsolakis et al., 2012). Το βασικότερο γνώρισμα που χρησιμοποιείται για την διάκρισή τους, είναι η χαιτοταξία του ιδιοσώματος.

Σύμφωνα με τα πιο πρόσφατα δεδομένα (Demite et al., 2014) η οικογένεια πλέον περιλαμβάνει 2.717 είδη, σε 91 γένη και 3 υποοικογένειες, τις Amblyseiinae, Phytoseiinae και Typhlodrominae. Την πιο πολυάριθμη αποτελεί η υποοικογένεια Amblyseiinae με 65 γένη και 1.748 καταγεγραμμένα είδη και ακολουθούν η Typhlodrominae με 23 γένη και 732 είδη και η Phytoseiinae με 3 γένη και 229 είδη. Τα γένη με τον μεγαλύτερο αριθμό ειδών είναι με φθίνουσα σειρά τα *Typhlodromus* (454), *Amblyseius* (400), *Neoseiulus* (397), *Phytoseius* (222), *Euseius* (213) και *Proprioseiopsis* (163). Υπάρχουν 34 φαινοτυπικά γένη. Από γεωγραφική οπτική τα περισσότερα είδη έχουν καταγραφεί στην Αμερική (313), την Κίνα (288), την Ινδία (195), τη Βραζιλία (190) και το Πακιστάν (178). Στις υπόλοιπες χώρες, είτε οι καταγεγραμμένες αναφορές για την ύπαρξη κάποιου είδους είναι λιγότερες από δεκαπέντε σε αριθμό ή δεν υπάρχουν καθόλου. Αντίστοιχα δεδομένα είχαν παρουσιάσει λίγα χρόνια νωρίτερα οι Hernandez et al. (2011), με τους αριθμούς των ειδών και των γενών να εντοπίζονται στα περίπου ίδια επίπεδα.

Η σημασία της οικογένειας κατέστησε απαραίτητη την καταγραφή όλων των πληροφοριών σε μία βάση δεδομένων η οποία ανανεώνεται συνεχώς. Σε αυτή μπορεί ο κάθε ενδιαφερόμενος να βρει πληροφορίες για όλα τα είδη Phytoseiidae σχετικά με την

συστηματική τους ταξινόμηση, την πρώτη τους καταγραφή, τις ερευνητικές εργασίες που τα αφορούν, τα ενδιαφέροντα και τις περιοχές που απαντώνται, τα συνώνυμά τους κλπ (Castilho et al., 2014; Demite et al., 2014). Αντίστοιχες βάσεις δεδομένων έχουν δημιουργηθεί εμπεριέχοντας και σχέδια των ειδών για τα γένη *Typhlodromus* (*Typhlodromus*) (Hernandes et al., 2012; Tixier, 2012a) και *Neoseiulella* (Tixier, 2012a). Παράλληλα, υπάρχει μία προσπάθεια για καταγραφή της βιογεωγραφίας των ειδών της οικογένειας, με σκοπό τη διερεύνηση της εξέλιξης και της φυλογένεσης εντός αυτής (Kreiter & Tixier, 2010). Επιπλέον, από αυτή τη διαδικασία και τα αποτελέσματά της αντλούνται πληροφορίες ως προς την κατεύθυνση της Βιολογικής και Ολοκληρωμένης Αντιμετώπισης των εχθρών, καθώς “γεωγραφικά και γενετικά κοντινοί” πληθυσμοί και είδη μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την αντιμετώπιση ίδιων εχθρών (Hernandes et al., 2012).



Εικόνα 1: Το άκαρι *Phytoseiulus persimilis* (Mesostigmata: Phytoseiidae) την ώρα που “αρπάζει” τη λεία του, μία νύμφη του είδους *Tetranychus urticae* Koch (Prostigmata: Tetranychidae), το οποίο έχει αναπτύξει ταχύτατα πληθυσμούς σε φυτό φασολιάς*.

* Οι φωτογραφίες που απεικονίζονται στο κείμενο έχουν ληφθεί από την συγγραφέα, εκτός αν αναφέρεται διαφορετικά στις αντίστοιχες λεζάντες.

ΓΕΝΟΣ TYPHLOSEIULUS

Τα χιλιάδες είδη που συγκαταλέγονται στην οικογένεια Phytoseiidae διακρίνονται μεταξύ τους εκτός των άλλων, με βάση την παρατήρηση συγκεκριμένων χαρακτηριστικών της χαιτοταξίας τους (αριθμών, μήκος, θέση τριχών κλπ). Ένα γένος στο οποίο ο προσδιορισμός των ειδών που το αποτελούν γίνεται κατεξοχήν με τα προαναφερθέντα χαρακτηριστικά είναι το γένος *Typhloseiulus* Chant & McMurtry (**Εικόνα 2**). Χαρακτηριστικό του γένους είναι η κέρινη (πιθανά) επικάλυψη των τριχών του νώτου, φαινόμενο το οποίο εμφανίζεται εντονότερο τον Χειμώνα (Papadoulis & Emmanouel, 1988).

Τα είδη αυτά συμβιώνουν με άλλα είδη ακάρεων, κυρίως φυτοφάγων, γεγονός που προσδίδει άλλη μία ιδιότητα στο γένος *Typhloseiulus*, αυτή του θηρευτή-αρπακτικού. Η ταξινομική κατάταξη του γένους φαίνεται στη συνέχεια:

Οικογένεια	Phytoseiidae
Υποοικογένεια	Typhlodrominae
Φυλή	Typhlodromini
Γένος	<i>Typhloseiulus</i>

Σε παγκόσμιο επίπεδο τα είδη του γένους που έχουν αναφερθεί είναι 10 και συγκεκριμένα τα:

- 1) *Typhloseiulus arzakanicus* (Arutunjan, 1972),
- 2) *Typhloseiulus calabriae* (Ragusa & Swirski, 1976),
- 3) *Typhloseiulus carmonae* (Chant & Yoshida-Shaul, 1983),
- 4) *Typhloseiulus eleonora* (Ragusa & Swirski, 1981),
- 5) *Typhloseiulus eliahuswirskii* (Ragusa Di Chiara, 1992),
- 6) *Typhloseiulus erymanthii* (Papadoulis & Emmanouel, 1988),
- 7) *Typhloseiulus peculiaris* (Kolodochka, 1980),
- 8) *Typhloseiulus rodopiensis* (Papadoulis & Emmanouel, 1994),
- 9) *Typhloseiulus simplex* (Chant, 1957) και
- 10) *Typhloseiulus subsimplex* (Arutunjan, 1972).



Εικόνα 2: Ακμαίο θηλυκό του είδους *Typhloseiulus carmonae* σε φύλλο βελανιδιάς κατά τη διάρκεια στερεοσκοπικής παρατήρησης.

Όσον αφορά το είδος *T. oskensis*, το οποίο αναφέρεται σε μία διδακτορική διατριβή από Ιρανό ερευνητή (Shirdel, 2003), που όμως δεν περιγράφεται πλήρως σε κάποια δημοσίευση, οπότε θεωρείται ότι αποτελεί συνώνυμο είδος με κάποιο από τα παραπάνω (Faraji et al., 2007). Στη συνέχεια αναφέρονται πληροφορίες για την καταγραφή των ειδών αυτών, τις περιοχές και τους ξενιστές στους οποίους έχουν εντοπιστεί καθώς και οι λοιπές επιβεβαιωμένες πληροφορίες από την βιβλιογραφική αναζήτηση και τις υπάρχουσες βάσεις δεδομένων.

Typhloseiulus arzakanicus

- Ολότυπος:** *Typhloseiulus arzakanicus* (Arutunjan, 1972b): 240; Razdan, Arzakan, σε *Fraxinus* sp.
- Συνώνυμα:**
- *Seiulus arzakanicus* - Arutunjan (1972b) - **πρώτη καταγραφή**
 - *Seiulus (Seiulus) arzakanicus* - Beglyarov (1981)
 - *Typhlodromus arzakanicus* - Chant & Yoshida-Shaul (1983c)
- Περιοχή:** Αρμενία: Arutunjan (1972b)
- Φυτά ξενιστές:** Oleaceae: *Fraxinus* sp. - Arutunjan (1972b)
- Επαναπροσδιορισμός (Redescription):** Arutunjan (1977); Chant & McMurtry (2007); Chant & Yoshida-Shaul (1983c); Faraji et al. (2007a)
- Αναφορές – Κατάλογος:** Moraes et al. (1986); Moraes et al. (2004); Prasad (2012)

Typhloseiulus calabriae

- Ολότυπος:** *Typhloseiulus calabriae* (Ragusa & Swirski, 1976): 179; Gambarie, Calabria, Italy, σε *Fagus* sp.
- Συνώνυμα:**
- *Seiulus calabriae* - Ragusa & Swirski (1976) - **πρώτη καταγραφή**
 - *Typhlodromus calabriae* - Chant & Yoshida-Shaul (1983c)
- Περιοχή:**
- Ελλάδα: Papadoulis & Emmanouel (1993); Papadoulis et al. (2009)
 - Ιταλία: Ragusa & Swirski (1976)
 - Κροατία: Tixier et al. (2010b)
 - Ουκρανία: Kolodochka (1981a)
- Φυτά ξενιστές:** Fagaceae: *Fagus* sp. - Ragusa & Swirski (1976)
- Επαναπροσδιορισμός (Redescription):** Chant & Yoshida-Shaul (1983); Faraji et al. (2007a); Karg (1991); Karg (1993b); Papadoulis et al. (2009); Ragusa & Swirski (1981)

Αναφορές – Κατάλογος: Moraes et al. (1986); Moraes et al. (2004); Prasad (2012)

Typhloseiulus carmonae

- Ολότυπος:** *Typhloseiulus carmonae* (Chant & Yoshida-Shaul, 1983c): 1146; Evora, Portugal, σε *Quercus ilex rotundifolia*.
- Συνώνυμα:**
- *Typhlodromus carmonae* - Chant & Yoshida-Shaul (1983c) **πρώτη καταγραφή**
 - *Seiulus carmonae* - Moraes et al. (1986)
- Περιοχή:**
- Γαλλία: Barbar et al. (2005); Tixier et al. (2006); Tixier et al. (2007a)
 - Ελλάδα: Papadoulis & Emmanouel (1993); Papadoulis et al. (2009)
 - Ισπανία: Ferragut (1991)
 - Κύπρος: Amitai (1992)
 - Πορτογαλία: Chant & Yoshida-Shaul (1983c)
- Φυτά ξενιστές:** Fagaceae: *Quercus ilex rotundifolia* - Chant & Yoshida-Shaul (1983c)
- Επαναπροσδιορισμός (Redescription):** Carmona (1970)^{OBS}; Chant & McMurtry (2007); Faraji et al. (2007a); Ferragut (1991); Ferragut et al. (2010); Papadoulis et al. (2009); Shirdel et al. (2008)
- Αναφορές – Κατάλογος:** Moraes et al. (1986); Moraes et al. (2004); Prasad (2012)

Typhloseiulus eleonora

- Ολότυπος** *Typhloseiulus eleonora* (Ragusa & Swirski, 1981): 269; Butera, Caltanissetta, Sicily, Italy, σε *Quercus* sp.
- Συνώνυμα** *Seiulus eleonora* - Ragusa & Swirski (1981) - **πρώτη καταγραφή**
- Περιοχή**
- Γαλλία: Barbar et al. (2005); Tixier et al. (2006); Tixier et al. (2007a)
 - Ιταλία: Nicotina et al. (2003); Ragusa & Swirski (1981); Ragusa Di Chiara & Tsolakis (1996); Ragusa Di Chiara & Tsolakis (2001); Ragusa Di Chiara et al. (1991)
- Φυτά ξενιστές** Fagaceae: *Quercus* sp. - Ragusa & Swirski (1981)
- Επαναπροσδιορισμός (Redescription)** Chant & McMurtry (2007); Faraji et al. (2007a); Ferragut (1991)

Αναφορές - Κατάλογος Moraes et al. (1986); Moraes et al. (2004); Prasad (2012)

Typhloseiulus eliahuswirskii

- Ολότυπος** *Typhloseiulus eliahuswirskii* (Ragusa Di Chiara, 1992): 23; Borgetto (Palermo), Sicily, Italy, σε *Quercus* sp.
- Συνώνυμα**
- *Seiulus eliahuswirskii* Ragusa Di Chiara (1992) - **πρώτη καταγραφή**
 - *Typhloseiopsis elianhuswirski* [sic] - Chant & McMurtry (2007)
- Περιοχή**
- Ελλάδα: Ragusa & Tsolakis (1998)
 - Ιταλία: Ragusa Di Chiara & Tsolakis (1996); Ragusa Di Chiara & Tsolakis (2001); Ragusa Di Chiara (1992)
- Φυτά ξενιστές** Fagaceae: *Quercus* sp. - Ragusa Di Chiara (1992)
- Επαναπροσδιορισμός (Redescription)** Chant & McMurtry (2007); Faraji et al. (2007a); Papadoulis et al. (2009)
- Αναφορές - Κατάλογος** Moraes et al. (2004); Prasad (2012)

Typhloseiulus erymanthii

- Ολότυπος** *Typhloseiulus erymanthii* (Papadoulis & Emmanouel, 1988): 3; Ano Blassia, Achaia, Greece, σε *Quercus coccifera*.
- Συνώνυμα** *Typhlodromus erymanthii* - Papadoulis & Emmanouel (1988) - **πρώτη καταγραφή**
- Περιοχή** Ελλάδα: Papadoulis & Emmanouel (1988); Papadoulis & Emmanouel (1990a); Papadoulis et al. (2009)
- Φυτά ξενιστές** Fagaceae: *Quercus coccifera* - Papadoulis & Emmanouel (1988)
- Επαναπροσδιορισμός (Redescription)** Chant & McMurtry (2007); Faraji et al. (2007a); Papadoulis & Emmanouel (1990a); Papadoulis & Emmanouel (1993a); Papadoulis et al. (2009)
- Αναφορές - Κατάλογος** Moraes et al. (2004); Prasad (2012)

Typhloseiulus peculiaris

Ολότυπος	<i>Typhloseiulus peculiaris</i> (Kolodochka, 1980b): 41; Sadovo Kalarashs, Moldova, σε <i>Tilia tomentosa</i> .
Συνώνυμα	<ul style="list-style-type: none">• <i>Seiulus peculiaris</i> Kolodochka (1980b) - πρώτη καταγραφή• <i>Typhlodromus peculiaris</i> - Chant & Yoshida-Shaul (1983c)
Περιοχή	<ul style="list-style-type: none">• Ελλάδα: Papadoulis & Emmanouel (1993a); Papadoulis et al. (2009)• Ιράν: Faraji et al. (2007a)• Μολδαβία: Kolodochka (1980b)
Φυτά ξενιστές	Tiliaceae: <i>Tilia tomentosa</i> - Kolodochka (1980b)
Επαναπροσδιορισμός (Redescription)	Chant & McMurtry (2007); Chant & Yoshida-Shaul (1983c); Faraji et al. (2007a); Papadoulis et al. (2009); Ragusa & Swirski (1981)
Αναφορές - Κατάλογος	Moraes et al. (1986); Moraes et al. (2004);

Typhloseiulus rodopiensis

Ολότυπος	<i>Typhloseiulus rodopiensis</i> (Papadoulis & Emmanouel, 1994): 183; Rodopi Mountain, Drama, Greece, σε <i>Quercus sp.</i>
Συνώνυμα	<i>Typhlodromus rodopiensis</i> Papadoulis & Emmanouel (1994) - πρώτη καταγραφή
Περιοχή	<ul style="list-style-type: none">• Ελλάδα: Papadoulis & Emmanouel (1994); Papadoulis et al. (2009)• Κροατία: Tixier et al. (2010c)
Φυτά ξενιστές	Fagaceae: <i>Quercus sp.</i> - Papadoulis & Emmanouel (1994)
Επαναπροσδιορισμός (Redescription)	Chant & McMurtry (2007); Faraji et al. (2007a); Papadoulis et al. (2009); Ragusa & Swirski (1981)
Αναφορές - Κατάλογος	Moraes et al. (2004); Prasad (2012)

Typhloseiulus simplex

Ολότυπος

Typhloseiulus simplex (Chant, 1957): 32; Barming Heath, Kent, England, σε *Fagus sylvatica*.

Συνώνυμα

- *Seiulus simplex* - Chant (1957) **πρώτη καταγραφή**
- *Typhlodromus simplex* - Hirschmann (1962)
- *Seiulus (Seiulus) simplex* - Beglyarov (1981)

Περιοχή

- Αγγλία: Chant (1957)
- Αρμενία: Arutunjan (1970); Arutunjan (1971b); Arutunjan (1972b)
- Γαλλία: Tixier et al. (2000)
- Ελλάδα: Papadoulis & Emmanouel (1993b); Papadoulis et al. (2009); Ragusa & Tsolakis (1998); Ragusa (2006); Ragusa Di Chiara et al. (1995)
- Ιράν: Daneshvar (1978)
- Ισραήλ: Swirski & Amitai (1997a); Wysoki & Swirski (1971)
- Ιταλία: Castagnoli et al. (1984); Nicotina et al. (2003); Ragusa & Swirski (1976); Ragusa Di Chiara & Tsolakis (1996); Ragusa Di Chiara & Tsolakis (2001); Ragusa Di Chiara et al. (1991); Tsolakis et al. (2000)
- Ισπανία: Faraji et al. (2011b)
- Ουγγαρία: Ripka et al. (2002); Ripka et al. (2013)
- Ουκρανία: Livshitz & Kuznetsov (1972)

Φυτά ξενιστές

Fagaceae: *Fagus sylvatica* - Chant (1957)

Επαναπροσδιορισμός (Redescription)

Arutunjan (1969c); Arutunjan (1971b); Arutunjan (1972b); Arutunjan (1977); Athias-Henriot (1958b); Beglyarov (1981); Chant & McMurtry (1994); Chant & McMurtry (2007); Chant & Yoshida-Shaul (1983c); Chant (1958a); Chant (1959b); Chant (1965a); Faraji et al. (2007a); Hirschmann (1962); Karg (1971b); Karg (1991); Karg (1993b); Kolodochka (2006); Livshitz & Kuznetsov (1972); Papadoulis et al. (2009); Ragusa & Swirski (1976); Ragusa & Swirski (1981); Rowell & Chant (1979); Rowell et al. (1978); Swirski et al. (1998); Tixier et al. (2013); Tsolakis & Ragusa (2010); Wainstein (1962b); Wysoki & Swirski (1971)^{OBS}; Yoshida-Shaul & Chant (1983)

Αναφορές - Κατάλογος

Moraes et al. (1986); Moraes et al. (2004); Prasad (2012); Swirski & Amitai (1997b)

Typhloseiulus subsimplex

Ολότυπος	<i>Typhloseiulus subsimplex</i> (Arutunjan, 1972b): 239; Razdan, Arzakan, Armenia, σε <i>Quercus</i> sp.
Συνώνυμα	<ul style="list-style-type: none">• <i>Seiulus subsimplex</i> - Arutunjan (1972b) - πρώτη καταγραφή• <i>Seiulus (Seiulus) subsimplex</i> - Beglyarov (1981)• <i>Typhlodromus subsimplex</i> - Chant & Yoshida-Shaul (1983c)
Περιοχή	<ul style="list-style-type: none">• Αρμενία: Arutunjan (1972b)• Κροατία: Tixier et al. (2010c)
Φυτά ξενιστές	Fagaceae: <i>Quercus</i> sp. - Arutunjan (1972b)
Επαναπροσδιορισμός (Redescription)	Arutunjan (1977); Beglyarov (1981); Chant & McMurtry (2007); Chant & Yoshida-Shaul (1983c); Faraji et al. (2007a); Faraji et al. (2007a)
Αναφορές - Κατάλογος	Moraes et al. (1986); Moraes et al. (2004); Prasad (2012)

Στη χώρα μας απαντώνται τα 8 από τα 10 είδη του γένους *Typhloseiulus* και συγκεκριμένα τα:

- 1) *Typhloseiulus calabriae* (Ragusa & Swirski, 1976),
- 2) *Typhloseiulus carmonae* (Chant & Yoshida-Shaul, 1983),
- 3) *Typhloseiulus eleonora* (Ragusa & Swirski, 1981),
- 4) *Typhloseiulus eliahuswirskii* (Ragusa Di Chiara, 1992),
- 5) *Typhloseiulus erymanthii* (Papadoulis & Emmanouel, 1988),
- 6) *Typhloseiulus peculiaris* (Kolodochka, 1980),
- 7) *Typhloseiulus rodopiensis* (Papadoulis & Emmanouel, 1994),
- 8) *Typhloseiulus simplex* (Chant, 1957)

ΦΥΤΑ ΞΕΝΙΣΤΕΣ

Τα είδη του γένους *Typhloseiulus* προτιμούν ξενιστές οι οποίοι εντοπίζονται σε μεγάλα υψόμετρα και κυρίως σε δασικές περιοχές. Κατά καιρούς έχουν εντοπιστεί σε δένδρα όπως η βελανιδιά, ο σφένδαμος, η αριά, το πουρνάρι και λιγότερο σε ελάτη και κρυνιά. Κοινό χαρακτηριστικό των φυτών αυτών, εκτός από την περίπτωση του πουρναρίου, είναι ότι στο κάτω μέρος των φύλλων υπάρχει έντονη χνόωση, η οποία διευκολύνει τα ακάρεα να κρύβονται και να προφυλάσσονται.

Παράλληλα, οι συγκεκριμένοι ξενιστές αποτελούν ενδαιτήματα διαφόρων φυτοφάγων αλλά κι αρπακτικών ακάρεων, εκτός της οικογένειας Phytoseiidae, αναπτύσσοντας και διατηρώντας μία διατροφική σχέση, γεγονός που υποδηλώνει την οικολογική σημασία των συγκεκριμένων φυτικών ειδών. Η διατήρηση και η προστασία τους από τη ρύπανση του περιβάλλοντος και την εντατική κτηνοτροφία, καθώς κάποια είδη, όπως το πουρνάρι, χρησιμοποιούνται ως τροφή από αιγοπρόβατα, κρίνεται σημαντική λόγω του πλήθους και των διαφορετικών οργανισμών που φιλοξενούν.

Χαρακτηριστικά και πληροφορίες για τους συγκεκριμένους ξενιστές παρουσιάζονται στη συνέχεια.

Acer spp. (Οικογένεια: Sapindaceae)

***Acer trilobum*, *A. pseudoplatanus* – Σφένδαμος**

Στην Ελλάδα απαντώνται δύο από τα είδη του γένους, με διακριτικό χαρακτηριστικό τους γνώρισμα το διαφορετικό αριθμό των αιχμηρών λοβών τους στα φύλλα, οι οποίοι είναι τρεις για το *Acer trilobum* και πέντε για το είδος *A. pseudoplatanus*. Είναι φυλλοβόλα δένδρα και την εποχή του φθινοπώρου τα φύλλα τους αλλάζουν χρώμα, περνώντας από το σκούρο πράσινο σε κόκκινο και τελικά κίτρινο, σηματοδοτώντας και την αλλαγή της εποχής. Το ύψος τους μπορεί να φτάσει τα 15 μ και χαρακτηρίζονται από την αντοχή τους στα κρύα και τους ισχυρούς ανέμους. Ο καρπός τους είναι χαρακτηριστικός και η παρουσία του βοηθά να διακρίνεται το *A. pseudoplatanus* από το δένδρο του πλατάνου (**Εικόνα 3**) (Sfikas, 2001).



Εικόνα 3: Δένδρα Σφενδάμου (*Acer* spp.) στο Βοτονόσι Ιωαννίνων.

Quercus spp. (Οικογένεια: Fagaceae)

Quercus aegilops, *Q. pubescens*, *Q. macedonicus* – Δρυς ή Βελανιδιά

Η βελανιδιά είναι το κατ' εξοχήν δένδρο των Εθνικών μας Δρυμών. Δένδρο ψηλό με γερές ρίζες και αιωνόβιο, με τη διάρκεια της ζωής του να φτάνει τα 600 χρόνια. Ευδοκίμει σε πεδινές, ημιορεινές και ορεινές περιοχές. Αναπτύσσει εκτεταμένο ριζικό σύστημα που εκτείνεται σε μεγάλη έκταση γύρω από το δέντρο και σε μεγάλο βάθος, συμβάλλοντας στην κατακράτηση των εδαφών και στον εμπλουτισμό της υπόγειας υδροφορίας. Λόγω του εκτεταμένου ριζικού συστήματος τα άτομα της βελανιδιάς φύονται σε αραιές αποστάσεις μεταξύ τους, γεγονός που επιτρέπει ενδιάμεσα την ανάπτυξη πολύ πλούσιας θαμνώδους και ποώδους βλάστησης, λόγω των εξαιρετικών συνθηκών και του μικροκλίματος που επικρατεί εκεί (**Εικόνα 4**).

Τα φύλλα της είναι δερματώδη, ωσειδή με οξείες παρυφές και χνουδωτά. Τα μεγαλύτερα ποσοστά φυλλόπτωσης σημειώνονται στο ίδιο διάστημα, για να συμπέσουν με την ανάπτυξη των νέων βλαστών. Η διάρκεια ζωής των φύλλων ποικίλλει από 1 έως 4 χρόνια. Τα άνθη εμφανίζονται κυρίως τον Μάιο και διαρκούν μέχρι τα τέλη Ιουνίου, οπότε και ξεκινά η ανάπτυξη των καρπών. Τα βελανίδια πέφτουν την περίοδο μεταξύ Νοεμβρίου και Ιανουαρίου, ενώ η πτώση τους εμφανίζει μέγιστο κάθε 2 με 4 χρόνια (Terradas, 1999; Sfikas, 2001). Στην Ελλάδα υπάρχουν δάση που αποτελούνται κυρίως από βελανιδιές (**Εικόνα 5**) και που έχουν αποτελέσει αντικείμενο συζήτησης από τα αρχαία χρόνια. Σύμφωνα με την ελληνική μυθολογία οι Δρυάδες ήταν οι γνωστές Νύμφες των Ελληνικών δασών.



Εικόνα 4: Δένδρα και καρποί Βελανιδιάς (*Quercus aegilops*, *Q. pubescens*, *Q. macedonicus*) στο δάσος της Φολόης στην Ηλεία και στην ευρύτερη περιοχή.



Εικόνα 5: Το επιβλητικό δάσος της Φολόης με τις πολλές βελανιδιές.

***Quercus coccifera* – Πουρνάρι**

Το πουρνάρι φύεται ως αειθαλής θάμνος ή μικρό δέντρο ύψους 1-6 m ανάλογα με τις συνθήκες που μεγαλώνει κι έχει ευρεία εξάπλωση στην περιοχή της Μεσογείου. Αποτελεί χαρακτηριστικό δένδρο για τα δάση σε ολόκληρη την Ελλάδα. Οι βλαστοί του χρησιμοποιούνται και ως τροφή των αιγοπροβάτων. Τα φύλλα του είναι απλά, πράσινα και αγκαθωτά, διατεταγμένα κατ' εναλλαγή, δερματώδη, με λεία επιφάνεια, μήκους 1-5 cm και πλάτους 0,5-2,8 cm (**Εικόνα 6**). Τα άνθη του είναι μονογενή: οι αρσενικοί ίουλοι φύονται μοναχικοί στις άκρες των νεαρών κλαδίσκων, ενώ τα θηλυκά άνθη εμφανίζονται μονήρη ή σε ζεύγη στις μασχάλες των φύλλων. Το κάρυο (βαλανίδι) έχει μήκος 1,5-3 (-3,5) cm και διάμετρο 0,8-1,5 cm και είναι χρώματος θαμπού καστανού (Terradas, 1999; Sfikas, 2001).



Εικόνα 6: Δένδρα Πουρναριού (*Quercus coccifera*) στην περιοχή της Αγίας Τριάδας Λασιθίου.

***Quercus ilex* – Αριά**

Η Αριά ανήκει στα αειθαλή, βραδείας ανάπτυξης δένδρα και αναπτύσσεται εκτός των ημιορεινών περιοχών της χώρας με σκιερά αλκαλικά εδάφη, και σε παραθαλάσσιες περιοχές. Μπορεί να φτάσει ακόμα και τα 25 μέτρα αν και συνήθως δεν ξεπερνά τα 10 μέτρα. Τα φύλλα της έχουν χρώμα σκούρο πράσινο στην πάνω επιφάνεια, γκριζοπράσινο στην κάτω και κανονικό ή οδοντωτό σχήμα. Ποικίλλουν πολύ σε μέγεθος και σχήμα, ακόμα και στο ίδιο δένδρο. Τα βελανίδια έχουν ωοειδές σχήμα και συγκρατούνται σε ένα κύπελλο με μέρη που αλληλεπικαλύπτονται (**Εικόνα 7**). Σπάνια συναντάται σε υψόμετρα μικρότερα από 350 μέτρα και μπορεί να βρεθεί και στα 1800 μέτρα (Terradas, 1999; Sfikas, 2001).



Εικόνα 7: Δένδρα Αριάς (*Quercus ilex*) στην περιοχή του Ανθηρού Καρδίτσας.

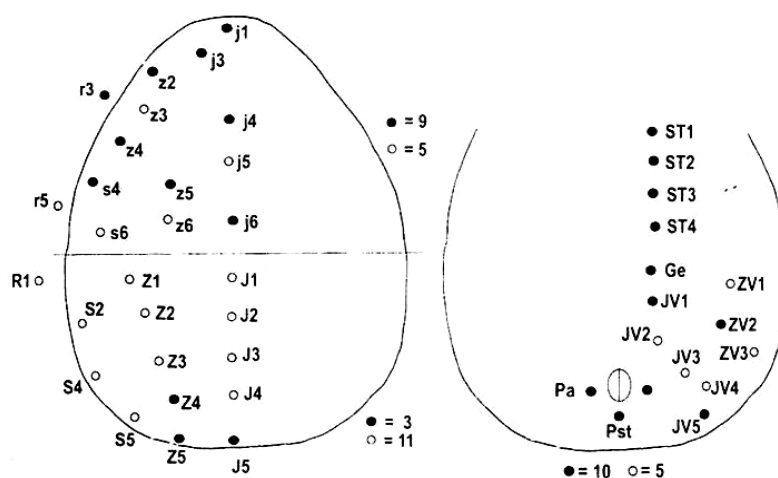
ΚΛΑΣΙΚΗ ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ

Η οικογένεια Phytoseiidae

Στα προγράμματα Βιολογικής Αντιμετώπισης που εφαρμόζονται πλέον κατά την καθημερινή γεωργική πρακτική, απαιτείται η ορθή χρήση των βιολογικών παραγόντων. Συγκεκριμένα, δεν αρκεί μόνο η σωστή δοσολογία και η συχνότητα των εφαρμογών, αλλά και η χρήση του ιδανικού οργανισμού (αρπακτικού ή παρασιτοειδούς), ώστε τα αποτελέσματα να είναι τα καλύτερα δυνατά ως προς την ποιότητα του τελικού προϊόντος αλλά και με χαμηλότερο κόστος (McMurtry, 2010).

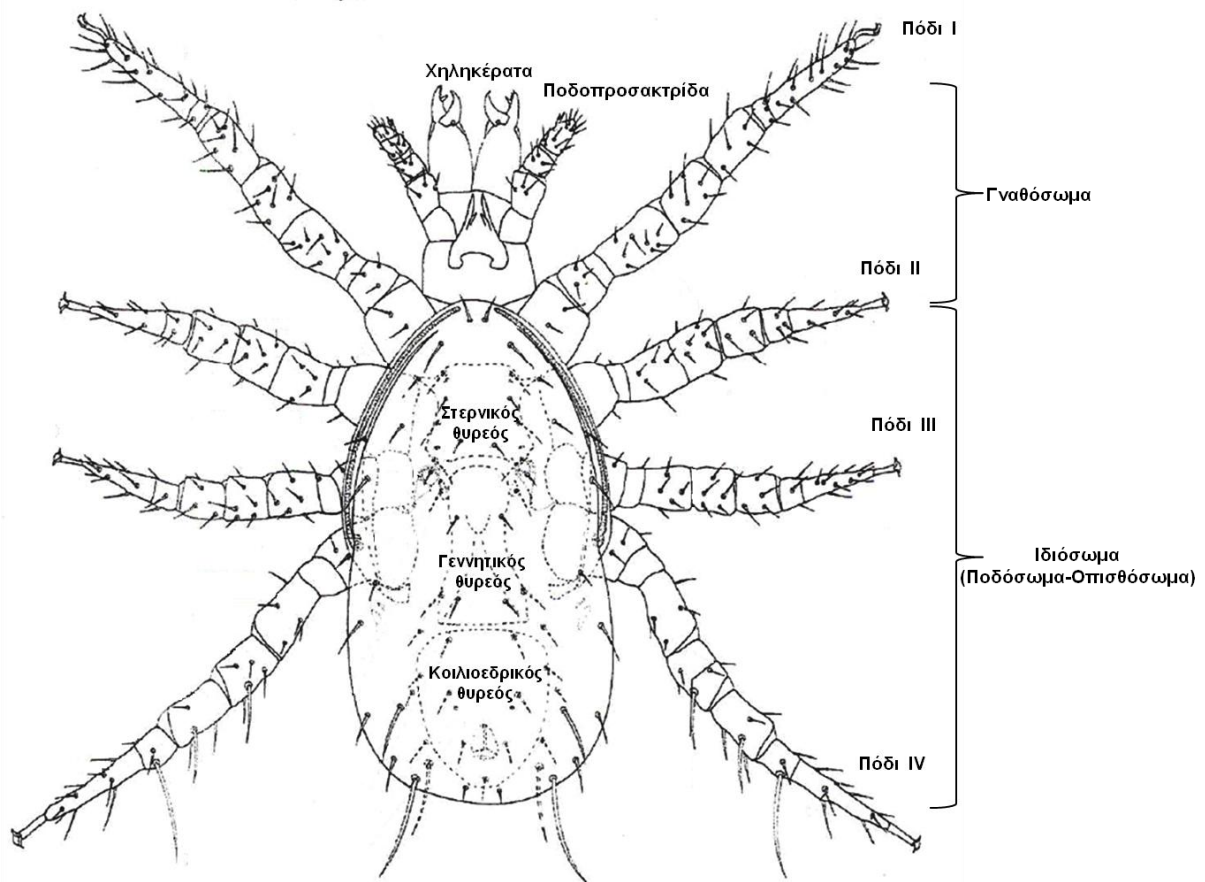
Οι παραπάνω λόγοι οδηγούν στην απαίτηση της σωστής ταξινόμησης του οργανισμού που θα εξαπολυθεί, για να συνδράμει στην προσπάθεια του παραγωγού για οικονομικά και ποιοτικά προϊόντα. Αντιλαμβάνεται, λοιπόν, κανείς πόσο σημαντικό είναι να γνωρίζει ο χρήστης – παραγωγός ότι χρησιμοποιεί το σωστό είδος ακάρεως ή εντόμου ανάλογα με τον εχθρό που έχει εμφανιστεί στην καλλιέργειά του (Okassa et al., 2012). Η λεία είναι ο βασικότερος παράγοντας που θα καθορίσει το αρπακτικό ή το παρασιτοειδές που θα επιλεγεί.

Για τον προσδιορισμό του είδους ακάρεων της οικογένειας Phytoseiidae, οι ταξινομοί βασίζονται κυρίως σε μορφολογικά χαρακτηριστικά των θηλυκών ατόμων, με τα βασικότερα να είναι η χαιτοταξία του νώτου και της κοιλίας του ιδιοσώματος, καθώς και των ποδών, το σχήμα της σπερματοθήκης, το μήκος του περιτρήματος και η μορφή των χηληκεράτων (Chant & McMurtry, 2007) (Εικόνες 8, 9). Στις περιπτώσεις που τα άτομα που έχουν συλλεχθεί είναι άρρενα ή ανήκουν σε ατελή στάδια, ο προσδιορισμός του είδους είναι πολύ δύσκολος ή αδύνατος.



Εικόνα 8: Απεικόνιση της θέσης των τριχών του νώτου (αριστερά) και της κοιλίας (δεξιά), χαρακτηριστικά για την οικογένεια Phytoseiidae (Papadoulis et al, 2009).

Το μήκος του σώματος των ενηλίκων της συγκεκριμένης οικογένειας κυμαίνεται από 200 έως 600μm, το σχήμα τους είναι συνήθως ωοειδές και το χρώμα τους ποικίλει από υπόλευκο έως καστανό. Στο πρόσθιο τμήμα του σώματος υπάρχει το γναθόσωμα με τα χηληκέρατα και τις ποδοπροσακτρίδες και το υπόλοιπο σώμα καλείται ιδιόσωμα (ποδόσωμα και οπισθόσωμα) και φέρει τους πόδες. Ο νωτιαίος θυρεός είναι χιτινισμένος λιγότερο ή περισσότερο και ανάλογα με την επιφάνειά του χαρακτηρίζεται ως λείος, ανάγλυφος, δικτυωτός ή γραμμοειδής (Παπαδούλης, 1994) (Εικόνα 9).



Εικόνα 9: Σχέδιο θήλεος αντιπροσωπευτικό της οικογένειας Phytoseiidae ύστερα από μικροσκοπικό παρασκεύασμα (Papadoulis et al., 2009).

Τα χαρακτηριστικά που χρησιμοποιήθηκαν αρχικά για τον προσδιορισμό των ειδών της οικογένειας ήταν το μήκος και το σχήμα κάποιων τριχών που φέρουν στη νωτιαία περιοχή, το σχήμα του κοιλοεδρικού θυρεού και του επιστόματος, καθώς και η παρουσία μακριών τριχών στους πόδες. Τη δεκαετία του '40 στην προσπάθεια να αποδοθούν γενικότεροι κανόνες που θα μπορούσαν να βοηθήσουν στην καλύτερη επικοινωνία των

συστηματικών, οι Sellnick (1944) και Garman (1948) πρότειναν την ονομασία των τριχών του νώτου. Στα παραπάνω προστέθηκαν το 1951 από τον Nesbitt το σχήμα των τριχών σε νώτο και κοιλία, το μήκος του περιτρήματος καθώς και ο αριθμός των οδόντων στα χηληκέρατα.

Ο χαιτοτακτικός τύπος του ιδιοσώματος χρησιμοποιήθηκε ως το πιο ολοκληρωμένο σύστημα για την αναγνώριση των ακάρεων και την ομαδοποίησή τους σε υποοικογένειες προ των γενών, τόσο από την Athias, όσο και από τον Chant το ίδιο έτος (Athias-Henriot, 1957; Chant, 1957). Κομβική για τα επόμενα έτη κρίθηκε η ονομασία των τριχών από τον Hirschmann (1957), ο οποίος με παραπλήσιο με τους προηγούμενους σύστημα χαρακτήρισε τις τρίχες με τα κεφαλαία γράμματα J, Z, S και R για το οπισθόσωμα και με τα αντίστοιχα μικρά τους, (j, z, s, και r) για το προποδόσωμα (**Εικόνα 8**).

Το 1961 τροποποιήθηκε η πρόταση του Garman για τον προσδιορισμό των γενών κι ενισχύθηκε με τους χαρακτήρες του πόδα IV (της κνήμης, του ταρσού και της επιγονατίδας), το σχήμα και χαρακτηριστικά του θώρακα, αλλά και με τον αριθμό και τη θέση των τριχών στην περιοχή του πρόσθιου νώτου (Muma, 1961). Αυτή ήταν η εικόνα μέχρι και τα τέλη του 1960, όπου η χαιτοταξία του νώτου, το σχήμα των θυρεών και η παρουσία των μακροσηρίγγων προσδιόριζε τα είδη και τα γένη της οικογένειας Phytoseiidae (Tsolakis et al., 2012).

Είναι γεγονός ότι υπάρχουν περιπτώσεις που τα κρίσιμα μορφολογικά χαρακτηριστικά δημιουργούν ερωτηματικά για το κατά πόσο χαρακτηρίζουν είδη και όχι άλλα taxa. Υπάρχουν για παράδειγμα περίπου 6% περιπτώσεις συνώνυμων ειδών που επαναπροσδιορίστηκαν με τα χρόνια, κάτι που σημαίνει ότι ο αριθμός αυτός ίσως είναι μεγαλύτερος και αυξηθεί μελλοντικά, όσο επανεξετάζονται μικροσκοπικά παρασκευάσματα ή νέα είδη βρίσκονται ανά τον κόσμο (Tixier et al. 2006, 2008a, 2011a; Okassa et al., 2011a, b). Αυτή η άποψη ενισχύεται σε περιπτώσεις νέων ειδών που όμως τα άτομα που χρησιμοποιήθηκαν ως ολότυποι και παράτυποι ήταν λίγα. Επιπλέον, δεδομένου του ότι τα άτομα της οικογένειας Phytoseiidae εντοπίζονται σε όλο τον κόσμο και του ότι η βιβλιογραφία για κάποια νέα είδη πιθανώς να μην είναι σε κοινή γλώσσα, π.χ. Ρωσικά, είναι πιθανό ήδη υπάρχοντα και αναγνωρισμένα είδη να έχουν καταγραφεί ξανά με άλλη ονομασία (Hernandes et al., 2011).

Όλα τα παραπάνω επιλύονται με το να σχεδιάζονται τα νέα είδη, αλλά και να προσδιορίζονται χαρακτηριστικά σε τουλάχιστον 10 άτομα του νέου είδους, χωρίς όμως πάντα τα παραπάνω να υλοποιούνται μερικώς ή εξολοκλήρου. Παράλληλα, γίνονται προσπάθειες και μάλιστα έχουν υλοποιηθεί σε κάποιο βαθμό, όπως έχει ήδη αναφερθεί σε

προηγούμενο κεφάλαιο, ώστε να δομηθούν βάσεις δεδομένων, όπου θα περιγράφοντα όλα τα γνωστά είδη με αναλυτικές πληροφορίες ή και φωτογραφίες των κύριων μορφολογικών χαρακτηριστικών τους.

Στοιχεία για τις κλείδες που χρησιμοποιούνται από τους συστηματικούς ώστε να προσδιορίσουν σε ποια υποοικογένεια ανήκει ένα άτομο, αλλά και πληροφορίες για τα βασικά χαρακτηριστικά κάποιων φυλών και γενών φαίνονται στην **Εικόνα 10**, όπως περιγράφονται από τους Papadoulis et al., (2009).

