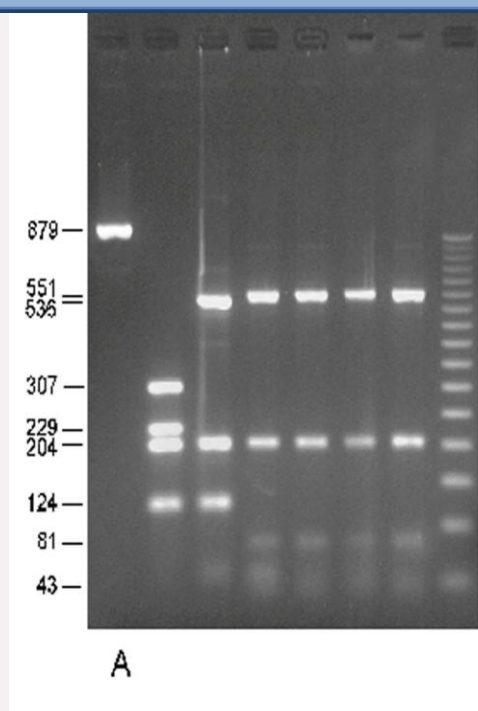


ΤΕΙ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ: ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΒΙΟΤΥΠΩΝ ΕΛΛΗΝΙΚΩΝ
ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ ΤΟΥ ΕΝΤΟΜΟΥ *Bemisia tabaci*
(ΗΜΙΠΤΕΡΑ: ALEYRODIDAE) ΜΕ ΜΟΡΙΑΚΕΣ
ΤΕΧΝΙΚΕΣ



ΠΟΛΥΧΡΟΝΑΚΗ ΕΙΡΗΝΗ

ΕΙΣΗΓΗΤΡΙΑ:

ΤΣΑΓΚΑΡΑΚΟΥ ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ

ΤΕΙ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ: ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΒΙΟΤΥΠΩΝ ΕΛΛΗΝΙΚΩΝ ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ ΤΟΥ
ΕΝΤΟΜΟΥ *Bemisia tabaci* (ΗΜΙΠΤΕΡΑ: Aleyrodidae) ΜΕ
ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

ΕΙΣΗΓΗΤΡΙΑ:

ΤΣΑΓΚΑΡΑΚΟΥ ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ
ΕΘΝΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ
ΑΓΡΟΤΙΚΩΝ ΕΡΕΥΝΩΝ

ΣΠΟΥΔΑΣΤΡΙΑ:

ΠΟΛΥΧΡΟΝΑΚΗ ΕΙΡΗΝΗ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Επιβλέπουσα Καθηγήτρια μου κυρία Τσαγκαράκου Αναστασία για τις πολύτιμες συμβουλές της, την εμπιστοσύνη και την διόρθωση της παρούσας πτυχιακής μελέτης. Οι γνώσεις που μου μεταλαμπάδευσε ήταν πολύτιμες για την ολοκλήρωση τόσο της πρακτικής όσο και της πτυχιακής μελέτης.

Ακόμα να εκφράσω ιδιαίτερες ευχαριστίες στα μέλη της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής κύριο Βερβερίδη Φίλιππο και Ροδιτάκη Εμμανουήλ, για την ανάγνωση και βαθμολόγηση της μελέτης.

Επιπλέον, ευχαριστώ ιδιαίτερα το φιλικό μου περιβάλλον για την βοήθεια και την στήριξη του τα οποία συνέβαλαν θετικά στην πορεία της μελέτης. Τέλος θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στην οικογένειά μου για την ηθική υποστήριξη που μου προσέφερε και την έμπρακτη βοήθειά της, όποτε αυτή ήταν αναγκαία.

Περιεχόμενα

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	6
1.1 Γενικά.....	6
1.2 Φυτά- Ξενιστές.....	7
1.2.1. Γεωγραφική εξάπλωση.....	8
1.2.2. Μορφολογικά χαρακτηριστικά και στάδια ανάπτυξης του <i>B. tabaci</i>	9
1.2.3. Ζημιές-ιώσεις του <i>B. tabaci</i>	13
1.2.4. Αντιμετώπιση του αλευρώδη του καπνού.....	16
1.3 Βιοτυπική ταυτότητα του αλευρώδη του καπνού.....	18
1.4 Μοριακές μέθοδοι.....	20
1.4.1. Μιτοχονδριακό DNA.....	20
1.4.2. Μιτοχονδριακό DNA του <i>B. tabaci</i>	21
1.5 PCR- Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης.....	22
1.5.1. Η αντίδραση PCR.....	23
1.5.2. RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphisms).....	25
1.5.3. Περιγραφή 1ης διαγνωστικής δοκιμής: Αμφίδρομη PCR.....	26
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	27
2.1 Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν.....	27
2.2 Περιγραφή 2 ^{ης} διαγνωστικής δοκιμής.....	28
2.3 Πληθυσμοί <i>B. tabaci</i>	30
2.4 Απομόνωση ολικού γενομικού DNA.....	32
2.5 Διαδικασία PCR.....	32
2.6 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.....	33
2.7 Διαδικασία RFLP-κόψιμο με <i>Alu1</i>	34
2.8 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.....	34
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	35
4. ΣΥΣΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	42
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	44

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο αλευρώδης του καπνού *Bemisia tabaci* Gennadius (Homoptera: Aleyrodidae), είναι ένας από τους κυριότερους εντομολογικούς εχθρούς πολλών καλλιεργειών σε ολόκληρο τον κόσμο και είναι παράσιτο των καλλιεργούμενων φυτικών ειδών των τροπικών, υποτροπικών και παραμεσόγειων περιοχών

Η μορφολογική του παραλλακτικότητα, οι διαφοροποιήσεις στο εύρος των φυτών ξενιστών, στην ικανότητα μετάδοσης ώσεων αλλά και οι διαφορές στην ενεργότητα των εστερασών και στην νουκλεοτιδική αλληλουχία του μιτοχονδριακού DNA, οδήγησε στην ταυτοποίηση πολλών βιοτύπων του *B. tabaci* (>19 βιοτύπους).

Η μοριακή ταυτοποίηση του βιοτύπου B ή Q (Q1 και Q2) θα αποτελέσει το αντικείμενο της παρούσας πτυχιακής μελέτης, Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε δείγματα πληθυσμών του *B. tabaci* που συλλέχτηκαν από διαφορετικές περιοχές της Ελλάδας από καλλιέργειες θερμοκηπίου ή υπαίθριες και από αυτοφυή φυτά.

Από τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας διαπιστώθηκε ότι ο Q βιότυπος είναι αυτός που επικρατεί και συγκεκριμένα ο Q1 βιότυπος τόσο στην Κρήτη από προηγούμενες μελέτες όσο και στην Ηπειρωτική Ελλάδα. Παρ'όλα αυτά δεν αποκλείεται η εισαγωγή και του B ή άλλων βιοτύπων στην Κρήτη και στην υπόλοιπη Ελλάδα. Τα μοριακά διαγνωστικά που έχουν αναπτυχθεί και χρησιμοποιήθηκαν και στην εργασία, επιτρέπουν την