Key to the subfamilies in the family Phytoseiidae

1. Setae z3 and s6 absent (Fig. 306).....
.....**Amblyseiinae** Muma
Either or both of setae z3 and s6 present (Figs. 671)....
.....2
2. Setae Z1, S2, S4 and S5 absent (Fig. 575).....
.....**Phytoseiinae** Berlese
At least one of setae Z1, S2, S4 or S5 present (Fig. 656)
.....**Typhlodrominae** Wainstein

Key to the genera in the tribe Typhlodromini

1. Seta Z1 absent (Fig. 688).....**Typhlodromus** Scheuten
Seta Z1 present (Fig. 660).....2
2. Setae on dorsal shield mostly thick, elongated, thorn-like (Fig. 651); peritreme striated (Fig. 655); spermatheca with calyx elongate, tubular (Fig. 653); ventrianal shield of female reduced, with only one pair of preanal setae (Fig. 652).....
.....**Typhloseiulus** Chant and McMurtry
Setae on dorsal shield slender, setiform (Fig. 660); peritreme punctate; ventrianal shield of female not reduced, with 3 or 4 pairs of preanal setae (Fig. 661).....**Neoseiulella** Muma

Key to the tribes in the subfamily Typhlodrominae

1. Seta s6 absent (Fig. 604).....
.....**Chanteiini** Chant and McMurtry
Seta s6 present (Fig. 623).....2
2. Seta z3 absent (Fig. 623).....
.....**Galendromimini** Chant and McMurtry
Seta z3 present (Fig. 625) (except for *C. pilosus*: note comments below).....3
3. Seta z6 present (Fig. 635).....
.....**Paraseiulini** Wainstein
Seta z6 absent (Fig. 671).....4
4. Most species with setae S4 and JV4 present (Fig. 688) (note that *T. (A.) arizonicus* has these 2 setae absent (Fig. 665) and 3 species have seta S4 present and seta JV4 absent: note comments below).....
.....**Typhlodromini** Wainstein
Setae S4 and JV4 absent (Fig. 705).....5
5. Seta z4 inserted mesad of setae z2 and s4 (Fig. 705).....
.....**Typhloseiopsini** Chant and McMurtry
Seta z4 inserted in line with setae z2 and s4 (Fig. 768)
.....**Metaseiulini** Chant and McMurtry

Εικόνα 10: Κλειδιά που οδηγούν από την Οικογένεια Phytoseiidae στο γένος *Typhloseiulus* (Papadoulis et al., 2009)

Το γένος *Typhloseiulus*

Το γένος *Typhloseiulus* ανήκει με τη σειρά στην φυλή Typhlodromini, την υποοικογένεια Typhlodrominae και την οικογένεια Phytoseiidae. Για τον προσδιορισμό των 10 ειδών που έχουν καταγραφεί παγκοσμίως χρησιμοποιούνται κυρίως τα εξής μορφολογικά χαρακτηριστικά:

- Αριθμός τριχών στην επιγονατίδα του δεύτερου πόδα (genu II)
- Μήκος και πάχος των τριχών που υπάρχουν στην νωτιαία περιοχή του σώματος

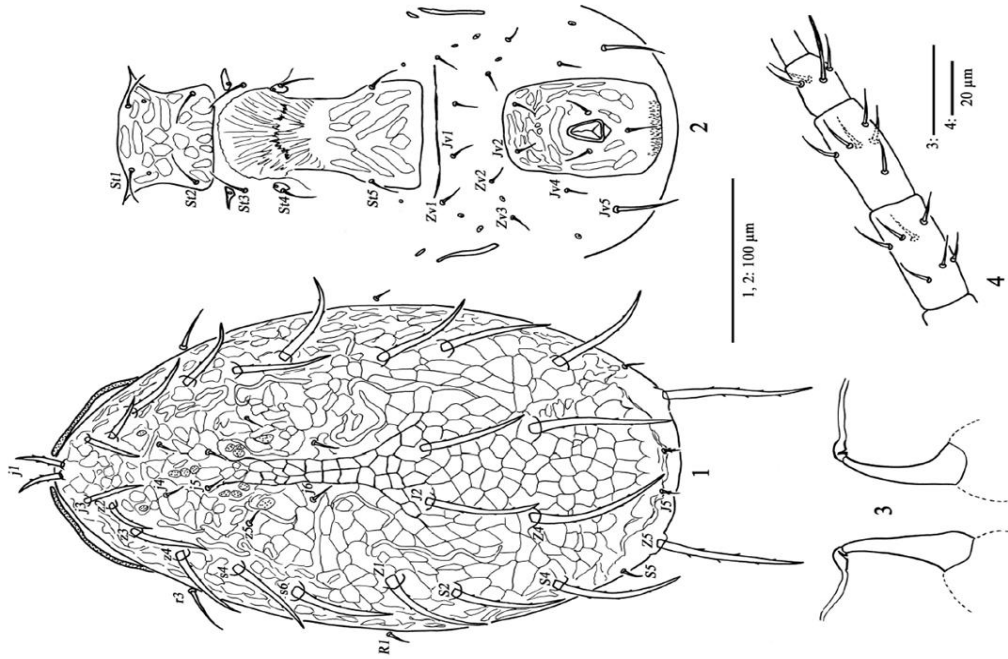
Τα βασικά χαρακτηριστικά φαίνονται στην **Εικόνα 11**, όπως έχουν σχεδιαστεί από δύο ομάδες ερευνητών. Σε αυτές απεικονίζονται τα προαναφερθέντα “κρίσιμα” χαρακτηριστικά στα διάφορα μέρη του σώματος των ακάρεων όπως και τα χηληκέρατα, η σπερματοθήκη κλπ.

Το θηλυκό άτομο φέρει 25 συνολικά τρίχες στο ιδιόσωμα με τον χαιτοτακτικό του τύπο να προσδιορίζεται ως 12A:9B/JV-3:ZV (r3, R1 εκτός θυρεού). Ο νωτιαίος θυρεός τους είναι δικτυωτός κι έντονα δικτυωτός, γεγονός που πολλές φορές οδηγεί στην εφαρμογή τροποποιημένων πρωτοκόλλων κατά την παρασκευή παρασκευασμάτων ώστε να είναι εφικτή η αποκάλυψη όλων των μορφολογικών χαρακτηριστικών και η ορθή αναγνώριση. Ο κοιλιοεδρικός θυρεός του θήλεος είναι μικρός και ορθογώνιος με ένα ζεύγος προεδρικών τριχών (JV2). Συνήθως, ο κάλυκας της σπερματοθήκης είναι επιμηκυσμένος, σωληνοειδής και διευρύνεται στο επάκριο τμήμα του.

Το ιδιόσωμα του άρρενος έχει χαιτοτακτικό τύπο τον 12A:9B/JV-3:ZV-3 (r3, R1 εντός θυρεού) και ο κοιλιοεδρικός θυρεός του φέρει τέσσερα ζεύγη προεδρικών τριχών, τις JV1, JV2, ZV1 και ZV2. Οι προεδρικοί πόροι απουσιάζουν. Το χηλήκερας φέρει έναν οδόντα στο κινητό σκέλος του, ο οποίος μπορεί να είναι απλός ή διφυής (*T. erymanthii*), ενώ το σταθερό του σκέλος έχει λίγους οδόντες. Για τους πόδες, η επιγονατίδα II φέρει 8 ή 9 τρίχες (*T. rodopiensis*), και στην επιγονατίδα του τρίτου πόδα (III) φύονται 7 τρίχες σε όλα τα είδη.

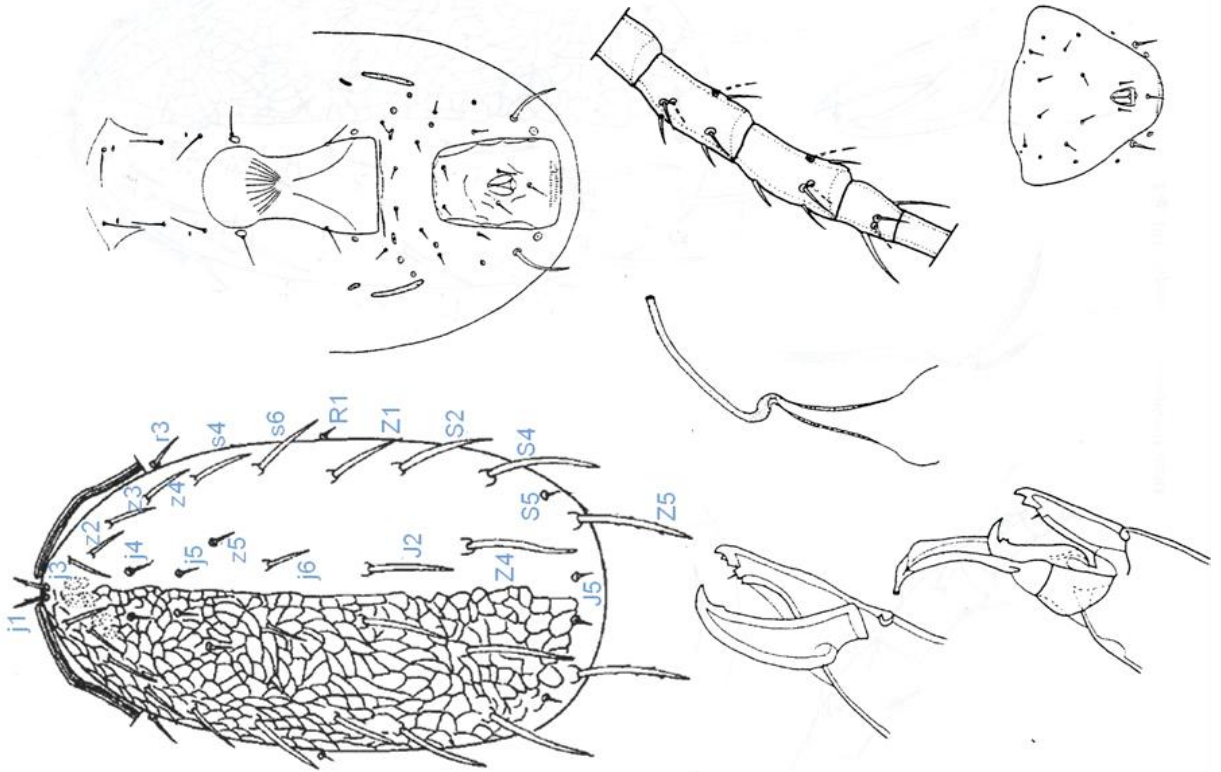
Έχει ήδη αναφερθεί ότι στην Ελλάδα έχουν καταγραφεί τα 8 από 10 είδη. Από αυτά το είδος *T. eleonora* κατεγράφη μόλις το 2010 στην περιοχή της Κρήτης σε ξενιστή του είδους *Q. ilex* (Stathakis & Papadoulis, 2012). Οι βασικότερες κλειδες φαίνονται στην **Εικόνα 12**.

β



Figs. 1-4. *Typhloseiulus peculiaris* (Kolodochka), Female - 1. Dorsal view of idiosoma, 2. Ventral view of idiosoma, 3. Spermatotheca, 4. Genua, tibia and basitarsus IV.

α



Εικόνα 11: Το είδος *Typhloseiulus peculiaris* όπως φαίνεται ύστερα από σχεδίαση μικροσκοπικού παρασκευάσματος από τους α) Paradoulis et al., 2009 και β) Faraji et al., 2007. Φαίνεται η θέση των τριχών που αποτελούν διαγνωστικά χαρακτηριστικά του είδους.

β

Key to the species of *Typhloseiulus* of World (female)

1. Seta *S*₅ conspicuously longer than *J*₅.....2
- Seta *S*₅ short, subequal to *J*₅.....4
2. Seta *j*₆ six times longer than *j*₄.....
- Seta *j*₆ less than twice as long as *j*₄.....3
3. Seta *J*₂ four times longer than *j*₆.....
- Seta *J*₂ less than twice as long as *j*₆.....
- Seta *J*₂ less than twice as long as *j*₆.....
4. Seta *j*₆ more than half distance between insertions of *j*₆ and *J*₂.....5
- Seta *j*₆ less than half distance between insertions of *j*₆ and *J*₂.....6
5. Seta *j*₆ about four times longer than *j*₅.....
- Seta *j*₆ about two times longer than *j*₅.....
6. Seta *J*₂ and *j*₆ subequal.....7
- Seta *J*₂ conspicuously longer than *j*₆.....8
7. Seta *S*₂ about two times longer than *J*₂.....
- Seta *S*₂ about nine times longer than *J*₂.....
8. Genu II with 9 setae.....
- Genu II with 8 setae.....9
9. Seta *J*₂ more than four times as long as *j*₆; *j*₆ 12-13 long.....
- Seta *J*₂ about twice as long as *j*₆; *j*₆ 24 long.....
-*simplex* (Chant)

α

Key to species of the genus *Typhloseiulus* in Greece and Cyprus based on adult females

1. Genu II with 9 setae.....
- Genu II with 8 setae.....
2. Setae *j*₄, *j*₅, *j*₆, *J*₂ and *z*₅ short and subequal in length.....
-*T. calabriae* (Ragusa and Swirski)
3. Seta *J*₂ (and *j*₆ in some species) conspicuously longer than *j*₄, *j*₅, *z*₅.....3
-*T. erymanthii* (Papadoulis and Emmanouel)
4. Seta *S*₅ conspicuously shorter than *j*₃.....4
5. Seta *j*₆ long and subequal to *J*₂; setae *j*₃, *j*₅ and *z*₅ subequal on length and thickness to *z*₂.....
-*T. carmonae* (Chant and Yoshida-Shaul)
6. Seta *j*₆ conspicuously shorter than *J*₂; setae *j*₄, *j*₅ and *z*₅ conspicuously shorter and thinner than *z*₂.....5
7. Seta *J*₂ more than 6 times longer than *j*₆ and reaching the base of *Z*₄.....
-*T. peculiaris* (Kolodochka)
8. Seta *J*₂ at most twice as long as *j*₆ and not reaching the base of *Z*₄.....6
-*T. simplex* (Chant)
9. Seta *J*₂ twice as long as *j*₆.....
-*T. simplex* (Chant)
10. Seta *J*₂ subequal in length to *j*₆ (*J*₂=5/4 *j*₆).....
-*T. eliahuswirsikii* (Ragusa Di Chiara)

Εικόνα 12: Κλειδές που χρησιμοποιούνται στην κλασική ταξινόμηση για τον προσδιορισμό ειδών του γένους *Typhloseiulus* σύμφωνα με τους α) Papadoulis et al. 2009 και β) Faraji et al. 2007.

Παρόλο που η οικογένεια Phytoseiidae φιλοξενεί πολλά είδη τα οποία έχουν χρησιμοποιηθεί κατά καιρούς ως αρπακτικοί και κρίσιμοι παράγοντες σε βιολογικά και ολοκληρωμένα συστήματα αντιμετώπισης εχθρών καλλιεργειών, οι μοριακές τεχνικές έχουν αρχίσει να βρίσκουν εφαρμογή τα τελευταία χρόνια. Ενώ υπάρχουν πολλά προσδιορισμένα και προσδιοριζόμενα είδη και πλέον υπάρχει η τάση για τη διερεύνηση των φαινοτυπικών και βιολογικών χαρακτηριστικών τους, υπάρχουν περιπτώσεις όπου δεν είναι βέβαιη η ταξινόμησή τους (*Typhlodromus* group). Με τις μοριακές τεχνικές να δίνουν περισσότερες πληροφορίες για την ταξινόμηση, τη φυλογένεση και τον προσδιορισμό των ειδών, φαίνεται ότι η κλασική συστηματική έχει έναν δυνατό σύμμαχο (Bowman & Hoy, 2012; Janzen et al., 2012).

ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

Στα πλαίσια της μελέτης και της συστηματικής έχουν χρησιμοποιηθεί και εξελιχθεί τα τελευταία χρόνια τεχνικές που σχετίζονται με το γενετικό υλικό. Αυτές στοχεύουν συνήθως στην ανάλυση του γενετικού υλικού, αλλά πολλές φορές και σε παράγωγά του, όπως πρωτεΐνες κι ένζυμα. Οι κυριότερες διαδικασίες είναι η απομόνωση του γενετικού υλικού, η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης, η ηλεκτροφόρηση με διάφορες παραπλήσιες τεχνικές οι οποίες πλέον τείνουν να αντικατασταθούν από τον ακριβή προσδιορισμό μίας συγκεκριμένης ανά περίπτωση γενετικής αλληλουχίας (SNP's, whole genome sequencing, standard sequencing κλπ).

Απομόνωση DNA

Κατά την απομόνωση του γενετικού υλικού γίνεται η αρχή για μια σειρά μεθόδων που ακολουθούν και που μπορούν να παρέχουν σημαντικές και ιδιαίτερα κατατοπιστικές πληροφορίες στον τομέα της βιο-οικολογίας, αλλά και της συστηματικής ταξινόμησης (Whitlock et al., 2008; Beltra et al., 2012). Ανάλογα με τον οργανισμό που θα επιλεγεί για ανάλυση, η διαδικασία της απομόνωσης DNA μπορεί να είναι εύκολη ή και πολύ δύσκολη. Όταν για παράδειγμα πρόκειται για φυτικό δείγμα, η δυσκολία έγκειται στο γεγονός ότι είναι περίπλοκο το να διαρρηχθεί το παχύ και δυνατό κυτταρικό τοίχωμα, ώστε να εξέλθει το γενετικό υλικό και οι υπόλοιπες ουσίες που βρίσκονται στο εσωτερικό του κυττάρων (Dentinger et al., 2010). Για τους ζωικούς οργανισμούς τα πράγματα είναι πιο εύκολα, με εξαίρεση κάποιων περιπτώσεων όπου η εφαρμογή γίνεται σε πολύ μικρούς οργανισμούς, οι οποίοι ίσα που μπορούν να διακριθούν με γυμνό οφθαλμό (Bleidorn et al., 2002; Castalanelli et al., 2010; Porco et al., 2010; Chen et al., 2010; Casquet et al., 2011).

Στα ακάρεα, η απομόνωση του DNA πραγματοποιείται ως αρχικό στάδιο μίας συνολικής διαδικασίας που στόχο μπορεί να έχει τη μελέτη του ακάρεως αυτού καθατού ή ακόμα και των οργανισμών που μπορεί να συμβιούν με αυτό (Navajas & Navia, 2010). Κάποιες τέτοιες περιπτώσεις είναι τα συμβιωτικά βακτήρια, τα οποία μάλιστα έχουν βρεθεί να σχετίζονται με στείρωση στους οργανισμούς που ανιχνεύονται (Tsagkarakou et al., 2012), όπως συνέβη με το *Metaseiulus (=Galendomus) occidentalis* (Nesbitt) (Acari: Phytoseiidae) και τα *Wolbachia* και *Cardinium* (Becnel et al., 2002; Hoy & Jeyaprakash, 2005; Wu & Hoy, 2012). Αυτός είναι και ο βασικότερος λόγος που απομονώνεται ολικό

DNA από τα ακάρεα και το επόμενο στάδιο και πρωτόκολλο καθορίζεται από τον προς εξέταση οργανισμό (Cruickshank et al., 2001).

Γενικά, υπήρχε η συνηθισμένη τεχνική του να απομονώνεται γενετικό υλικό από 5-10 άτομα ταυτόχρονα, τα οποία αποτελούσαν το δείγμα (Anderson & Trueman, 2000; Jeyaprakash & Hoy, 2004; Tixier et al., 2008b; Hinomoto et al., 2010; Tixier et al., 2012b; Wu & Hoy, 2012). Έτσι 5-10 ακάρεα τα οποία προέρχονταν από την ίδια εκτροφή ή καλλιέργεια ή φυτό, ομογενοποιούνταν ώστε να δώσουν ένα δείγμα και η απομόνωση συνεχιζόταν με το υλικό, το οποίο είχε εξέλθει από τα κύτταρα και των 10 ακάρεων. Σε αυτή την περίπτωση όλες οι πληροφορίες αφορούσαν και τα 10 ακάρεα με αποτέλεσμα να μην είναι δυνατή η ανάλυση των αποτελεσμάτων που απόρρεαν από αυτήν την απομόνωση (Cruickshank, 2002). Το βασικότερο πρόβλημα που αντιμετωπίζεται στην περίπτωση των ακάρεων αλλά και όλων των μικρότερων οργανισμών είναι το μέγεθός τους, το οποίο όντας μικρό δεν επιτρέπει τον εύκολο χειρισμό τους ώστε να αποδοθεί ικανοποιητική ποιότητα και ποσότητα DNA για περαιτέρω ανάλυση (Ivanova et al., 2006; Konakandla et al., 2006; Jeyaprakash & Hoy, 2007; 2009; Dermauw et al., 2010; Li et al., 2010).

Υπήρξαν προσπάθειες κατά τις οποίες πραγματοποιήθηκε και συγκριτική μελέτη διαφόρων πρωτοκόλλων που εφαρμόστηκαν σε ένα άτομο ακάρεως, του *Dermanyssus gallinae* (Acari: Dermanyssidae), ακολουθώντας είτε τις παραδοσιακές τεχνικές απομόνωσης (χρήση χλωροφορμίου-ισοαμυλικής αλκοόλης, Chelex ή CTAB κλπ), είτε την χρήση κάποιου λιγότερο χρονοβόρου Kit του εμπορίου (Halos et al., 2004; Desloire et al., 2006; Konakandla et al., 2006). Παρόλο που ξεκίνησαν σχετικά νωρίς και διήρκησαν αρκετά, φαίνεται ότι υπήρξαν αρκετές δυσκολίες ως προς την εφαρμογή τους και παράλληλα τα αποτελέσματα δεν ήταν ικανοποιητικά, ώστε να επιτρέψουν την καλή ποιότητα και συγκέντρωση στο απομονωμένο DNA. Έτσι, για μεγάλο διάστημα ήταν συνήθης τεχνική η χρήση περισσότερων του ενός ατόμου, ώστε να είναι δυνατή η συνέχιση της διαδικασίας.

Οι μοριακές τεχνικές επετεύχθησαν τελικά, ώστε το DNA να απομονώνεται από ένα μεμονωμένο άκαρι, ξεκινώντας από ακάρεα μεγαλύτερου μεγέθους, όπως είναι τα ακάρεα της οικογένειας Oribatidae και τα *Ixodes ricinus*, *Demodex folliculorum*, *Demodex brevis*, *Demodex canis* και *Varroa destructor* (Anderson & Trueman, 2000; Hill & Gutierrez, 2003; Halos et al., 2004; Maraum et al., 2004; Ota et al., 2011; Maggi et al., 2012; Zhao et al., 2012). Έτσι, ενώ προηγουμένως δέκα άτομα έδιναν ένα στοιχείο, τώρα τα δέκα άτομα δίνουν 10 στοιχεία, ένα για το κάθε άτομο. Έτσι, είναι πολύ πιο αποτελεσματική η επεξεργασία των δεδομένων που προκύπτουν ώστε να κατασκευαστεί ένα φυλογενετικό δένδρο, να διερευνηθεί η ενδοπληθυσμιακή παραλλακτικότητα ενός πληθυσμού, να εξεταστεί η ύπαρξη ενός ή

περισσότερων διαφορετικών ειδών οργανισμών, ακόμα και να προσδιοριστεί με πιο διευρυμένα κριτήρια η προσβολή των αναλυθέντων ατόμων από άλλους μικροοργανισμούς.

Η τεχνογνωσία και η προσπάθεια αυτή μεταφέρθηκε και στα ακάρεα της οικογένειας Phytoseiidae, τα οποία ενδιέφεραν τους ερευνητές, κυρίως για τη συμπεριφορά τους ως αρπακτικοί παράγοντες, στοχεύοντας κυρίως στη φυλογενετική και βιογεωγραφική ανάλυση των πληθυσμών στα διάφορα είδη, αλλά και τον ορθό προσδιορισμό των ειδών. Έτσι αρκετές μελέτες ασχολήθηκαν με τον ορθό προσδιορισμό των ειδών (Jeyaprakash & Hoy, 2002; 2004; Ben-David et al., 2007; Jeyaprakash & Hoy, 2007; 2009; Hoy, 2009; Espeland et al., 2010; Kanouh et al., 2010a; Hinomoto et al., 2011; Okassa et al., 2011a; 2011b; Wu & Hoy, 2012).

Ακόμα, για δείγματα τα οποία έχουν διατηρηθεί για πολύ μεγάλο χρονικό διάστημα και φυλλάσσονται σε μουσεία, κρίνεται απαραίτητο να μην υπάρξει η παραμικρή αλλοίωση των χαρακτηριστικών τους. Σε αυτές τις περιπτώσεις, που δεν είναι δυνατή η επέμβαση με χημικές ουσίες (π.χ. για τη δημιουργία παρασκευασμάτων), η λύση δίνεται με τις μοριακές τεχνικές και τον προσδιορισμό του είδους με απομόνωση DNA, η οποία όμως δεν θα καταστρέψει το πολύτιμο δείγμα (Gilbert et al., 2007; Rowley et al., 2007; Paquin & Vink, 2009; Thomsen et al., 2009; Hofreiter, 2012; Rivasseau et al., 2014; Kim et al., 2013).

Ισπανοί ερευνητές κατάφεραν εκτός από την μεμονωμένη απομόνωση, να μελετήσουν ακριβώς το ίδιο άτομο με ηλεκτρονική μικροσκοπία (Valdecasas & Abad, 2011). Με αυτόν τον τρόπο υπάρχει πλήρης ταύτιση των αποτελεσμάτων ως προς το άτομο που εξετάζεται, καθώς εφαρμόζεται παράλληλα μορφολογική παρατήρηση του οργανισμού από τον οποίο έχει εξαχθεί ή θα εξαχθεί το γενετικό υλικό. Η προσπάθεια αυτή είχε ως μοντέλο υδρόβια ακάρεα (Acari: Hydrachnidia) και φαίνεται ότι ο εξοπλισμός που απαιτείται για την μορφολογική εξέταση έχει αυξημένο κόστος και κρίνεται ιδιαίτερα σπάνιος.

Το 2010 πραγματοποιήθηκε μία αντίστοιχη προσπάθεια ώστε το ίδιο άτομο από το οποίο εξάγεται υλικό για να γίνει η απομόνωση DNA, χρησιμοποιείται για τη δημιουργία παρασκευάσματος από το οποίο να γίνει προσδιορισμός του είδους του με βάση την κλασική Συστηματική Ταξινόμηση και τη χρήση κλειδών (Jeyaprakash & Hoy, 2010a). Αντίστοιχη προσπάθεια αλλά με τροποποιημένο πρωτόκολλο πραγματοποιήθηκε δύο χρόνια αργότερα από τους Tsolakis et al. (2012). Στόχος της μελέτης αυτής ήταν να διερευνηθεί το κατά πόσο τα ακάρεα που βάσει των μορφολογικών χαρακτηριστικών τους έχουν ταξινομηθεί να ανήκουν σε ένα γένος, το *Neoseiulus* (Acari: Phytoseiidae), ταξινομούνται στο ίδιο γένος αν αναλυθούν γενετικά και προσδιοριστούν με μοριακούς δείκτες. Τις περισσότερες φορές τα ακάρεα που είχαν υποστεί κάποια “μοριακή επεξεργασία” δεν έδιναν καλά παρασκευάσματα

και ήταν αδύνατη η παρατήρηση κάποιων χαρακτηριστικών ή αδύνατος ο σχεδιασμός τους (Ramadan et al., 2009; Tsolakis et al., 2012).

Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης

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

Ο λόγος που εφαρμόστηκε και διαδόθηκε η PCR ήταν ο συνδυασμός απλότητας, ακρίβειας, ταχύτητας και απουσίας ζωντανού κυττάρου. Η αρχική έκδοση των Kleppe et al. (1971) συμπεριλάμβανε ζωντανό κύτταρο, όμως αργότερα (Chien et al., 1976) και με την ανακάλυψη της Taq-πολυμεράσης (Taq-polymerase), η οποία απομονώθηκε από θερμοφιλά βακτήρια (*Thermus aquaticus*), η διαδικασία επιταχύνθηκε κατά πολύ. Η πολυμεράση αυτή αντέχει σε υψηλές θερμοκρασίες (50-90°C) επιτρέποντας την αποδιάταξη των δίκλωνων αλυσίδων και χρησιμοποιώντας νουκλεοτίδια (αδενίνη, θυμίνη, γουανίνη, κυτοσίνη - dNTPs) συνθέτει ταχύτατα γονιδιακές αλληλουχίες (Mullis & Faloona, 1987). Η ανακάλυψη αυτή έδωσε στον Mullis το βραβείο Nobel το 1993. Η χρήση της μεθόδου δεν έμεινε σε ερευνητικό επίπεδο, αλλά γρήγορα βρήκε εφαρμογή στη βιοτεχνολογία, στην ιατρική για τη διάγνωση ασθενειών όπως η αναιμία, στην ιατροδικαστική και τη δικαιοσύνη για τη διαλεύκανση υποθέσεων, στην αρχαιολογία για τη μελέτη αρχαϊκού DNA, αλλά και στην περίπτωση ειδών υπό εξαφάνιση. Αποτελεί αρωγό σε κάθε περίπτωση που το γενετικό υλικό δεν επαρκεί για να μελετηθεί.

Η PCR είναι μία διαδικασία η οποία μπορεί να δώσει πληροφορίες συνδυαζόμενη ή μη με άλλες μεθόδους με τρεις διαφορετικούς τρόπους:

- Τον άμεσο προσδιορισμό της γενετικής αλληλουχίας (sequencing),
- Την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της (συμβατική PCR και ηλεκτροφόρηση),
- Την εφαρμογή της σε πραγματικό χρόνο (Real time PCR ή qt-PCR) (Jeyaprakash & Hoy, 2010b)

Σε κάθε περίπτωση για την εξαγωγή αποτελεσμάτων επιλέγονται τόσο οι κατάλληλοι μοριακοί δείκτες όσο και η κατάλληλη μέθοδος που θα ακολουθηθεί. Και οι δύο αυτοί παράγοντες, δείκτες και μέθοδος, πρέπει να καθορίζονται με κριτήριο τον οργανισμό που αναλύεται και το είδος της ανάλυσης που επιδιώκεται. Με βάση την παραπάνω διαφοροποίηση, οι μοριακοί δείκτες διακρίνονται σε **κυρίαρχους δείκτες** (dominant markers) και **συγκυρίαρχους δείκτες** (co-dominant markers), οι οποίοι συμμετέχουν σε διαφορετικές μεθόδους.

Οι **κυρίαρχοι δείκτες** βρίσκουν εφαρμογή στις μεθόδους όπου αναγνωρίζεται μόνο ένα αλληλόμορφο σε ένα γονιδιακό τμήμα και συγκεκριμένα στη:

- μέθοδο RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA - Polymerase Chain Reaction) και
- μέθοδο PCR-AFLPs (Polymerase Chain Reaction - Amplified Fragment Length Polymorphisms).

Στην περίπτωση της RAPD-PCR χρησιμοποιούνται τυχαίοι εκκινητές (random primers), ανεξάρτητοι από τον οργανισμό που χρησιμοποιείται, ώστε να ενισχύσουν το DNA (Black et al., 1992). Στο παρελθόν έχει χρησιμοποιηθεί για τη χαρτογράφηση γονιδιωμάτων. Επιπλέον, μπορεί να δώσει πληροφορίες για τον πολυμορφισμό και τις διαφορές οργανισμών κι εντόμων με γεωργική υγειονομική ή άλλη σημασία (Edwards et al., 1993; 1997). Στα πλεονεκτήματα συμπεριλαμβάνονται το ιδιαίτερα χαμηλό κόστος, η ταχύτητα λήψης αποτελεσμάτων, η ευαισθησία της ως τεχνική και η μεγάλη ποικιλομορφία που μπορεί να προσδιορίσει (Wilkerson et al., 1993). Όμως, η απουσία επανάληψης της μεθόδου και η πιθανή αλλοίωση λόγω εξωτερικών παραγόντων (περιβάλλον) αποτρέπουν τους ερευνητές να τη χρησιμοποιήσουν, όταν μάλιστα υπάρχουν άλλες τεχνικές πιο σύγχρονες που έχουν λύσει αυτά τα προβλήματα.

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

Έχει ανακαλυφθεί ότι τα βακτήρια έχουν αναπτύξει έναν αμυντικό μηχανισμό για να απορρίπτουν την είσοδο και ενσωμάτωση ξένου γενετικού υλικού στον οργανισμό τους.

Σύμφωνα με αυτόν, υπάρχουν κάποια ένζυμα που ονομάζονται περιοριστικές ενδονουκλεάσες ή ένζυμα περιορισμού και έχουν την ικανότητα να αναγνωρίζουν και να “κόβουν” συγκεκριμένες αλληλουχίες βάσεων. Με αυτό τον τρόπο, οποιοδήποτε ξένο γενετικό υλικό βρεθεί στην περιοχή δράσης τους, το αχρηστεύουν αποκόπτοντάς το. Το μήκος των αλληλουχιών που αναγνωρίζουν δεν ξεπερνά τα 12 νουκλεοτίδια, αλλά συνήθως είναι 5-6.

Εκμεταλλεόμενοι την ιδιότητα αυτή οι επιστήμονες ξεκίνησαν να χρησιμοποιούν την περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI, η οποία απομονώθηκε από το κοσμοπολίτικο βακτήριο *Escherichia coli* και αφού αναγνωρίσει την αλληλουχία GAATTC την κόβει μεταξύ G-A. Χρησιμοποιήθηκε πολύ στην τεχνολογία του ανασυνδυσμένου DNA και σήμερα έχουν μελετηθεί περισσότερα από 3000 τέτοια ένζυμα, ενώ περίπου 600 είναι διαθέσιμα στο εμπόριο.

Κατά τη μέθοδο αυτή δημιουργούνται περισσότερα τμήματα γονιδιακών αλληλουχιών από το αρχικό, τα οποία αν βρεθούν σε κάποιο ηλεκτρικό πεδίο λόγω του αρνητικού φορτίου που φέρουν θα αρχίσουν να κινούνται. Πραγματοποιείται σε τρία στάδια: εφαρμογή περιοριστικών ενζύμων και σύνδεση με υποδοχείς νουκλεοτιδίων, επιλογή και ενίσχυση των θραυσμάτων, ηλεκτροφόρηση και παρατήρησή τους σε πήγμα (gel). Τελικά, καταγράφεται ο αριθμός των θραυσμάτων και των ζωνών που αποκαλύφθηκαν κατά την ηλεκτροφόρηση.

Οι **συγκυρίαρχοι δείκτες** βρίσκουν εφαρμογή στις μεθόδους όπου αναγνωρίζονται όλα τα αλληλόμορφα που υπάρχουν σε ένα συγκεκριμένο γονιδιακό τμήμα και βρίσκουν εφαρμογή στις μεθόδους:

- Ηλεκτροφορητική ανάλυση πρωτεϊνών (Allozymes-Isoenzymes)
- PCR-RFLPs (Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphisms)
- Ανάγνωση γονιδιακών αλληλουχιών (DNA sequencing)
- Μεμονωμένοι πολυμορφισμοί νουκλεοτιδίων (SNPs)
- Μικροδορυφορικό DNA (Microsatellites)

Οι πρωτεΐνες αποτελούν προϊόντα έκφρασης του γενετικού υλικού των οργανισμών και είναι γνωστό ότι ένα γονίδιο συνθέτει μία πολυπεπτιδική αλυσίδα. Επομένως, η διερεύνησή τους θα μπορούσε να δώσει πληροφορίες για το αντίστοιχο DNA. Στα πλαίσια αυτής της λογικής πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση ενζύμων (ηλεκτροφορητική ανάλυση

πρωτεϊνών), ως μέθοδος διαχωρισμού. Οι πληροφορίες που συλλέγονται ανάγονται στο επίπεδο αλληλομόρφων γονιδίων και ερμηνεύονται με μία έμμεση μέθοδο. Με αυτόν τον τρόπο διαπιστώνεται η ύπαρξη μεταλλαγών, η παραλλακτικότητα ή η συγγένεια οργανισμών, η εξέλιξη των ειδών κλπ (Frey et al., 2013).

Στην ηλεκτροφόρηση συμμετέχουν συνήθως ισοένζυμα, δηλαδή διαφορετικές μορφές ενός ενζύμου με όμοιες ιδιότητες, αλλά διαφορετικό ηλεκτρικό φορτίο. Επομένως, εάν βρεθούν σε ηλεκτρομαγνητικό πεδίο και εφαρμοστεί πάνω τους ηλεκτρική δύναμη θα αποκτήσουν διαφορετική ταχύτητα. Έτσι, στο τέλος της ηλεκτροφόρησης τα διαφορετικά ένζυμα βρίσκονται σε διαφορετική θέση, δηλώνοντας τη διαφορετικότητα των αλληλομόρφων των γονιδίων απ' όπου προήλθαν. Οι διαφορές τους μπορεί να οφείλονται σε πολλά αίτια, όπως επίδραση περιβάλλοντος, γενετική ποικιλότητα, διαφοροποιήσεις κατά τη διαδικασία της έκφρασης κλπ, γεγονός που καθιστά τη μέθοδο αυτή όχι ιδιαίτερα αξιόπιστη αν επιδιώκεται η σύγκριση οργανισμών σε επίπεδο είδους. Στα πλεονεκτήματα αναφέρονται η ταχύτητα της μεθόδου και το γεγονός ότι μπορεί να εφαρμοστεί ταυτόχρονα σε πολλά ενζυμικά συστήματα με χαμηλό κόστος (Sambrook & Russel, 2001).

Αρκετά σημεία της μεθόδου PCR-RFLPs είναι κοινά με την PCR-AFLPs. Και πάλι χρησιμοποιείται ηλεκτροφόρηση τμημάτων γονιδίων που έχουν πολλαπλασιαστεί με PCR κι έχουν διαχωριστεί με περιοριστικά ένζυμα. Η βασική διαφορά με την πρώτη εντοπίζεται στο ότι εδώ εστιάζει στο μέγεθος των θραυσμάτων, την ταχύτητα που αποκτούν και το σημείο που θα βρεθούν με το τέλος της διαδικασίας της ηλεκτροφόρησης. Επομένως, υπάρχει ένα αντικειμενικό κριτήριο για να γίνουν οι επιθυμητές συγκρίσεις και συζητήσεις. Αποτέλεσε μία από τις πρώτες μεθόδους ανάλυσης DNA και χρησιμοποιείται ακόμα και σήμερα λόγω της ακρίβειας και της ταχύτητας στις πληροφορίες που δίνει και την απλότητα ως προς την εφαρμογή (Margaritopoulos et al., 2007).

Οι μεμονωμένοι πολυμορφισμοί νουκλεοτιδίων (Singlenucleotide polymorphisms-SNPs) είναι αλλαγές που έχουν προκληθεί για διάφορους λόγους στην αλληλουχία του DNA. Συνήθως, σε ένα συγκεκριμένο γονιδιακό τμήμα μια αζωτούχος βάση υποκαθίσταται από μια άλλη π.χ. αδενίνη αντί για θυμίνη. Τα SNPs είναι συνηθισμένες μεταλλάξεις στο DNA κάθε ατόμου. Ένας ή περισσότεροι «μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί» (SNPs) μπορεί να καθορίζουν μια σειρά από χαρακτηριστικά, που ως αποτέλεσμα μπορεί να διαφέρουν στα άτομα ενός πληθυσμού. Αυτό συμβαίνει καθώς ακόμα και με μία τόσο μικρή αλλαγή, παράγονται 2 διαφορετικά αλληλόμορφα, τα οποία μπορεί να δώσουν μέχρι και 3

διαφορετικούς γονότυπους, πχ AA, AG ή GG. Οι περισσότεροι από αυτούς τους πολυμορφισμούς δεν επηρεάζουν άμεσα την υγεία ή την ανάπτυξη ενός οργανισμού και μπορούν να αποτελέσουν κριτήρια για τη διάκριση των ατόμων. Τα τελευταία χρόνια εφαρμόζονται όλο και πιο συχνά σε πληθυσμιακές μελέτες με στόχο την διερεύνηση της παραλλακτικότητας των πληθυσμών, αλλά και τον εντοπισμό νέων ειδών ή συγγενών ειδών.

Το μικροδορυφορικό DNA ανήκει στο πυρηνικό DNA και χαρακτηρίζεται από μεγάλο αριθμό τυχαίων επαναλαμβανόμενων νουκλεοτιδίων. Αποτελείται από 1-6 μονάδες νουκλεοτιδίων, οι οποίες επαναλαμβάνονται έως και 100 φορές σε ένα τόπο. Συνήθως, το συνολικό τους μήκος δε ξεπερνά τα 300 νουκλεοτίδια και διακρίνονται για τον υψηλό βαθμό πολυμορφισμού που παρουσιάζουν. Υπολογίζεται ότι αποτελεί περίπου το 3% του συνολικού γονιδιώματος των οργανισμών.

Ανάλογα με τον τρόπο που επαναλαμβάνονται οι μικρές αυτές αλληλουχίες στο γονίδιο, διακρίνονται σε τέλειο (ομοιογενές επαναλαμβανόμενο τμήμα), ατελές (στο ομοιογενές τμήμα παρεμβάλλονται άλλες αζωτούχες βάσεις) και σύνθετο (υπάρχουν περισσότερα του ενός επαναλαμβανόμενα τμήματα). Οι μικροδορυφορικοί δείκτες έχουν την ιδιότητα να εμφανίζουν υψηλού βαθμού πολυμορφισμό και αυτό τους καθιστά χρήσιμους στην ανίχνευση διαφορών μεταξύ ειδών, πληθυσμών ή και ατόμων (Hinamoto & Maeda, 2004; Pasquer et al., 2009; Sabater-Munoz et al., 2012; Sun et al., 2012).

Ηλεκτροφόρηση

Η τεχνική της ηλεκτροφόρησης είναι μέθοδος διαχωρισμού σωματιδίων ή μορίων που φέρουν φορτίο, θετικό ή αρνητικό. Όπως φαίνεται και από τις μεθόδους που ήδη περιγράφησαν, έχει ευρεία εφαρμογή στον κλάδο της βιολογίας έχοντας αρχικά εφαρμογή σε μόρια πρωτεϊνών και μετέπειτα στο ίδιο το DNA ενός οργανισμού. Χρησιμοποιείται άμεσα στον διαχωρισμό μακρομορίων (πρωτεϊνών, λιποπρωτεϊνών, DNA/RNA, και οργανικών ουσιών), στην ανίχνευση επιμολυντών (ποιοτικά ή ποσοτικά), τον προσδιορισμό του μοριακού βάρους μίας ουσίας κι έμμεσα για την διάκριση ειδών, την εύρεση γενετικών διαφορών σε πληθυσμούς, τον προσδιορισμό των γονέων και των απογόνων κλπ.

Διακρίνεται σε οριζόντια και κάθετη ανάλογη με την διάσταση στην οποία πραγματοποιείται και σε αгарόζης ή αμυλοπηκτικής, ανάλογα με το υλικό που χρησιμοποιείται για να κατασκευαστεί το πήγμα (gel). Το πήγμα είναι αδρανές υλικό το οποίο χρησιμοποιείται ως μέσο για να “κινηθεί” σε αυτό το μόριο που επιθυμούμε (πρωτεΐνη, προϊόν PCR, DNA κλπ). Με τη βοήθεια ηλεκτροδίων, στο πήγμα εφαρμόζεται ηλεκτρικό πεδίο ώστε να συνεχιστεί η διαδικασία (Robyrt & White, 1990). Η κίνηση των μορίων μέσα στο ηλεκτρικό πεδίο εξαρτάται από το ηλεκτρικό φορτίο και το μοριακό βάρος των ουσιών. Το DNA ως αρνητικά ηλεκτρισμένο θα κινηθεί προς τον θετικό πόλο του πεδίου και μάλιστα όσο πιο μικρό σε μήκος (ζεύγη βάσεων – base pairs-bp) είναι, τόσο πιο γρήγορα θα κινηθεί. Η ιδιότητά της αυτή χρησιμοποιείται σε πολλές μεθόδους, όπως έχει ήδη περιγραφεί (Sambrook & Russel, 2001).

Προσδιορισμός Γενετικής Αλληλουχίας (Sequencing)

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

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

Το επόμενο βήμα αφορά την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης - Polymerase Chain Reaction (PCR). Η μέθοδος PCR ή αλλιώς Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης αποτελεί μία γρήγορη και ακριβή μέθοδο λήψης μεγάλου αριθμού αντιγράφων μίας συγκεκριμένης νουκλεοτιδικής αλληλουχίας. Οι εκκινητές (primers) που οριοθετούν το επιθυμητό κομμάτι συνεργάζονται με την πολυμεράση, η οποία έχοντας ως πρώτη ύλη νουκλεοτίδια (dNTPs) συνθέτει τη νέα αλληλουχία. Για να δημιουργηθούν πολλά αντίγραφα εφαρμόζεται αυξομείωση της θερμοκρασίας ώστε να αποχωρίζονται οι αλυσίδες του γενετικού υλικού (υψηλή θερμοκρασία) και να προσκολλώνται τα νουκλεοτίδια (χαμηλή θερμοκρασία). Η πολυμεράση που έχει ως βασικό ρόλο την τοποθέτηση των νουκλεοτιδίων στην κατάλληλη θέση πρέπει να αντέχει στις υψηλές θερμοκρασίες που υπάρχουν και γι αυτό χρησιμοποιήθηκε θερμοάντοχη DNA-πολυμεράση που απομονώθηκε από θερμοφιλά βακτήρια (*Thermus aquaticus*) (Mullis & Fellona, 1987; Swindell, 1997).

Οι εκκινητές που χρησιμοποιούνται στην περίπτωση της ταυτοποίησης ειδών οργανισμών είναι λίγοι σε αριθμό, αλλά φαίνεται να δίνουν λύση στις περισσότερες των περιπτώσεων (Navajas & Fenton, 2000; Navia et al., 2005; Naidu et al., 2012; Sonoda et al., 2012; Lv et al., 2014). Πιο αναλυτικά, αυτοί είναι:

τμήμα 16S του ριβοσωμικού DNA: Συμμετέχει και καθορίζει τη δομή των ριβοσωμάτων.

τμήμα 18S του ριβοσωμικού DNA: Συμμετέχει στη δομή των ριβοσωμάτων

τμήμα 28S του ριβοσωμικού DNA: Συμμετέχει στη δομή των ριβοσωμάτων

τιμήματα του κυτοχρώματος b: Συμμετέχουν στη μεταφορά ηλεκτρονίων κατά την διαδικασία της αναπνοής.

τιμήματα της υπομονάδας I της κυτοχρωμικής οξειδάσης: Συμμετέχουν στη μεταφορά ηλεκτρονίων κατά τη διαδικασία της αναπνοής.

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

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

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

Μιτοχονδριακό DNA – mtDNA

Τα μιτοχόνδρια αποτελούν πολύπλοκα οργανίδια των ευκαρυωτικών κυττάρων με κύρια λειτουργία τους την αερόβια αναπνοή, δηλαδή την παραγωγή χημικών μορίων (ATP) που θα μεταφραστούν σε ενέργεια για τον οργανισμό όπου ανήκουν. Λόγω των μηχανισμών που καταλύουν, βρίσκονται σε μεγαλύτερη ποσότητα σε κύτταρα που καταναλώνουν μεγάλες ποσότητες ενέργειας, όπως είναι τα μυϊκά κύτταρα, τα κύτταρα της καρδιάς κλπ. Διαθέτουν το δικό τους γενετικό υλικό, συνθέτουν τις δικές τους πρωτεΐνες και πολλαπλασιάζονται ταχύτατα, όμως για να εκτελέσουν πλήρως τις λειτουργίες τους εξαρτώνται και από το πυρηνικό DNA. Το μιτοχονδριακό DNA (mtDNA) υπάρχει σε πολλά αντίγραφα, είναι κυκλικό και μικρό σε μέγεθος και περνά στην επόμενη γενιά, συνήθως από τον θηλυκό γονέα (μητρική προέλευση ή κληρονομικότητα).

Συγκριτικά με το πυρηνικό DNA, το μιτοχονδριακό εξελίσσεται πολύ πιο γρήγορα, δεν παράγει πρωτεΐνες που αφορούν την αντιγραφή, μεταγραφή και μετάφρασή του (Adams, 2005). Επιπλέον, τα μιτοχόνδρια δεν μπορούν να επιδιορθώσουν οποιαδήποτε μεταλλαγή υποστούν με αποτέλεσμα η ύπαρξη μεταλλάξεων να εντοπίζεται πολύ πιο εύκολα στο μιτοχονδριακό DNA λόγω του υψηλού εξελικτικού ρυθμού και του μεγάλου αριθμού των αντιγράφων του (Harrison, 1989). Ακόμα, δεν έχει παρατηρηθεί το φαινόμενο του ανασυνδυασμού. Τα παραπάνω χαρακτηριστικά το καθιστούν σημαντικό εργαλείο σε μελέτες που αφορούν τις συγκρίσεις και την εξελικτική διαδικασία οργανισμών (Avise, 2000; Hebert et al., 2003; Hebert & Gregory, 2005; Li et al., 2012; Colangelo et al., 2012; Liu et al., 2013). Αρκετά είδη εντόμων και αρθροπόδων γενικότερα έχουν εξεταστεί με αυτόν τον τρόπο (Sperling & Hickey, 1994; Hebert et al., 2004; Rubinoff et al., 2006; Sezonlin et al., 2006; Dabert et al., 2008; Hunter et al., 2008; Valentini et al., 2009; Jung et al., 2011; Albernaz et al., 2012; Nava et al., 2012; Puillandre et al., 2012).

Πληθυσμιακή Ανάλυση – Υπολογισμός Γενετικών Αποστάσεων

Οι γενετικές αποστάσεις μεταξύ πληθυσμών ή ειδών έχουν καθοριστεί ώστε να εκφράζουν με νούμερα το κατά πόσο δύο πληθυσμοί είναι περισσότερο ή λιγότερο όμοιοι. Η γενετική ποικιλομορφία που εντοπίζεται κι εντοπίζεται ως γενετική απόσταση είναι απόρροια δύο κυρίως φαινομένων: της μεταλλαγής ή μετάλλαξης (mutation) και του ανασυνδυασμού (recombination). Τα γεγονότα αυτά, πραγματοποιούνται κατά τις διαδικασίες της αντιγραφής, μεταγραφής, έκφρασης και διαίρεσης των κυττάρων και δίνουν έως ένα βαθμό, διαφορετικούς γενετικά απογόνους συμβάλλοντας στην εξέλιξη (Hajibabaei et al., 2007).

Η έννοια του πληθυσμού (population) ορίζεται ως μία τυχαία ομάδα ατόμων που ανήκουν στο ίδιο είδος και διαβιούν εντός μίας περιορισμένης γεωγραφικά περιοχής. Άτομα τα οποία μπορεί να διαφοροποιηθούν ελαφρώς στα πλαίσια της εξέλιξης, εξακολουθούν να θεωρούνται ότι ανήκουν στον ίδιο πληθυσμό. Εντούτοις, δεν πρέπει να θεωρούνται ως απομονωμένες ομάδες που αναπτύσσονται πληρώνοντας αυστηρές προδιαγραφές και για το λόγο αυτό καθορίζονται ύστερα και από την εκτίμηση οικολογικών, γενετικών και άλλων δεδομένων (Nei & Kumar, 2000; Ramadan et al., 2004; Freeland, 2005; Freeland et al., 2013).

Η γενετική και η νουκλεοτιδική παραλλακτικότητα σε ένα γονιδιακό τμήμα διαφοροποιείται ανάλογα με τους μοριακούς δείκτες που έχουν χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό της. Εξαρτάται από τον ρυθμό και το είδος των μεταλλαγών που πραγματοποιούνται εντός αλλά και μεταξύ των γονιδιωμάτων. Επιπλέον, οι δείκτες που εξελίσσονται με μεγαλύτερο ρυθμό (π.χ.: Microsatellites) συνήθως αποκαλύπτουν γονίδια με υψηλότερη παραλλακτικότητα σε σύγκριση με εκείνους που εξελίσσονται πιο αργά (π.χ.: allozymes) (Kohlmann et al., 2003). Επηρεάζεται από την φυσική επιλογή, τον τρόπο αναπαραγωγής του πληθυσμού, την διάταξη και γεωγραφική οριοθέτηση του πληθυσμού αλλά και την τάση για γενετική παρρέκλιση. Σε κάθε περίπτωση δεν είναι δυνατό να προβλεφθεί ποιος παράγοντας από τους παραπάνω θα επηρεάσουν και πόσο τον πληθυσμό (Maryańska-Nadachowska et al., 2011; Mastan et al., 2012; Miller et al., 2012).

Συνήθως, η μειωμένη γενετική παραλλακτικότητα οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα ομομιξίας, γεγονός που ευθύνεται για τη μείωση της προσαρμοστικότητας των ατόμων και συνεπώς και των πληθυσμών στις συνθήκες και το περιβάλλον που εντοπίζονται. Η υπόθεση αυτή έχει σημαντική εφαρμογή στη βιολογία και τη διατήρηση των ειδών (Kimura, 1980; Piffaretti et al., 2012).

Η βασική αιτία που δημιουργεί και επηρεάζει την γενετική παραλλακτικότητα στα άτομα ενός πληθυσμού είναι ο τρόπος που τα γονίδια περνούν από γενιά σε γενιά και καθορίζονται από τις περιβαλλοντικές και κλιματικές αλλαγές, τον τρόπο αναπαραγωγής, τα όρια της περιοχής, τις ενδοπληθυσμιακές επιδράσεις, την ικανότητα διασποράς και τα γεωγραφικά όρια της διασποράς αυτής (Kimura, 1983).

Σχεδιασμός Φυλογενετικών Δένδρων

Τα φυλογενετικά δένδρα είναι διαγράμματα που απεικονίζουν τις σχέσεις που μπορεί να υπάρχουν μεταξύ ειδών κι εντός πληθυσμών, όπως αυτές διαμορφώνονται μέσα από τη θεωρία της εξέλιξης (Felsenstein, 1985). Οι αποστάσεις που υπάρχουν μεταξύ διαφορετικών ομάδων, όπως αυτές υποδηλώνονται από τους κλάδους των δένδρων, υποδεικνύουν το κατά πόσο σχετίζεται μία ομάδα με μία άλλη. Δίνουν μία εικόνα για πιθανή κοινή καταγωγή με βάση μορφολογικά χαρακτηριστικά, γονιδιακές αλληλουχίες κλπ.

Η κατασκευή των φυλογενετικών δένδρων βασίζεται σε μία σειρά από αλγορίθμους οι οποίοι εκτελούνται από τις διάφορες ηλεκτρονικές εφαρμογές. Κάθε αλγόριθμος χρησιμοποιεί διαφορετικά χαρακτηριστικά των πληθυσμών που συγκρίνονται, δίνοντας έτσι και διαφορετικό δένδρο. Υπάρχουν τέσσερις μεγάλες κατηγορίες μεθόδων κατασκευής δένδρων (Baum & Offner, 2008):

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

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

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

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

δημιουργείται νέα μήτρα με τις επόμενες αλληλουχίες που μοιάζουν περισσότερο μεταξύ τους και σταδιακά, με τον ίδιο τρόπο και ανάλογα με το πόσο απέχουν, προστίθενται και οι υπόλοιπες. Έτσι, στο τέλος προκύπτει ένα δένδρο με εξελικτική συμμετρία, το οποίο έχει πάντα ρίζα.

Μέθοδος Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987)

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

- **ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΕΓΙΣΤΗΣ ΦΕΙΔΩΛΟΤΗΤΑΣ - Maximum Parsimony Methods**

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

- **ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΕΓΙΣΤΗΣ ΠΙΘΑΝΟΦΑΝΕΙΑΣ - Maximum Likelihood Methods**

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

- ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΛΑΧΙΣΤΗΣ ΕΞΕΛΙΞΗΣ - Minimum Evolution Methods

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

ΣΚΟΠΟΣ

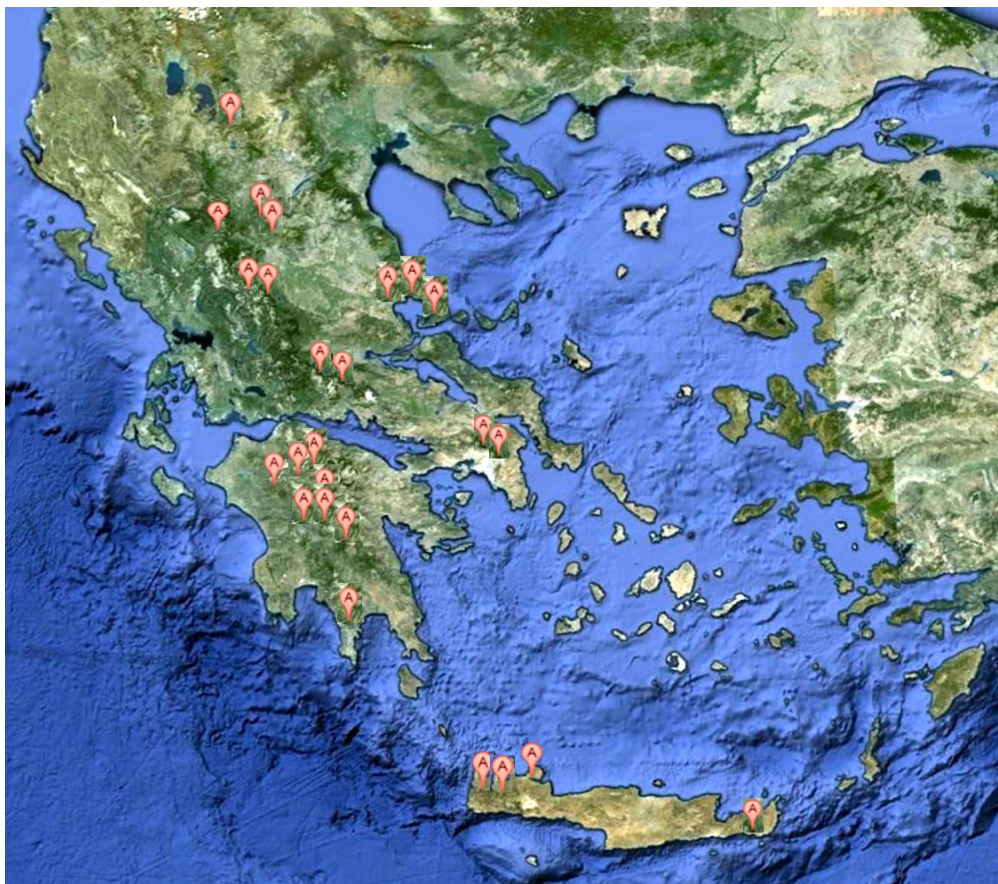
Αυτή η πειραματική διαδικασία έχει ως σκοπό τη διερεύνηση της σχέσης που μπορεί να έχει η κλασική συστηματική ταξινόμηση και ο προσδιορισμός της γενετικής αλληλουχίας που υποδεικνύει ένα είδος ακάρεως. Είναι σημαντικό, πέραν της κλασικής συστηματικής να υπάρχει και κάποιος άλλος τρόπος για την αναγνώριση των ειδών, καθώς υπάρχουν περιπτώσεις που περισσότερες πληροφορίες οδηγούν σε ασφαλέστερα συμπεράσματα και είναι κατανοητό πόσο σημαντικό είναι ο κάθε οργανισμός να ταυτοποιείται και να ονομάζεται σωστά. Επιπλέον, οι μοριακές τεχνικές μπορούν να δώσουν στοιχεία για τις γενετικές αποστάσεις μεταξύ των ειδών, αλλά και τις φυλογενετικές διαφορές που μπορεί να υπάρχουν στο είδος αλλά και εντός πληθυσμών του ίδιου είδους.

Για την εφαρμογή των παραπάνω χρησιμοποιήθηκε το γένος *Typhloseiulus* της οικογένειας Phytoseiidae, καθώς σε αυτό τα διάφορα είδη που το αποτελούν διαφέρουν μορφολογικά μεταξύ τους κυρίως στον αριθμό και το μήκος των τριχών που φέρουν στο σώμα τους.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία τα είδη του γένους *Typhloseiulus* εντοπίζονται σε δασικά δένδρα των γενών *Acer*, *Quercus*, *Abies* και σε συγκεκριμένο υψόμετρο, οπότε και σε τέτοιες περιοχές έγινε η συλλογή δειγμάτων (**Εικόνα 13, Πίνακας 1**). Ανάλογα με το μέγεθος του δένδρου κόβονταν 5-10 κλάδοι μήκους περίπου 70-100cm, τοποθετούνταν σε πλαστικές σακούλες δειγματοληψίας και μεταφέρονταν στο εργαστήριο. Εκεί και με τη χρήση στερεοσκοπίου γινόταν παρατήρηση της επιφάνειας των κλάδων με σκοπό τον εντοπισμό και τη συλλογή των ακάρεων. Τα συγκεκριμένα ακάρεα έχουν ισχυρές και μεγάλης διαμέτρου τρίχες στο νώτο τους, χαρακτηριστικό που καθόριζε ήδη από το στερεοσκόπιο, ποια ακάρεα θα συλλεχθούν για περαιτέρω μελέτη.

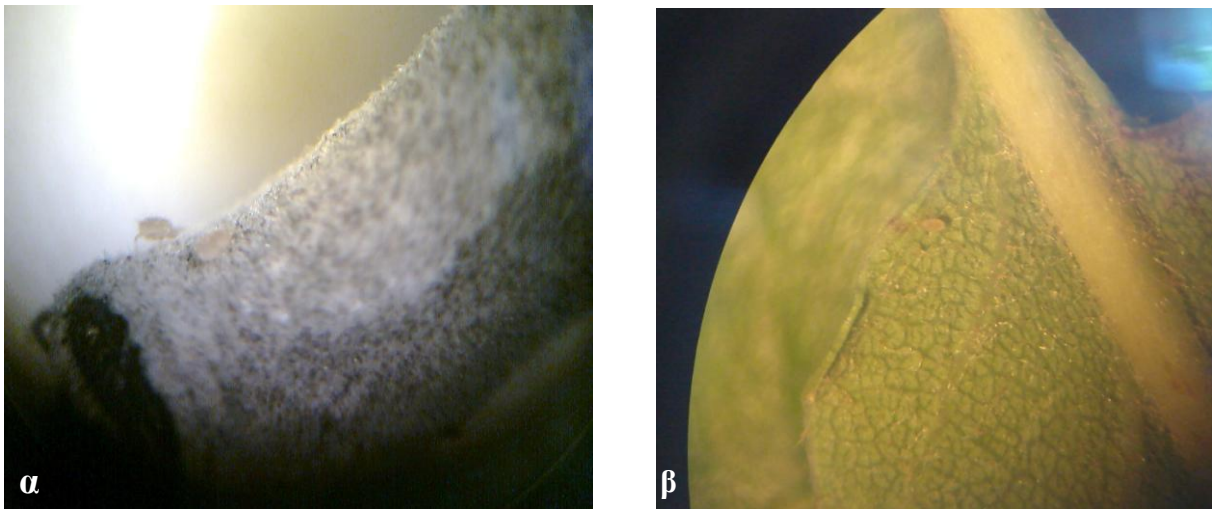


Εικόνα 13: Τα σημεία όπου ελήφθησαν φυτικά δείγματα για την ανεύρεση επί αυτών ατόμων του γένους *Typhloseiulus*.

Πίνακας 1: Περιοχές και δεδομένα δειγματοληψίας όπου εντοπίστηκαν ακάρεα του γένους *Typhloseiulus*

Νομός - Περιοχή		Φυτό Ξενιστής	Ημ/νία Συλλογής
Αρκαδία	Σταυροδρόμι	<i>Quercus ilex</i>	27/10/2012
Αρκαδία	Στεμνίτσα	<i>Quercus ilex</i>	24/03/2012
Αρκαδία	Στεμνίτσα	<i>Quercus coccifera</i>	24/03/2012
Αττική	Πάρνηθα	<i>Quercus aegilops</i>	22/04/2012
Αττική	ΟΑΚΑ	<i>Quercus ilex</i>	07/04/2012
Αττική	Πάρνηθα	<i>Quercus aegilops</i>	19/06/2011
Αττική	Πάρνηθα	<i>Quercus aegilops</i>	01/10/2011
Αττική	Πάρνηθα	<i>Quercus aegilops</i>	22/04/2012
Αττική	Πάρνηθα	<i>Quercus ilex</i>	22/04/2012
Αχαΐα	Καλάβρυτα	<i>Quercus coccifera</i>	10/12/2011
Αχαΐα	Μίχας	<i>Quercus coccifera</i>	10/12/2011
Αχαΐα	Βλασία	<i>Quercus coccifera</i>	10/12/2011
Αχαΐα	Τριπόταμα	<i>Quercus pubescens</i>	12/06/2011
Γρεβενά	Άνοιξη	<i>Quercus pubescens</i>	01/07/2011
Γρεβενά	Άνοιξη	<i>Quercus macedonicus</i>	01/07/2011
Γρεβενά	Κηπουριό	<i>Quercus pubescens</i>	03/07/2011
Ηλεία	Φολόη	<i>Quercus pubescens</i>	11/06/2011
Ηλεία	Λαμπεία	<i>Quercus pubescens</i>	11/06/2011
Ηλεία	Λούβρο	<i>Quercus ilex</i>	27/10/2012
Ιωάννινα	Αντάρτικο	<i>Acer platanoides</i>	02/07/2011
Ιωάννινα	Βοτονόσι	<i>Acer sempervirens</i>	02/07/2011
Καρδίτσα	Φυλακτή	<i>Acer sempervirens</i>	22/08/2011
Καρδίτσα	Τριζόλο	<i>Acer sempervirens</i>	23/07/2011
Καρδίτσα	Φυλακτή	<i>Quercus aegilops</i>	21/11/2010 & 14/10/2012
Καρδίτσα	Ανθηρό	<i>Quercus pubescens</i>	23/07/2011
Καρδίτσα	Κατούσι	<i>Quercus pubescens</i>	24/07/2011
Καρδίτσα	Οξυά	<i>Quercus pubescens</i>	11/10/2010
Λακωνία	Βάθεια	<i>Quercus aegilops</i>	17/04/2012
Λασιθι	Αγία Τριάδα	<i>Quercus coccifera</i>	16/11/2012
Μαγνησία	Τσαγκαράδα	<i>Quercus ilex</i>	17/12/2011
Μαγνησία	Χορευτό	<i>Quercus ilex</i>	17/12/2011
Μαγνησία	Πορταριά	<i>Quercus pubescens</i>	16/12/2011
Τρίκαλα	Μύκανη	<i>Quercus pubescens</i>	02/07/2011
Φωκίδα	Πανουριάς	<i>Quercus pubescens</i>	15/12/2012
Φωκίδα	Σκλήθρο	<i>Quercus aegilops</i>	16/12/2012
Χανιά	Σηρικάρι	<i>Quercus ilex</i>	15/09/2010
Χανιά	Μηλιά	<i>Quercus ilex</i>	15/09/2010
Χανιά	Σηρικάρι	<i>Quercus ilex</i>	21/07/2011
Χανιά	Πιθάρι	<i>Quercus aegilops</i>	13/09/2010

Αυτά εντοπίζονταν κυρίως στα “δωμάτια” των φύλλων, αλλά και σε άλλες προστατευμένες θέσεις, όπως κοντά στους οφθαλμούς, σε ερινώσεις, κηκίδες κλπ (**Εικόνα 14**). Τα άτομα συλλέγονταν με πινέλο και τοποθετούνταν ζωντανά σε αιθανόλη 95% η οποία είχε προστεθεί σε κελί μίας πλάκας PCR 96 θέσεων (96 x PCR plate – **Εικόνα 15**). Εκτός από αυτό το γένος και άλλα ακάρεα της οικογένειας Phytoseiidae, αλλά και των οικογενειών Cunaxidae, Eriophyidae, Stigmaidae, Tarsonemidae, Tetranychidae και Tenuipalpidae βρέθηκαν και συλλέχθηκαν για άλλες δραστηριότητες του Εργαστηρίου.

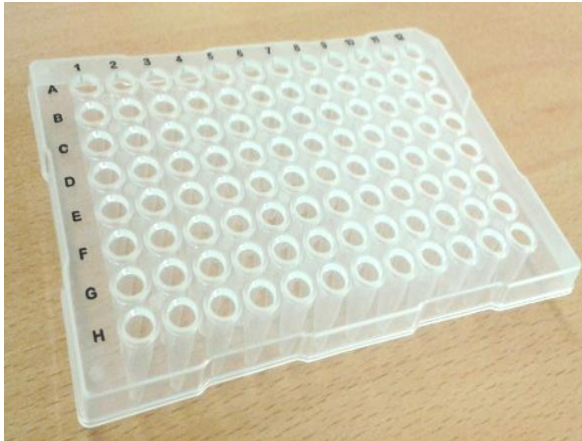


Εικόνα 14: Δύο άτομα του γένους *Typhloseiulus* όπως φαίνονται με στερεοσκοπική παρατήρηση πάνω σε α) κλάδο αριάς και β) φύλλο βελανιδιάς, λίγο πριν συλλεχθούν και τοποθετηθούν σε αιθανόλη 95%.

Για να χρησιμοποιηθεί στην παρούσα μελέτη ένας πληθυσμός στη συνέχεια θα έπρεπε να αποτελείται από τουλάχιστον 6 άτομα: ένα για να γίνει το μικροσκοπικό παρασκεύασμα και 5 για να εφαρμοστούν οι μοριακές τεχνικές. Σε αντίθετη περίπτωση ο πληθυσμός δεν κρινόταν κατάλληλος και αποκλειόταν από τη συνέχεια.

Για να αποφευχθεί αυτό, δείγματα στα οποία δεν παρατηρούνταν στερεοσκοπικά ο επιθυμητός αριθμός ακάρεων τοποθετούνταν σε συσκευή “Berlese” και συλλεγόταν σε φιαλίδιο που περιείχε αιθανόλη 95%. Συνοπτικά, η συσκευή αυτή αποτελείται από χωνιά, στα οποία τοποθετείται το φυτικό δείγμα και οι όποιοι οργανισμοί αυτό φιλοξενεί. Τα χωνιά και το δείγμα είναι εκτεθειμένα σε φως το οποίο αυξάνεται κάθε 24 ώρες με αποτέλεσμα τα φωτόφοβα ακάρεα, τα οποία επιπλέον πρέπει να επιβιώσουν σε φυτικό ιστό που ξηραίνεται λόγω της αυξημένης θερμοκρασίας, να κατεβαίνουν όλο και πιο χαμηλά στο χωνί. Τελικά, καταλήγουν να πέφτουν στην αιθανόλη.

Τα φιαλίδια με την αιθανόλη μεταφέρονταν στο εργαστήριο κι εκεί το περιεχόμενο τους αδειάζονταν σε γυάλινο τριβλίο petri διαμέτρου 2-4cm. Το τριβλίο εξετάζονταν σε στερεοσκόπιο και ακάρεα που συλλέγονταν με πινέλο και τοποθετούνταν στην πλάκα PCR σε αιθανόλη 95%.



Εικόνα 15: Πλάκα PCR 96 θέσεων (PCR plate) στην οποία φυλασσόταν τα ακάρεα έως ότου χρησιμοποιηθούν στις υπόλοιπες πειραματικές διαδικασίες.

Η συλλογή με τη συσκευή Berlese δεν απέδωσε ικανοποιητικά κι έπαψε να χρησιμοποιείται ύστερα από τις πρώτες αποτυχημένες προσπάθειες, καθώς ελάχιστα άτομα προστίθεντο σε σχέση με την απευθείας παρατήρηση και συλλογή κάτω από το στερεοσκόπιο (**Εικόνα 14**).

Αξίζει να σημειωθεί ότι αρχικά υπήρξε η ιδέα του να διατηρηθούν εκτροφές από τον κάθε πληθυσμό με στόχο να εξεταστεί σε μεγαλύτερο βαθμό η φυλογενετική τους συμπεριφορά. Όμως οι τροφές που δοκιμάστηκαν (γύρη αμυγδαλιάς, μηλιάς και τύφας, το άκαρι *Tetranychus urticae* και ακάρεα της οικογένειας Eriophyidae-που εντοπίζονταν στους κλάδους όπου συλλέγονταν τα υπό εξέταση ακάρεα) φαίνεται ότι δεν ήταν κατάλληλες για την επιβίωση των ατόμων. Επίσης, μη έχοντας πληροφορίες για τις ιδανικές συνθήκες ανάπτυξής τους δοκιμάστηκαν εκείνες στις οποίες συνηθίζεται να επιβιώνουν ακάρεα της οικογένειας Phytoseiidae, αλλά και εκείνες που επικρατούσαν στον τόπο συλλογής τους.



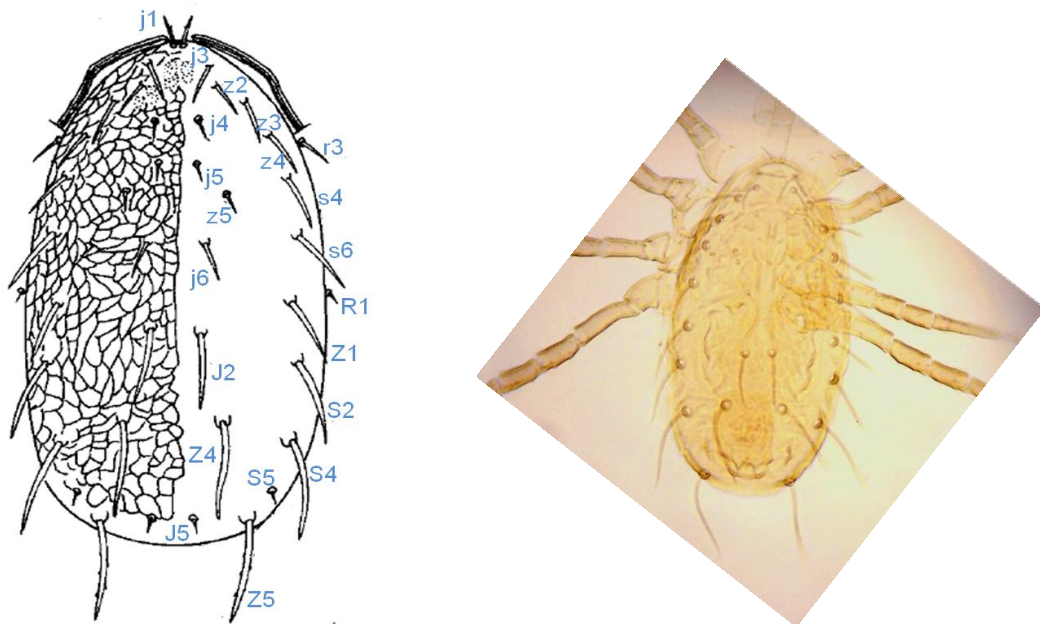
Εικόνα 16: Χαρακτηριστική εικόνα τοπίου που διεξάγονταν οι δειγματοληψίες

ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΚΗ ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ – ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΙΔΟΥΣ ΒΑΣΕΙ ΚΛΕΙΔΩΝ

Αρχικά, οι πληθυσμοί των ακάρεων προσδιορίζονταν με βάση την κλασική συστηματική ταξινόμηση, προσπαθώντας να υπάρχει κοινό σημείο αναφοράς με τις μοριακές τεχνικές. Ένα άτομο ανά πληθυσμό τοποθετούνταν σε ύαλο ωρολογίου με γαλακτικό οξύ 70% και παρέμενε σε κλίβανο στους 50°C για περίπου 24 ώρες, ώστε να διαλυαστεί. Σε περίπτωση που το άκαρι δεν είχε αποκτήσει την διαυγή εικόνα που είναι απαραίτητη για την ευκολότερη αναγνώρισή του, τοποθετούνταν και πάλι στην ίδια θερμοκρασία για άλλες 24 ώρες.

Σε αντικειμενοφόρο πλάκα και πάνω σε μία σταγόνα από το εγκλειστικό υγρό Hoyer's τοποθετούνταν το διαλυασμένο άκαρι και αφού καλύπτονταν με καλυπτρίδα, το παρασκεύασμα παρέμενε για άλλες 48 ώρες σε κλίβανο στους 50°C και σε μόνιμη πλέον μορφή, φυλάσσονταν σε θήκη έως ότου προσδιοριστεί το είδος του.

Για την αναγνώριση των ειδών τα παρασκευάσματα παρατηρούνταν σε μικροσκόπιο. Η κλείδα που χρησιμοποιήθηκε παρουσιάζεται από τους Papadoulis et al. (2009) και περιλαμβάνει τα 8 εκ των 10 ειδών που υπάρχουν παγκοσμίως στο υπό μελέτη γένος (**Εικόνα 17**).



Εικόνα 17: Σχέδιο και φωτογραφία μικροσκοπικού παρασκευάσματος είδους του γένους *Typhloseiulus* όπου φαίνεται η έντονη χαιτοταξία που φέρει στο νώτο.

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ DNA

Για την απομόνωση του γενετικού υλικού των ακάρεων χρησιμοποιήθηκαν τα αντιδραστήρια και οι συσκευές όπως αναφέρονται στη συνέχεια.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

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

Ζυγίζονται οι παρακάτω ποσότητες αλάτων:

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

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

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

ΣΥΣΚΕΥΕΣ

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

- ◆ **Φίλτρα και στήλες**, DNeasy Blood and Tissue Kit (50) - Qiagen
- ◆ **Φυγόκεντρος**, Iec Micromax Microcentrifuge (vertilated) M.3591 - Thermo Electron Corporation
- ◆ **Καταψύκτης**, GSV22V20 - Bosch
- ◆ **Ψυγείο**, RN110 CE - Voxson

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Για την απομόνωση του ολικού DNA χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο DNeasy Blood & Tissue kit (Qiagen), ακολουθώντας και τροποποιώντας ελαφρά τη διαδικασία του κατασκευαστή.

Συγκεκριμένα, ένα άκαρι ή ωό αφαιρέθηκε από την αιθανόλη, μεταφέρθηκε σε ένα κελί από PCR plate και παρέμεινε σε υδατόλουτρο με θερμοκρασία 70°C για 5 λεπτά, ώστε να απομακρυνθεί και η παραμικρή ποσότητα αλκοόλης, που πιθανώς να δημιουργούσε προβλήματα στη συνέχεια. Ακολουθούσε προσθήκη 10μL διαλύματος ομογενοποίησης ιστών (PBS) στο κελί με το ξηρό δείγμα (ωό ή άκαρι) και το σύνολο ομογενοποιούνταν με αποστειρωμένο tip και υπό το οπτικό πεδίο στερεοσκοπίου.

Έπειτα, προστίθεντο το διάλυμα που οδηγούσε στη λύση των κυττάρων (AL) και ποσότητα πρωτεΐνάσης K, η οποία δέσμευε τα μόρια DNA που υπήρχαν στο διάλυμα. Το περιεχόμενο του erpendorf ανακινούνταν και τοποθετούντα σε υδατόλουτρο στους 70°C για 10 λεπτά. Στη συνέχεια, εισαγόταν αιθανόλη και ακολουθούσε ανακίνηση και εισαγωγή του ολικού διαλύματος σε φίλτρο – στήλη, που περιέχονταν στο kit. Ύστερα από φυγοκέντρηση απορριπτόταν το υποκείμενο διάλυμα.

Στην επόμενη φάση προσθέτονταν τα διαλύματα καθαρισμού ακολουθούμενα από φυγοκεντρήσεις και απορρίψεις του υποκείμενου διαλύματος ανά περίπτωση. Το φίλτρο τοποθετούνταν σε νέο erpendorf, προσθέτονταν το διάλυμα έκπλυσης (AE) και αφήνονταν για μικρό χρονικό διάστημα σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να απομακρυνθεί πιθανή ποσότητα αιθανόλης. Ύστερα από μία τελευταία φυγοκέντρηση, συλλεγόταν το υποκείμενο διάλυμα το οποίο και περιελάμβανε το ολικό απομονωμένο DNA, τελικού όγκου 25μL. Αυτό διατηρούταν σε θερμοκρασία των -20°C για περαιτέρω χρήση.

ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ

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

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

- ◆ Αποστειρωμένο **H₂O** [Ultra pure water] - Biochrom AG
- ◆ Διάλυμα χλωριούχου μαγνησίου [50mM **MgCl₂**] - Invitrogen
- ◆ Διάλυμα τριφωσφο-δεσοξυριβονουκλεοτιδίων [2mM (**dNTPs**: dATP, dCTP, dGTP, dTTP), Nucleotide solution mix] - BioLabs
- ◆ **Ρυθμιστικό διάλυμα** [10x PCR buffer -MgCl₂] - Invitrogen
- ◆ **Taq DNA πολυμεράση** [Taq DNA Polymerase] – Invitrogen
- ◆ Απομονωμένο **DNA** των διαφόρων σταδίων του *I. degenerans* που έχει ληφθεί με την διαδικασία που περιγράφεται προηγουμένως

Στη συγκεκριμένη μελέτη, χρησιμοποιήθηκαν τρία διαφορετικά ζεύγη εκκινητών (primers). Συνολικά δοκιμάστηκαν πέντε, όμως δε φάνηκε να δουλεύουν ικανοποιητικά και ύστερα από τα πρώτα απογοητευτικά αποτελέσματα αποφασίστηκε να μην εξεταστούν τα 2 από αυτά. Αυτά που τελικά προχώρησαν φαίνονται στη συνέχεια:

- ◆ Ζεύγος εκκινητών που προσδιορίζουν εκείνο το γονιδιακό τμήμα (περίπου 350bp) το οποίο ελέγχει τη σύνθεση της μικρής υπομονάδας του ριβοσώματος (12Sr) - BioLabs. Η άρτια κατασκευή των ριβοσωμάτων αποτελεί σημαντική διαδικασία καθώς συμμετέχουν και επηρεάζουν άμεσα την πρωτεϊνοσύνθεση (Palumbi et al., 1991).

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

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

- ◆ Ζεύγος εκκινητών που προσδιορίζουν εκείνο το γονιδιακό τμήμα (περίπου 900bp) το οποίο ελέγχει τη σύνθεση της κυτοχρωμικής οξειδάσης (COI - CJ-NR) - BioLabs (Hinomoto et al., 2010).

C1-J- 1718: 5'-GGAGGATTTGGAAATTGATTAGTTCC-3' (Simon et al., 1994)

NR: 5'- TACAGCTCCTATAGATAAAAC-3' (Navajas et al., 1996)

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

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

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

Τα διάφορα διαλύματα χρησιμοποιήθηκαν σε διαφορετικές ποσότητες ανάλογα με το ζεύγος εκκινητών. Σε κάθε περίπτωση αναμιγνύονταν οι αντίστοιχες ποσότητες των αντιδραστηρίων κι έπειτα εισαγόταν η προτεινόμενη ποσότητα του απομονωμένου DNA. Στη συνέχεια τα tubes τοποθετήθηκαν στον θερμοκυκλοποιητή (PCR machine) όπου εφαρμόστηκε διαφορετικό πρόγραμμα σε κάθε περίπτωση εκκινητών, /όπως προκύπτει από την αντίστοιχη βιβλιογραφία (Palumbi et al., 1991; Folmer et al., 1994; Hinomoto et al., 2010). Το βασικό χαρακτηριστικό της συσκευής αυτής είναι η ικανότητά της να διατηρεί σταθερές θερμοκρασίες για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα που έχει οριστεί από τον χρήστη. Ο συνδυασμός των παραγόντων θερμοκρασία και χρόνος στο πείραμα αυτό πραγματοποιήθηκε με μικρές τροποποιήσεις της προτεινόμενης βιβλιογραφίας.

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

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

ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ

Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε οριζόντια σε πήγμα αγαρόζης και κύριος στόχος της ήταν η επιβεβαίωση της ορθής απομόνωσης γενετικού υλικού από τα άτομα, αλλά και η επιτυχής εφαρμογή της Αλυσιδωτής Αντίδρασης της Πολυμεράσης. Μία σειρά από αντιδραστήρια και συσκευές συμμετείχαν στη διαδικασία και φαίνονται στη συνέχεια:

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

- ◆ Απεσταγμένο **H₂O**
- ◆ Ρυθμιστικό **διάλυμα 3X TBE** (Tris/Borate/EDTA), το οποίο παρασκευάστηκε με το πρωτόκολλο που ακολουθεί:

Ζυγίζονται οι παρακάτω ποσότητες αλάτων:

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

και προστίθενται σε 400ml απιονισμένου νερού (d H₂O). Ακολουθεί ανάδευση έως ότου διαλυθούν τα άλατα και προσθήκη d H₂O ώστε το συνολικό διάλυμα να έχει όγκο 2L.

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

ΣΥΣΚΕΥΕΣ

- ◆ **Κλίβανος αποστείρωσης**, Koch - Pbi International
- ◆ **Αποστακτήρας** νερού, Nova 4 - Jencons
- ◆ **Ζυγός ακριβείας**, 100-3 - Kern
- ◆ **Φούρνος μικροκυμάτων**, WP700sl17-2 - Greenpoint
- ◆ **Πιπέττες** τύπου eppendorf
- ◆ **Eppendorfs**
- ◆ **Μήτρα σταθεροποίησης gel**
- ◆ **Συσκευή Οριζόντιας Ηλεκτροφόρησης**

- ◆ **Τροφοδοτικό**, Consort EV 265
- ◆ **Ηλεκτροφοριστική συσκευή** διαστάσεων 28X29X9 cm³, CSSU2515 Classic (TM) - Thermo Electron Corporation
- ◆ **Οδοντωτή μήτρα** 25 θέσεων (7mm)
- ◆ **Δοχείο** διαστάσεων 25X17X7 cm³
- ◆ **Συσκευή ανακίνησης (Rocker)**, ST(5) – CAT
- ◆ **Gel Documentation System**
- ◆ **Συσκευή Υπεριώδους Ακτινοβολίας**, ETX-20M - Vilber lourmat
- ◆ **Κάρτα μνήμης 128 MB** - Kingston
- ◆ **USB Card reader** - Trascend
- ◆ **Καταψύκτης**, GSV22V20 - Bosch
- ◆ **Ψυγείο**, RN110 CE - Voxson

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Αρχικά, παρασκευαζόταν διάλυμα αγαρόζης 2% (αγαρόζη και διάλυμα TBE X 0.5), με τη βοήθεια φούρνου μικροκυμάτων ώστε να διαλυθεί η στερεή αγαρόζη. Το διάλυμα ριπτόταν και αφηνότα στη μήτρα-καλούπι έως ότου κρυώσει και σταθεροποιηθεί, δηλαδή για τουλάχιστον 30 λεπτά. Στη συνέχεια το gel, πλέον, τοποθετούνταν στην οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης και στις θέσεις φόρτισης (πηγαδάκια) προστίθεντο είτε ποσότητα DNA είτε ποσότητα προϊόντων PCR αναμεμιγμένα με το διάλυμα φόρτωσης (loading buffer). Επιπλέον, προσθέτονταν ποσότητα του μάρτυρα (PCR marker-ladder, 1000bp) και ακολούθησε ηλεκτροφόρηση με την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου σταθερής τάσης 110V, για περίπου 1 ώρα και 30 λεπτά.

Έπειτα, το gel τοποθετούνταν σε δοχείο που περιείχε απεσταγμένο νερό και φθορίζουσα ουσία (βρωμιούχο αιθίδιο), η οποία έχει την ιδιότητα να δημιουργεί σύμπλοκο με τα μόρια του DNA και να είναι εμφανής όταν εκτεθεί σε υπεριώδη ακτινοβολία. Το δοχείο ανακινούνταν με τη βοήθεια συσκευής ανακίνησης (rocker) όπου παρέμενε για 20-30 λεπτά, χρόνος αρκετός ώστε να υπάρξει σύμπλοκο, και με ρυθμό ανακίνησης στις 37 στροφές ανά λεπτό. Τέλος, το gel φωτογραφιζόταν στην τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας και η φωτογραφία αποθηκευόταν σε σχετική μνήμη. Σε περιπτώσεις όπου οι αναμενόμενες ζώνες του DNA ή των προϊόντων της PCR ή του μάρτυρα δεν ήταν εμφανείς, ακολουθούσε επεξεργασία της ληφθείσας φωτογραφίας με κατάλληλο λογισμικό όπου τροποιούνταν η φωτεινότητα και η αντίθεση. Εάν και πάλι δεν εμφανίζονταν ζώνες, τότε η διαδικασία επαναλαμβανόταν στάδιο-στάδιο, ώστε αν χρειαζόταν να

πραγματοποιούνταν από την αρχή ακόμα και η απομόνωση του γενετικού υλικού από άτομο του ίδιου πληθυσμού.

ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

Το στάδιο που ακολουθεί την ηλεκτροφόρηση του πηγματος αγαρόζης είναι αυτό του “καθαρισμού του προϊόντος που προέκυψε έπειτα από την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης. Σε αυτό στόχος είναι να αποχωριστεί και να απομονωθεί από όσες άλλες ουσίες έχουν συμμετάσχει στις παραπάνω διαδικασίες, το τμήμα του DNA του οποίου η αλληλουχία ενδιαφέρει να προσδιοριστεί. Για τον καθαρισμό των προϊόντων της PCR εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο του *NucleoSpin Extract II kit - Macherey-Nagel* σύμφωνα με το οποίο συμμετείχαν τα παρακάτω διαλύματα που εμπεριέχονται στο kit και συσκευές που υπήρχαν στο Εργαστήριο:

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

- ◆ **Προϊόν PCR**, έχει παραχθεί κατά το στάδιο της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης
- ◆ **Διάλυμα NT**, NucleoSpin Extract II kit - Macherey-Nagel
- ◆ **Διάλυμα NT3**, NucleoSpin Extract II kit - Macherey-Nagel
- ◆ **Διάλυμα NE**, NucleoSpin Extract II kit - Macherey-Nagel

ΣΥΣΚΕΥΕΣ

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

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Αρχικά, στο προϊόν της PCR το οποίο είχε απομείνει μετά από την ηλεκτροφόρηση, προστίθεντο το διάλυμα δέσμευσης των μορίων DNA που συντέθηκαν κατά την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (NT). Το συνολικό διάλυμα εισαγόταν σε φίλτρο και κολώνα που περιέχονται στο kit και πραγματοποιούνταν φυγόκεντρωση. Το υποκείμενο διάλυμα

απορρίπτονταν και εισαγόταν το διάλυμα καθαρισμού (NT₃). Ακολουθούσε φυγοκέντρηση εις διπλούν κι έπειτα τοποθετούνταν στο υδατόλουτρο στους 70°C για 5 λεπτά. Τέλος, προσθέτονταν το διάλυμα έκπλυσης (NE), φυγοκεντρούταν το μίγμα και διατηρείτο το υποκείμενο διάλυμα που εμπεριέχει και την επιθυμητή αλληλουχία. Διατηρούταν στη θερμοκρασία των -20°C έως ότου παραπεμφθεί στην επόμενη διαδικασία του προσδιορισμού της αλληλουχίας (sequencing). Στην εικόνα που ακολουθεί φαίνεται συνοπτικά η διαδικασία του καθαρισμού.

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ **(SEQUENCING)**

Η αρχή και ο στόχος όλων όσων προηγήθηκαν είναι ο προσδιορισμός μίας συγκεκριμένης γενετικής αλληλουχίας, της οποίας η ανάλυση δίνει πολλές πληροφορίες και απαντήσεις σε βασικά ερωτήματα, όπως αυτά εκφράστηκαν κατά τον σκοπό και την εισαγωγή της συγκεκριμένης μελέτης.

Ο προσδιορισμός της προς εξέταση αλληλουχίας των νουκλεοτιδίων, πραγματοποιήθηκε από την εταιρεία CeMIA SA Company (<http://cemia.eu/>) στην ποία αποστέλλονταν τα καθαρά προϊόντα της PCR. Η όλη διαδικασία βασίζεται σε μία μέθοδο η οποία πλεονεκτεί σε χρόνο και ακρίβεια συγκριτικά με τις υπόλοιπες (Sanger et al., 1977; Sanger & Coulson, 1975). Σύμφωνα με αυτή οι δύο κλώνοι του DNA ανοίγουν και δημιουργούνται δύο μονόκλωνα μόρια. Έπειτα, χρησιμοποιούνται οι ίδιοι συνήθως εκκινητές που χρησιμοποιούνται και κατά την Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR) και με τη συμμετοχή πολυμεράσης και ολιγονουκλεοτιδίων, παράγονται αντίγραφα των αρχικών μορίων.

Εισάγοντας διδεοξυνουκλεοτίδιο καταστέλλεται η αντιγραφή σε συγκεκριμένη νουκλεοτιδική αλληλουχία, καθώς λόγω απουσίας υδροξυλίου στη θέση 3' της 2-δεοξυριβόζης το διδεοξυνουκλεοτίδιο δε μπορεί να αναπτύξει φωσφοδιεστερικό δεσμό με το επόμενο νουκλεοτίδιο. Τα τελικά τμήματα DNA εμπλέκονται περαιτέρω σε διαδικασία ραδιοσήμανσης, ηλεκτροφόρησης και αυτοραδιογραφίας. Η διαδικασία αυτή αποτελεί την κλασική διαδικασία αλληλούχισης (standard sequencing). Τα τελικά προϊόντα της αλληλούχισης εξετάζονται ως προς την ομοιότητάς τους με ήδη κατατεθειμένες αλληλουχίες στην Παγκόσμια τράπεζα γονιδιώματος (NCBI-GENBANK) και κατατίθενται σε αυτή.

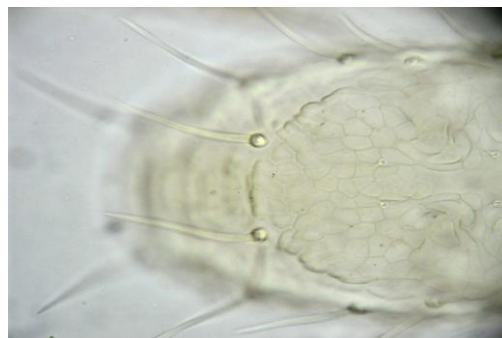
ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ – ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΔΕΝΔΡΩΝ

Στη συνέχεια, για την ευθυγράμμιση των αλληλουχιών χρησιμοποιούνταν το υπολογιστικό πακέτο *CLUSTAL W2* (Thomson et al., 1994; Zhang et al., 2000). Επιπλέον, με το πρόγραμμα *DnaSP 5.10* (Librado & Rozas, 2009) εκτιμούνταν οι απλότυποι και οι θέσεις που παρουσιάζονται οι διαφορές στους πληθυσμούς των δύο ειδών ανά γονίδιο. Ο απλότυπος αναφερόταν στο σύνολο των αλληλόμορφων γονιδίων ενός ατόμου και στην εγγενή αναπαραγωγή μπορεί να δώσει πληροφορίες για τους γονείς ενός πληθυσμού, καθώς κάθε άτομο έχει ένα αλληλόμορφο από κάθε γονέα (γονότυπος). Αξίζει να αναφερθεί ότι μετάλλαξη ακόμα και σε ένα νουκλεοτίδιο δίνει διαφορετικό απλότυπο.

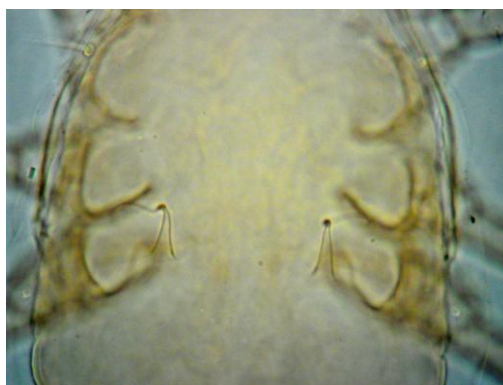
Με το στατιστικό πακέτο *Mega v. 6.0.0* (Tamura et al., 2011; 2013) συγκεντρώθηκαν πληροφορίες για τις γενετικές αποστάσεις των πληθυσμών και των ειδών για τα διαφορετικά γονιδιακά τμήματα και τη νουκλεοτιδική ποικιλομορφία. Ακόμα, δημιουργήθηκαν διάφορα φυλογενετικά δένδρα, τα οποία έδωσαν καλύτερη εικόνα των αποτελεσμάτων. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή τους ήταν της ελάχιστης εξέλιξης (Rzhetsky & Nei, 1993), της μέγιστης φειδωλότητας (Saitou and Imanishi, 1989) και του Neighbour-Joining (μήτρες απόστασης) (Saitou & Nei, 1987).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

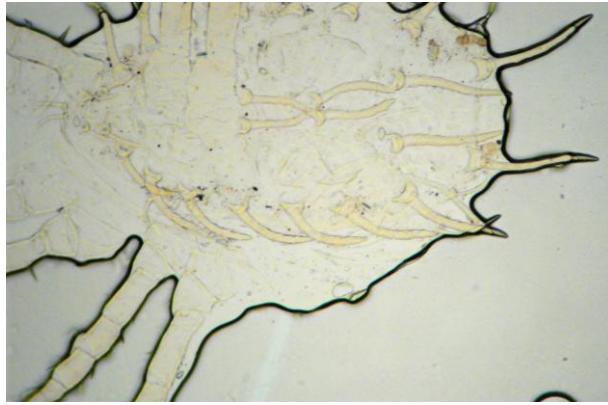
Σε κάθε περίπτωση ο πληθυσμός που θα συνέχιζε για την γενετική ανάλυση με μοριακές τεχνικές αντιπροσωπευόταν από ένα τουλάχιστον μικροσκοπικό παρασκεύασμα, το οποίο είχε λάβει και την ονομασία του είδους σύμφωνα με την κλασική ταξινόμηση και τις κλείδες που αναφέρθησαν. Τα διάφορα είδη που εντοπίστηκαν είναι τα *T. calabriae*, *T. carmonae*, *T. eleonora*, *T. eliahuswirskii*, *T. erymanthii*, *T. peculiaris*, *T. rodopiensis*, *T. simplex*, και φαίνονται στις εικόνες που ακολουθούν (Εικόνα 17 - 24). Σημειώνεται ότι ενώ εντοπίστηκε και άτομο του είδους *T. simplex*, δεν υπήρχε ικανοποιητικός αριθμός ώστε να πραγματοποιηθεί η διαδικασία με τις μοριακές μεθόδους. Παρόλο που πραγματοποιήθηκε και πάλι επίσκεψη στο σημείο που είχε βρεθεί ο μικρός πληθυσμός (απαρτιζόταν από 3 άτομα συνολικά) και ξαναλήφθησαν κλάδοι, δεν κατέστη δυνατή η συλλογή άλλων ατόμων. Επομένως, για το συγκεκριμένο είδος δεν υπάρχουν περισσότερες του παρασκευάσματος πληροφορίες και τα είδη που αναλύθηκαν τελικά είναι επτά εκ των οκτώ που έχουν καταγραφεί στην Ελλάδα.



Εικόνα 17: Μικροσκοπικό παρασκεύασμα θηλυκού ατόμου του *T. calabriae* και λεπτομέρειες της χαιτοταξίας που φέρει στο πίσω μέρος του σώματος.



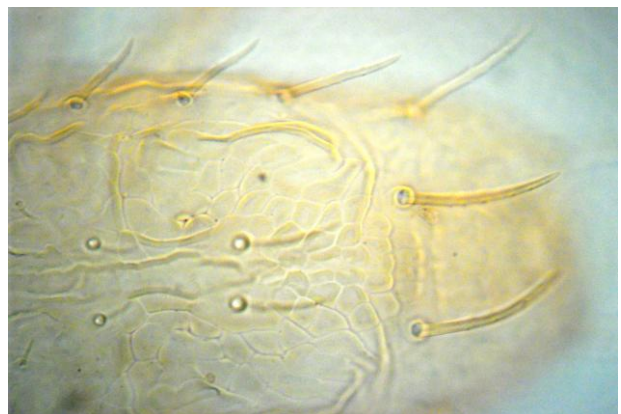
Εικόνα 18: Μικροσκοπικό παρασκεύασμα θηλυκού ατόμου του *T. carmonae* και τμήμα του σώματός του όπου φαίνονται οι σπερματοθήκες του.



Εικόνα 19: Μικροσκοπικό παρασκεύασμα θηλυκού ατόμου του *T. eleonora*. Διακρίνονται οι ισχυρές και μεγάλης διαμέτρου τρίχες που φέρει στο νότο.



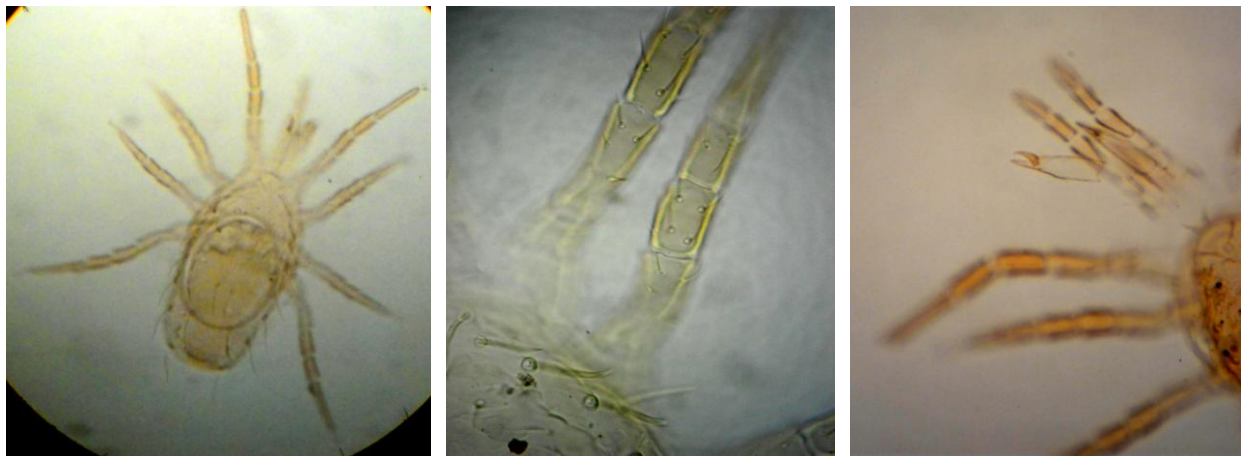
Εικόνα 20: Μικροσκοπικό παρασκεύασμα θηλυκού ατόμου του *T. eliahuswirskii* και οι χαρακτηριστικές τρίχες που φέρει στο genu II.



Εικόνα 21: Μικροσκοπικό παρασκεύασμα θηλυκού ατόμου του *T. erymanthii* με τις χαρακτηριστικές τρίχες στο πίσω μέρος του σώματος. Διακρίνονται τα λιγυστά υπολείματα της κέρινης επικάλυψης παρά την επεξεργασία και την έκθεση σε υψηλή θερμοκρασία.



Εικόνα 22: Μικροσκοπικό παρασκεύασμα θηλυκού ατόμου του *T. peculiaris* και τμήμα του σώματός του όπου φαίνονται οι τριγωνικές σπερματοθήκες του.



Εικόνα 23: Μικροσκοπικό παρασκεύασμα θηλυκού ατόμου του *T. rodopiensis* που φέρει ωό. Διακρίνονται οι τρίχες στο genu II καθώς και ένα χηλήκερας στο γναθόσωμα.



Εικόνα 24: Μικροσκοπικό παρασκεύασμα θηλυκού ατόμου του *T. simplex* με μία πληρωμένη με σπέρμα και καλοσχηματισμένη σπερματοθήκη στο μέσο του σώματος.

Τα διάφορα άτομα που αναγνωρίστηκαν με την χρήση κλειδών εκπροσωπήθηκαν από πέντε άτομα του ίδιου πληθυσμού για να ακολουθήσουν οι αναλύσεις με τις μοριακές τεχνικές. Τις περισσότερες φορές δεν ήταν ικανοποιητικά τα αποτελέσματα που λαμβάνονταν για όλα τα γονιδιακά τμήματα με αποτέλεσμα να μην αναλύονται οι ίδιοι πληθυσμοί ή τα ίδια είδη με όλους τους μοριακούς δείκτες. Αξίζει να σημειωθεί ότι εκτός των τριών δεικτών που περιγράφονται πλήρως εξετάστηκαν και κάποιοι άλλοι οι (π.χ. δείκτης D-LOOP) οποίοι δεν έδωσαν ενθαρρυντικά αποτελέσματα και δεν συνεχίστηκε η εφαρμογή τους σε όλους τους πληθυσμούς που συλλέχτηκαν. Σύνοψη των παραπάνω δίνεται στους πίνακες που ακολουθούν (**Πίνακας 2 - 4**) και στους οποίους παρέχονται όλες οι πληροφορίες και η κωδικοποίηση για τα άτομα που αναλύθηκαν τελικά με μοριακές τεχνικές για τα τρία γονιδιακά τμήματα. Συνοπτικά εξετάστηκαν μέχρι και το τελευταίο στάδιο της πειραματικής διαδικασίας 195 άτομα για το γονιδιακό τμήμα 12Sr, 175 για το COI – CJ-NR και 20 για το COI Barcode, που αντιστοιχούν σε 39, 35 και 4 πληθυσμούς και 7 είδη.

Πίνακας 2: Περιοχές και δεδομένα δειγματοληψίας όπου εντοπίστηκαν ακάρεα του γένους *Typhloseiulus* και που έδωσαν αποτελέσματα για το γονιδιακό τμήμα 12Sr.

Κωδικοποίηση	Φυτό Ξενιστής	Περιοχή	Ημ/νία Συλλογής
Typhloseiulus calabrae ANTARTIKO_1 - 5	<i>Acer platanoides</i>	Ιωάννινα	02/07/2011
Typhloseiulus calabrae FYLAKTI_1 - 5	<i>Acer sempervirens</i>	Καρδίτσα	22/08/2011
Typhloseiulus calabrae MYKANI_1 - 5	<i>Quercus pubescens</i>	Τρίκαλα	02/07/2011
Typhloseiulus calabrae TRIZOLO_1 - 5	<i>Acer sempervirens</i>	Καρδίτσα	23/07/2011
Typhloseiulus calabrae VOTONOSI_1 - 5	<i>Acer sempervirens</i>	Ιωάννινα	02/07/2011
Typhloseiulus carmonae FYLAKTI_1 - 5	<i>Quercus aegilops</i>	Καρδίτσα	14/10/2012
Typhloseiulus carmonae PANOURIAS_1 - 5	<i>Quercus pubescens</i>	Φωκίδα	15/12/2012
Typhloseiulus carmonae PARNITHA_1 - 5	<i>Quercus aegilops</i>	Αττική	22/04/2012
Typhloseiulus eleonoraе SIRIKARI_1 - 5	<i>Quercus ilex</i>	Κρήτη	15/09/2010
Typhloseiulus eleonoraе STAVRODROMI_1 - 5	<i>Quercus ilex</i>	Αρκαδία	27/10/2012
Typhloseiulus eliahuswirskii OAKA_1 - 5	<i>Quercus ilex</i>	Αττική	07/04/2012
Typhloseiulus eliahuswirskii MILIA_1 - 5	<i>Quercus ilex</i>	Χανιά	15/09/2010
Typhloseiulus eliahuswirskii PARNITHA_1 - 5	<i>Quercus ilex</i>	Αττική	22/04/2012
Typhloseiulus eliahuswirskii SIRIKARI_1 - 5	<i>Quercus ilex</i>	Χανιά	21/07/2011
Typhloseiulus eliahuswirskii STEMNITSA_1 - 5	<i>Quercus ilex</i>	Αρκαδία	24/03/2012
Typhloseiulus eliahuswirskii TSAGARADA_1 - 5	<i>Quercus ilex</i>	Μαγνησία	17/12/2011
Typhloseiulus eliahuswirskii XOREFTO_1 - 5	<i>Quercus ilex</i>	Μαγνησία	17/12/2011
Typhloseiulus erymanthii AGTRIADA_1 - 5	<i>Quercus coccifera</i>	Λασιίθι	16/11/2012
Typhloseiulus erymanthii KALAVRYTA_1 - 5	<i>Quercus coccifera</i>	Αχαΐα	10/12/2011
Typhloseiulus erymanthii MIXAS_1 - 5	<i>Quercus coccifera</i>	Αχαΐα	10/12/2011
Typhloseiulus erymanthii STEMNITSA_1 - 5	<i>Quercus coccifera</i>	Αρκαδία	24/03/2012
Typhloseiulus erymanthii VLASSIA_1 - 5	<i>Quercus coccifera</i>	Αχαΐα	10/12/2011
Typhloseiulus peculiaris ANOIXI_1 - 5	<i>Quercus pubescens</i>	Γρεβενά	01/07/2011
Typhloseiulus peculiaris ANOIXI_1 - 5 mac	<i>Quercus macedonicus</i>	Γρεβενά	01/07/2011
Typhloseiulus peculiaris KIPOURIO_1 - 5	<i>Quercus pubescens</i>	Γρεβενά	03/07/2011
Typhloseiulus peculiaris PARNITHA_1 - 5	<i>Quercus aegilops</i>	Αττική	01/10/2011
Typhloseiulus peculiaris VATHEIA_1 - 5	<i>Quercus aegilops</i>	Λακωνία	17/04/2012
Typhloseiulus rodopiensis ANTHIRO_1 - 5	<i>Quercus pubescens</i>	Καρδίτσα	23/07/2011
Typhloseiulus rodopiensis FOLOI_1 - 5	<i>Quercus pubescens</i>	Ηλεία	11/06/2011
Typhloseiulus rodopiensis KATOUSI_1 - 5	<i>Quercus pubescens</i>	Καρδίτσα	24/07/2011
Typhloseiulus rodopiensis LAMPIA_1 - 5	<i>Quercus pubescens</i>	Ηλεία	11/06/2011
Typhloseiulus rodopiensis LOUVRO_1 - 5	<i>Quercus ilex</i>	Ηλεία	27/10/2012
Typhloseiulus rodopiensis OXYA_1 - 5	<i>Quercus pubescens</i>	Καρδίτσα	11/10/2010
Typhloseiulus rodopiensis PARNITHA_1 - 5	<i>Quercus aegilops</i>	Αττική	22/04/2012
Typhloseiulus rodopiensis PARNITHA_1 - 5	<i>Quercus ilex</i>	Αττική	22/04/2012
Typhloseiulus rodopiensis PITHARI_1 - 5	<i>Quercus aegilops</i>	Χανιά	13/09/2010
Typhloseiulus rodopiensis PORTARIA_1 - 5	<i>Quercus pubescens</i>	Μαγνησία	16/12/2011
Typhloseiulus rodopiensis SKLITHRO_1 - 5	<i>Quercus aegilops</i>	Φωκίδα	16/12/2012
Typhloseiulus rodopiensis TRIPOTAMA_1 - 5	<i>Quercus pubescens</i>	Αχαΐα	12/06/2011

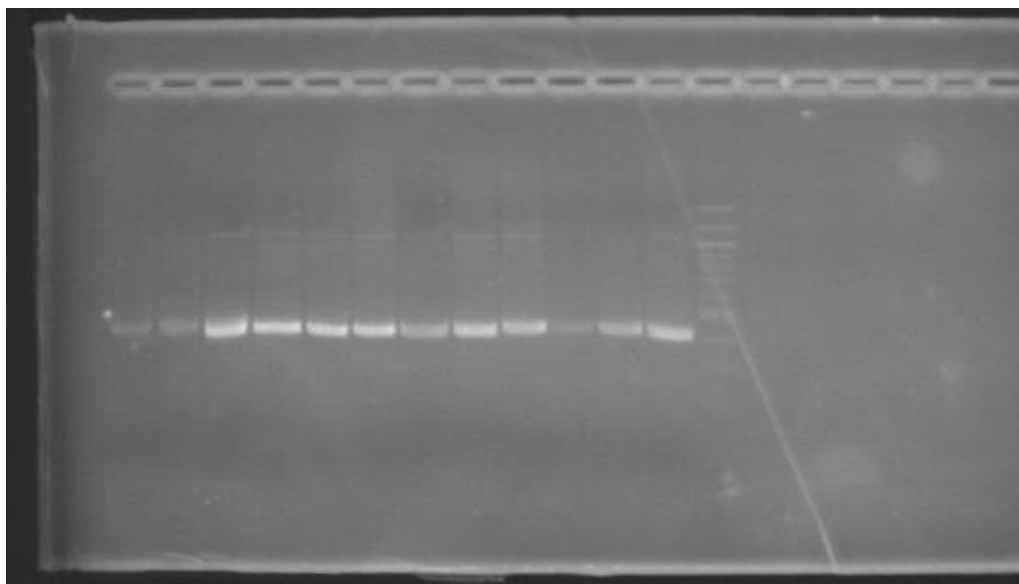
Πίνακας 3: Περιοχές και δεδομένα δειγματοληψίας όπου εντοπίστηκαν ακάρεα του γένους *Typhloseiulus* και που έδωσαν αποτελέσματα για το γονιδιακό τμήμα COI - CJ-NR.

Κωδικοποίηση	Φυτό Ξενιστής	Περιοχή	Ημ/νία Συλλογής
Typhloseiulus calabriae ANTARTIKO_1 - 5	<i>Acer platanoides</i>	Ιωάννινα	02/07/2011
Typhloseiulus calabriae MYKANI_1 - 5	<i>Quercus pubescens</i>	Τρίκαλα	02/07/2011
Typhloseiulus calabriae TRIZOLO_1 - 5	<i>Acer sempervirens</i>	Καρδίτσα	23/07/2011
Typhloseiulus calabriae VOTONOSI_1 - 5	<i>Acer sempervirens</i>	Ιωάννινα	03/07/2011
Typhloseiulus calabriae FYLAKTI_1 - 5	<i>Acer sempervirens</i>	Καρδίτσα	22/08/2011
Typhloseiulus carmonae FYLAKTI_1 - 5	<i>Quercus aegilops</i>	Καρδίτσα	21/11/2010 & 14/10/2012
Typhloseiulus carmonae PANOURIAS_1 - 5	<i>Quercus pubescens</i>	Φωκίδα	15/12/2012
Typhloseiulus carmonae PARNITHA_1 - 5	<i>Quercus aegilops</i>	Αττική	22/04/2012
Typhloseiulus eliahuswirskii MILIA_1 - 5	<i>Quercus ilex</i>	Κρήτη	15/09/2010
Typhloseiulus eliahuswirskii OAKA_1 - 5	<i>Quercus ilex</i>	Αττική	07/04/2012
Typhloseiulus eliahuswirskii PARNITHA_1 - 5	<i>Quercus ilex</i>	Αττική	22/04/2012
Typhloseiulus eliahuswirskii SIRIKARI_1 - 5	<i>Quercus ilex</i>	Κρήτη	21/07/2011
Typhloseiulus eliahuswirskii STEMNITSA_1 - 5	<i>Quercus ilex</i>	Αρκαδία	24/03/2012
Typhloseiulus eliahuswirskii TSAGARADA_1 - 5	<i>Quercus ilex</i>	Μαγνησία	17/12/2011
Typhloseiulus eliahuswirskii XOREFTO_1 - 5	<i>Quercus ilex</i>	Μαγνησία	17/12/2011
Typhloseiulus erymanthii AG.TRIADA_1 - 5	<i>Quercus coccifera</i>	Κρήτη	16/11/2012
Typhloseiulus erymanthii MIXAS_1 - 5	<i>Quercus coccifera</i>	Αχαΐα	10/12/2011
Typhloseiulus erymanthii VLASSIA_1 - 5	<i>Quercus coccifera</i>	Αχαΐα	10/12/2011
Typhloseiulus peculiaris ANOIXI_1 - 5	<i>Quercus pubescens</i>	Γρεβενά	01/07/2011
Typhloseiulus peculiaris ANOIXI_1 - 5 mac	<i>Quercus macedonicus</i>	Γρεβενά	01/07/2011
Typhloseiulus peculiaris KIPOURIO_1 - 5	<i>Quercus pubescens</i>	Γρεβενά	03/07/2011
Typhloseiulus peculiaris PARNITHA_1 - 5	<i>Quercus aegilops</i>	Αττική	19/06/2011
Typhloseiulus peculiaris VATHEIA_1 - 5	<i>Quercus aegilops</i>	Λακωνία	17/04/2012
Typhloseiulus rodopiensis ANTHIRO_1 - 5	<i>Quercus pubescens</i>	Καρδίτσα	23/07/2011
Typhloseiulus rodopiensis FOLOI_1 - 5	<i>Quercus pubescens</i>	Ηλεία	11/06/2011
Typhloseiulus rodopiensis KATOUSI_1 - 5	<i>Quercus pubescens</i>	Καρδίτσα	24/07/2011
Typhloseiulus rodopiensis LAMPIA_1 - 5	<i>Quercus pubescens</i>	Ηλεία	11/06/2011
Typhloseiulus rodopiensis LOUVRO_1 - 5	<i>Quercus ilex</i>	Ηλεία	27/10/2012
Typhloseiulus rodopiensis OXYA_1 - 5	<i>Quercus pubescens</i>	Καρδίτσα	11/10/2010
Typhloseiulus rodopiensis PARNITHA_1 - 5	<i>Quercus aegilops</i>	Αττική	22/04/2012
Typhloseiulus rodopiensis PARNITHA_1 - 5 ilex	<i>Quercus ilex</i>	Αττική	22/04/2012
Typhloseiulus rodopiensis PITHARI_1 - 5	<i>Quercus aegilops</i>	Κρήτη	13/09/2010
Typhloseiulus rodopiensis PORTARIA_1 - 5	<i>Quercus pubescens</i>	Μαγνησία	16/12/2011
Typhloseiulus rodopiensis TRIPOTAMA_1 - 5	<i>Quercus pubescens</i>	Αχαΐα	12/06/2011
Typhloseiulus rodopiensis SKLITHRO_1 - 5	<i>Quercus aegilops</i>	Φωκίδα	16/12/2012

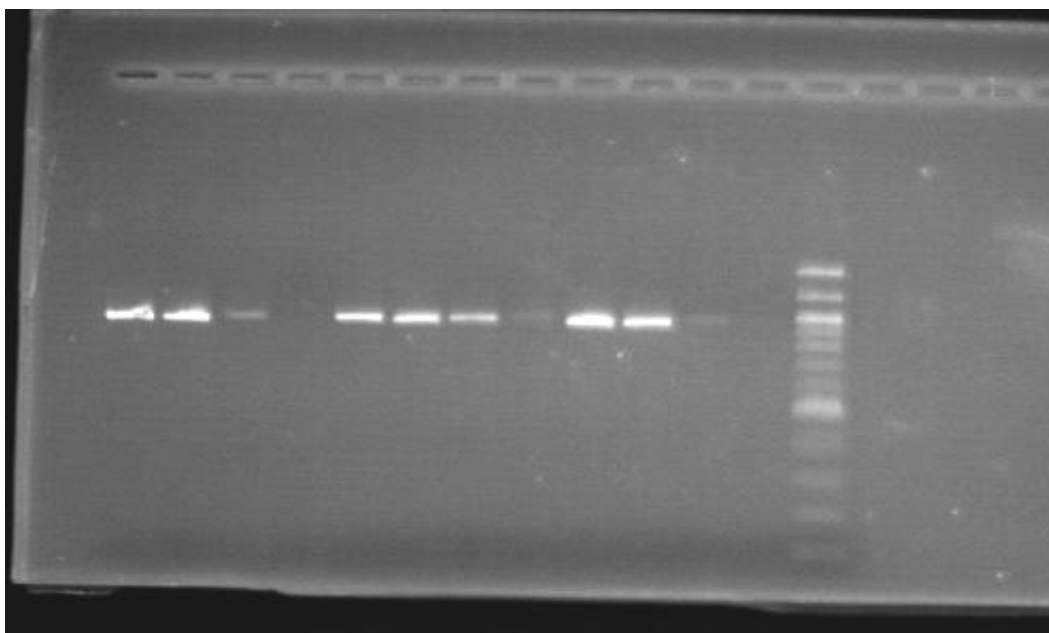
Πίνακας 4: Περιοχές και δεδομένα δειγματοληψίας όπου εντοπίστηκαν ακάρεα του γένους *Typhloseiulus* και που έδωσαν αποτελέσματα για το γονιδιακό τμήμα COI - Barcode.

Κωδικοποίηση	Φυτό Ξενιστής	Περιοχή	Ημ/ία Συλλογής
<i>Typhloseiulus eleonora</i> SIRIKARI_1-5	<i>Quercus ilex</i>	Χανιά	15/09/2010
<i>Typhloseiulus eleonora</i> STAVRODROMI_1-5	<i>Quercus ilex</i>	Αρκαδία	27/10/2012
<i>Typhloseiulus eliahuswirskii</i> SIRIKARI_1-5	<i>Quercus ilex</i>	Χανιά	21/07/2011
<i>Typhloseiulus peculiaris</i> PARNITHA_1-5	<i>Quercus aegilops</i>	Αττική	01/10/2011

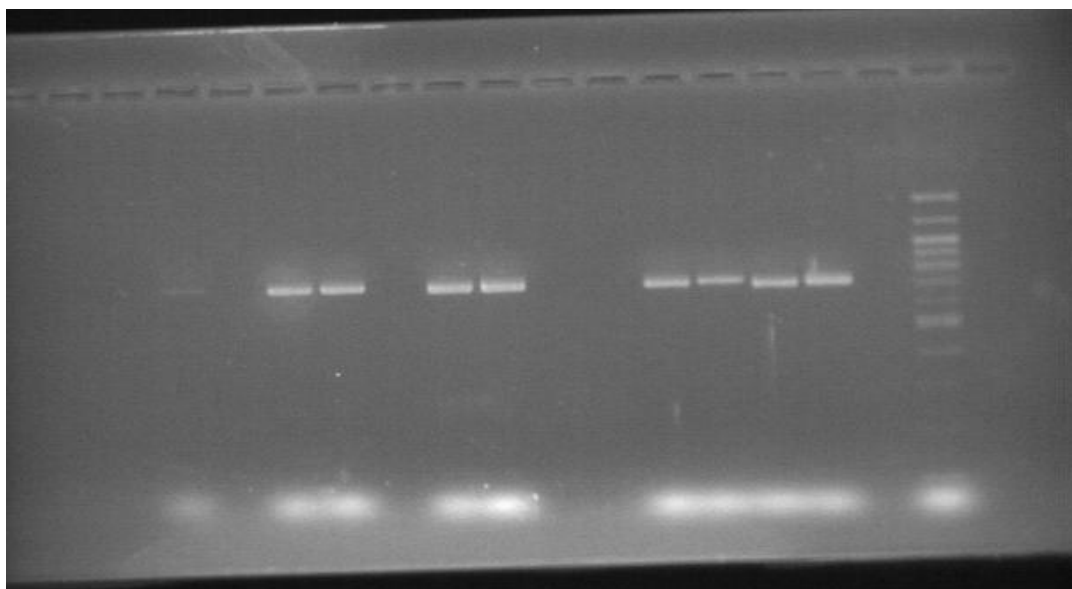
Το πρώτο ουσιαστικό και ορατό αποτέλεσμα που λαμβάνεται κατά την πειραματική διαδικασία των μοριακών τεχνικών είναι στο στάδιο της ηλεκτροφόρησης. Στις εικόνες που ακολουθούν φαίνονται οι ζώνες που αντιστοιχούν στα πολλαπλασιασμένα μετά την PCR γονιδιακά τμήματα. Συγκεκριμένα, οι ζώνες εμφανίζονται στο ύψος των 341 ζευγών βάσεων για τον μοριακό δείκτη 12Sr (**Εικόνα 25**), στα 865 ζεύγη βάσεων για το τμήμα COI – CJ-NR (**Εικόνα 26**) και στα 648 ζεύγη βάσεων για το COI Barcode (**Εικόνα 27**). Τα παραπάνω συνδυάζονται με τις ζώνες που φέρει ο μάρτυρας-ladder και φθάνουν από 50bp έως 1000bp.



Εικόνα 25: Φωτογραφία πήγματος αгарόζης ύστερα από ηλεκτροφόρηση σε προϊόντα PCR για το γονιδιακό τμήμα 12Sr (αναμενόμενο μήκος: 350bp).



Εικόνα 26: Φωτογραφία πήγματος αγαρόζης ύστερα από ηλεκτροφόρηση σε προϊόντα PCR για το γονιδιακό τμήμα COI – CJ-NR (αναμενόμενο μήκος: 900bp).



Εικόνα 27: Φωτογραφία πήγματος αγαρόζης ύστερα από ηλεκτροφόρηση σε προϊόντα PCR για το γονιδιακό τμήμα COI Barcode (αναμενόμενο μήκος: 650bp).

Το τελικό στάδιο των μοριακών τεχνικών, το sequencing μας δίνει ως αποτελέσματα χρωματογραφήματα, όπου η κάθε κορυφή αντιστοιχεί και διαβάζει μία αζωτούχο βάση (**Εικόνα 28**). Η αλληλουχία των αζωτούχων αυτών βάσεων δίνει ένα γονιδιακό τμήμα το οποίο είναι αντιπροσωπευτικό του μοριακού δείκτη που χρησιμοποιήθηκε, αλλά και του ατόμου του ακάρεως που αναλύθηκε. Τα γονιδιακά τμήματα που προέκυψαν μετά την αλληλούχιση έδωσαν τμήματα με μήκος 341 ζεύγη βάσεων για το γονιδιακό τμήμα 12Sr, 865bp για το COI – CJ-NR και 648bp για το COI Barcode. Όλες οι παραπάνω αλληλουχίες έχουν κατατεθεί στην παγκόσμια τράπεζα γονιδιώματος (Genbank) με τους αναγνωριστικούς κωδικούς KR018563-KR018611, KR018513-KR018561 και KR018505-KR018512, αντίστοιχα.

Εκτός των χρωματογραφημάτων, τα αποτελέσματα έρχονται και σε τέτοια μορφή (.abi) την οποία επεξεργάζονται τα διάφορα στατιστικά πακέτα και δίνουν πληροφορίες για τις διαφορές μεταξύ των ατόμων που συγκρίθηκαν. Οι διαφορές αυτές μπορούν να απεικονιστούν και με τα φυλογενετικά δένδρα που κατασκευάζονται.

Στη συγκεκριμένη μελέτη κατασκευάστηκαν τελικά και παρατίθενται εδώ τρία φυλογενετικά δένδρα, ένα για το κάθε γονιδιακό τμήμα και για τους αντίστοιχους πληθυσμούς που έδωσαν ικανοποιητικά αποτελέσματα (**Εικόνα 29 - 31**). Έγινε προσπάθεια να συνδυαστούν τα τρία δένδρα, όμως αυτό απαιτούσε τον συνδυασμό των τριών γονιδίων σε ένα, γεγονός που σημαίνει ότι το λογισμικό θα έπρεπε να επεξεργαστεί ένα τμήμα μήκους περίπου 1900bp και δεν έχει αυτή τη δυνατότητα. Τα μοντέλα που χρησιμοποιήθηκαν έδωσαν τα ίδια αποτελέσματα όσον αφορά τις ομαδοποιήσεις των πληθυσμών σε κλάδους και τον διαχωρισμό τους από άλλους συγγενείς, οπότε και παρουσιάζεται μόνο ένα δένδρο ανά μοριακό δείκτη.

Όπως φαίνεται στα φυλογενετικά δένδρα, τα διάφορα είδη διακρίνονται μεταξύ τους και με τους 3 μοριακούς δείκτες, χωρίς όμως να ισχύει το ίδιο και για τους πληθυσμούς τους. Για παράδειγμα, στο γονίδιο 12Sr το είδος *T. rodopiensis* ξεχωρίζει από τα υπόλοιπα, όμως υπάρχει μία σύγχυση για τα άτομα εντός του είδους, καθώς ακόμα και πληθυσμοί του ίδιου είδους που συλλέχθηκαν σε διαφορετικά γεωγραφικά διαμερίσματα π.χ Πελοπόννησο (Λούβρο) και Θεσσαλία (Ανθηρό), ομαδοποιούνται σε κοινό κλάδο.

Η συνέχεια της στατιστικής επεξεργασίας για τον υπολογισμό των απλοτύπων ανά γονιδιακό τμήμα, έδωσε 49 απλοτύπους με συνολικά 138 διαφορετικά σημεία πολυμορφισμού για το 12Sr (σε σύνολο 341bp), 49 απλοτύπους με συνολικά 329 διαφορετικά σημεία πολυμορφισμού για το COI – CJ-NR (σε σύνολο 865bp) και 8 απλοτύπους με συνολικά 215 διαφορετικά σημεία πολυμορφισμού για το COI Barcode (σε σύνολο 648bp) και με τον μέσο όρο των νουκλεοτιδικών διαφορών (k) να είναι 36,13410, 124,02509 και 95,77368 για τα αντίστοιχα τμήματα (**Πίνακας 5, Εικόνα 32**). Η νουκλεοτιδική ετερογένεια (P_i) υπολογίστηκε

με τα δύο στατιστικά πακέτα (*DnaSP 5.10* και *Mega v. 6.0.0*) και βρέθηκε ίδια και συγκεκριμένα ίση με 0,10597, 0,14371 και 0,14780 για τους τρεις γονιδιακούς δείκτες που εφαρμόστηκαν. Τέλος, ο συντελεστής του Tajima (D) εκτιμήθηκε στο 0,12783, 1,96274 και 1,19506 και οι γενετικές αποστάσεις που αποκαλύφθηκαν έχουν ως εξής:

- για το γονιδιακό τμήμα 12Sr:

μέση = $0,119 \pm 0,009$

μέγιστη = 0,242 μεταξύ των *T.erymanthii_AGTRIADA_2* και *T.carmonae_PANOURIAS_2*

ελάχιστη = 0,000 εντός κάποιων πληθυσμών

- για το γονιδιακό τμήμα COI – CJ-NR:

μέση = $0,191 \pm 0,013$

μέγιστη = 0,341 μεταξύ των *T.eliahuswirskii_TSAGARADA,XOREFTO* και *T.calabriae_FYLAKTI_1*

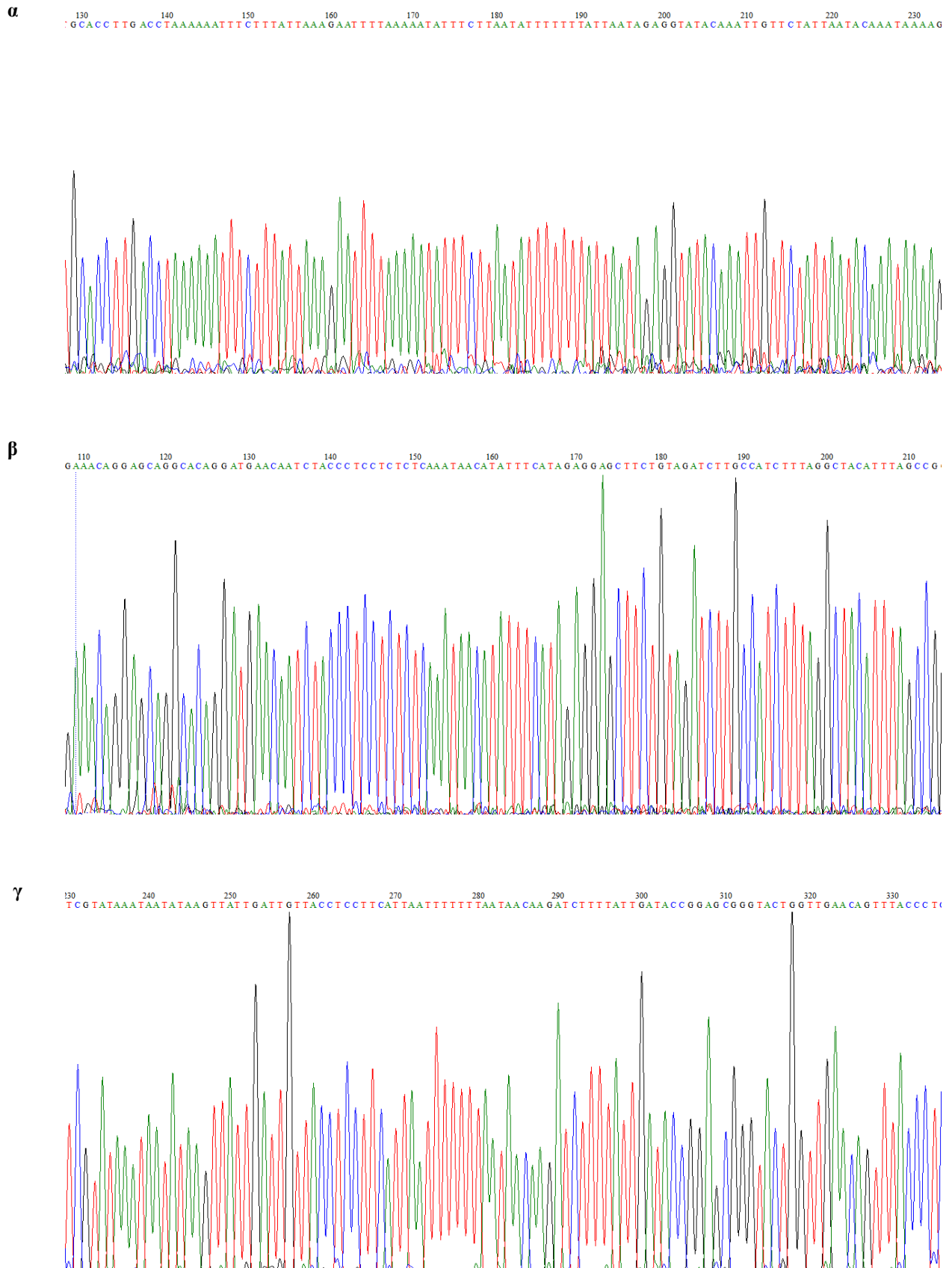
ελάχιστη = 0,000 εντός κάποιων πληθυσμών και

- για το γονιδιακό τμήμα COI Barcode:

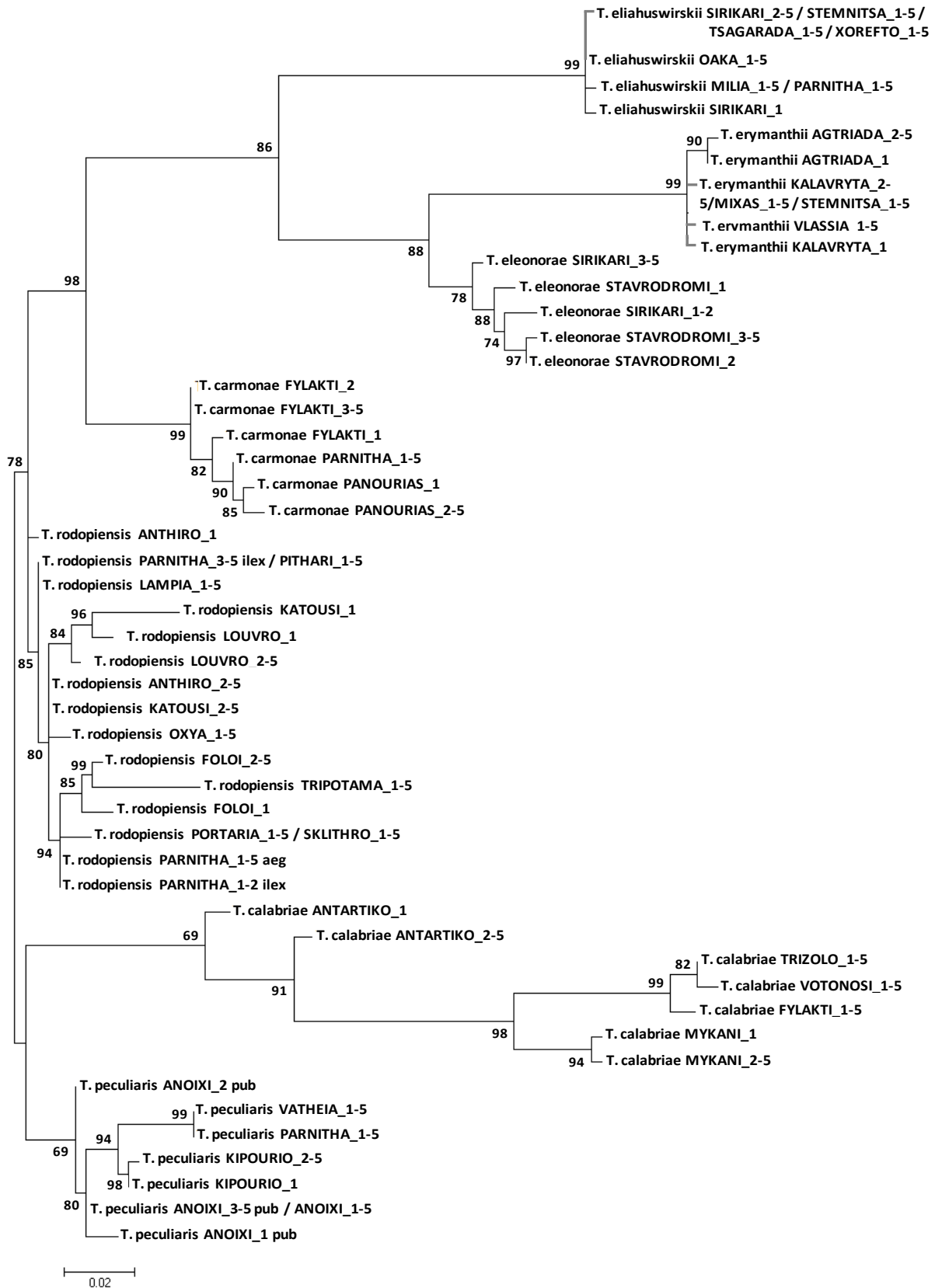
μέση = $0,174 \pm 0,012$

μέγιστη = 0,323 μεταξύ των *T. eliahuswirskii SIRIKARI* και *T. eleonorae SIRIKARI*

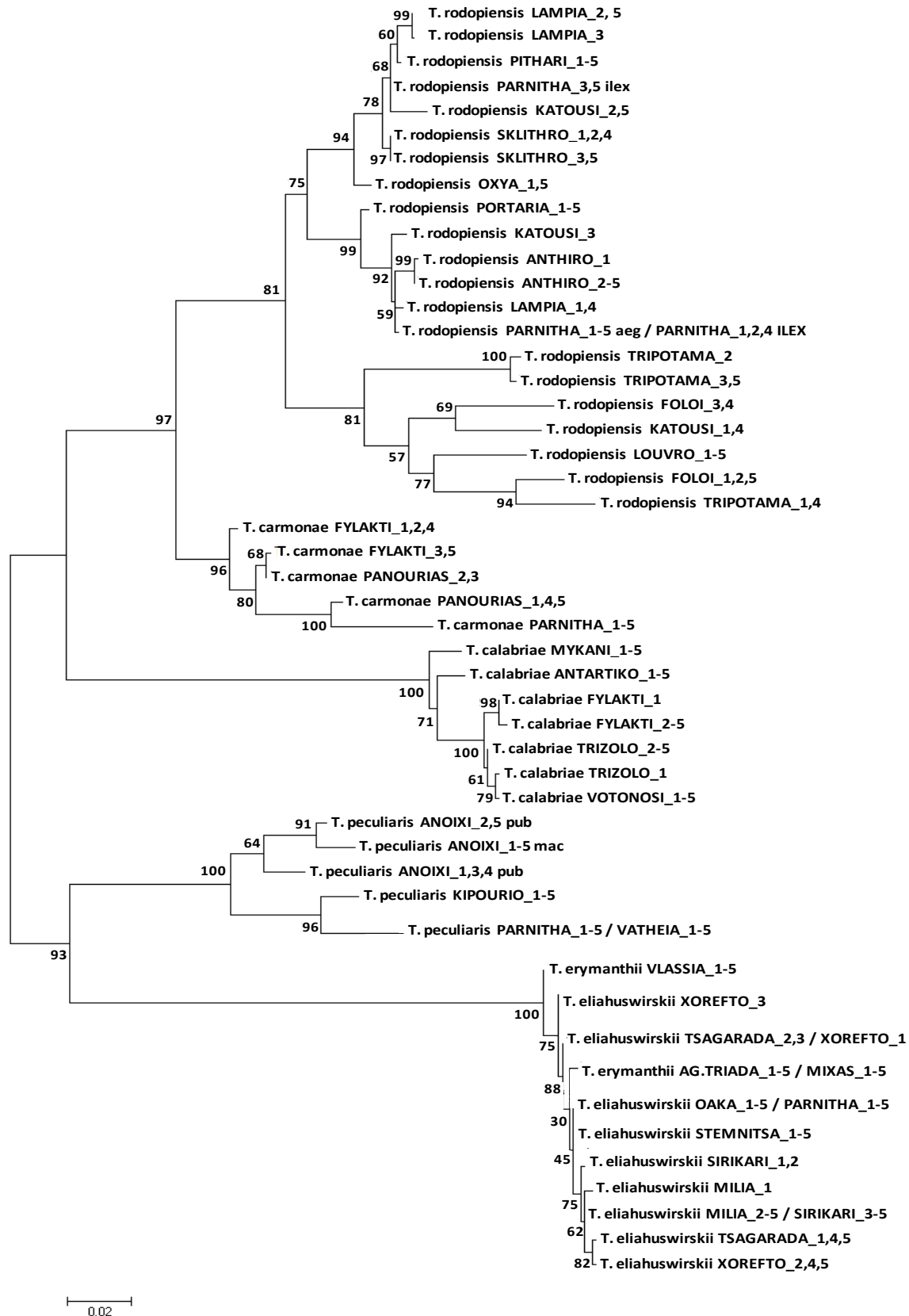
ελάχιστη = 0,000 εντός κάποιων πληθυσμών και



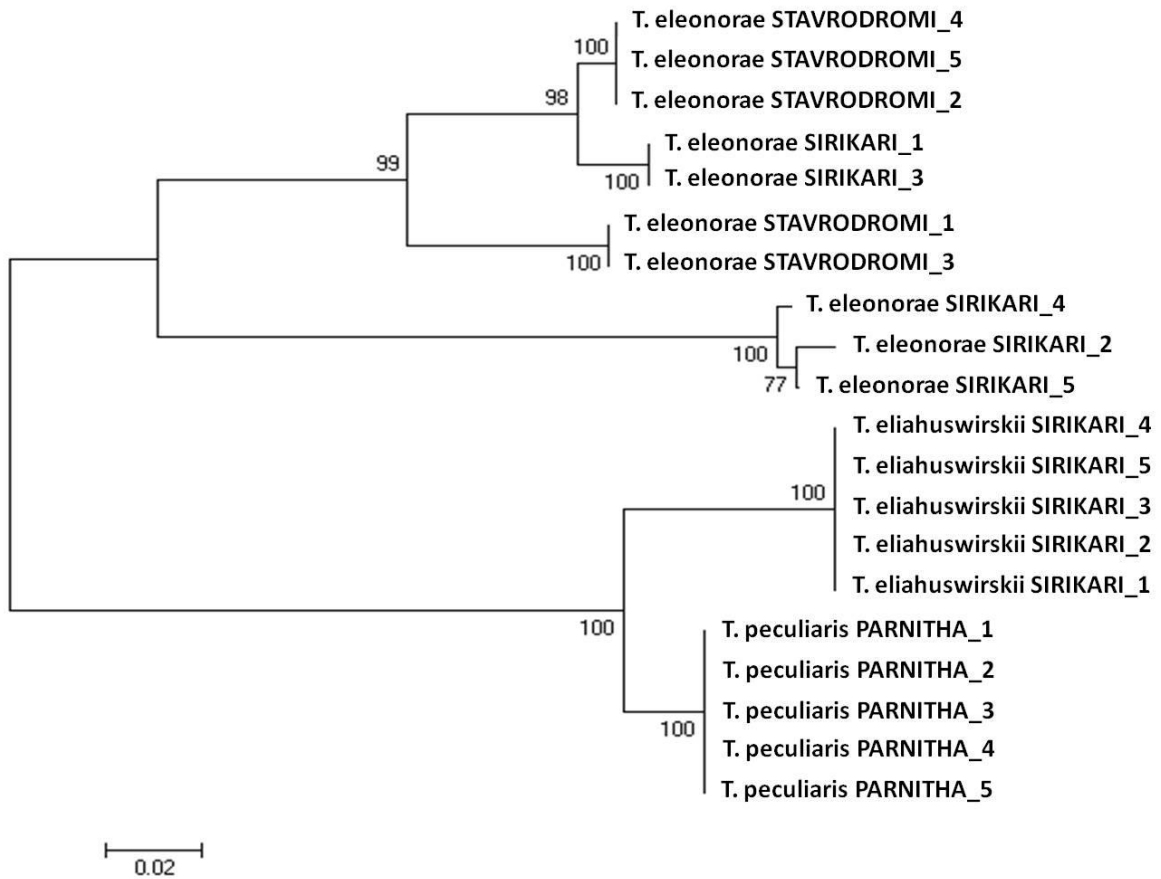
Εικόνα 28: Χαρακτηριστικά χρωματογραφήματα ύστερα από την ανάγνωση του γονιδιώματος (sequencing) για τα τρία γονιδιακά τμήματα που εξετάστηκαν: α) 12Sr (341bp), β) COI (865bp) και γ) COI-Barcode (648bp).



Εικόνα 29: Φυλογενετικό δένδρο, κατασκευασμένο με το λογισμικό *Mega v. 6.0.0*, σύμφωνα με το πρότυπο της Μέγιστης Πιθανοφάνειας (Maximum Likelihood) βασιζόμενο στις γονιδιακές αλληλουχίες που προσδιορίστηκαν για το γονιδιακό τμήμα 12Sr (bootstrap: 1000).



Εικόνα 30: Φυλογενετικό δένδρο, κατασκευασμένο με το λογισμικό *Mega v. 6.0.0*, σύμφωνα με το πρότυπο της Μέγιστης Φειδωλότητας (Maximum Parsimony) βασιζόμενο στις γονιδιακές αλληλουχίες που προσδιορίστηκαν για το γονιδιακό τμήμα COI – CJ-NR (bootstrap: 1000).



Εικόνα 31: Φυλογενετικό δένδρο, κατασκευασμένο με το λογισμικό *Mega v. 6.0.0*, σύμφωνα με το πρότυπο της Μέγιστης Πιθανοφάνειας (Maximum Likelihood) βασιζόμενο στις γονιδιακές αλληλουχίες που προσδιορίστηκαν για το γονιδιακό τμήμα COI-Barcode (bootstrap: 1000).

Πίνακας 5: Απλότυποι όπως παρουσιάζονται ύστερα από την στατιστική ανάλυση με το λογισμικό DNAsp για το γονιδιακό τμήμα α) 12Sr, β) COI - CJ-NR και γ) COI-Barcode

	12Sr	COI - CJ-NR	COI-Barcode
1	Typhloseiulus_calabriae_ANTARTIKO_1	Typhloseiulus_calabriae_ANTARTIKO_1	T. eleonoraе SIRIKARI 1,3
2	Typhloseiulus_calabriae_ANTARTIKO_2	Typhloseiulus_calabriae_MYKANI_1	T. eleonoraе SIRIKARI 2
3	Typhloseiulus_calabriae_FYLAKTI_1	Typhloseiulus_calabriae_TRIZOLO_1	T. eleonoraе SIRIKARI 4
4	Typhloseiulus_calabriae_MYKANI_1	Typhloseiulus_calabriae_TRIZOLO_2	T. eleonoraе SIRIKARI 5
5	Typhloseiulus_calabriae_MYKANI_2	Typhloseiulus_calabriae_VOTONOSI_1	T. eleonoraе STAVRODROMI 1,3
6	Typhloseiulus_calabriae_TRIZOLO_1	Typhloseiulus_calabriae_FYLAKTI_1	T. eleonoraе STAVRODROMI 2,4,5
7	Typhloseiulus_calabriae_VOTONOSI_1	Typhloseiulus_calabriae_FYLAKTI_2	T. eliahuswirskii SIRIKARI 1-5
8	Typhloseiulus_carmonae_FYLAKTI_1	Typhloseiulus_carmonae_FYLAKTI_2	T. peculiaris PARNITHA 1-5
9	Typhloseiulus_carmonae_FYLAKTI_2	Typhloseiulus_carmonae_FYLAKTI_3	
10	Typhloseiulus_carmonae_FYLAKTI_3	Typhloseiulus_carmonae_PANOURIAS_1	
11	Typhloseiulus_carmonae_PANOURIAS_1	Typhloseiulus_carmonae_PANOURIAS_2	
12	Typhloseiulus_carmonae_PANOURIAS_2	Typhloseiulus_carmonae_PARNITHA_1	
13	Typhloseiulus_carmonae_PARNITHA_1	Typhloseiulus_eliahuswirskii_MILIA_1	
14	Typhloseiulus_eleonoraе_SIRIKARI_1	Typhloseiulus_eliahuswirskii_MILIA_2	
15	Typhloseiulus_eleonoraе_SIRIKARI_3	Typhloseiulus_eliahuswirskii_OAKA_1	
16	Typhloseiulus_eleonoraе_STAVRODROMI_1	Typhloseiulus_eliahuswirskii_SIRIKARI_2	
17	Typhloseiulus_eleonoraе_STAVRODROMI_2	Typhloseiulus_eliahuswirskii_STEMNITSA_1	
18	Typhloseiulus_eleonoraе_STAVRODROMI_3	Typhloseiulus_eliahuswirskii_TSAGARADA_1	
19	Typhloseiulus_eliahuswirskii_OAKA_1	Typhloseiulus_eliahuswirskii_TSAGARADA_2	
20	Typhloseiulus_eliahuswirskii_MILIA_1	Typhloseiulus_eliahuswirskii_XOREFTO_2	
21	Typhloseiulus_eliahuswirskii_SIRIKARI_1	Typhloseiulus_eliahuswirskii_XOREFTO_3	
22	Typhloseiulus_eliahuswirskii_SIRIKARI_2	Typhloseiulus_erymanthii_AG.TRIADA-LAS_1	
23	Typhloseiulus_erymanthii_AGTRIADA_1	Typhloseiulus_erymanthii_VLASSIA_1	
24	Typhloseiulus_erymanthii_AGTRIADA_2	Typhloseiulus_peculiaris_ANOIXI_1_pub	
25	Typhloseiulus_erymanthii_KALAVRYTA_1	Typhloseiulus_peculiaris_ANOIXI_2_pub	
26	Typhloseiulus_erymanthii_KALAVRYTA_2	Typhloseiulus_peculiaris_ANOIXI_1_mac	
27	Typhloseiulus_erymanthii_VLASSIA_3	Typhloseiulus_peculiaris_KIPOURIO_1	
28	Typhloseiulus_peculiaris_ANOIXI_1	Typhloseiulus_peculiaris_PARNITHA_1	
29	Typhloseiulus_peculiaris_ANOIXI_2	Typhloseiulus_rodopiensis_ANTHIRO_1	
30	Typhloseiulus_peculiaris_ANOIXI_3	Typhloseiulus_rodopiensis_ANTHIRO_2	
31	Typhloseiulus_peculiaris_KIPOURIO_1	Typhloseiulus_rodopiensis_FOLOI_2	
32	Typhloseiulus_peculiaris_KIPOURIO_2	Typhloseiulus_rodopiensis_FOLOI_3	
33	Typhloseiulus_peculiaris_PARNITHA_1	Typhloseiulus_rodopiensis_KATOUSI_1	
34	Typhloseiulus_peculiaris_VATHEIA_1	Typhloseiulus_rodopiensis_KATOUSI_2	
35	Typhloseiulus_rodopiensis_ANTHIRO_1	Typhloseiulus_rodopiensis_KATOUSI_3	
36	Typhloseiulus_rodopiensis_ANTHIRO_2	Typhloseiulus_rodopiensis_LAMPPIA_1	
37	Typhloseiulus_rodopiensis_FOLOI_1	Typhloseiulus_rodopiensis_LAMPPIA_2	
38	Typhloseiulus_rodopiensis_FOLOI_2	Typhloseiulus_rodopiensis_LAMPPIA_3	
39	Typhloseiulus_rodopiensis_KATOUSI_1	Typhloseiulus_rodopiensis_LOUVRO_1	
40	Typhloseiulus_rodopiensis_KATOUSI_2	Typhloseiulus_rodopiensis_OXYA_1	
41	Typhloseiulus_rodopiensis_LAMPPIA_2	Typhloseiulus_rodopiensis_PARNITHA_1_aeg	
42	Typhloseiulus_rodopiensis_LOUVRO_1	Typhloseiulus_rodopiensis_PARNITHA_3_ilex	
43	Typhloseiulus_rodopiensis_LOUVRO_2	Typhloseiulus_rodopiensis_PITHARI_1	
44	Typhloseiulus_rodopiensis_OXYA_1	Typhloseiulus_rodopiensis_PORTARIA_1	
45	Typhloseiulus_rodopiensis_PARNITHA_1_aeg	Typhloseiulus_rodopiensis_TRIPOTAMA_1	
46	Typhloseiulus_rodopiensis_PARNITHA_1_ilex	Typhloseiulus_rodopiensis_TRIPOTAMA_2	
47	Typhloseiulus_rodopiensis_PARNITHA_3_ilex	Typhloseiulus_rodopiensis_TRIPOTAMA_3	
48	Typhloseiulus_rodopiensis_PORTARIA_3	Typhloseiulus_rodopiensis_SKLITHRO_1	
49	Typhloseiulus_rodopiensis_TRIPOTAMA_1	Typhloseiulus_rodopiensis_SKLITHRO_3	

α

[1]	nt_9	[2]	nt_14	[3]	nt_19	[4]	nt_22	[5]	nt_24	[6]	nt_26	[7]	nt_27	[8]	nt_28	[9]	nt_29	[10]	nt_30
[11]	nt_31	[12]	nt_32	[13]	nt_33	[14]	nt_34	[15]	nt_37	[16]	nt_38	[17]	nt_39	[18]	nt_40	[19]	nt_41	[20]	nt_43
[21]	nt_44	[22]	nt_45	[23]	nt_46	[24]	nt_47	[25]	nt_49	[26]	nt_51	[27]	nt_57	[28]	nt_58	[29]	nt_59	[30]	nt_60
[31]	nt_62	[32]	nt_64	[33]	nt_66	[34]	nt_77	[35]	nt_81	[36]	nt_88	[37]	nt_89	[38]	nt_92	[39]	nt_105	[40]	nt_114
[41]	nt_115	[42]	nt_116	[43]	nt_119	[44]	nt_120	[45]	nt_121	[46]	nt_122	[47]	nt_123	[48]	nt_124	[49]	nt_125	[50]	nt_126
[51]	nt_130	[52]	nt_131	[53]	nt_132	[54]	nt_133	[55]	nt_134	[56]	nt_137	[57]	nt_138	[58]	nt_143	[59]	nt_144	[60]	nt_145
[61]	nt_146	[62]	nt_147	[63]	nt_148	[64]	nt_151	[65]	nt_153	[66]	nt_154	[67]	nt_157	[68]	nt_159	[69]	nt_160	[70]	nt_167
[71]	nt_168	[72]	nt_171	[73]	nt_172	[74]	nt_176	[75]	nt_180	[76]	nt_182	[77]	nt_184	[78]	nt_185	[79]	nt_186	[80]	nt_187
[81]	nt_188	[82]	nt_190	[83]	nt_192	[84]	nt_193	[85]	nt_194	[86]	nt_195	[87]	nt_196	[88]	nt_197	[89]	nt_198	[90]	nt_208
[91]	nt_212	[92]	nt_215	[93]	nt_216	[94]	nt_217	[95]	nt_226	[96]	nt_228	[97]	nt_229	[98]	nt_244	[99]	nt_250	[100]	nt_251
[101]	nt_254	[102]	nt_255	[103]	nt_256	[104]	nt_257	[105]	nt_265	[106]	nt_266	[107]	nt_268	[108]	nt_269	[109]	nt_272	[110]	nt_277
[111]	nt_278	[112]	nt_279	[113]	nt_280	[114]	nt_282	[115]	nt_283	[116]	nt_285	[117]	nt_286	[118]	nt_292	[119]	nt_293	[120]	nt_296
[121]	nt_297	[122]	nt_298	[123]	nt_299	[124]	nt_300	[125]	nt_301	[126]	nt_302	[127]	nt_303	[128]	nt_304	[129]	nt_305	[130]	nt_307
[131]	nt_308	[132]	nt_309	[133]	nt_310	[134]	nt_317	[135]	nt_326	[136]	nt_329	[137]	nt_330	[138]	nt_340				

β

[1]	nt_2	[2]	nt_5	[3]	nt_6	[4]	nt_8	[5]	nt_17	[6]	nt_20	[7]	nt_23	[8]	nt_25	[9]	nt_26	[10]	nt_30
[11]	nt_32	[12]	nt_33	[13]	nt_35	[14]	nt_38	[15]	nt_41	[16]	nt_44	[17]	nt_45	[18]	nt_47	[19]	nt_48	[20]	nt_50
[21]	nt_51	[22]	nt_53	[23]	nt_54	[24]	nt_56	[25]	nt_59	[26]	nt_60	[27]	nt_61	[28]	nt_62	[29]	nt_63	[30]	nt_65
[31]	nt_66	[32]	nt_67	[33]	nt_68	[34]	nt_71	[35]	nt_72	[36]	nt_73	[37]	nt_74	[38]	nt_77	[39]	nt_78	[40]	nt_80
[41]	nt_83	[42]	nt_85	[43]	nt_86	[44]	nt_89	[45]	nt_92	[46]	nt_95	[47]	nt_98	[48]	nt_101	[49]	nt_102	[50]	nt_104
[51]	nt_107	[52]	nt_114	[53]	nt_116	[54]	nt_119	[55]	nt_120	[56]	nt_122	[57]	nt_124	[58]	nt_125	[59]	nt_126	[60]	nt_128
[61]	nt_130	[62]	nt_131	[63]	nt_138	[64]	nt_141	[65]	nt_142	[66]	nt_143	[67]	nt_146	[68]	nt_149	[69]	nt_152	[70]	nt_153
[71]	nt_155	[72]	nt_158	[73]	nt_161	[74]	nt_167	[75]	nt_168	[76]	nt_170	[77]	nt_173	[78]	nt_174	[79]	nt_179	[80]	nt_182
[81]	nt_183	[82]	nt_184	[83]	nt_185	[84]	nt_186	[85]	nt_187	[86]	nt_188	[87]	nt_191	[88]	nt_192	[89]	nt_194	[90]	nt_200
[91]	nt_201	[92]	nt_203	[93]	nt_209	[94]	nt_215	[95]	nt_217	[96]	nt_218	[97]	nt_224	[98]	nt_225	[99]	nt_227	[100]	nt_230
[101]	nt_236	[102]	nt_238	[103]	nt_245	[104]	nt_246	[105]	nt_247	[106]	nt_248	[107]	nt_250	[108]	nt_251	[109]	nt_254	[110]	nt_257
[111]	nt_258	[112]	nt_259	[113]	nt_261	[114]	nt_263	[115]	nt_264	[116]	nt_266	[117]	nt_267	[118]	nt_269	[119]	nt_272	[120]	nt_275
[121]	nt_281	[122]	nt_282	[123]	nt_284	[124]	nt_287	[125]	nt_290	[126]	nt_293	[127]	nt_296	[128]	nt_299	[129]	nt_300	[130]	nt_302
[131]	nt_303	[132]	nt_306	[133]	nt_308	[134]	nt_309	[135]	nt_311	[136]	nt_314	[137]	nt_320	[138]	nt_323	[139]	nt_329	[140]	nt_332
[141]	nt_335	[142]	nt_338	[143]	nt_341	[144]	nt_345	[145]	nt_347	[146]	nt_348	[147]	nt_350	[148]	nt_352	[149]	nt_353	[150]	nt_356
[151]	nt_359	[152]	nt_362	[153]	nt_365	[154]	nt_371	[155]	nt_372	[156]	nt_374	[157]	nt_377	[158]	nt_380	[159]	nt_383	[160]	nt_389
[161]	nt_395	[162]	nt_401	[163]	nt_404	[164]	nt_405	[165]	nt_407	[166]	nt_408	[167]	nt_410	[168]	nt_413	[169]	nt_416	[170]	nt_420
[171]	nt_431	[172]	nt_434	[173]	nt_437	[174]	nt_440	[175]	nt_443	[176]	nt_449	[177]	nt_452	[178]	nt_455	[179]	nt_456	[180]	nt_458
[181]	nt_461	[182]	nt_462	[183]	nt_464	[184]	nt_467	[185]	nt_473	[186]	nt_476	[187]	nt_479	[188]	nt_482	[189]	nt_485	[190]	nt_488
[191]	nt_489	[192]	nt_491	[193]	nt_492	[194]	nt_494	[195]	nt_495	[196]	nt_497	[197]	nt_500	[198]	nt_501	[199]	nt_502	[200]	nt_503
[201]	nt_506	[202]	nt_509	[203]	nt_512	[204]	nt_513	[205]	nt_514	[206]	nt_515	[207]	nt_521	[208]	nt_524	[209]	nt_527	[210]	nt_529
[211]	nt_530	[212]	nt_531	[213]	nt_533	[214]	nt_536	[215]	nt_542	[216]	nt_545	[217]	nt_548	[218]	nt_552	[219]	nt_554	[220]	nt_555
[221]	nt_563	[222]	nt_564	[223]	nt_566	[224]	nt_567	[225]	nt_569	[226]	nt_572	[227]	nt_575	[228]	nt_581	[229]	nt_587	[230]	nt_590
[231]	nt_593	[232]	nt_599	[233]	nt_603	[234]	nt_605	[235]	nt_608	[236]	nt_611	[237]	nt_613	[238]	nt_615	[239]	nt_617	[240]	nt_620
[241]	nt_623	[242]	nt_626	[243]	nt_629	[244]	nt_632	[245]	nt_638	[246]	nt_639	[247]	nt_641	[248]	nt_642	[249]	nt_644	[250]	nt_647
[251]	nt_656	[252]	nt_659	[253]	nt_662	[254]	nt_668	[255]	nt_674	[256]	nt_683	[257]	nt_686	[258]	nt_689	[259]	nt_690	[260]	nt_692
[261]	nt_693	[262]	nt_695	[263]	nt_698	[264]	nt_699	[265]	nt_701	[266]	nt_703	[267]	nt_704	[268]	nt_707	[269]	nt_710	[270]	nt_711
[271]	nt_712	[272]	nt_713	[273]	nt_716	[274]	nt_726	[275]	nt_727	[276]	nt_728	[277]	nt_729	[278]	nt_731	[279]	nt_734	[280]	nt_735
[281]	nt_739	[282]	nt_740	[283]	nt_742	[284]	nt_743	[285]	nt_744	[286]	nt_745	[287]	nt_746	[288]	nt_748	[289]	nt_751	[290]	nt_753
[291]	nt_756	[292]	nt_757	[293]	nt_758	[294]	nt_759	[295]	nt_761	[296]	nt_764	[297]	nt_765	[298]	nt_767	[299]	nt_768	[300]	nt_773
[301]	nt_774	[302]	nt_776	[303]	nt_779	[304]	nt_782	[305]	nt_788	[306]	nt_791	[307]	nt_792	[308]	nt_794	[309]	nt_795	[310]	nt_797
[311]	nt_800	[312]	nt_803	[313]	nt_806	[314]	nt_809	[315]	nt_812	[316]	nt_815	[317]	nt_817	[318]	nt_818	[319]	nt_819	[320]	nt_821
[321]	nt_822	[322]	nt_823	[323]	nt_824	[324]	nt_827	[325]	nt_830	[326]	nt_836	[327]	nt_842	[328]	nt_845	[329]	nt_848		

γ

[1]	nt_1	[2]	nt_2	[3]	nt_3	[4]	nt_4	[5]	nt_5	[6]	nt_6	[7]	nt_7	[8]	nt_8	[9]	nt_10	[10]	nt_11
[11]	nt_13	[12]	nt_14	[13]	nt_16	[14]	nt_17	[15]	nt_18	[16]	nt_19	[17]	nt_21	[18]	nt_22	[19]	nt_23	[20]	nt_28
[21]	nt_29	[22]	nt_30	[23]	nt_31	[24]	nt_32	[25]	nt_40	[26]	nt_41	[27]	nt_43	[28]	nt_46	[29]	nt_47	[30]	nt_49
[31]	nt_52	[32]	nt_55	[33]	nt_56	[34]	nt_58	[35]	nt_60	[36]	nt_61	[37]	nt_64	[38]	nt_67	[39]	nt_70	[40]	nt_72
[41]	nt_73	[42]	nt_74	[43]	nt_76	[44]	nt_77	[45]	nt_78	[46]	nt_79	[47]	nt_82	[48]	nt_87	[49]	nt_88	[50]	nt_89
[51]	nt_91	[52]	nt_93	[53]	nt_94	[54]	nt_97	[55]	nt_98	[56]	nt_100	[57]	nt_103	[58]	nt_104	[59]	nt_106	[60]	nt_118
[61]	nt_136	[62]	nt_142	[63]	nt_151	[64]	nt_157	[65]	nt_163	[66]	nt_166	[67]	nt_172	[68]	nt_173	[69]	nt_174	[70]	nt_175
[71]	nt_179	[72]	nt_181	[73]	nt_185	[74]	nt_187	[75]	nt_190	[76]	nt_193	[77]	nt_196	[78]	nt_199	[79]	nt_205	[80]	nt_214
[81]	nt_229	[82]	nt_231	[83]	nt_236	[84]	nt_238	[85]	nt_239	[86]	nt_241	[87]	nt_244	[88]	nt_247	[89]	nt_250	[90]	nt_251
[91]	nt_253	[92]	nt_254	[93]	nt_259	[94]	nt_260	[95]	nt_265	[96]	nt_266	[97]	nt_267	[98]	nt_268	[99]	nt_271	[100]	nt_272
[101]	nt_275	[102]	nt_276	[103]	nt_277	[104]	nt_278	[105]	nt_280	[106]	nt_283	[107]	nt_284	[108]	nt_286	[109]	nt_292	[110]	nt_295
[111]	nt_298	[112]	nt_301	[113]	nt_307	[114]	nt_313	[115]	nt_322	[116]	nt_325	[117]	nt_328	[118]	nt_330	[119]	nt_331	[120]	nt_332
[121]	nt_333	[122]	nt_334	[123]	nt_337	[124]	nt_341	[125]	nt_342	[126]	nt_347	[127]	nt_348	[128]	nt_349	[129]	nt_351	[130]	nt_352
[131]	nt_353	[132]	nt_354	[133]	nt_355	[134]	nt_358	[135]	nt_359	[136]	nt_361	[137]	nt_362	[138]	nt_363	[139]	nt_364	[140]	nt_374
[141]	nt_376	[142]	nt_380	[143]	nt_385	[144]	nt_388	[145]	nt_392	[146]	nt_393	[147]	nt_397	[148]	nt_407	[149]	nt_409	[150]	nt_415
[151]	nt_423	[152]	nt_424	[153]	nt_427	[154]	nt_431	[155]	nt_436	[156]	nt_442	[157]	nt_444	[158]	nt_445	[159]	nt_451	[160]	nt_452
[161]	nt_453	[162]	nt_454	[163]	nt_455	[164]	nt_456	[165]	nt_457	[166]	nt_466	[167]	nt_467	[168]	nt_469	[169]	nt_472	[170]	nt_473
[171]	nt_478	[172]	nt_480	[173]	nt_481	[174]	nt_493	[175]	nt_495	[176]	nt_496	[177]	nt_499	[178]	nt_502	[179]	nt_506	[180]	nt_508
[181]	nt_509	[182]	nt_511	[183]	nt_512	[184]	nt_514	[185]	nt_515	[186]	nt_517	[187]	nt_520	[188]	nt_521	[189]	nt_526	[190]	nt_528
[191]	nt_529	[192]	nt_530	[193]	nt_535	[194]	nt_538	[195]	nt_541	[196]	nt_544	[197]	nt_551	[198]	nt_553	[199]	nt_554	[200]	nt_556
[201]	nt_562	[202]	nt_565	[203]	nt_571	[204]	nt_577	[205]	nt_578	[206]	nt_580	[207]	nt_586	[208]	nt_589	[209]	nt_595	[210]	nt_598
[211]	nt_601	[212]	nt_610	[213]	nt_613	[214]	nt_616	[215]	nt_619										

Εικόνα 32: Σημεία πολυμορφισμών στις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες, από τις οποίες καθορίζονται και οι απλότυποι για το γονιδιακό τμήμα α) 12Sr, β) COI και γ) COI-Barcode.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η αντιμετώπιση των φυτοφάγων εχθρών που προσβάλλουν διάφορες καλλιέργειες μπορεί να γίνει με τους κατάλληλους βιολογικούς παράγοντες, που η ορθή αναγνώρισή τους είναι μείζονος σημασίας για τη βιωσιμότητα και την αποδοτικότητα της καλλιέργειας. Τέτοιοι παράγοντες είναι και πολλά ακάρεα της οικογένειας Phytoseiidae, κάποια είδη εκ των οποίων ομοιάζουν πολύ μεταξύ τους, με αποτέλεσμα η διάκρισή τους με βάση μόνο τα μορφολογικά χαρακτηριστικά να μην είναι αρκετή. Μία τέτοια περίπτωση είναι το γένος *Typhloseiulus* που εξετάζεται σε αυτή τη μελέτη και στο οποίο τα διάφορα είδη διακρίνονται μεταξύ τους κυρίως βάσει της χαιτοταξίας τους.

Οι πιο σύγχρονες κλείδες που αναφέρονται στο συγκεκριμένο γένος είναι δύο και περιγράφονται από τους Papadoulis et al., 2009 και Faraji et al., 2007 (Εικόνα 12). Ωστόσο, αυτή που χρησιμοποιήθηκε είναι αυτή των Papadoulis et al., 2009, καθώς περιέχει τα 8 είδη που εντοπίζονται στην Ελλάδα. Σε κάθε περίπτωση υπήρξε “επιβεβαίωση” και με τη δεύτερη κλείδα, τουλάχιστον στις πρώτες αναγνωρίσεις που πραγματοποιήθηκαν, καταλήγοντας στα ίδια συμπεράσματα - είδη.

Το επόμενο πειραματικό κομμάτι που πραγματοποιήθηκε αφορούσε την ανάλυση και τον προσδιορισμό αλληλουχίας γονιδιακών τμημάτων μιτοχονδρικού DNA. Εφαρμόζοντας τις μοριακές τεχνικές, στόχος ήταν η διερεύνηση μίας αποτελεσματικής μεθόδου ώστε να διακρίνονται τα διάφορα είδη του γένους, τα οποία μοιάζουν πολύ ως προς τα μορφολογικά χαρακτηριστικά τους. Παράλληλα με τις αναγνωρίσεις και τη χρήση κλειδών, χρησιμοποιήθηκαν τρεις νέοι μοριακοί δείκτες (12srDNA, COI – CJ-NR και COI-barcode) για τον προσδιορισμό των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών. Και οι τρεις υπάγονται στο μιτοχονδριακό DNA και εφαρμόστηκαν με επιτυχία, σε αντίθεση με κάποιους δείκτες πυρηνικού DNA οι οποίοι δεν έδωσαν ενθαρρυντικά και χρήσιμα αποτελέσματα. Τα τρία γονιδιακά τμήματα που επιλέχθηκαν δεν έχουν εφαρμοστεί ξανά σε ερευνητικό επίπεδο για τα συγκεκριμένα είδη, παρά μόνο σε κάποιες άλλες περιπτώσεις ακάρεων (Tixier et al., 2008a, b; Hinomoto et al., 2010; Kanouh et al., 2010a, b) και οι πληροφορίες που παρέχουν είναι σημαντικές. Επιπλέον, νέα είναι και η προσπάθεια που γίνεται για εύρεση ομοιοτήτων και διαφορών σε επίπεδο πληθυσμών εντός του κάθε είδους.

Από την στατιστική ανάλυση που έγινε φαίνεται ότι υπάρχει ομοιότητα μεταξύ της κλασικής ταξινόμησης και των μοριακών δεικτών ως προς τη διάκριση των 7 ειδών που συλλέχθηκαν στις διάφορες δειγματοληψίες, όμως δύναται να σκεφτεί κανείς ότι παρατηρώντας

τον τρόπο με τον οποίο απομακρύνεται ή συγκλίνει το ένα είδος από το άλλο στα φυλογενετικά δένδρα που κατασκευάστηκαν, θα μπορούσε να μορφοποιηθεί διαφορετικά η κλείδα για το συγκεκριμένο γένος. Συγκρίνοντας τις 2 κλείδες που χρησιμοποιήθηκαν, φαίνεται ότι η κλείδα των Faraji et al. (2007) είναι πιο κοντά στην εικόνα που παρουσιάζουν τα φυλογενετικά δένδρα, τα οποία κατασκευάστηκαν με αλληλουχίες που προέκυψαν από τους συγκεκριμένους τρεις μοριακούς δείκτες.

Σε επίπεδο πληθυσμών, εντός του ίδιου είδους δεν υπάρχει ξεκάθαρη εικόνα. Φαίνεται ότι όσο περισσότεροι πληθυσμοί εντός του ίδιου είδους έχουν αναλυθεί, τόσο πιο πολύ περιπλέκονται τα συμπεράσματα. Για τον λόγο αυτό θα ήταν πιο κατατοπιστικό αν για το κάθε είδος δημιουργούνταν ένα φυλογενετικό δένδρο ώστε να εξαχθούν πιο ασφαλή συμπεράσματα. Όμως, σε μια τέτοια προσπάθεια που έγινε για το είδος *T. rodopiensis*, που συλλέχθηκε και σε περισσότερες περιοχές ή εποχές, δεν υπήρξε ιδιαίτερα διαφορετική εικόνα ώστε να καθιστά επιτακτική την δημιουργία ξεχωριστών φυλογενετικών δένδρων. Φαίνεται δηλαδή ότι με τους συγκεκριμένους μοριακούς δείκτες δεν είναι εύκολη η διάκριση πληθυσμών εντός του είδους, ανάλογα με τη γεωγραφική τους προέλευση. Ίσως με τη συλλογή περισσότερων πληθυσμών και στα υπόλοιπα είδη, αλλά και με τη δειγματοληψία τους να γίνεται περίπου την ίδια εποχή, να είναι δυνατή η διάκρισή τους.

Είναι γεγονός ότι οι μεγαλύτεροι πληθυσμοί συλλέχθηκαν την περίοδο του καλοκαιριού, ενώ υπήρξαν λίγες περιπτώσεις όπου πληθυσμοί δεν εξετάστηκαν καν καθώς τα άτομά τους ήταν ελάχιστα (λιγότερα από πέντε σε αριθμό). Αυτοί οι προβληματικοί πληθυσμοί συλλέχθηκαν κυρίως την περίοδο του χειμώνα ή σε περιοχή όπου υπήρχε μόνο ένα φυτό. Είναι λογικό ότι όσο μεγαλύτερος είναι ο πληθυσμός, τόσο μεγαλύτερες ομοιότητες θα έχουν τα άτομα μεταξύ τους καθώς πιθανότατα προέρχονται από κοινούς ή “συγγενείς” γονείς. Αντίθετα, στους μικρούς πληθυσμούς που εντοπίζονται τον χειμώνα, αυτοί αποτελούνται κυρίως από διαχειμάζουσες μορφές (ακμαία θηλυκά άτομα), οι οποίες διαφέρουν αρκετά μεταξύ τους. Το συγκεκριμένο επιβεβαιώνεται και από τις γενετικές τους αποστάσεις, όπως αυτές υπολογίστηκαν κατά την στατιστική ανάλυση.

Οι γενετικές αποστάσεις από το ένα είδος στο άλλο είναι μεγαλύτερες απ’ ότι στους πληθυσμούς του ενός. Ακόμα, στα φυλογενετικά δένδρα οι κύριοι κλάδοι που δημιουργούνται αντιπροσωπεύουν τα είδη και πάλι διαχωρίζοντάς τα ευκρινώς. Συγκρίνοντας τους τρεις μοριακούς δείκτες φαίνεται ότι ο συνδυασμός τους μπορεί να δώσει με ιδιαίτερη αξιοπιστία την ονομασία ενός είδους στο υπό ανάλυση γένος. Επιπλέον, ο δείκτης COI-Barcode δίνει εντυπωσιακά αποτελέσματα στο είδος *T. eleonora*, ενώ οι άλλοι σχεδόν αποτυγχάνουν για το συγκεκριμένο είδος. Αντιλαμβάνεται κανείς ότι έχοντας αυτό το εργαλείο, μπορεί αμέσως να

προσδιοριστεί εάν κάποιο άτομο ανήκει στο είδος αυτό, εφαρμόζοντας μόνο έναν δείκτη, τον COI-Barcode. Ενώ η συγκεκριμένη γονιδιακή αλληλουχία εξετάστηκε σε τουλάχιστον ένα πληθυσμό ανά είδος, δεν έδωσε τόσο καλά αποτελέσματα σε όλα, και μάλιστα στις δύο άλλες περιπτώσεις που πήραμε αποτελέσματα (*T. eliahuswirskii* και *T. peculiaris*), αυτά δεν ήταν ιδιαίτερα αξιόπιστα καθώς οι αλληλουχίες είχαν αρκετά κενά ή λάθη. Εκτός αυτού θα μπορούσε να καταγραφεί ότι τα δύο αυτά είδη φέρονται να είναι πιο συγγενή με το *T. eleonora* σε σχέση με τα υπόλοιπα τέσσερα.

Εξετάζοντας μία άλλη πλευρά του θέματος, ιδιαίτερη εντύπωση προκαλεί ο μεγάλος αριθμός των απλότυπων που παρατηρήθηκαν ανά γονίδιο (49). Η ερμηνεία που μπορεί να δοθεί είναι ότι αφενός υπάρχει μεγάλη παραλλακτικότητα εντός των πληθυσμών σε κάθε είδος και αφετέρου οι γονείς σε κάθε πληθυσμό-αποικία είναι πολλοί και κυρίως τα θηλυκά από τα οποία θα προκύψουν οι απόγονοι. Εκτός των άλλων δεν αποκλείεται και η περίπτωση κάποια από τα άτομα να έχουν υποστεί μεταλλάξεις οι οποίες διαφοροποιούν αρκετά το γενετικό τους υλικό.

Αξιολογώντας τις γονιδιακές αλληλουχίες και τις διαφορές που βρέθηκαν στα νουκλεοτίδιά τους κατά την στατιστική ανάλυση, ο δείκτης 12Sr με 138 στα 341bp (2,47%) είναι ελάχιστα κατώτερος από τον COI - CJ-NR με 329/865bp (2,63%), ως προς την ικανότητα διάκρισης των ειδών. Αξίζει να καταγραφεί ότι με τον πρώτο δείκτη εξετάστηκαν και ελήφθησαν αξιόλογα αποτελέσματα για 195 αλληλουχίες (39 πληθυσμοί), 20 λιγότερες σε σχέση με τον COI - CJ-NR (35 πληθυσμοί). Έλεγχος περισσότερων πληθυσμών με τον δεύτερο δείκτη ίσως να του δώσει προβάδισμα ως προς την ιδιότητα αυτή.

Ακόμα, έχει παρατηρηθεί ότι κάποια είδη προτιμούν να βρίσκονται σε συγκεκριμένα φυτά ξενιστές, όπως το είδος *T. eleonora* που έχει βρεθεί μόνο σε δένδρα αριάς (*Q. ilex*) και το *T. erymanthii* σε πουρνάρι (*Q. coccifera*). Όμως, επειδή στον ίδιο ξενιστή υπάρχει περίπτωση να φιλοξενοούνται και άλλα είδη, όπως το *T. rodopiensis*, ο ξενιστής δεν είναι ασφαλές κριτήριο για τον προσδιορισμό του είδους, αν και μας δίνει μία σωστή κατεύθυνση και μία επιπλέον σημαντική πληροφορία.

Συμπερασματικά, είναι ξεκάθαρο ότι οι μοριακοί δείκτες που επιλέχθηκαν στην παρούσα μελέτη είναι ικανοί να διακρίνουν τα είδη του γένους *Typhloseiulus* μεταξύ τους. Φαίνεται να είναι αναγκαίος ο συνδυασμός και των τριών ώστε να καταλήξει κάποιος σε καλύτερα συμπεράσματα, ενώ ο συνδυασμός της κλασικής συστηματικής με την εφαρμογή των μοριακών τεχνικών είναι ιδανικός. Σχετικά με τους δείκτες, και οι τρεις δίνουν σημαντικές πληροφορίες τόσο για τα είδη όσο και για τους πληθυσμούς, με τη δεύτερη περίπτωση να πρέπει να διερευνηθεί ακόμα περισσότερο και σε περισσότερους πληθυσμούς. Επιπρόσθετα, ίσως θα ήταν χρήσιμο να διερευνηθεί η εφαρμογή περιοριστικών ενζύμων, τουλάχιστον στους δύο

δείκτες μιας και ο COI-Barcode, μπορεί να προσδιορίσει αυτούσιος το είδος *T. eleonora*. Με αυτόν τον τρόπο και λαμβάνοντας υπόψη τον αριθμό των διαφορετικών νουκλεοτιδίων που έχουν καταγραφεί είναι σαφές ότι υπάρχουν κάποια σημεία ή κάποιοι συνδυασμοί σημείων που είναι αντιπροσωπευτικοί για κάθε είδος. Έτσι, τα κατάλληλα περιοριστικά ένζυμα μπορούν να εντοπίσουν τα σημεία αυτά, να “κόψουν” τη γονιδιακή αλληλουχία και να παράξουν δύο ή περισσότερα γονιδιακά τμήματα διαφορετικών μεγεθών. Η ιχνηθέτησή τους και η παρατήρησή τους κατά την ηλεκτροφόρηση θα προσδιορίζει άμεσα το είδος του ακάρεως.

Απαιτείται, λοιπόν, περαιτέρω μελέτη για τη διερεύνηση της ενδοειδικής ποικιλότητας των ειδών και ενδεχομένως τον συσχετισμό της με την βιοοικολογία τους και την περιβαλλοντική τους συμπεριφορά και σημασία. Με την εξέταση περισσότερων πληθυσμών σε κάθε είδος και τις συγκρίσεις μεταξύ τους θα μπορούσε στο μέλλον να δοθεί κάποια σχετική απάντηση.

**ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΙΔΟΥΣ ΑΠΟ ΟΛΑ ΤΑ
ΣΤΑΔΙΑ ΕΝΟΣ ΑΚΑΡΕΩΣ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ
ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ**

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΕΧΘΡΩΝ & ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ

Τόσο η ολοκληρωμένη όσο και η βιολογική αντιμετώπιση προτείνουν εκτός από την εξαπόλυση βιολογικών παραγόντων και τη διατήρηση όσων υπάρχουν στις καλλιέργειες. Μάλιστα, είναι επιθυμητή η ανίχνευση τέτοιων βιολογικών παραγόντων, με τους παραγωγούς να επιδιώκουν και την παραμονή τους στην καλλιέργεια για μεγάλη διάρκεια, ώστε να μην αναγκάζονται να προμηθεύονται συνεχώς νέους οργανισμούς-εμπορικά βιολογικά σκευάσματα, γεγονός που αυξάνει κατά πολύ το τελικό κόστος της καλλιέργειας (αγορά σκευάσματος και εργατοώρες που απαιτούνται για την εφαρμογή του στην καλλιέργεια).

Υπάρχουν περιπτώσεις που ενώ εντοπίζονται τέτοιου είδους οργανισμοί, δε είναι εφικτή η αναγνώριση ως προς το είδος τους με την κλασική συστηματική ταξινόμηση (κλείδες), επειδή τα άτομα αυτά δεν είναι ακμαία. Αποτέλεσμα να μην είναι δυνατός και ασφαλής ο προσδιορισμός τους κι επομένως να είναι αμφίβολη η θετική τους επίδραση. Αυτό όχι μόνο γιατί δεν είναι ο κατάλληλος βιολογικός παράγων για τους φυτοφάγους οργανισμούς που υπάρχουν στην καλλιέργεια, αλλά κι επειδή είναι πιθανό, απουσία λείας να δημιουργήσουν σημαντικά προβλήματα στην ίδια την καλλιέργεια, ακόμα και κανιβαλίζοντας σε άτομα της ίδια οικογένειας ή του ίδιου είδους (Schausberger & Croft, 2000; Schausberger, 2003; de Courcy Williams et al., 2004a). Έχουν καταγραφεί περιπτώσεις όπου οι βιολογικοί παράγοντες τρεφόνται με γύρη, όπως κάποια ακάρεα της οικογένειας Phytoseiidae, μειώνοντας την καρπόδεση ή τη βλαστικότητα της γύρης, ενώ άλλοι, όπως κάποια έντομα του γένους *Orius*, τρέφονται με χυμό από το ίδιο το φυτό, μειώνοντας την ανάπτυξη και την καλή του υγεία (Gurr et al., 2012).

Επιπλέον, η γνώση των οργανισμών που υπάρχουν στην καλλιέργεια ή που έχουν αγοραστεί κι εξαπολυθεί στα πλαίσια της ολοκληρωμένης αντιμετώπισης των εχθρών μίας καλλιέργειας, είναι σημαντική για την καλύτερη επιλογή των χημικών και φυτοπροστατευτικών ουσιών που θα χρησιμοποιηθούν. Κι εδώ γίνεται αναφορά όχι μόνο στο ποιές δραστικές ουσίες και σκευάσματα θα χρησιμοποιηθούν ώστε να μην επηρεάσουν τους ήδη υπάρχοντες πληθυσμούς αρπακτικών και παρασιτοειδών στην καλλιέργεια, αλλά και σε ποια χρονική στιγμή, ώστε οι βιολογικοί παράγοντες να υποστούν την μικρότερη μείωση πληθυσμού (Van

Driesche & Bellows, 1996). Για παράδειγμα, διαφορετική επίδραση έχουν οι χημικές ουσίες στα ωά και τα μικρότερα ηλικιακά στάδια και άλλη στα ακμαία άτομα.

Αντιλαμβάνεται κανείς πόσο σημαντική είναι η σωστή κι έγκαιρη αναγνώριση ενός είδους που υπάρχει σε μία καλλιέργεια ακόμα και αν αυτό βρίσκεται σε διάφορα στάδια. Είναι γεγονός ότι θα μπορούσε το όποιο άτομο βρεθεί στην ατελή του μορφή, να αφήνεται στο εργαστήριο να φτάσει στην ηλικία του ενήλικου ώστε να προσδιοριστεί συστηματικά. Αυτό όμως προϋποθέτει χρόνο και μάλιστα χωρίς να είναι σίγουρο το ότι θα φτάσει στο επιθυμητό στάδιο. Επιπλέον, είναι πιθανό να μην υπάρχει η κατάλληλη τεχνογνωσία η οποία θα επιτρέψει να εφαρμοστεί ώστε να φτάσει στην ενηλικίωση το άτομο. Στοιχεία όπως οι διατροφικές συνήθειες του οργανισμού, οι ιδανικές συνθήκες θερμοκρασίας, σχετικής υγρασίας και φωτοπεριόδου, ο κατάλληλος ξενιστής-φυτό στον οποίο θα πρέπει να διατηρηθεί η εκτροφή κλπ, είναι ιδιαίτερα σημαντικά ώστε να αναπτυχθεί και να περάσει στο επιθυμητό στάδιο του ακμαίου το άτομο που ενδιαφέρει (McMurtry & Croft, 1997).

Μελετώντας το παραπάνω φαινόμενο και την ανάγκη προσδιορισμού των ειδών ακάρεων κι εντόμων ακόμα και στα ατελή τους στάδια, υπάρχει μία τάση εφαρμογής μοριακών τεχνικών προς αυτή την κατεύθυνση. Έχουν γίνει προσπάθειες με επιτυχή αποτελέσματα, σύμφωνα με τις οποίες μπορεί να απομονωθεί γενετικό υλικό από όλα σχεδόν τα στάδια ενός εντόμου, ενώ στα ακάρεα οι προσπάθειες αυτές είναι λιγότερες, λόγω του μικρού τους μεγέθους, καθώς αυτό σημαίνει την ύπαρξη επιμολύνσεων ή κακής ποιότητας γενετικού υλικού. Ωστόσο, αυτό δεν τις καθιστά ανεπιτυχείς, αλλά με πιθανότητες βελτίωσης, ώστε να είναι δυνατή η απομόνωση γενετικού υλικού ακόμα και σε πολύ αρχικά ατελή στάδια, όπως είναι αυτό του ωού. Στη συνέχεια μοριακοί δείκτες και ήδη υπάρχουσες πληροφορίες που έχουν καταχωρηθεί σε παγκόσμιες τράπεζες και βάσεις δεδομένων, οδηγούν με αφάλεια και ταχύτητα στον προσδιορισμό του είδους του υπό ανάλυση ατόμου.

IPHISEIUS DEGENERANS

Έντομα και ακάρεα ποικίλων οικογενειών έχουν χρησιμοποιηθεί κατά καιρούς ως βιολογικοί παράγοντες αρθροπόδων, με κάποια να έχουν μεγαλύτερη απήχηση καθώς καταφέρνουν καλύτερα αποτελέσματα κατά την εφαρμογή τους σε μία καλλιέργεια. Τέτοιοι οργανισμοί συνήθως εκτρέφονται μαζικά, συσκευάζονται από εταιρείες σε βιολογικά σκευάσματα και διανέμονται ανά τον κόσμο με απώτερο σκοπό να φτάσουν σε κάποια καλλιέργεια όπου θα τραφούν με κάποιον φυτοφάγο και ανεπιθύμητο οργανισμό.

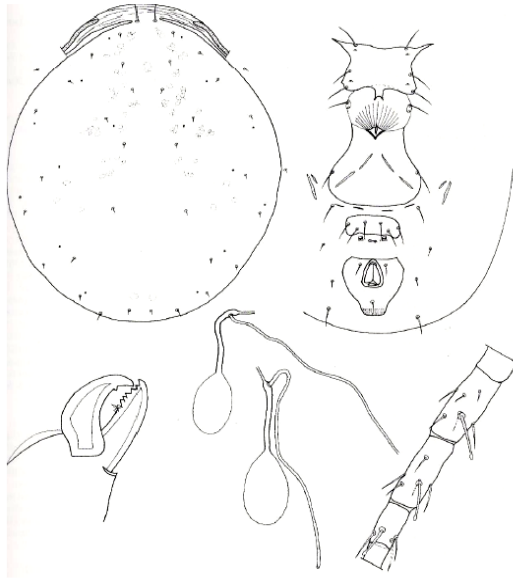
Μία τέτοια περίπτωση είναι το αρπακτικό άκαρι *Iphiseius degenerans* (Berlese) της οικογένειας Phytoseiidae το οποίο έχει μελετηθεί ιδιαίτερα τα τελευταία χρόνια και μάλιστα υπάρχει πλέον και ως εμπορευόμενο σκεύασμα (Vantornhout et al., 2004). Χρησιμοποιείται κυρίως για τη μείωση των πληθυσμών των θριπών (Insecta: Thysanoptera) και κάποιων φυτοφάγων ακάρεων της οικογένειας Tetranychidae (Vantornhout et al., 2005; Tsoukanas et al., 2006; Fantinou et al., 2012). Τρέφεται τόσο με θήραμα όσο και με γύρη, κυρίως όταν το θήραμα απουσιάζει κι εντάσσεται στην κατηγορία θηρευτή τύπου III, δηλαδή τρέφεται σε όλο και μεγαλύτερους πληθυσμούς ατόμων με την αύξηση της λείας αλλά σταματά σε κάποιο σημείο (πλατό), όπου και συνεχίζει την σταθερή πορεία (McMurtry & Croft, 1997; de Courcy Williams et al., 2004b).

Τα άτομα του *I. degenerans* έχουν σφαιρικό σχήμα, μέγεθος 0,6mm και το χρώμα τους ποικίλει από σκούρο καφέ έως μαύρο, θυμίζοντας μαργαριτάρι (**Εικόνα 33**). Τα χαρακτηριστικά που χρησιμοποιούνται κατά τη συστηματική ταξινόμηση ώστε να προσδιοριστεί το είδος είναι η έντονα χιτινισμένη μεμβράνη του μέσου θυρεού, το μικρό μήκος των νωπιαίων τριχών και ο διαχωρισμός του θυρεού σε κοιλιακό και εδρικό (**Εικόνα 34**).



Εικόνα 33: Ακμαίο θηλυκό άτομο του *I. degenerans* τρεφόμενο σε λεία *T. urticae*

Παγκοσμίως, έχει εντοπιστεί σε χώρες όπως η Αλγερία, το Ισραήλ, η Βραζιλία, η Τουρκία, η Πορτογαλία, η Ιταλία, η Ισπανία (Κανάριοι νήσοι), ο Λίβανος, το Μαρόκο, η Νιγηρία, η Κίνα κλπ και σε καλλιέργειες εσπεριδοειδών ή σε αυτοφυή φυτά των γενών *Prunus*, *Ricinus*, *Solanum* και *Rubus*. Στη χώρα μας έχει καταγραφεί σε καλλιέργειες εσπεριδοειδών στο νομό Ιωαννίνων, Άρτας, Πρεβέζης, Μεσολογγίου, Αττικής και Αργολίδος, ενώ στην Άρτα, την Πρέβεζα και το Ναύπλιο έχει βρεθεί σε καλλιέργεια ελιάς (Papadoulis et al., 2009).



Εικόνα 34: Μορφολογικά χαρακτηριστικά του *I. degenerans* όπως προσδιορίζονται κατά την συστηματική ταξινόμηση (Papadoulis et al., 2009).

Ο βιολογικός του κύκλος όπως και όλων των ακάρεων που ανήκουν στην οικογένεια Phytoseiidae, αποτελείται από 5 στάδια ανάπτυξης, ωό, λάρβα, πρωτονύμφη, δευτερονύμφη και ακμαίο, άρρεν ή θήλυ. Όλα τα στάδια πέραν αυτού της λάρβας φέρουν τέσσερα ζεύγη ποδών. Κατά την μετάβαση από το ένα στάδιο στο επόμενο πραγματοποιείται έκδυση με το έκδυμα να σηματοδοτεί την αλλαγή του σταδίου. Οι ιδανικές συνθήκες για την ανάπτυξή του έχουν προσδιοριστεί ως: θερμοκρασία 25°C, σχετική υγρασία 70% και φωτοπερίοδος 16L:8D, όπου μπορεί να ολοκληρώσει τον βιολογικό του κύκλο σε 6,7 ημέρες τρεφόμενο σε διάφορα στάδια του *Tetranychus urticae* Koch, ενώ φαίνεται να αλλάζει στάδια και σε θερμοκρασίες των 12°C (Vantornhout et al., 2005; Tsoukanas et al., 2006).

ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της ερευνητικής αυτής εργασίας είναι η διερεύνηση πρωτοκόλλων με εφαρμογή των μοριακών τεχνικών ώστε να επιτευχθεί απομόνωση γενετικού υλικού και προσδιορισμός του είδους σε όλα τα στάδια ενός αρπακτικού ακάρεως της οικογένειας Phytoseiidae, ξεκινώντας από το ωό και καταλήγοντας στο ακμαίο θηλυκό. Για την διεξαγωγή των πειραμάτων επιλέχθηκε το άκαρι *Iphiseius degenerans* (Berlese), το οποίο μελετάται αρκετά τα τελευταία χρόνια ως προς την επιτυχημένη του αρπακτική ικανότητα σε φυτοφάγα μικροαρθρόποδα, που δημιουργούν προβλήματα σε υπαίθριες και θερμοκηπιακές καλλιέργειες.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

ΣΥΛΛΟΓΗ – ΕΚΤΡΟΦΗ ΑΚΑΡΕΩΝ

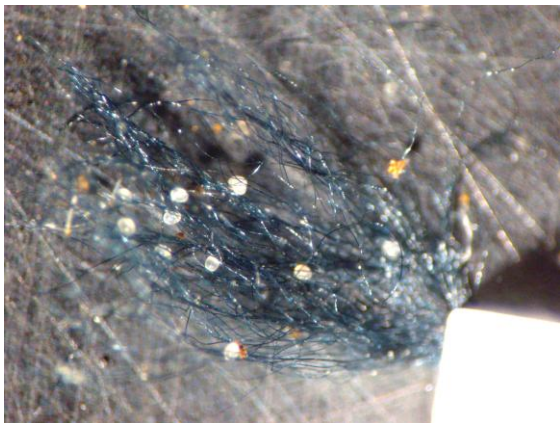
Για την εφαρμογή των μοριακών τεχνικών στη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν ακάρεα του είδους *Iphiseius degenerans* (Berlese) (Acari: Phytoseiidae). Η εκτροφή τους δημιουργήθηκε από άτομα που συλλέχθηκαν τον Οκτώβριο του 2012 σε καλλιέργεια πορτοκαλιάς *Citrus sinensis* var. Valencia στην περιοχή του Μεσολογγίου και διατηρούνταν σε πειραματικά πεδία με συγκεκριμένη κατασκευή, όπως την έχει προτείνει ο Overmeer το 1981 σε σχετική εργασία (Overmeer, 1981). Συγκεκριμένα, αυτή αποτελείται από μια πλάκα plexi glass μαύρου χρώματος (διαστάσεων 23,5 x 8,5 cm) που είχε τοποθετηθεί πάνω σε ένα κομμάτι σφουγγαριού ανθοδετικής (Oasis) όμοιων διαστάσεων. Το πλωτό σύστημα (σφουγγάρι – πλάκα) τοποθετούνταν σε λεκάνη διαστάσεων 26,5 x 15 x 5 cm, η οποία ήταν γεμάτη με νερό.



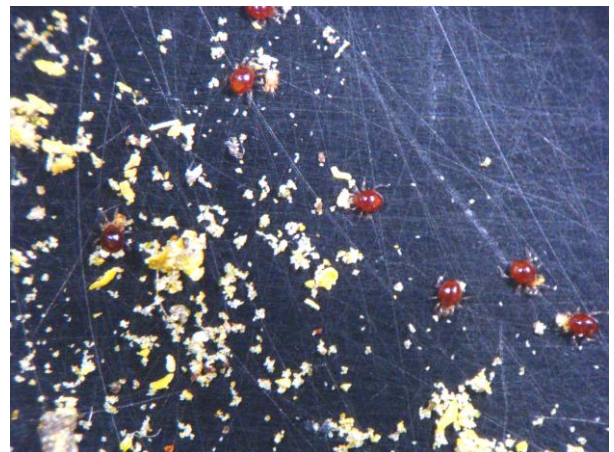
Εικόνα 35: Ομαδικό πεδίο εκτροφής του *I. degenerans* σε γύρη αμυγδαλιάς.

Κατά μήκος των τεσσάρων πλευρών της πλάκας απλώνονταν λωρίδες διηθητικού χαρτιού, αφήνοντας όσο μεγαλύτερο μέρος της πλάκας ελεύθερο και το υπόλοιπο μέρος τους ήταν βυθισμένο συνεχώς στο νερό της λεκάνης. Πάνω στο διηθητικό χαρτί κατασκευαζόταν ένα

«τείχος» βρεγμένου βάμβακος ώστε να διατηρείται κάποια υγρασία στο εσωτερικό του πεδίου, αλλά και να αποτρέπεται η διαφυγή των ατόμων (**Εικόνα 35**). Ακόμη, επί της πλάκας τοποθετούνταν μικρές κατασκευές σχήματος «Π» από διάφανο plexi glass, καθώς και κομμάτια κλωστής, τα οποία χρησίμευαν ως περιοχές εναπόθεσης των ωών (**Εικόνα 36**). Τα ακάρεα τρέφονταν σε γύρη αμυγδαλιάς (*Prunus amygdalus* - Firman Almond Pollen), αλλά και με λεία το φυτοφάγο άκαρι *Tetranychus urticae* δύο φορές την εβδομάδα (**Εικόνα 33, 37**). Οι συνθήκες που επικρατούσαν στους θαλάμους ελεγχόμενων συνθηκών ήταν θερμοκρασία $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, σχετική υγρασία $65\pm 5\%$ και φωτοπερίοδος 16:8 Φ:Σ ώρες, οι οποίες χαρακτηρίζονται ιδανικές σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (Vantornhout et al., 2004; Vantornhout et al., 2005). Η αρχική αναγνώριση του είδους έγινε βάση της κλασικής ταξινόμησης στο στάδιο του ακμαίου (Papadoulis et al., 2009).



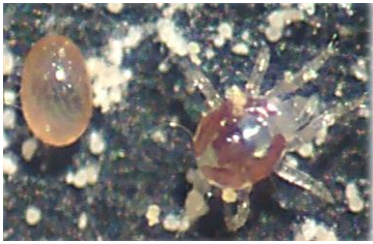
Εικόνα 36: Ωά του *I. degenerans* όπως έχουν τοποθετηθεί από τα ακμαία θηλυκά σε κλωστές στα πεδία εκτροφής.



Εικόνα 37: Ακμαία θηλυκά του είδους *Iphseius degenerans*, όπως φαίνονται στα πεδία εκτροφής τρεφόμενα σε γύρη αμυγδαλιάς.

Πέραν του σταδίου του ωού και της λάρβας, η οποία φέρει τρία ζεύγη ποδών, για τη διάκριση των υπολοίπων σταδίων χρησιμοποιήθηκε ως στοιχείο η παρουσία του εκδύματος που συνηθίζει να αφήνει το άκαρι όταν μεταβαίνει από το ένα ηλικιακό στάδιο στο επόμενο (ωό-λάρβα-πρωτονύμφη-δευτερονύμφη-ακμαίο) (**Εικόνα 38, 39**). Για τον λόγο αυτό οι λάρβες τοποθετούνταν σε μεμονωμένα πεδία, τα οποία αποτελούσαν μικρογραφίες αυτών που έχουν ήδη περιγραφεί, και μόλις εντοπιζόταν κάποιο έκδυμα αυτομάτως είχαν

κατηγοριοποιηθεί στο αντίστοιχο στάδιο, ανάλογα με τον αριθμό των εκδυμάτων που εντοπίζονται. Για την περίπτωση των ακμαίων που προέκυπταν με την παρουσία τριών εκδυμάτων (πρωτονύμφη-δευτερονύμφη-ακμαίο) αυτά διακρίνονταν εύκολα σε θήλυ και άρρεν καθώς το πρώτο έχει μεγαλύτερο μέγεθος αλλά και πιο σφαιρικό σχήμα συγκριτικά με το άρρεν που είναι εμφανώς μικρότερου μεγέθους.



Εικόνα 38: Ωό και λάρβα του *I. degenerans*



Εικόνα 39: Πρωτονύμφη του *I. degenerans*. Διακρίνονται τα τέσσερα ζεύγη ποδών σε σχέση με τα τρία ζεύγη που φέρει η λάρβα

Ύστερα από τον προσδιορισμό του σταδίου, τα άτομα παρέμεναν για 24 ώρες σε ασιτία, τοποθετούνταν ζωντανά σε αλκοόλη 95% και στους -20°C και αφήνονταν εκεί έως ότου χρησιμοποιηθούν στις μοριακές μεθόδους. Συνολικά συλλέχθηκαν 10 άτομα ανά στάδιο (ωό, λάρβα, πρωτονύμφη, δευτερονύμφη, ακμαίο αρσενικό, ακμαίο θηλυκό) και απομονώθηκε γενετικό υλικό σε κάθε ένα μεμονωμένα.

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ DNA

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ και ΣΥΣΚΕΥΕΣ

Τα αντιδραστήρια και ο εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκε κατά την απομόνωση του γενετικού περιγράφονται στην αντίστοιχη παράγραφο του προηγούμενου κεφαλαίου.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Για την απομόνωση του ολικού DNA χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο DNeasy Blood & Tissue kit (Qiagen), ακολουθώντας και τροποποιώντας ελαφρά τη διαδικασία του κατασκευαστή.

Συγκεκριμένα, ένα άκαρι ή ωό αφαιρούνταν από την αιθανόλη, μεταφερόταν σε ένα κελί από PCR plate και παρέμεινε σε υδατόλουτρο με θερμοκρασία 70°C για 5 λεπτά, ώστε να απομακρυνθεί και η παραμικρή ποσότητα αλκοόλης, που πιθανώς να δημιουργούσε προβλήματα στη συνέχεια. Ακολουθούσε προσθήκη 10μL διαλύματος ομογενοποίησης ιστών (PBS) στο κελί με το ξηρό δείγμα (ωό ή άκαρι) και το σύνολο ομογενοποιούνταν με αποστειρωμένο tip και υπό το οπτικό πεδίο στερεοσκοπίου.

Έπειτα, προσθέτονταν το διάλυμα που οδηγούσε στη λύση των κυττάρων (AL) και ποσότητα πρωτεΐνάσης K, η οποία δέσμευε τα μόρια DNA που υπήρχαν στο διάλυμα. Στη συνέχεια η διαδικασία ήταν όμοια με την ήδη περιγραφείσα στην προηγούμενη πειραματική διαδικασία (1^ο κεφάλαιο). Τέλος, ύστερα από μία τελευταία φυγοκέντρηση, συλλεγόταν το υποκείμενο διάλυμα το οποίο και περιελάμβανε το ολικό απομονωμένο DNA, τελικού όγκου 25μL και το οποίο τοποθετούνταν στους -20°C για περαιτέρω χρήση.

Για τον προσδιορισμό της ποσότητας και της ποιότητας του απομονωμένου γενετικού υλικού χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της φασματοφωτομέτρησης και κατεγράφησαν οι απορροφήσεις στα παρακάτω μήκη κύματος: 260nm (A260), 280nm (A280) και 320nm (A320). Η ποιότητα - καθαρότητα του DNA προκύπτει από τον λόγο A260/A280 και η ποσότητά του από τον μαθηματικό τύπο $Q = DF * 37 * (A260 - A320)$, όπου DF είναι ο συντελεστής αραιώσης του διαλύματος που στη συγκεκριμένη περίπτωση ήταν το 100.

ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ και ΣΥΣΚΕΥΕΣ

Για την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης χρησιμοποιήθηκαν τα διαλύματα και οι συσκευές που περιγράφονται στην αντίστοιχη παράγραφο του προηγούμενου κεφαλαίου, με τη διαφορά ότι εδώ μόνο ένα ζεύγος εκκινητών έλαβε μέρος, καθώς για το υπό εξέταση είδος ακάρεως, μόνο μία αλληλουχία υπήρχε κατατεθειμένη και ήταν αποτέλεσμα της εφαρμογής του αυτού του ζεύγους εκκινητών:

- ◆ Ένα ζεύγος **εκκινητών** 100μM (primers):

Ζεύγος εκκινητών (Palumbi et al., 1991).

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

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

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR) αποτελεί τρόπο επιλογής και παραγωγής μεγάλου αριθμού αντιγράφων μίας συγκεκριμένης νουκλεοτιδικής αλυσίδας χωρίς να εμπλέκεται ζωντανός ιστός ή κύτταρο (in vitro). Σκοπός είναι να δημιουργηθεί ικανή ποσότητα αντιγράφων των τμημάτων που επιθυμούμε να μελετηθούν ώστε να προχωρήσουμε σε περαιτέρω διαδικασίες.

Στη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία δοκιμάστηκαν συνολικά 3 ζεύγη εκκινητών που συνήθως χρησιμοποιούνται για τον γενετικό προσδιορισμό των ακάρεων, όμως τελικά επιλέχθηκε εκείνο που έδωσε τα καλύτερα αποτελέσματα, το 12SrDNA, ώστε να προχωρήσουμε σε πιο μαζική μελέτη. Το συγκεκριμένο ζεύγος εκκινητών προσδιορίζει εκείνο το γονιδιακό τμήμα, μήκους περίπου 400bp, το οποίο ελέγχει τη σύνθεση της μικρής υπομονάδας του ριβοσώματος (12SrDNA) (5'-AAACTGGGATTAGATACCCCACTAT-3', 5'-GAGGGTGACGGGCGGTGTGT-3'). Η άρτια κατασκευή των ριβοσωμάτων αποτελεί σημαντική διαδικασία καθώς συμμετέχουν και επηρεάζουν άμεσα την πρωτεϊνοσύνθεση (Palumbi et al., 1991).

Τόσο οι ποσότητες των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν για την διαδικασία όσο και οι συνθήκες στην οποία λειτούργησε ο θερμοκυκλοποιητής περιγράφονται από τους Evangelou et al., 2013.

Σε κάθε περίπτωση αναμειγνύονταν οι αντίστοιχες ποσότητες των αντιδραστηρίων και έπειτα εισαγόταν η ποσότητα του απομονωμένου DNA. Στη συνέχεια τα φιαλίδια τύπου

erpendorf τοποθετούνταν στον θερμοκυκλοποιητή (PCR machine) όπου εφαρμοζόταν συγκεκριμένο πρόγραμμα. Το βασικό χαρακτηριστικό της συσκευής αυτής είναι η ικανότητά της να διατηρεί σταθερές θερμοκρασίες για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα που έχει οριστεί από τον χρήστη. Ο συνδυασμός των παραγόντων θερμοκρασία και χρόνος στο πείραμα αυτό παρουσιάζονται από τους Evangelou et al., 2013.

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

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

ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΠΗΓΜΑΤΟΣ ΑΓΑΡΟΖΗΣ (Agarose Gel Electrophoresis)

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ και ΣΥΣΚΕΥΕΣ

Για την τεχνική της ηλεκτροφόρησης με πήγμα αγαρόζης χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω διαλύματα και συσκευές, περιγράφονται στην αντίστοιχη παράγραφο του προηγούμενου κεφαλαίου.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Τόσο το απομονωμένο DNA όσο και τα προϊόντα της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης ελέγχονταν κυρίως ως προς την ποσότητά τους με την τεχνική της ηλεκτροφόρησης σε πήγμα αγαρόζης 2% (Sambrook et al., 1989). Το πήγμα (gel) αφηνόταν στη μήτρα έως ότου κρυώσει και σταθεροποιηθεί, δηλαδή για περίπου 30 λεπτά.

Στη συνέχεια το gel τοποθετούνταν στην οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης και οι θέσεις φόρτισης (πηγαδάκια) πληρώνονταν με το DNA ή το μίγμα των προϊόντων PCR και του διαλύματος φόρτωσης (loading buffer). Επιπλέον, προθέτονταν ποσότητα του μάρτυρα (PCR marker-ladder) αναμειγμένη με ποσότητα χρωστικής (loading buffer), και ακολουθούσε ηλεκτροφόρηση με την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου σταθερής τάσης 110V, για περίπου 1 ώρα και 30 λεπτά.

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

ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ και ΣΥΣΚΕΥΕΣ

Το επόμενο στάδιο αφορά τον καθαρισμό του προϊόντος της διαδικασίας της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης. Σε αυτό απομακρύνονταν όλα τα συστατικά που χρησιμοποιούνταν προηγούμενα με στόχο να παραμείνει μόνο το τμήμα του DNA του οποίου η αλληλουχία ενδιαφέρει να προσδιοριστεί. Στη φάση αυτή χρησιμοποιούνταν το *NucleoSpin Extract II kit* - Macherey-Nagel και ακολουθούνταν το πρωτόκολλο της εταιρίας σύμφωνα με το οποίο συμμετείχαν τα διαλύματα και οι συσκευές, όπως αναγράφονται στο προηγούμενο κεφάλαιο όπου αναφέρεται και πάλι η ίδια μέθοδος.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Αρχικά, στο προϊόν της PCR το οποίο είχε απομείνει μετά από την ηλεκτροφόρηση, προσθέτονταν το διάλυμα δέσμευσης των μορίων DNA που συντέθηκαν κατά την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (NT). Το συνολικό διάλυμα εισαγόταν σε φίλτρο και κολώνα που περιέχονταν στο kit και πραγματοποιούνταν φυγοκέντρηση. Το υποκείμενο διάλυμα απορριπτόταν και εισαγόταν το διάλυμα καθαρισμού (NT₃). Ακολούθησε φυγοκέντρηση για δύο φορές κι έπειτα τοποθετούνταν στο υδατόλουτρο στους 70°C για 5 λεπτά. Τέλος, ακολουθούσε εισαγωγή του διαλύματος έκπλυσης (NE), φυγοκέντρηση και διατήρηση του υποκείμενου διαλύματος. Αυτό περιείχε την αλληλουχία των νεοκλεοτιδίων που θέλαμε να μελετήσουμε και διατηρούνταν στη θερμοκρασία των -20°C.

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ (DNA Sequencing)

Όλα τα παραπάνω στάδια και οι διαδικασίες που προηγήθηκαν έχουν ως απώτερο στόχο τον προσδιορισμό μίας συγκεκριμένης γενετικής αλληλουχίας της οποίας η ανάλυση δίνει πολλές πληροφορίες και απαντήσεις σε βασικά ερωτήματα όπως εκφράστηκαν στην αρχή της συγκεκριμένης μελέτης.

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

Εισάγοντας διδεοξυνουκλεοτίδιο καταστέλλεται η αντιγραφή σε συγκεκριμένη νουκλεοτιδική αλληλουχία, καθώς λόγω απουσίας υδροξυλίου στη θέση 3' της 2-δεοξυριβόζης το διδεοξυνουκλεοτίδιο δε μπορεί να αναπτύξει φωσφοδιεστερικό δεσμό με το επόμενο νουκλεοτίδιο. Τα τελικά τμήματα DNA εμπλέκονται περαιτέρω σε διαδικασία ραδιοσήμανσης, ηλεκτροφόρησης και αυτοραδιογραφίας. Τα τελικά προϊόντα της αλληλούχισης εξετάζονται ως προς την ομοιότητάς τους με ήδη κατατεθειμένες αλληλουχίες στην Παγκόσμια τράπεζα γονιδιώματος και κατατίθενται σε αυτή.

ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Με την παραλαβή των αποτελεσμάτων πραγματοποιούνταν έλεγχος των αλληλουχιών (βάση προς βάση) με το πρόγραμμα *FinchTV v.1.4.0* (Geospiza) κι ακολούθως συστοίχισή τους καταφεύγοντας στην ηλεκτρονική βάση δεδομένων *GenBank* του *NCBI* (Altschul et al., 1990). Συγκεκριμένα, χρησιμοποιώντας την εφαρμογή *BLAST* (Basic Local Alignment Search Tool), συγκρινόντουσαν οι αλληλουχίες που λαμβάνονταν με ήδη κατατεθειμένες στη βάση δεδομένων. Έτσι, υπήρχε έλεγχος του γονιδιακού τμήματος του οποίου η αλληλουχία προσδιορίστηκε. Αν το ποσοστό ταύτισης ήταν μικρότερο του 90% οι αλληλουχίες απορρίπτοναν και δε συμμετείχαν στην περαιτέρω στατιστική επεξεργασία, η οποία πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό *Mega v. 6.0.6* (Tamura et al., 2011; 2013). Με αυτά έγινε διερεύνηση για την ύπαρξη και τον αριθμό των απλοτύπων και τις πιθανές διαφορές σε συγκεκριμένες νουκλεοτιδικές θέσεις

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

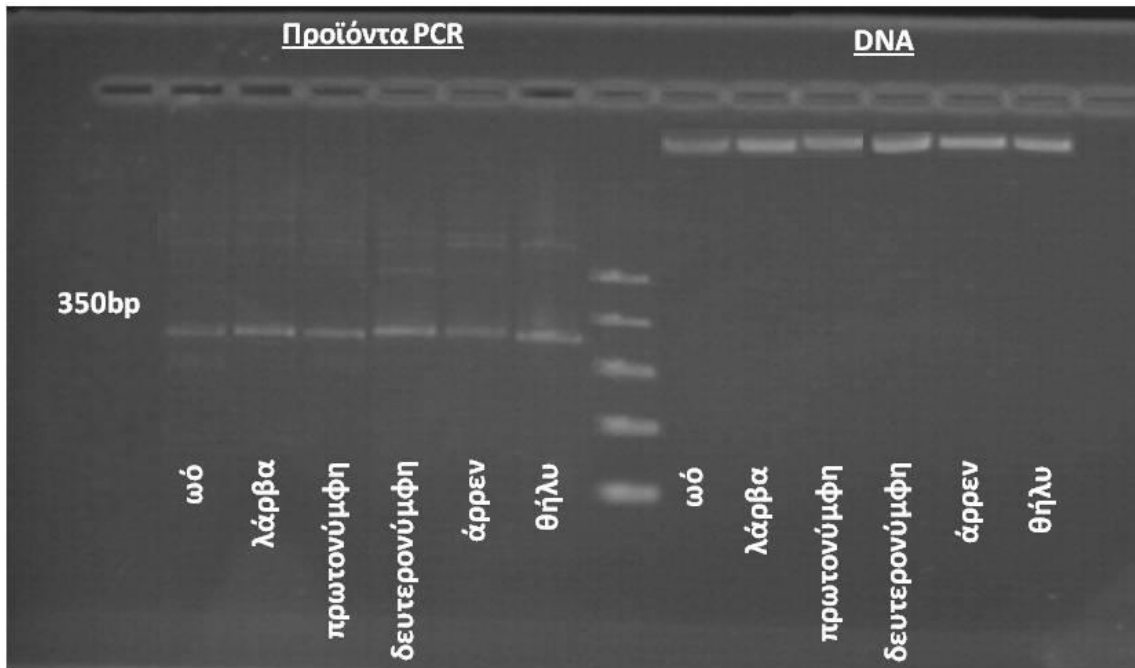
Τα πρώτα αποτελέσματα που ελήφθησαν κατά την πειραματική διαδικασία αφορούσαν στα χαρακτηριστικά της ποιότητας του γενετικού υλικού που απομονώθηκε από τα διάφορα στάδια του ακάρεως *I. degenerans*. Τα χαρακτηριστικά αυτά είναι η συγκέντρωση-ποσότητα του DNA και η καθαρότητά του. Σύμφωνα με αυτά η διαδικασία της απομόνωσης του ολικού γενετικού υλικού ήταν επιτυχής σε όλα τα στάδια, με το DNA που απομονώθηκε από τα ακμαία θηλυκά άτομα να βρίσκεται σε μεγαλύτερη ποσότητα ($123,2 \pm 12,9$ ng/μL), τις ζώνες να είναι πιο συμπαγείς κι έντονες κατά την ηλεκτροφόρηση και τις αλληλουχίες να δίνουν πιο συγκροτημένα αποτελέσματα. Κατά τον προσδιορισμό τους ακολούθησαν τα αρρενα ακμαία ($103,8 \pm 5,1$ ng/μL) και οι δευτερονύμφες ($97,6 \pm 6,7$ ng/μL), οι πρωτονύμφες ($80,2 \pm 13,6$ ng/μL) και τέλος οι λάρβες ($41,4 \pm 2,2$ ng/μL) και τα ωά ($39,2 \pm 6,9$ ng/μL). Στην περίπτωση του DNA που απομονώθηκε από ένα ωό, η συγκέντρωσή του ήταν αρκετά μεγαλύτερη από την αντίστοιχη μέση τιμή στο συγκεκριμένο στάδιο ($51,6$ ng/μL \gg $39,2$ ng/μL), η οποία μάλιστα υπερβαίνει και την μέση τιμή του αμέσως επόμενου σταδίου ($41,1$ ng/μL \pm $2,2$ ng/μL), αυτού της λάρβας (**Πίνακας 6**).

Η καθαρότητα του DNA εκτιμήθηκε μεταξύ των τιμών 1,594 και 1,839 για το σύνολο των μετρήσεων που πραγματοποιήθηκαν, με τα ενήλικα άτομα και τις δευτερονύμφες να παρουσιάζουν τις υψηλότερες τιμές στο επίπεδο του 1,8. Συγκεκριμένα, για τα θηλυκά άτομα καταγράφηκε ο μέσος όρος $1,810 \pm 0,006$, για τα αρρενα $1,813 \pm 0,009$ και για τις δευτερονύμφες $1,809 \pm 0,024$ (**Πίνακας 6**).

Η ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αγαρόζης τόσο του DNA όσο και των προϊόντων της PCR έδωσαν αποτελέσματα στις πλείστες των περιπτώσεων. Στις ζώνες που εμφανίστηκαν υπήρχε μία κοινή εικόνα ως προς την εμφάνισή τους όταν αυτές αφορούσαν το ίδιο στάδιο. Και όταν αναφερόμαστε στην εικόνα τους, βασικά χαρακτηριστικά είναι το πόσο έντονες ή άτονες είναι, αλλά και το πόσο συγκεντρωμένες είναι γύρω από ένα σημείο. Όσο πιο έντονη και πιο συγκεντρωμένη είναι μία ζώνη, τόσο πληρέστερη είναι η παρουσία του DNA ως προς την καθαρότητα και την ποσότητά του. Τα ενήλικα άτομα και των δύο γενών αλλά και οι νύμφες του δευτέρου σταδίου είχαν την καλύτερη εμφάνιση συγκριτικά με τα υπόλοιπα πιο ατελή στάδια (**Εικόνα 40**).

Πίνακας 6: Οι συγκεντρώσεις και η καθαρότητα του γενετικού υλικού όπως απομονώθηκε από τις διάφορες ηλικίες (ωό, λάρβα, πρωτονύμφη, δευτερονύμφη, ακμαίο άρρεν και θήλυ) του ακάρεως *Iphiseius degenerans*.

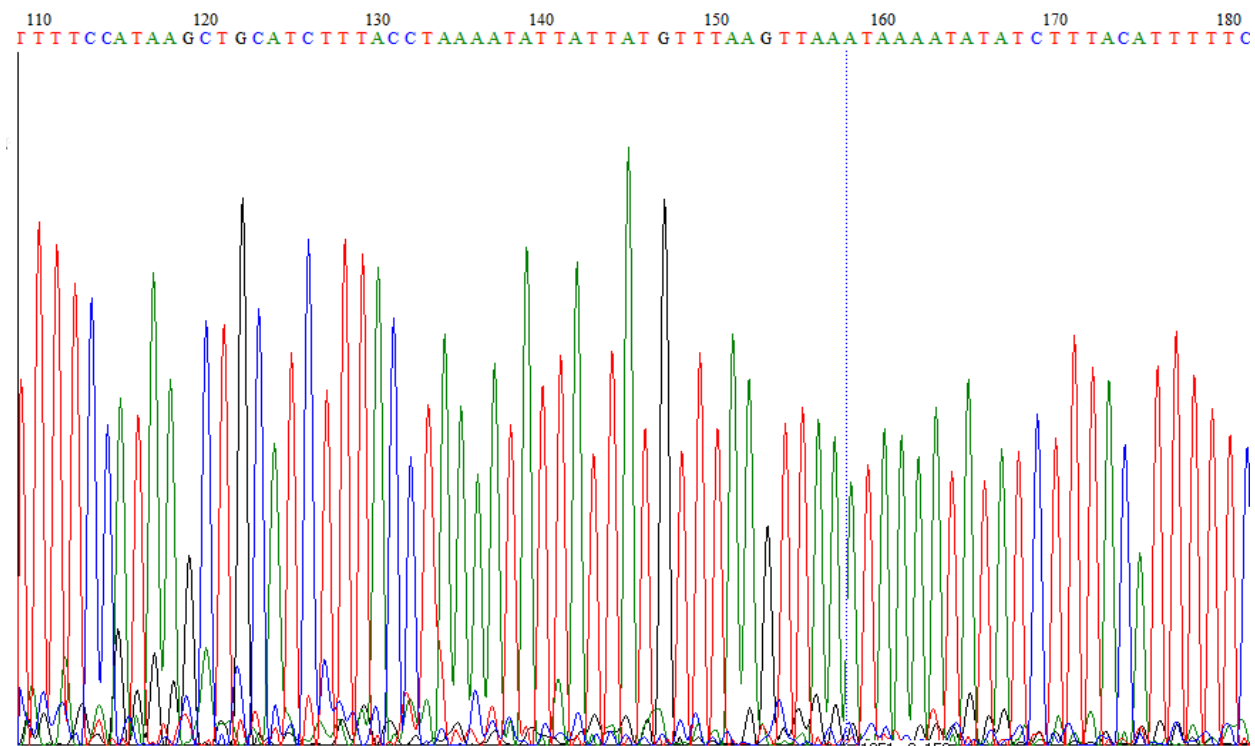
Στάδιο	Ποσότητα DNA (ng/μL) [Q = DF*37*(A260 -A320)]	Καθαρότητα DNA [A260/A280]	Στάδιο	Ποσότητα DNA (ng/μL) [Q = DF*37*(A260 -A320)]	Καθαρότητα DNA [A260/A280]
Ωό	40,7	1,594	Δευτερονύμφη	109,7	1,792
	51,6	1,635		94,6	1,780
	38,4	1,701		94,9	1,810
	32,1	1,599		100,6	1,824
	33,2	1,631		88,2	1,839
	45,3	1,642		103,6	1,793
	35,6	1,611		95,1	1,801
	47,1	1,637		97,6	1,784
	37,1	1,618		102,8	1,813
	30,9	1,652		88,9	1,854
	39,2 ± 6,9	1,632 ± 0,031		97,6 ± 6,7	1,809 ± 0,024
Λάρβα	40,4	1,711	Ενήλικο Άρρεν	110,2	1,820
	41,2	1,631		98,6	1,815
	45,7	1,658		95,1	1,802
	38,2	1,702		107,3	1,800
	40,0	1,653		107,8	1,828
	42,7	1,685		106,2	1,816
	39,5	1,706		99,4	1,806
	43,1	1,666		100,7	1,812
	40,2	1,688		103,9	1,820
	40,0	1,610		108,8	1,811
	41,1 ± 2,2	1,671 ± 0,034		103,8 ± 5,1	1,813 ± 0,009
Πρωτονύμφη	97,2	1,720	Ενήλικο Θήλυ	137,5	1,819
	78,6	1,658		110,3	1,817
	90,1	1,699		127,6	1,804
	85,9	1,718		100,9	1,809
	49,2	1,770		139,7	1,801
	73,6	1,701		127,3	1,806
	69,3	1,731		125,9	1,813
	87,4	1,695		106,7	1,810
	83,6	1,713		129,4	1,808
	87,1	1,725		126,7	1,813
	80,2 ± 13,6	1,713 ± 0,029		123,2 ± 12,9	1,810 ± 0,006



Εικόνα 40: Φωτογραφία ηλεκτροφόρησης σε πήγμα αγαρόζης των προϊόντων της PCR για το γονιδιακό τμήμα 12SrDNA και του γενετικού υλικού (DNA) που απομονώθηκε από τα διάφορα στάδια του *Iphiseius degenerans*.

Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης του 12S rDNA mtDNA έδωσαν νουκλεοτιδικές αλληλουχίες με μήκος 349 ζεύγη βάσεων ύστερα από ευθυγράμμιση με το πρόγραμμα *Clustal* (**Εικόνα 41**). Οι αλληλουχίες που παράχθηκαν κατά την πειραματική διαδικασία παρουσίασαν υψηλή ομοιότητα, ύψους τουλάχιστον 96% με δύο άλλες αλληλουχίες που είχαν ήδη κατατεθεί στην GenBank (NCBI) για το είδος *I. degenerans* και που είχαν αναγνωριστικό κωδικό - accession number – το HQ404834.1 και AY099368.1.

Ύστερα από την στατιστική επεξεργασία των 60 αλληλουχιών με τα αναφερθέντα λογισμικά δεν βρέθηκε παρά μόνο ένας κοινός απλότυπος, γεγονός που ήταν αναμενόμενο αν λάβουμε υπόψη το γεγονός ότι τα άτομα συλλέχθηκαν από την ίδια εκτροφή και ύστερα από επαναλαμβανόμενες γενεές χωρίς τον εμπλουτισμό τους με νέα άτομα. Η αλληλουχία αυτή έχει κατατεθεί στην Παγκόσμια Τράπεζα Γονιδιώματος κι έχει λάβει αναγνωριστικό κωδικό KJ933453.



Εικόνα 41: Μέρος χρωματογραφήματος από την αλληλούχιση του γονιδιακού τμήματος 12SrDNA σε θηλυκό άκαρι του είδους *I. degenerans*.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Κατά την γεωργική πρακτική είναι κομβικό να γνωρίζει ο παραγωγός τους οργανισμούς που υπάρχουν κι έχουν εγκατασταθεί στην καλλιέργειά του ώστε να αποφασίσει αν αυτοί πρέπει να απομακρυνθούν από την καλλιέργεια, καθώς αποτελούν ζημιογόνους παράγοντες για αυτή, ή να παραμείνουν και να ενισχυθούν εφόσον μπορούν να βοηθήσουν στην αύξηση και βελτίωση της παραγωγής.

Σε αυτήν την κατεύθυνση μπορούν να βοηθήσουν τόσο η κλασική συστηματική ταξινόμηση όσο και οι μοριακές τεχνικές. Υπάρχουν περιπτώσεις που τα άτομα που εντοπίζονται βρίσκονται στο στάδιο του ακμαίου θηλυκού, στάδιο που για την οικογένεια Phytoseiidae είναι το ιδανικό για την αναγνώριση του είδους. Εδώ, οι μοριακές τεχνικές μπορούν να επιβεβαιώσουν ή να δώσουν περισσότερες πληροφορίες για την ορθή αναγνώριση. Υπάρχουν όμως κι εκείνες οι περιπτώσεις όπου το εντοπισθέν άτομο ανήκει σε κάποιο άλλο ηλικιακό στάδιο ή φύλο, γεγονός που καθιστά δύσκολο και πολλές φορές αδύνατο τον προσδιορισμό του είδους. Αποτέλεσμα αυτής της αδυναμίας μπορεί να είναι η λανθασμένη αναγνώριση του είδους, γεγονός που μπορεί να προκαλέσει πολλά προβλήματα στην καλλιέργεια και οικονομική ζημία στον παραγωγό.

Ακόμα υπάρχουν περιπτώσεις όπου τα άτομα αυτά ανήκουν σε είδη καραντίνας, δηλαδή οργανισμούς οι οποίοι δεν υπάρχουν στην πανίδα μίας χώρας ή περιοχής και που συνήθως προκαλούν σοβαρά προβλήματα στην καλλιέργεια ή το φυτό που προσβάλλουν και η αντιμετώπισή τους κρίνεται συνήθως δύσκολη έως αδύνατη. Η διαχείρισή τους καλύπτεται και διασφαλίζεται από συγκεκριμένο νομικό πλαίσιο και εκτελείται από εξουσιοδοτημένες Αρχές της εκάστοτε χώρας) ή που καταγράφονται για πρώτη φορά στη χώρα ή τη συγκεκριμένη καλλιέργεια. Αντιλαμβάνεται, λοιπόν, κανείς πως όχι μόνο η σωστή, αλλά και η άμεση ταυτοποίηση του είδους είναι μείζονος σημασίας για την καλλιέργεια ή τις καλλιέργειες γενικότερα.

Δεδομένου του ότι η εύρεση διαφορετικού από το ακμαίο θηλυκό άτομο καθιστά την αναγνώριση προβληματική, θα μπορούσε το ευρεθέν στάδιο να εκτεθεί στις ιδανικές συνθήκες ώστε να φτάσει το στάδιο του ενήλικου και αν είναι θηλυκού φύλου, να προσδιοριστεί. Η διαδικασία αυτή προϋποθέτει την επιβίωση του ατόμου καθώς θα περνά από στάδιο σε στάδιο. Αυτό σημαίνει ότι πρέπει άμεσα να εντοπιστούν οι πιθανές ιδανικές συνθήκες θερμοκρασίας, σχετικής υγρασίας και φωτοπερίόδου, καθώς και η ιδανική τροφή -

λεία η οποία θα του παρέχεται ώστε να φτάσουμε στο επιθυμητό αποτέλεσμα, την ενηλικίωση του ατόμου. Ακόμη, το ιδανικό είναι το όποιο στάδιο βρεθεί, να δώσει άτομο θηλυκού γένους. Η παραπάνω διαδικασία ακόμα και αν επιτύχει να δώσει ακμαίο θηλυκό άτομο, είναι πολύ πιθανό να διαρκέσει σημαντικό χρονικό διάστημα (5-6 ημέρες), γεγονός που οδηγεί στο ίδιο αδιέξοδο.

Αρωγός στα παραπάνω ζητήματα θεωρούνται οι μοριακές τεχνικές και η απομόνωση γενετικού υλικού από τον οργανισμό του οποίου η αναγνώριση κρίνεται σημαντική, κάτι που διερευνήθηκε στη συγκεκριμένη διδακτορική διατριβή. Η προσπάθεια αυτή πραγματοποιήθηκε και από άλλους ερευνητές, οι οποίοι ασχολήθηκαν με το θέμα του προσδιορισμού του είδους στα διάφορα ατελή ή μη στάδια, σε περιπτώσεις εντόμων ή άλλων αρthropόδων (Paquin & Hedin, 2004; Miller et al., 2005; Levkanicova & Bocak, 2009; Ditttrich-Schroder et al., 2012).

Οι Paquin & Hedin το 2004 ασχολήθηκαν με κάποια είδη αραχνών τα οποία απειλούνταν με εξαφάνιση. Στη συγκεκριμένη περίπτωση είναι εξαιρετικά δύσκολη η συλλογή ακμαίων ατόμων καθώς εντοπίζονται πολύ δύσκολα σε σχέση με τα ατελή τους στάδια κι επομένως προέβησαν σε απομόνωση γενετικού υλικού από τα ατελή στάδια, τα οποία δεν είναι ιδανικά ως υλικό για την κλασική ταξινόμηση, αλλά έδωσαν ικανοποιητικά αποτελέσματα ως προς τον προσδιορισμό του είδους μέσω των μοριακών τεχνικών και του μιτοχονδριακού DNA. Αντίστοιχη είναι και η εργασία από τους Levkanicova & Bocak (2009) που ασχολείται με την εφαρμογή των μοριακών τεχνικών σε διάφορα στάδια ειδών των οικογενειών Lycidae και Lampyridae (Coleoptera: Lycidae), ώστε συνδυάζοντας τις πληροφορίες για τα ακμαία αλλά και για τα ατελή στάδια, να είναι πιο ολοκληρωμένη και εύστοχη η αναγνώριση του είδους.

Σε μία άλλη πειραματική μελέτη εξετάστηκε κατά πόσο είναι δυνατή η απομόνωση γενετικού υλικού από ατελή στάδια και άρρενα άτομα τριών ειδών υδρόβιων κολεοπτέρων (Miller et al., 2005). Σε αυτή την περίπτωση είναι δύσκολος ο εντοπισμός και η συλλογή του ακμαίου θηλυκού καθώς προτιμά να κρύβεται σε πτυχές βράχων σε ποτάμια και λίμνες, σε αντίθεση με τα ατελή στάδια που “κολυμπούν” πιο ελεύθερα στα συγκεκριμένα ενδιαίτηματα. Η διαδικασία του προσδιορισμού ήταν και πάλι επιτυχής και μάλιστα ύστερα και από την φυλογενετική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε οι ερευνητές κατέληξαν στο ότι μία περίπτωση προνούμφης που δεν μπορούσε να προσδιοριστεί-ταξινομηθεί σε είδος με άλλο τρόπο, εντάχθηκε σε συγκεκριμένο κλάδο που την κατέταξε αυτόματα σε συγκεκριμένο είδος αλλά και πληθυσμό.

Το παραπάνω ενδιαφέρον έλαβαν υπόψη τους οι Okassa et al. (2012), οι οποίοι εξέτασαν άτομα ακάρεων της οικογένειας Phytoseiidae, επικαλούμενοι τη σημασία της ορθής κι έγκαιρης αναγνώρισης των ακάρεων που συμμετέχουν στα συστήματα Ολοκληρωμένης και Βιολογικής Αντιμετώπισης εχθρών καλλιεργειών. Συγκεκριμένα, δύο είδη της οικογένειας Phytoseiidae συμμετείχαν στην πειραματική διαδικασία, τα *Typhlodromus (Typhlodromus) exhilaratus* Ragusa και *Typhlodromus (Typhlodromus) phialatus* Athias-Henriot (Acari: Phytoseiidae). Σε αυτά απομονώθηκε DNA χρησιμοποιώντας το ίδιο kit, αλλά με διαφορετική διαδικασία από αυτή της παρούσης διατριβής. Η ποιότητα και η ποσότητα του γενετικού υλικού ελέγχθηκε και μετρήθηκε για όλα τα στάδια των ακάρεων, εκτός από τις περιπτώσεις κάποιων μικρότερων σταδίων (ωό, λάρβα και πρωτονύμφη), στα οποία η διαδικασία που εφαρμόστηκε δεν έδωσε ικανοποιητικά αποτελέσματα. Για την ακρίβεια, στα στάδια αυτά παρουσιάστηκαν αρκετές επιμολύνσεις κατά την απομόνωση, με αποτέλεσμα κατά την PCR και κατά την διαδικασία του προσδιορισμού της μίας γονιδιακής αλληλουχίας (sequencing) και της ταυτοποίησης του είδους, να δημιουργηθούν προβλήματα και να μην είναι δυνατή η ταυτοποίηση των ειδών.

Η διαδικασία απομόνωσης από τους Jeyaprakash & Hoy (2004) για το άκαρι *Metaseiulus (=Galendromus) occidentalis* (Nesbitt) έδωσε καλύτερα αποτελέσματα, προφανώς λόγω του μεγαλύτερου μεγέθους του ακάρεως. Ωστόσο, στην εργασία αυτή δεν εξετάστηκαν όλα τα στάδια του είδους, παρά μόνο το ωό και τα δύο ακμαία, με αποτέλεσμα να μην μπορούμε να εξάγουμε ασφαλή συμπεράσματα για την ικανότητα των μοριακών τεχνικών που εφαρμόστηκαν.

Αξίζει να σημειωθεί ότι τόσο η παρούσα, όσο και οι δύο τελευταίες εργασίες που αναφέρθηκαν περιγράφουν τη διαδικασία απομόνωσης από ένα μόνο. Με τον τρόπο αυτό είναι δεδομένο ότι το γενετικό υλικό και η προσδιοριζόμενη γονιδιακή του αλληλουχία αντιστοιχεί σε αυτό και μόνο το άτομο. Στις περιπτώσεις πολλών ατόμων υπάρχει πάντα η πιθανότητα τα άτομα που έχουν συλλεχθεί και ομαδοποιηθεί, να αντιστοιχούν σε περισσότερα του ενός κοντινά είδη, με αποτέλεσμα η ομαδοποιημένη απομόνωση να δίνει λανθασμένη αντιστοιχία είδους για το κάθε άτομο. Είναι, λοιπόν, ιδιαίτερα σημαντικό η διαδικασία της απομόνωσης να εφαρμόζεται σε ένα άτομο, ώστε το αποτέλεσμα να είναι αντιπροσωπευτικό του ατόμου αυτού Jeyaprakash & Hoy (2010b).

Είναι εμφανές από τα παραπάνω πως οι προσπάθειες κινούνται στην ίδια κατεύθυνση με την παρούσα μελέτη χωρίς όμως να καταφέρουν να δώσουν καθολική λύση στο υπό συζήτηση θέμα. Στην παρούσα διδακτορική διατριβή, η οποία διενεργήθηκε παράλληλα με την ερευνητική εργασία των Okassa et al. (2012), εφαρμόστηκε μία

τροποποιημένη μέθοδος κατά την απομόνωση η οποία φαίνεται ότι την διαφοροποιεί σε σημαντικά σημεία από τις υπόλοιπες.

Αν αναλογιστεί κανείς, ότι σε όλα τα δείγματα-άτομα που εφαρμόστηκε η συγκεκριμένη διαδικασία της απομόνωσης το DNA ήταν ικανή να δώσει λειτουργικά προϊόντα PCR, τότε φαίνεται ότι το πρώτο στάδιο της διαδικασίας είναι αυτό που ευθύνεται για τα επιτυχημένα αποτελέσματα. Στο στάδιο αυτό, που προηγείται του σταδίου της “λύσης” των κυττάρων όπως ονομάζεται, στο κάθε μεμονωμένο στάδιο-άκαρι έγινε διαβροχή με 10μL διαλύματος PBS και ακολούθησε ομογενοποίηση του δείγματος με τη χρήση ενός αποστειρωμένου tip σε οπτικό πεδίο στερεοσκοπίου. Εδώ το δείγμα θα δώσει στο διάλυμα όση περισσότερη πληροφορία υπάρχει στο εσωτερικό των κυττάρων του, ώστε να είναι πιο εύκολη η διαδικασία που θα ακολουθήσει, μέχρι το τελικό στάδιο της ανάγνωσης της γονιδιακής αλληλουχίας. Γίνεται αντιληπτό ότι με τη συγκεκριμένη μεθοδολογία είναι εφικτός ο προσδιορισμός του είδους στα διαφορετικά στάδια των ακάρεων με την εφαρμογή μοριακών δεικτών, ακόμα και στο στάδιο του ωού, εμφανίζοντας ταυτόσημο ποσοστό 96% με τις ήδη κατατεθειμένες αλληλουχίες

Όπως ήταν αναμενόμενο, τα ακμαία θηλυκά άτομα έδωσαν τα αρτιότερα αποτελέσματα, καθώς κατά την απομόνωση παράγγααν και τη μεγαλύτερη συγκέντρωση του γενετικού υλικού σε σχέση με τα άλλα στάδια και τα αρρενα άτομα. Αυτό δικαιολογείται κυρίως λόγω του μεγαλύτερου μεγέθους του θηλυκού ατόμου καθώς αυτό διευκολύνει το στάδιο της ομογενοποίησης, στάδιο με ιδιαίτερη σημασία για την τελική συγκέντρωση και ποσότητα του γενετικού υλικού που απομονώνεται. Για τον ίδιο λόγο όσο μειώνεται το μέγεθος περνώντας σε μικρότερα στάδια, τόσο μικρότερη είναι η ποσότητα του DNA που απομονώνεται από αυτά. Εντούτοις, επιβεβαιώνεται ότι το είδος μπορεί να προσδιοριστεί με μοριακές τεχνικές ακόμα και στο στάδιο του ωού. Γενικά, υπάρχει έκδηλη η τάση με την αύξηση του μεγέθους του σώματος του ακάρεως να αυξάνεται και η ποσότητα του εξαγόμενου γενετικού υλικού.

Είναι γεγονός ότι η ενασχόληση και η μελέτη τόσο μικρών αρθροπόδων, προμηνύει από μόνη της μία δυσκολία στην εξαγωγή γενετικού υλικού που θα έχει ικανοποιητική καθαρότητα-ποιότητα και συγκέντρωση-ποσότητα, ώστε να δώσει λειτουργικά προϊόντα στην Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης και στον προσδιορισμό της γονιδιακής αλληλουχίας. Φαίνεται, όμως, πως το πρωτόκολλο που περιγράφεται και προτείνεται στην παρούσα διατριβή, αποτελεί μία γρήγορη και επιτυχημένη διαδικασία με εφαρμογή σε όλα τα στάδια του είδους *I. degenerans*. Η συγκεκριμένη μπορεί κάλλιστα να βρει εφαρμογή και σε ένα πιο διευρυμένο πεδίο, αυτό των μικροαρθροπόδων που συμμετέχουν στη Βιολογική και

Ολοκληρωμένη Αντιμετώπιση, με στόχο τον έγκαιρο και ορθό προσδιορισμό των ειδών που εντοπίζονται σε καλλιέργειες ή σε ευρύτερα οικοσυστήματα.

Επειδή πολλές φορές οι πληροφορίες που απορρέουν από τις μοριακές τεχνικές ίσως να μη μπορούν να συνδυαστούν εύκολα με άλλες πηγές πληροφοριών, οι Kanouh et al. (2010b) προτείνουν τη χρήση περισσότερων του ενός μοριακών δεικτών για την ταυτοποίηση του είδους και μάλιστα, αν είναι δυνατόν, να προέρχονται από δύο είδη DNA, το μιτοχondριακό και το πυρηνικό. Εκτιμώντας τη σημασία της πρότασης αυτής θα ήταν φρόνιμο να εξεταστεί ένα ακόμη γονιδιακό τμήμα το οποίο θα προέρχεται από πυρηνικό DNA, ώστε να υπάρχει έτσι μία ακόμα δικλείδα ασφαλείας για τον ορθό προσδιορισμό του είδους ενός τόσο μικρού οργανισμού, όπως είναι τα ακάρεα. Εναλλακτικά, θα μπορούσε κάποιος άλλος μοριακός δείκτης να δώσει ακόμη καλύτερα αποτελέσματα και στα πρώτα ατελή στάδια του ωού και της λάρβας.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Adams, J.** (2005) Nuclear and mitochondrial DNA in the courtroom. *J. Law Policy* 13: 69-97.
- Albernaz, K.C., Silva-Brandão, K.L., Fresia, P., Cônsoli, F.L. and Omoto, C.** (2012) Genetic variability and demographic history of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) populations from Brazil inferred by mtDNA sequences. *Bulletin of Entomological Research* 102(3): 333-343.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J.** (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215: 403-410.
- Anderson, D.L. and Trueman, J.W.H.** (2000) *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) is more than one species. *Experimental and Applied Acarology* 24: 165-189.
- Athias-Henriot, C.** (1957) *Typhlodromus ornatus* n.sp. et *Typhlodromus longilaterus* n.sp. (Acarina, Phytoseiidae) Mésostigmates prédateurs d'Algérie. *Revue de Pathologie Végétale et Entomologie Agricole de France* 36: 215-222.
- Avice, J.C.** (2000) Phylogeography: The history and formation of species. Cambridge, Massachusetts, Harvard University Press. 447 pp.
- Baum, D.A., and Offner, S.** (2008) Phylogenies and tree thinking. *American Biology Teacher* 70: 222-229.
- Becnel, J.J. Jeyaprakash, A., Hoy, M.A. and Shapiro A.** (2002) Morphological and molecular characterization of a new microsporidian species from the predatory mite *Metaseiulus occidentalis* (Nesbitt) (Acari, Phytoseiidae). *Journal of Invertebrate Pathology* 79(3): 163-172.
- Beltrà, A., Soto, A. and Malausa, T.** (2012) Molecular and morphological characterisation of Pseudococcidae surveyed on crops and ornamental plants in Spain. *Bulletin of Entomological Research* 102(2): 165-172.
- Ben-David, T., Melamed, S., Gerson, U. and Morin, S.** (2007) ITS2 sequences as barcodes for identifying and analyzing spider mites (Acari: Tetranychidae). *Experimental and Applied Acarology* 41(3): 169-181.
- Bjørnson, S.** (2008) Natural enemies of mass-reared predatory mites (family Phytoseiidae) used for biological pest control. *Experimental and Applied Acarology* 46(1-4): 299-306.
- Black, W.C., DuTeau, N.M., Puterka, G.J., Nechols, J.R. and Pettorini, J.M.** (1992) Use of the random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR) to detect DNA polymorphisms in aphids (Homoptera: Aphididae). 82(2): 151-159.
- Bleidorn, C., Schmidt-Rhaesa, A. and Garey, J.R.** (2002): Systematic relationships of Nematomorpha based on molecular and morphological data. *Invertebrate Biology* 121: 357-364.

- Bowman, H.M., Hoy, M.A.** (2012) Molecular discrimination of phytoseiids associated with the red palm mite *Raoiella indica* (Acari: Tenuipalpidae) from Mauritius and South Florida. *Experimental and Applied Acarology* 57(3-4): 395-407.
- Casquet, J., Thebaud, Ch. and Gillespie, R.G.** (2011) Chelex without boiling, a rapid and easy technique to obtain stable amplifiable DNA from small amounts of ethanol-stored spiders. *Molecular Ecology Resources* 12(1): 136-141.
- Castalanelli, M.A., Severtson, D.L., Brumley, C.J., Szito, A., Footitt, R.G., Grimm, M., Munyard, K. and Groth, D.M.** (2010) A rapid non-destructive DNA extraction method for insects and other arthropods. *Journal of Asia-Pacific Entomology* 13(3): 243-248.
- Castilho, R.C., Narita, J.P.Z., de Moraes, G.J. and McMurtry, J.A.** (2014) Mites GSDs: PhytoseiidBase (version Sep 2009). In: Species 2000 & ITIS Catalogue of Life, 22nd August 2014 (Roskov Y., Kunze T., Orrell T., Abucay L., Culham A., Bailly N., Kirk P., Bourgoin T., DeWalt R.E., Decock W., De Wever A., eds). Species 2000: Naturalis, Leiden, the Netherlands. (www.catalogueoflife.org/col).
- Chant, D.A. and McMurtry, J.A.** (1994) A review of the subfamilies Phytoseiinae and Typhlodrominae (Acari: Phytoseiidae). *International Journal of Acarology* 20: 223-310.
- Chant, D.A.** (1957) Note on the status of some genera in the family Phytoseiidae (Acarina). *The Canadian Entomologist* 89: 528-532.
- Chant, D.A. and McMurtry, J.A.** (2005) A review of the subfamily Amblyseiinae Muma (Acari: Phytoseiidae): part VII. Typhlodromipsini n. tribe. *International Journal of Acarology* 31: 315-340.
- Chant, D.A. and McMurtry, J.A.** (2006) A review of the subfamily Amblyseiinae Muma (Acari: Phytoseiidae): part IX. An overview. *International Journal of Acarology* 32: 125-152.
- Chant, D.A. and McMurtry, J.A.** (2007) Illustrated keys and diagnoses for the genera and subgenera of the Phytoseiidae of the world (Acari: Mesostigmata). West Bloomfield, MI: *Indira Publishing House*, 220p.
- Chen, H., Rangasamy, M., Tan, S.Y., Wang, H. and Siegfried, B.D.** (2010) Evaluation of five methods for total DNA extraction from western corn rootworm beetles. *PloS ONE* 5: e11963.
- Chien, A., Edgar, D.B. and Trela, J.M.** (1976) Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *Journal of Bacteriology* 174: 1550-1557.
- Colangelo, P., Aloise, G., Franchini, P., Annesi, F. and Amori, G.** (2012) Mitochondrial DNA reveals hidden diversity and an ancestral lineage of the bank vole in the Italian peninsula. *Journal of Zoology* 287: 41-52.
- Cruickshank, R.H., Johnson, K.P., Smith, V.S., Adams, R.J., Clayton, D.H. and Page R.D.** (2001) Phylogenetic analysis of partial sequences of elongation factor 1alpha identifies major groups of lice (Insecta: Phthiraptera). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 19(2): 202-215.

- Cruickshank, R.H.** (2002) Molecular markers for the phylogenetics of mites and ticks. *Systematic & Applied Acarology* 7: 3-14.
- Dabert, J., Ehrnsberger, R. and Dabert, M.** (2008) *Glaucalgae tytonis* sp. n. (Analgoidea: Xolalgidae) from the barn owl *Tyto alba* (Strigiformes: Tytonidae): compiling morphology with DNA barcode data for taxa descriptions in mites (Acari). *Zootaxa* 1719: 41-52.
- de Courcy Williams, M.E., Kravar-Garde, L., Fenlon, J.S. and Sunderland, K.D.** (2004a) The relationship between dietary specialism and availability of food and water on cannibalistic interactions among predatory mites in protected crops. *Experimental and Applied Acarology* 33(1-2): 31-44.
- de Courcy Williams, M.E., Kravar-Garde, L., Fenlon, J.S. and Sunderland, K.D.** (2004b) Phytoseiid mites in protected crops: the effect of humidity and food availability on egg hatch and adult life span of *Iphiseius degenerans*, *Neoseiulus cucumeris*, *N. californicus* and *Phytoseiulus persimilis* (Acari: Phytoseiidae). *Experimental and Applied Acarology* 32(1-2): 1-13.
- Demite, P.R., McMurtry, J.A. and de Moraes, G.J.** (2014) Phytoseiidae Database: a website for taxonomic and distributional information on phytoseiid mites (Acari). *Zootaxa* 3795(5): 571-577. (<http://www.lea.esalq.usp.br/phytoseiidae/>)
- Dentinger, B.T., Margaritescu, S. and Moncalvo, J.M.** (2010) Rapid and reliable high-throughput methods of DNA extraction for use in barcoding and molecular systematics of mushrooms. *Molecular Ecology Resources* 10(4): 628-633.
- Dermauw, W., Vanholme, B., Tirry, L. and Van Leeuwen, T.** (2010) Mitochondrial genome analysis of the predatory mite *Phytoseiulus persimilis* and a revisit of the *Metaseiulus occidentalis* mitochondrial genome. *Genome* 53:285-301.
- Desloire, S., Valiente Moro, C., Cauve, C. and Zenner, L.** (2006) Comparison of four methods of extracting DNA from *D. gallinae* (Acari: Dermanyssidae). *Veterinary Research* 37: 725-732.
- Dittrich-Schroder, G., Wingfield, M.J., Klein, H. and Slippers, B.** (2012) DNA extraction techniques for DNA barcoding of minute gall-inhabiting wasps. *Molecular Ecology Resources* 12: 109-115.
- Edwards, O.R. and Hoy, M.A.** (1993) Polymorphism in two parasitoids detected using random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction. *Biological Control* 3: 243-257.
- Edwards, O.R., Melo, E.L., Smith, L. and Hoy, M.A.** (1997) Discrimination of three *Typhlodromalus* species (Acari: Phytoseiidae) using random amplified polymorphic DNA markers. *Experimental & Applied Acarology* 21: 101-109.
- Espeland, M., Irestedt, M., Johanson, K.A., Åkerlund, M., Bergh, J.-E. and Källersjö, M.** (2010) Dichlorvos exposure impedes extraction and amplification of DNA from insects in museum collections. *Frontiers in Zoology* 7: 2-7.
- Evangelou, V.I., Bouga, M., Emmanouel, N.G., Perdakis D.Ch. and Papadoulis, G.Th.** (2013) Discrimination of two natural biocontrol agents in the Mediterranean region based on

mitochondrial DNA sequencing data. *Biochemical Genetics* 51: 825-840.

Fantinou, A.A., Baxevani, A., Drizou, F., Labropoulos, P., Perdakis, D. and Papadoulis G. (2012) Consumption rate, functional response and preference of the predaceous mite *Iphiseius degenerans* to *Tetranychus urticae* and *Eutetranychus orientalis*. *Experimental and Applied Acarology* 58(2): 133-144.

Faraji, F., Hajizadeh, J., Ueckermann, E.A., Kamali, K. and McMurtry, J.A. (2007) Two new records for Iranian phytoseiid mites with synonymy and keys to the species of *Typhloseiulus* Chant and McMurtry and Phytoseiidae in Iran (Acari: Mesostigmata). *International Journal of Acarology* 33(3): 231-239.

Farris, J.S. (1977) Phylogenetic analysis under Dollo's law. *Systematic Zoology* 26: 77-88.

Felsenstein, J. (1985) Confidence-Limits on phylogenies - an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.

Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R. and Vrijenhoek, R. (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3: 294-299.

Freeland, J.R. (2005) Molecular Ecology-1st edition. *Wiley-Blackwel*.

Freeland, J.R., Petersen, S.D. and Kirk H. (2013) Molecular Ecology-2nd edition. *Wiley-Blackwel*.

Frey, J.E., Guillén, L., Frey, B., Samietz, J., Rull, J. and Aluja, M. (2013) Developing diagnostic SNP panels for the identification of true fruit flies (Diptera: Tephritidae) within the limits of COI-based species delimitation. *BMC Evolutionary Biology* 13:106.

Garman, P. (1948) Mite species from apple trees in Connecticut. *Connecticut Agricultural Experimental Station Bulletin* 520: 5-27.

Gerson, U., Smiley, R.L. and Ochoa, R. (2003) Mites (Acari) for Pest Control. *Blackwell Science Ltd, UK*. 539 p.

Gilbert, Th.M.P., Moore, W., Melchior, L. and Worobey, M. (2007) DNA extraction from dry museum beetles without conferring external morphological damage. *PLoS ONE* 2(3): e272.

Gurr, G.M., Wratten, S.D. and Snyder W.E. (2012) Biodiversity and Insect Pests: Key Issues for Sustainable Management. *John Wiley & Sons* 368pp.

Hajibabaei, M., Singer, G.A.C., Hebert, P.D.N. and Hickey, D.A. (2007) DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. *Trends in Genetics* 23: 167-172.

Halos, L., Jamal, T., Vial, L., Maillard, R., Suau, A., Le Menach, A., Boulouis, H.-J. and Vayssier-Taussat, M. (2004) Determination of an efficient and reliable method for DNA extraction from ticks. *Veterinary Research* 35: 709-713.

Harrison, R.G. (1989) Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology. *Trends in Ecology & Evolution* 4: 6-11.

- Hebert, P.D., Cywinska, A., Ball S.L. and deWaard, J.R.** (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London B-Biological Sciences* 270: 313-322.
- Hebert, P.D., Stoeckle, M.Y., Zemplak, T.S and Francis, C.M.** (2004) Identification of birds through DNA barcodes. *PLoS Biology* 2: e312.
- Hebert, P.D. and Gregory, T.R.** (2005) The promise of DNA barcoding for taxonomy. *Systematic Biology* 54: 852-859.
- Hernandes, F.A., Kreiter, S. and Tixier, M.-S.** (2011) Biogeographical analysis within the family Phytoseiidae berlese (Acari:Mesostigmata): An example from the large sub-genus *Typhlodromus* (*Anthoseius*) de leon. *Acarologia* 51(4): 431-448.
- Hernandes, F.A., Kreiter, S., Tixier M.-S.** (2012) The first electronic polytomous key to the world species of the subgenus *Typhlodromus* (*Anthoseius*) De Leon (Acari: Phytoseiidae). *Zootaxa* 3451: 46-59 (<http://www1.montpellier.inra.fr/CBGP/phytoseiidae/anthoseiuskeypresentation.html>).
- Hill, C.A. and Gutierrez, J.A.** (2003) A method for extraction and analysis of high quality genomic DNA from ixodid ticks. *Medical and Veterinary Entomology* 17(2): 224-227.
- Hinomoto, N. and Maeda, T.** (2004) Isolation of Microsatellite Markers in *Neoseiulus womersleyi* Schicha (Acari: Phytoseiidae). *Journal of the Acarological Society of Japan* 14(1): 25-30.
- Hinomoto, N., Shintaku, T. and Amano, H.** (2010) Comparison of genetic diversity among three Phytoseiid mite species in Japan by mitochondrial DNA sequence analysis. *Journal of Acarological Society of Japan* 19(1): 9-14.
- Hinomoto, N., Todokoro, Y. and Higaki, T.** (2011) Population structure of the predatory mite *Neoseiulus womersleyi* in a tea field based on an analysis of microsatellite DNA markers. *Experimental and Applied Acarology* 53(1): 1-15.
- Hirschmann, W.** (1957) Gangsystematik der Parasitifomes. *Acarologie Schriftenreihe fur Vergleichende Milbenkunde* 1-20.
- Hirschmann W.** (1962) Gangsystematik der Parasitifomes. *Acarologie Schriftenreihe fur Vergleichende Milbenkunde* 80.
- Hofreiter, M.** (2012) Nondestructive DNA extraction from museum specimens. *Methods of Molecular Biology* 840: 93-100.
- Hoy, M.A. and Jeyaprakash, A.** (2005) Microbial diversity in the predatory mite *Metaseiulus occidentalis* (Acari: Phytoseiidae) and its prey, *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *Biological Control* 32(3): 427-441.
- Hoy, M.A.** (2009) Genome analyses of the predatory mite *Metaseiulus occidentalis*: mitey small and mitey large. *BioEssays* 31: 581-590
- Hunter, S.J., Goodall, T.I., Walsh, K.A., Owen, R. and Day, J.C.** (2008) Nondestructive DNA extraction from blackflies (Diptera: Simuliidae): retaining voucher specimens for DNA barcoding projects. *Molecular Ecology Resources* 8(1): 56-61.

- Ivanova, N.V., Dewaard, J.R. and Hebert, P.D.N.** (2006) An inexpensive, automation-friendly protocol for recovering high-quality DNA. *Molecular Ecology Notes* 6: 998-1002.
- Janzen, D.H., Hallwachs, W., Harvey, D., Darrow, K., Rougerie, R., Hajibabaei, M., Smith, M.A., Chacon, I., Espinoza, B., Sullivan, B., Decaëns, T., Herbin, D., Chavarria, L.F., et al.** (2012) What happens to the traditional taxonomy when a well-known tropical saturniid moth fauna is DNA barcoded? *Invertebrate Systematics* 26: 478-505.
- Jeyaprakash, A. and Hoy, M.A.** (2002) Mitochondrial 12S rRNA sequences used to design a molecular ladder assay to identify six commercially available phytoseiids (Acari: Phytoseiidae). *Biological Control* 25: 136-142.
- Jeyaprakash, A. and Hoy, M.A.** (2004) Multiple displacement amplification in combination with high-fidelity PCR improves detection of bacteria from single females or eggs of *Metaseiulus occidentalis* (Nesbitt) (Acari: Phytoseiidae). *Journal of Invertebrate Pathology* 86(3): 111-116.
- Jeyaprakash, A. and Hoy, M.A.** (2007) The mitochondrial genome of the predatory mite *Metaseiulus occidentalis* (Arthropoda: Chelicerata: Acari: Phytoseiidae) is unexpectedly large and contains several novel features. *Gene* 391: 264-274.
- Jeyaprakash, A. and Hoy, M.A.** (2009) The nuclear genome of the phytoseiid *Metaseiulus occidentalis* (Acari: Phytoseiidae) is among the smallest known in arthropods. *Experimental and Applied Acarology* 47: 263-273.
- Jeyaprakash, A. and Hoy, M.A.** (2010a) A DNA extraction procedure that allows mite specimens to be slide mounted: phytoseiid species evaluated as a model. *Experimental and Applied Acarology* 52(2): 131-140.
- Jeyaprakash, A. and Hoy, M.A.** (2010b) Real-time PCR reveals endosymbiont titer fluctuations in *Metaseiulus occidentalis* (Acari: Phytoseiidae) colonies held at different temperatures. *Florida Entomologist* 93(3): 464-466.
- Jung, S., Duwal, R. K. and Lee, S.** (2011) COI barcoding of true bugs (Insecta, Heteroptera). *Molecular Ecology Resources* 11: 266-270.
- Kanouh, M., Tixier, M.-S., Okassa, M. and Kreiter, S.** (2010a) Phylogenetic and biogeographic analysis of the genus *Phytoseiulus* (Acari: Phytoseiidae). *Zoologica Scripta* 39(5): 450-461.
- Kanouh, M., Tixier, M.-S., Guichou, S., Brigitte, C. and Kreiter, S.** (2010b) Two synonymy cases within the genus *Neoseiulella* (Acari: Phytoseiidae): is the molecular evidence so evident? *Biological Journal of the Linnean Society* 101: 323-344.
- Kleppe, K., Ohtsuka, E., Kleppe, R., Molineux, I. and Khorana, H.G.** (1971) Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNAs as catalyzed by DNA polymerases. *Journal of Molecular Biology* 56: 341-361.
- Kim, S.Y., Park, S.H., Piao, H., Chung, U., Ko, K.S. and Hwang, J.-J.** (2013) Vouchering of forensically important fly specimens by nondestructive DNA extraction. *ISRN Entomology* 2013(1): 1-5.

- Kimura, M.** (1980) A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16: 111-120.
- Kimura, M.** (1983) The Neutral Theory of Molecular Evolution. *Cambridge University Press*, UK, 384 pp.
- Kluge, A.G., and Farris, J.S.** (1969) Quantitative phyletics and the evolution of anurans. *Systematic Zoology* 18: 1-32.
- Kohlmann, K., Gross, R., Murakaeva, A. and Kersten, P.** (2003) Genetic variability and structure of common carp (*Cyprinus carpio*) populations throughout the distribution range inferred from allozyme, microsatellite and mitochondrial DNA markers. *Aquatic Living Resources* 16(5): 421-431.
- Konakandla, B., Park, Y. and Margolies, D.** (2006) Whole genome amplification of Chelex-extracted DNA from a single mite: a method for studying genetics of the predatory mite *Phytoseiulus persimilis*. *Experimental and Applied Acarology* 40(3-4): 241-247.
- Kostiainen, T.S. and Hoy M.A.** (1996) The Phytoseiidae as biological control agents of pest mites and insects. A bibliography. *Monograph 17, University of Florida, Agricultural Experiment Station*, 355 pp.
- Kreiter, S. and Tixier, M.S.** (2010) A new genus and species of phytoseiid mites from the Brazilian Atlantic forest. *Acarologia* 50(2): 197-205.
- Levkanicova, Z. and Bocak, L.** (2009) Identification of net-winged beetle larvae (Coleoptera: Lycidae) using three mtDNA fragments: a comparison of their utility. *Systematic Entomology* 34: 210-221.
- Li, G.Q., Xue, X.F., Zhang, K.J. and Hong, X.Y.** (2010) Identification and molecular phylogeny of agriculturally important spider mites (Acari: Tetranychidae) based on mitochondrial and nuclear ribosomal DNA sequences, with an emphasis on *Tetranychus*. *Zootaxa* 2647: 1-15.
- Li, J.B., Li, Y.X., Sun, J.T., Xue, X.F., Xu, X.N. and Hong, X.** (2012) COI barcoding as a molecular assay for the identification of phytoseiid mites. *Systematic and Applied Acarology*, 17(4): 397-406.
- Librado, P. and Rozas, J.** (2009). DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25:1451-1452.
- Liu, Q.-H., Jiang, Li.Y. and Qiao, G.-X.** (2013) DNA barcoding of Greenideinae (Hemiptera:Aphididae) with resolving taxonomy problems. *Invertebrate Systematics* 27: 428-438.
- Lv, J., Wu, S., Zhang, Y., Chen, Y., Feng, C., Yuan, X., Jia, G., Deng, J., Wang, C., Wang, Q., Mei, L. and Lin, X.** (2014) Assessment of four DNA fragments (COI, 16S rDNA, ITS2, 12S rDNA) for species identification of the Ixodida (Acari: Ixodida). *Parasites and Vectors* 7(1): 93.

- Maggi, M., Medici, S., Quintana, S., Ruffinengo, S., Marcángeli, J., Gimenez Martinez, P., Fuselli, S. and Eguaras, M.** (2012) Genetic structure of *Varroa destructor* populations infesting *Apis mellifera* colonies in Argentina. *Experimental and Applied Acarology* 56: 309-318.
- Maraun, M., Heethoff, M., Schneider, K., Scheu, S., Weigmann, G., Cianciolo, J., Thomas, R.H. and Norton, R.A.** (2004) Molecular phylogeny of oribatid mites (Oribatida, Acari): evidence for multiple radiations of parthenogenetic lineages. *Experimental and Applied Acarology* 33(3): 183-201.
- Margaritopoulos, J.T., Gotosopoulos, B., Mamuri, Z., Skouras, P.J., Voudouris, K.C., Bacandritsos, N., Fantinou, A.A. and Tsitsipis, J.A.** (2007) Genetic variation among Mediterranean populations of *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae) as revealed by RFLP mtDNA analysis. *Bulletin of Entomological Research* 97: 299-308.
- Maryańska-Nadachowska, A., Kajtoch, Ł. and Lachowska, D.** (2011) Genetic diversity of *Philaenus spumarius* and *P. tessellatus* (Hemiptera, Aphrophoridae): implications for evolution and taxonomy. *Systematic Entomology* 37: 55-64.
- Mastan, S.G., Sudheer, P.D., Rahman, H., Ghosh, A., Rathore, M.S., Ravi Prakash, Ch. and Chikara, J.** (2012) Molecular characterization of intra-population variability of *Jatropha curcas* L. using DNA based molecular markers. *Molecular Biology Reports* 39(4): 4383-4390.
- McMurtry, J.A.** (2010) Concepts of classification of the Phytoseiidae: Relevance to biological control of mites, In Sabelis M.W. and Bruin J. (eds.), *Trends in Acarology: Proceedings of the 12th International Congress* 393-397.
- McMurtry, J.A. and Croft, B.A.** (1997) Life-styles of phytoseiid mites and their roles in biological control. *Annual Review of Entomology* 42: 291-321.
- Miller, A.D., Umina, P.A., Weeks, A.R. and Hoffmann, A.A.** (2012) Population genetics of the wheat curl mite (*Aceria tosichella* Keifer) in Australia: implications for the management of wheat pathogens. *Bulletin of Entomological Research* 102(2): 199-212.
- Miller, K.B., Alarie, Y., Wolfe, G.W. and Whiting, M.F.** (2005) Association of insect life stages using DNA sequences: the larvae of *Philodytes umbrinus* (Motschulsky) (Coleoptera: Dytiscidae). *Systematic Entomology* 30: 499-509.
- Moraes, G.J., McMurtry, J.A., Denmark, H.A. and Campos, C.B.** (2004) A revised catalog of the mite family Phytoseiidae. *Zootaxa* 434: 1-494.
- Mullis, K.B. and Faloona, F.A.** (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerasecatalysed chain-reaction. *Methods in Enzymology*. 155: 335-350.
- Muma, M.H.** (1961) Subfamilies, genera, and species of Phytoseiidae (Acarina: Mesostigmata). *Bulletin of Florida State Museum* 5: 267-302.
- Naidu, A., Fitak, R.R., Munguia-Vega, A. and Culver, M.** (2012) Novel primers for complete mitochondrial cytochrome b gene sequencing in mammals. *Molecular Ecology Resources* 12(2): 191-196.

- Nava, S., Venzal, J.M., Reyes Novelo, E.A., Mangold, A.J. and Labruna, M.B.** (2012) Morphological study of *Ornithodoros viguerasi* cooley and kohls, 1941 (Acari: Ixodida: Argasidae), with sequence information from the mitochondrial 16S rDNA gene. *Acarologia* 52(1): 29-38.
- Navajas, M., J. Gutierrez, J. Lagnel and P. Boursot.** (1996) Mitochondrial cytochrome oxidase I in tetranychid mites: a comparison between molecular phylogeny and changes of morphological and life history traits. *Bulletin of Entomological Research* 86: 407–417.
- Navajas, M. and Fenton, B.** (2000) The application of molecular markers in the study of diversity in acarology: a review. *Experimental & Applied Acarology* 24(10-11): 751-774.
- Navajas, M. and Navia, D.** (2010) DNA-based methods for eriophyoid mite studies: review, critical aspects, prospects and challenges. *Experimental & Applied Acarology* 51(1-3): 257-271.
- Navia, D., de Moraes, G.J., Roderick, G. and Navajas, M.** (2005) The invasive coconut mite *Aceria guerreronis* (Acari: Eriophyidae): origin and invasion sources inferred from mitochondrial (16S) and nuclear (ITS) sequences. *Bulletin of Entomological Research* 95(6): 505-516.
- Nei, M. and Kumar, S.** (2000) Molecular evolution and phylogenetics. Oxford University Press, Oxford, England/New York, USA. 333 pp.
- Nesbitt, H.H.J.** (1951) A taxonomic study of the Phytoseiinae (family Laelaptidae) predaceous upon Tetranychidae of economic importance. *Zoologische Verhandelingen*, 12: 1-96.
- Okassa, M., Tixier, M.-S. and Kreiter, S.** (2011a) Morphological and molecular diagnostics of *Phytoseiulus persimilis* and *Phytoseiulus macropilis* (Acari: Phytoseiidae). *Experimental & Applied Acarology* 52(3): 291-303.
- Okassa, M., Kreiter, S., Guichou, S. and Tixier, M.-S.** (2011b) Molecular and morphological boundaries of the predatory mite *Neoseiulus californicus* (McGregor) (Acari: Phytoseiidae). *Biological Journal of the Linnean Society* 104: 393-406.
- Okassa, M., Kreiter, S. and Tixier, M.-S.** (2012) Obtaining molecular data for all life stages of *Typhlodromus (Typhlodromus) exhilaratus* (Mesostigmata: Phytoseiidae): consequences for species identification. *Experimental & Applied Acarology* 57(2): 105-116.
- Ota, S., Karasawa, S., Nakamura, T., Harada, H. and Shimano, S.** (2011) Non-destructive DNA extraction protocol for oribatid mites (Acari: Oribatida). *Edaphologia* 89: 19-24.
- Overmeer, W.P.J.** (1981) Notes on breeding phytoseiid mites from orchards (Acarina: Phytoseiidae) in the laboratory. *Meded Fac Landbouwwet Rijksuiv Gent*, 46: 503-509.
- Palumbi, S., Martin, A., Romano, S., McMillan, W. O., Stice, L. and Grabowski, G.** (1991) The Simple Fool's Guide to PCR. University of Hawaii, Department of Zoology and Kewalo Marine Laboratory.

- Papadoulis, G.Th. and Emmanouel, N.G.** (1988) *Typhlodromus erymanthii*, a new species of the family Phytoseiidae (Acari: Mesostigmata) from Greece. *Entomologica Hellenica* 6: 3-6.
- Παπαδοῦλης, Γ.Θ.** (1994) Συμβολή στη μελέτη της μορφολογίας και συστηματικής των Phytoseiidae (Acari: Mesostigmata) που απαντούν στην Ελληνική χλωρίδα. Διδακτορική Διατριβή - Αθήνα, 462 σελ.
- Papadoulis, G.Th. and Emmanouel, N.G.** (1994) A new species of *Typhlodromus scheuten* (Acari: phytoseiidae) from Greece. *International Journal of Acarology* 20(3): 183-187.
- Papadoulis, G., Emmanouel, N.G. and Kapaxidi, E.V.** (2009) Phytoseiidae of Greece and Cyprus. Indira Publishing House, West Bloomfield, Michigan, USA, 200pp.
- Paquin, P. and Hedin, M.** (2004) The power and perils of ‘molecular taxonomy’: a case study of eyeless and endangered *Cicurina* (Araneae: Dictynidae) from Texas caves. *Molecular Ecology* 13: 3239-3255.
- Paquin, P. and Vink, C.J.** (2009) Testing compatibility between molecular and morphological techniques for arthropod systematics: a minimally destructive DNA extraction method that preserved morphological integrity, and the effect of lactic acid on DNA quality. *Journal of Insect Conservation* 13: 453-457.
- Pasquer, F., Pfunder, M., Frey, B. and Frey, J.E.** (2009). Microarray-based genetic identification of beneficial organisms as a new tool for quality control of laboratory cultures. *Biocontrol Science and Technology* 19(8): 809-833.
- Piffaretti, J., Vanlerberghe-Masutti, F., Tayeh, A., Clamens, A.-L., Coeur D'Acier, A. and Jusselin, E.** (2012) Molecular phylogeny reveals the existence of two sibling species in the aphid pest *Brachycaudus helichrysi* (Hemiptera: Aphididae). *Zoologica Scripta* 41: 266-280.
- Porco, D., Rougerie, R., Deharveng, L. and Hebert, P.** (2010) Coupling non-destructive DNA extraction and voucher retrieval for small soft-bodied Arthropods in a high throughput context: the example of Collembola. *Molecular Ecology Resources* 10: 942-945.
- Puillandre, N., Bouchet, P., Boisselier-Dubayle, M.C., Brisset, J., Buge, B., Castelin, M., Chagnoux, S., Christophe, T., Corbari, L., Lambourdière, J., Lozouet, P., Marani, G., Rivasseau, A., Silva, N., Terryn, Y., Tillier, S., Utge, J. and Samadi, S.** (2012) New taxonomy and old collections: integrating DNA barcoding into collections curation processes. *Molecular Ecology Resources* 12: 396-402.
- Ramadan, H.A.I., El-Banhawy, E.M., Hassan, A.A. and Afia, S.I.** (2004) Genetic variation in the predacious phytoseiid mite, *Amblyseius swirskii* (Acari: Phytoseiidae): Analysis of specific mitochondrial and nuclear sequences. *Arab Journal of Biotechnology* 7(2): 189-196.
- Ramadan, H.A.I., El-Banhawy, E.M. and Afia, S.I.** (2009) On the identification of a taxa collected from Egypt in the species sub-group andersoni: morphological relationships with related species and molecular analysis of inter and intra-specific variations (Acari: Phytoseiidae). *Acarologia* 49(3-4): 115-120.

- Robyt, J.F. and White, B.J.** (1990) *Biochemical Techniques Theory and Practice*. *Waveland Press*.
- Rowley, D.L., Coddington, J.A., Gates, M.W., Norrbom, A.L., Ochoa, R.A., Vandenberg, N.J. and Greenstone, M.H.** (2007) Vouchering DNA-barcoded specimens: test of a nondestructive extraction protocol for terrestrial arthropods. *Molecular Ecology Notes* 7: 915-924
- Rubinoff, D., Cameron, S. and Will, K.** (2006) A genomic perspective on the shortcomings of mitochondrial DNA for "barcoding" identification. *Journal of Heredity* 97(6): 581-594.
- Rzhetsky, A. and Nei, M.** (1993) Theoretical foundation of the minimum-evolution method of phylogenetic inference. *Molecular Biology and Evolution* 10:1073-1095.
- Sabater-Munoz, B., Pascual-Ruiz, S., Gómez-Martínez, M.A., Jacas, J.A. and Hurtado, M.A.** (2012) Isolation and characterization of polymorphic microsatellite markers in *Tetranychus urticae* and cross amplification in other Tetranychidae and Phytoseiidae species of economic importance. *Experimental and Applied Acarology* 57(1): 37-51.
- Sambrook, J. and Russel, D.W.** (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 3rd Ed. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*. Cold Spring Harbor, NY.
- Saitou, N. and Nei, M.** (1987) The Neighbor-Joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4: 406-425.
- Saitou, N. Imanishi, T.** (1989) Relative efficiencies of the Fitch-Margoliash, maximum-parsimony, maximum-likelihood, minimum-evolution, and neighbor-joining methods of phylogenetic tree construction in obtaining the correct tree. *Molecular Biology and Evolution* 6: 514-525.
- Sambrook, J., Fritch, A.F., Maniatis, T.** (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, second edition.
- Sanger, F., and Coulson, A.R.** (1975) A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Journal of Molecular Biology* 94: 441-448.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R.** (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 74: 5463-5467.
- Schausberger, P. and Croft, B.A.** (2000) Cannibalism and intraguild predation among phytoseiid mites: are aggressiveness and prey preference related to diet specialization? *Experimental and Applied Acarology* 24(9): 709-725.
- Schausberger, P.** (2003) Cannibalism among phytoseiid mites: a review. *Experimental and Applied Acarology* 29: 173-91.
- Sellnick, M.** (1944) Zercon C.L. KOCH. – Acari (Lotzen) 5: 30-41.
- Sezonlin, M., Dupas, S., Le Rü, B., Le Gall, P., Moyal, P., Calatayud, P.A., Giffard, I., Faure, N., Silvain, J.F.** (2006) Phylogeography and population genetics of the maize stalk borer *Busseola fusca* (Lepidoptera, Noctuidae) in sub-Saharan Africa. *Molecular Ecology* 15: 407-420.

- Sfikas, G.** (2001) Trees and Shrubs of Greece. *Efstathiadis Group S.A.* Greece.
- Shirdel, D.** (2003) Survey on the phytoseiid fauna of East Azarbaijan. Ph. D. thesis (unpublished). Department of Plant protection, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
- Shirdel, D., Kamali, K. and Faraji, F.** (2008) Redescription of *Typhloseiulus carmonae* (Chant and Yoshida-Shaul) (Mesostigmata: Phytoseiidae) new species for Iran. *Acarina* 16(1): 51-56.
- Simon, C., Frati, F., Bechenbach, A., Crespi, B., Liu, H. and Flook, P.** (1994) Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequence and compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America* 87: 651-701.
- Simonsen, M., Mailund, T., and Pedersen C.N.S.** (2008) Algorithms in Bioinformatics: Rapid Neighbour-Joining. *Springer Berlin / Heidelberg* 5251: 113-122.
- Sonoda, S., Kohara, Y., Siqingerile, Toyoshima, S., Kishimoto, H. and Hinomoto, N.** (2012) Phytoseiid mite species composition in Japanese peach orchards estimated using quantitative sequencing. *Experimental and Applied Acarology* 56(1): 9-22.
- Sneath, P.H.A. and Sokal, R.R.** (1973) Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification. *San Francisco: Freeman* 573.
- Sperling, F.A. and Hickey, D.A.** (1994) Mitochondrial DNA sequence variation in the spruce budworm species complex (Choristoneura: Lepidoptera). *Molecular Biology and Evolution* 11: 656-665.
- Stathakis, Th.I. and Papadoulis, G.Th.** (2012) New records of phytoseiid mites from Greece with description of *Typhlodromus (Anthoseius) creticus* sp. nov. (Acari: Phytoseiidae). *International Journal of Acarology* 38(2): 116-119.
- Sun, J.-T., Lian, C., Navajas, M. and Hong, X.-Y.** (2012) Microsatellites reveal a strong subdivision of genetic structure in Chinese populations of the mite *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). *BMC Genetics* 13: 8.
- Swindell, S.R.** (1997) Methods in Molecular Biology: Sequence Data Analysis Guidebook. *Humana Press* 384 pp.
- Takahashi, K., and Nei, M.** (2000) Efficiencies of fast algorithms of phylogenetic inference under the criteria of maximum parsimony, minimum evolution, and maximum likelihood when a large number of sequences are used. *Molecular Biology and Evolution* 17: 1251-1258.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. and Kumar, S.** (2011) MEGA 5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731-2739.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipiski, A. and Kumar, S.** (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725-2729.

- Terradas, J.** (1999) Holm Oak and Hold Oak Forests: An Introduction, In Ecology of Mediterranean Evergreen Oak Forests – Ecological Studies, Vol. 137, Analysis and Synthesis, (eds Roda, F., Retana, J., Gracia, C.A., Bellot) Springer, Berlin, 3-14pp.
- Thomsen, P.F., Elias, S., Gilbert, M.T.P., Haile, J., Munch, K., et al.** (2009) Non-Destructive sampling of ancient insect DNA. *PLoS ONE* 4(4): e5048.
- Thomson, J., Higgins, D. and Gibson, T.** (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673-4680.
- Tixier, M.-S., Kreiter, S., Barbar, Z., Ragusa, S. and Cheval, B.** (2006) The status of two cryptic species: *Typhlodromus exhilaratus* Ragusa and *Typhlodromus phialatus* Athias-Henriot (Acari: Phytoseiidae): consequences for taxonomy. *Zoologica scripta* 35: 115-122.
- Tixier, M.-S., Kreiter, S. and de Moraes, G.J.** (2008a) Biogeographic distribution of the Phytoseiidae (Acari: Mesostigmata). *Zoological Journal of the Linnean Society* 93: 845-856.
- Tixier, M.-S., Kreiter, S., Croft, B.A. and Cheval, B.** (2008b) *Kampimodromus aberrans* (Acari Phytoseiidae) from the USA - morphological and molecular assesment of its density. *Bulletin of Entomological Research* 98: 125-134.
- Tixier, M.-S. and Kreiter, S.** (2009) Arthropods in biodiversity hotspots: the case of the Phytoseiidae (Acari: Mesostigmata). *Biodiversity and Conservation* 18(3): 507-527.
- Tixier, M.-S., Ferrero, M., Okassa, M., Guichou, S. and Kreiter, S.** (2010a) On the specific identity of specimens of *Phytoseiulus longipes* Evans (Mesostigmata: Phytoseiidae) showing different feeding behaviours: morphological and molecular analyses. *Bulletin of Entomological Research* 100: 569-579.
- Tixier, M.-S., Guichou, S. and Kreiter, S.** (2010b).Assessment of the usefulness of eight DNA fragments for phylogenetic studies within the family Phytoseiidae. . *In: Trends in Acarology. Proceedings of the 12th International Congress* Amsterdam 41-47.
- Tixier, M.-S., Okassa, M., Liguori, M., Poinso, A., Salerno, B. and Kreiter, S.** (2010c). Voucher specimens for DNA sequences of phytoseiid mites (Acari: Mesostigmata). *Acarologia* 50: 487-494.
- Tixier, M.-S., Hernandez-Akashi, F., Guichou, S. and Kreiter, S.** (2011a) The puzzle of DNA sequences of Phytoseiidae (Acari: Mesostigmata) in the public Genbank database. *Invertebrate Systematics* 25: 389-406.
- Tixier, M.-S., Tsolakis, H., Ragusa, S., Poinso, A., Ferrero, M., Okassa, M. and Kreiter, S.** (2011b) Integrative taxonomy demonstrates the unexpected synonymy between two predatory mite species: *Cydnodromus idaeus* and *C. picanus* (Acari: Phytoseiidae). *Invertebrate Systematics* 25(4): 273-281.
- Tixier, M.-S.** (2012a) Electronic polytomous key to species of the sub-genus *Typhlodromus* (*Typhlodromus*) Scheuten (Acari: Phytoseiidae) of the world. (<http://www1.montpellier.inra.fr/CBGP/phytoseiidae/Typhlodromuskeypresentation.html>).

- Tixier, M.-S., Okassa, M. and Kreiter, S.** (2012b) An integrative morphological and molecular diagnostics for *Typhlodromus pyri* (Acari: Phytoseiidae). *Zoologica Scripta* 41(1): 68-78.
- Tixier, M.-S.** (2012c) Statistical approaches to assess intraspecific variations of morphological continuous characters: the case study of the family Phytoseiidae (Acari: Mesostigmata). *Cladistics* 28: 489-502.
- Tixier, M.S., Kreiter, S. and Kanouh, M.** (2012d) Electronic polytomous key to species of the genus *Neoseiulella* Muma (Acari: Phytoseiidae) of the world. (<http://www1.montpellier.inra.fr/CBGP/phytoseiidae/Neoseiulellakeypresentation.html>).
- Tixier, M.-S., Otto, J., Kreiter, S., Dos Santos, V. and Beard, J.** (2014) Is *Neoseiulus wearnei* the *Neoseiulus californicus* of Australia? *Experimental & Applied Acarology* 62(3): 267-277.
- Tsagkarakou, A., Mouton, L., Kristoffersen, J.B., Dokianakis, E., Grispou, M. and Bourtzis, K.** (2012) Population genetic structure and secondary endosymbionts of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) from Greece. *Bulletin of Entomological Research* 102 (3): 353-365.
- Tsolakis, H. and Ragusa, S.** (2010) Generic concept of the phytoseiids (Acari: Phytoseiidae) according to Athias-Henriot. *Acarologia* 50(4): 415-429.
- Tsolakis, H., Tixier, M.-S., Kreiter, S. and Ragusa, S.** (2012) The concept of genus within the family Phytoseiidae (Acari: Parasitiformes): historical review and phylogenetic analyses of the genus *Neoseiulus* Hughes. *Zoological Journal of the Linnean Society* 156: 253-273.
- Tsoukanas, V.L., Papadopoulos, G.D., Fantinou, A.A. and Papadoulis., G.Th.** (2006) Temperature-dependent development and life table of *Iphiseius degenerans* (Acari: Phytoseiidae). *Environmental Entomology* 35(2): 212-218.
- Valdecasas, A.G. and Abad, A.** (2011) Morphological confocal microscopy in Arthropods and the enhancement of autofluorescence after proteinase k extraction. *Microscopy and Microanalysis* 17: 109-113.
- Valentini, A., Pompanon, F. and Taberlet, P.** (2009) DNA barcoding for ecologists. *Trend in Ecology and Evolution* 24: 110-117.
- Van Driesche, R.G. and Bellows, T.S.** (1996) Biological Control. *Chapman and Hall*, New York, U.S.A.
- Vantornhout, I., Minnaert, H.L., Tirry, L. and de Clercq, P.** (2004) Effect of pollen, natural prey and factitious prey on the development of *Iphiseius degenerans*. *Biocontrol* 49: 627-644.
- Vantornhout, I., Minnaert, H.L., Tirry, L. and de Clercq, P.** (2005) Influence of diet on life table parameters of *Iphiseius degenerans* (Acari: Phytoseiidae). *Experimental & Applied Acarology* 35: 183-195.

- Whitlock, R., Hipperson, H., Mannarelli, M. and Burke, T.** (2008) A high-throughput protocol for extracting high-purity genomic DNA from plants and animals. *Molecular Ecology Resources* 8: 736-741.
- Wilkerson, R.C., Parsons, T.J., Albright, D.G., Klein, T.A. and Braun, M.J.** (1993) Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers readily distinguish cryptic mosquito species (Diptera: Culicidae: *Anopheles*). *Insect Molecular Biology* 1(4): 205-211.
- Wu, K. and Hoy, M.A.** (2012) Extended starvation reduced and eliminated Wolbachia, but not Cardinium, from *Metaseiulus occidentalis* females (Acari: Phytoseiidae): a need to reassess Wolbachia's status in this predatory mite? *Journal of Invertebrate Pathology* 109(1): 20-26.
- Wu, H-B., Wen, C-G, and Guo, W.** (2012) Sequence variation of the mitochondrial 12S rRNA gene among *Unionicola* (Wolcottatax) *arcuata* (Acari: Unionicolidae) from freshwater mussels in China. *International Journal of Acarology* 38(5): 394-401.
- Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L. and Miller, W.** (2000) A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of Computational Biology* 7: 203-214.
- Zhao, Y.E., Xu, J.R., Hu, L., Wu, L.P. and Wang, Z.H.** (2012) Complete sequence analysis of 18S rDNA based on genomic DNA extraction from individual Demodex mites (Acari: Demodicidae). *Experimental Parasitology* 131(1): 45-51.

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Μάρπος, 2015

Βασιλική Ι. Ευαγγέλου

Ατομικά Στοιχεία

Όνομα Πατρός: Ιωάννης
Όνομα Μητρός: Μαριάνθη
Ημ/νία Γέννησης: 20/03/1986
Τόπος Γέννησης: Αθήνα, Αττική
Διεύθυνση: Δάσους 1, Χαλάνδρι / Τ.Κ.15233
Τηλέφωνο: 697 8869459
Ηλεκτρονική Διεύθυνση: v.evangelou@aua.gr

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

2010 - 2015: Υποψήφια διδάκτωρ στο Εργαστήριο Γεωργικής Ζωολογίας κ Εντομολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών με τίτλο διατριβής «Χρήση μοριακών μεθόδων για τον προσδιορισμό και τη διερεύνηση της γενετικής ποικιλομορφίας ειδών της οικογένειας Phytoseiidae (Acari: Mesostigmata)». – *Στάδιο συγγραφής διδακτορικής διατριβής*

2008-2010: Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης στην κατεύθυνση «Φυτοπροστασία και Περιβάλλον» του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών «Επιστήμη και σύγχρονα συστήματα φυτικής παραγωγής, φυτοπροστασίας και αρχιτεκτονικής τοπίου», Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

- Βαθμός: Άριστα (9,17)
- Μεταπτυχιακή Μελέτη: Εργαστήριο Γεωργικής Ζωολογίας κ Εντομολογίας, «Χρήση μοριακών δεικτών για τη διάκριση πληθυσμών των ειδών εντόμων *Macrolophus pygmaeus* και *Macrolophus melanotoma* (Hemiptera: Miridae)»
- 10ήμερη Πρακτική Άσκηση: Εργαστήριο Ακαρολογίας κ Γεωργικής Ζωολογίας, Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο

2003-2008: Πτυχίο Γεωπόνου, κατεύθυνση Φυτοπροστασίας και Περιβάλλοντος, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

- Βαθμός: Λίαν Καλώς (7,27)
- Πτυχιακή Μελέτη: Εργαστήριο Γεωργικής Ζωολογίας κ Εντομολογίας, «Μελέτη του εντόμου της ελάτης *Physokermes hemicryphus* (Dalman) (Homoptera: Coccidae) στο όρος Πάρνηθα»
- Τετράμηνη Πρακτική Άσκηση: Εργαστήριο Γεωργικής Ζωολογίας κ Εντομολογίας, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Ξένες Γλώσσες – Πληροφορική

Αγγλικά (Certificate of Proficiency in English, University of Michigan).

ECDL Expert Certificate – Syllabus version 1.0 (Database, Word Processing, Presentation, Spreadsheets, Windows, Internet).

Επαγγελματική Εμπειρία

01/11/2013 - Σήμερα: Επιστημονική υπεύθυνη του ευρωπαϊκού προγράμματος: “*MARS — Marker Assisted Resistance to Sharka*”. See-Era.Net - 7th Framework Programme for Research and Technological Development, FP7-KBBE-2013-7-single-stage (Στα πλαίσια συνεργασίας με την εταιρεία Food Allergens Laboratory -Partner).

- Συντονισμός δειγματοληψιών και εφαρμογής μοριακών τεχνικών σε φυτά βερικοκιάς για τον εντοπισμό ανθεκτικότητας σε υβρίδια
- Εξέλιξη πρωτοκόλλου απομόνωσης γενετικού υλικού
- Συμμετοχή στις συναντήσεις με υπόλοιπους partner
- Συγγραφή εκθέσεων
- Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων

12/01/2011 - Σήμερα: Επιστημονική Συνεργάτης της εταιρείας “Food Allergens Laboratory” – Υπεύθυνη Εργαστηρίου Μοριακών Τεχνικών – Υπεύθυνη Διαχείρισης Ποιότητας (ΕΣΥΔ)

- Συλλογή - Καταχώρηση δειγμάτων
- Πραγματοποίηση αναλύσεων τροφίμων (υπολείμματα φαρμάκων, Ανίχνευση παθογόνων, αλλεργιογόνων κα, Έλεγχος Γενετικά Τροποποιημένων προϊόντων κλπ)
- Επεξήγηση & εγκατάσταση μεθόδων/εξοπλισμού ελέγχου (μοριακών-микροβιολογικών μεθόδων κλπ)

01/04/2014 - 31/08/2014: Συμμετοχή στο πρόγραμμα του ΜΦΙ (συντονιστής: Δρ Μυλωνάς) “Μελέτη της εξάπλωσης εντόμων στη Νότιο Ανατολική πλευρά της Ευρωπαϊκής Ένωσης σε σχέση με την αλλαγή του κλίματος, εστιάζοντας σε κοκκοειδή έντομα (Hemiptera: Coccoidea)”, που χρηματοδοτείται από τη Γ.Γ.Ε.Τ. (ΜΦΙ – κος Μυλωνάς)

15/05/2011 - 31/12/2012: Επιστημονική υπεύθυνη του ευρωπαϊκού προγράμματος: “*Conservation and sustainable exploitation of indigenous Medicinal and Aromatic plants traditionally used in the SEE, WB countries. A model approach for Sideritis spp. (Mountain tea)*”. See-Era.Net - 7th Framework Programme for Research and Technological Development (Στα πλαίσια συνεργασίας με την εταιρεία Food Allergens Laboratory (Partner)).

- Δημιουργία κ εφαρμογή πρωτοκόλλου ανάλυσης μετάλλων σε τσάι *Sideritis spp.*
- Διερεύνηση Ευρωπαϊκής κ Παγκόσμιας νομοθεσίας σχετικά με την κατανάλωση τσαγιού: Πλεονεκτήματα, Μειονεκτήματα
- Βιβλιογραφική αναζήτηση κι εγγραφή εκθέσεων

30/08/2010 - 31/12/2012: Θέση Εργαστηριακού Ερευνητή υπό τον «Φορέα Πιστοποίησης Βασιλισσών Μελισσών» - Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Εργαστήριο Γεωργικής Ζωολογίας κ Εντομολογίας.

- Δειγματοληψία μελισσών
- Εφαρμογή μοριακών τεχνικών (ανάπτυξη και χρήση περιοριστικών ενζύμων) και προσδιορισμός-διάκριση των φυλών του εντόμου ανά περιοχή δειγματοληψίας

01/06/2009 - 31/12/2010: Συμμετοχή στο Πρόγραμμα «Παρακολούθηση και έλεγχος του πληθυσμού των εντόμων στον Διεθνή Αερολιμένα Αθηνών». Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Εργαστήριο Γεωργικής Ζωολογίας κ Εντομολογίας.

- Δειγματοληψίες εντόμων
- Αναγνώριση, παρακολούθηση εντόμων (ορθοπτέρων)
- Διενέργεια πειραματικών ψεκασμών (βιοδοκιμές) - Αξιολόγηση φυτοπροστατευτικών προϊόντων
- Σύνταξη έκθεσης προόδου

Κοιτίς σε Διεθνή Περιοδικά με Impact factor

Journal of Medicinal Plants Research (2015 – 0.89)

Molecular Ecology (2015 – 5.84)

Ερευνητικές Εργασίες - Δημοσιεύσεις

1. **Evangelou V.I.**, Bouga M. and Papadoulis G.Th. Molecular Identification in Early Life Stages of the predatory mite *Iphiseius degenerans* (Acari: Phytoseiidae) for timely effective Biological Control. *Agricultural & Forest Entomology* under review
2. **Evangelou V.I.**, Bouga M., Emmanouel N.G., Perdikis D.Ch. and Papadoulis G.Th. (2013) Discrimination of two natural biocontrol agents existing at the Mediterranean region based on mitochondrial DNA sequencing data. *Biochemical Genetics* 51 (11-12): 825-840.
3. Bouga, M., **Evangelou, V.**, Lykoudis, D., Cakmak, I., Hatjina, F. (2011) Study on genetic structure of *Marchalina hellenica* (Hemiptera: Margarodidae) populations from Turkey: Preliminary mtDNA sequencing data. *Biochemical Genetics* 49 (11-12): 683-694.
4. Hatjina, F., Tsoktouridis, G., Bouga, M., Charistos, L., **Evangelou, V.**, Avtzis D., Meeus, I., Brunain, M., Smagghe, G., de Graaf, DC. (2011) Polar tube protein gene diversity among *Nosema ceranae* strains derived from a Greek honey bee health study. *Journal of Invertebrate Pathology* 108 (2): 131-134.

Ερευνητικές Εργασίες - Συνέδρια

1. **ΕΥΑΓΓΕΛΟΥ Β.Ι.**, Μ. ΜΠΟΥΓΑ, Γ.Θ. ΠΑΠΑΔΟΥΛΗΣ. Ταυτοποίηση του αρπακτικού ακάρεως *Iphiseius degenerans* (Acari: Phytoseiidae) σε διαφορετικά στάδια, με την εφαρμογή μοριακών τεχνικών σε μεμονωμένα άτομα. *15^ο Πανελλήνιο Εντομολογικό Συνέδριο – Καβάλα (22-25/10/2013)*.

2. **ΕΥΑΓΓΕΛΟΥ Β.Ι.**, Μ. ΜΠΟΥΓΑ, Γ.Θ. ΠΑΠΑΔΟΥΛΗΣ. Προσδιορισμός γενετικής αλληλουχίας με την εφαρμογή μοριακών δεικτών σε πληθυσμούς του γένους *Typhloseiulus* (Acari: Phytoseiidae). *15^ο Πανελλήνιο Εντομολογικό Συνέδριο* – Καβάλα (22-25/10/2013).
3. **Β. Ευαγγέλου**, Α. Λαμπιδώνης, Γ. Σειραγάκης. Μοριακές Τεχνικές στην Ασφάλεια - Ποιότητα - Γνησιότητα Τροφίμων. *4^ο Πανελλήνιο Συνέδριο «Βιοτεχνολογία και Τεχνολογία Τροφίμων* – Αθήνα (11-13/10/2013).
4. **Evangelou V.I.**, Bouga M. and Papadoulis G.Th. Sequencing data obtained by mtDNA gene segments analysis are used to discriminate Greek populations of the genus *Typhloseiulus* (Acari: Phytoseiidae). *7th Symposium of the EUROpean Association of Acarologists* – Vienna, Austria (9-13/07/2012).
5. ΣΕΙΡΑΓΑΚΗΣ Γ., Ρ. ΤΟΝΤΟΥ, **Β. ΕΥΑΓΓΕΛΟΥ**. Υποκατάσταση ζωικών λιπαρών για παραγωγή γαλακτοκομικών προϊόντων υψηλής διατροφικής αξίας - Παγωτό με ελαιόλαδο. (Replacement of animal origin fats in dairy products for high nutritional value novel foods. Ice cream with olive oil.) *4ο Πανελλήνιο Συνέδριο Τροφίμων «Σύγχρονη Προσέγγιση στην Υγιεινή και Ασφάλεια των Τροφίμων»* – Θεσσαλονίκη (11-13/11/2011).
6. SIRAGAKIS G., R. ΤΟΝΤΟΥ, Ε. CHRISTODOULOU, Τ. ΑΝΘΙ, **V. EVANGELOU**. Food allergens in table olives and olive spreads by immunoanalytical and molecular biology techniques. *4th Conference on "Biotechnology and olive products quality in the Mediterranean"* – Chania, Greece (31/10/2011 – 4/11/2011).
7. **ΕΥΑΓΓΕΛΟΥ Β.Ι.**, Μ. ΜΠΟΥΓΑ, Γ.Θ. ΠΑΠΑΔΟΥΛΗΣ. Μοριακοί δείκτες για τη διάκριση ειδών του γένους *Typhloseiulus* (Acari: Phytoseiidae). *14^ο Πανελλήνιο Εντομολογικό Συνέδριο* – Ναύπλιο (11-14/10/2011).
8. ΨΑΡΟΥΔΑΚΗ Σ., **Β. ΕΥΑΓΓΕΛΟΥ**, Δ. ΠΕΡΔΙΚΗΣ, Γ. ΠΑΠΑΔΟΥΛΗΣ, Α.Α. ΦΑΝΤΙΝΟΥ. Αρπακτική ικανότητα του *Macrolophus rymmaeus* (Heteroptera: Miridae) σε διάφορες πυκνότητες των φυτοφάγων ακάρεων: *Eutetranychus orientalis* και *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *14^ο Πανελλήνιο Εντομολογικό Συνέδριο* – Ναύπλιο (11-14/10/2011).
9. ΜΗΛΑ Σ., **Β. ΕΥΑΓΓΕΛΟΥ**, Μ. ΜΠΟΥΓΑ, Ν. ΕΜΜΑΝΟΥΗΛ. Γενετική ποικιλομορφία του εντόμου *Rhynchophorus ferrugineus* (Coleoptera: Curculionidae) (ρυγχοφόρος των φοινικοειδών) στην Ελλάδα - Προκαταρκτική έρευνα. *14^ο Πανελλήνιο Εντομολογικό Συνέδριο* – Ναύπλιο (11-14/10/2011).
10. **ΕΥΑΓΓΕΛΟΥ Β.**, Μ. ΜΠΟΥΓΑ, Ν. ΕΜΜΑΝΟΥΗΛ, Δ. ΠΕΡΔΙΚΗΣ, Γ. ΠΑΠΑΔΟΥΛΗΣ. Χρήση μοριακών δεικτών για τη διάκριση πληθυσμών των αρπακτικών εντόμων *Macrolophus rymmaeus* (Hemiptera: Miridae) και *Macrolophus melanotoma* (Hemiptera: Miridae). *13^ο Πανελλήνιο Εντομολογικό Συνέδριο* – Αλεξανδρούπολη (03-06/11/2009).
11. ΕΜΜΑΝΟΥΗΛ Ν., **Β. ΕΥΑΓΓΕΛΟΥ**, Μ. ΜΠΟΥΓΑ. Χρήση μοριακών δεικτών για τη διερεύνηση διαφορών σε πληθυσμούς του μελιτογόνου εντόμου *Physokermes hemicryphus* (Homoptera: Coccidae) στην Ελλάδα. – Προκαταρκτική Έρευνα. *13^ο Πανελλήνιο Εντομολογικό Συνέδριο* – Αλεξανδρούπολη (03-06/11/2009).
12. ΧΑΤΖΗΝΑ Φ., Γ. ΤΣΟΚΤΟΥΡΙΔΗΣ, Μ. ΜΠΟΥΓΑ, **Β. ΕΥΑΓΓΕΛΟΥ**, Δ. ΑΒΤΖΗΣ, Λ. ΧΑΡΙΣΤΟΣ. *Nosema ceranae* (Microspora: Nosematidae), ένας νέος παθογόνος οργανισμός της *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae). *13^ο Πανελλήνιο Εντομολογικό Συνέδριο* – Αλεξανδρούπολη (03-06/11/2009).

Παρακολούθηση Ημερίδων – Συνεδρίων

1. **30/01-02/02/2015**: ΕΞΠΟΤΡΟΦ: Έλεγχοι Επισημάνσης, Ασφάλειας και Ποιότητα Τροφίμων (Συμμετοχή με ομιλία).

2. **11-13/10/2013:** 4^ο Πανελλήνιο Συνέδριο «Βιοτεχνολογία και Τεχνολογία Τροφίμων – Αθήνα.
3. **11-12/03/2013:** 1st Meeting of COST Action FA1204 “Vegetable grafting to improve yield and fruit quality under biotic and abiotic stress conditions”, Agricultural University of Athens, Greece.
4. **1-3/03/2013:** 2ο Συνέδριο-Έκθεση “ΕΛΛΙΟΤΕΧΝΙΑ - ΝΕΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ, Προοπτικές & δυνατότητες”, Πρώην Δυτικό αεροδρόμιο-Ελληνικό.
5. **9-13/07/2012:** 7th Symposium of the EURopean Association of Acarologists – Vienna, Austria.
6. **11-13/11/2011:** 4ο Πανελλήνιο Συνέδριο Τροφίμων. «Σύγχρονη Προσέγγιση στην Υγιεινή και Ασφάλεια των Τροφίμων», Ελληνική Κτηνιατρική Εταιρεία – Θεσσαλονίκη.
7. **9-12/11/2011:** 1st Medicinal Crops Conference (MEDICROPS'11). “Medicinal crops (plants and mushrooms): challenges and prospects for sustainable development in small-scale farming”, IAS, AUA and NAGREF - Athens.
8. **31/10/2011-4/11/2011:** 4th Conference on "Biotechnology and olive products quality in the Mediterranean". Olivebioteq – Chania, Greece.
9. **11-14/10/2011:** 14^ο Πανελλήνιο Εντομολογικό Συνέδριο. Εντομολογική Εταιρεία Ελλάδος – Ναύπλιο.
10. **03-06/11/2009:** 13^ο Πανελλήνιο Εντομολογικό Συνέδριο. Εντομολογική Εταιρεία Ελλάδος – Αλεξανδρούπολη.
11. **02-04/10/2008:** 6^ο Πανελλήνιο Λιβαδοπονικό Συνέδριο. «Λιβαδοπονία και προστατευμένες περιοχές», Ελληνική Λιβαδοπονική Εταιρεία και Αναπτυξιακή Πάρνωνα – Λεωνίδιο, Αρκαδία.
12. **02/04/2006:** «Οι Γεωπονικές επιστήμες-Νέα τάσεις και προοπτικές» – Αθήνα.

Επιστημονικές Εταιρείες

- Ελληνική Εντομολογική Εταιρεία
- EURopean Association of ACarologists (EURAAC)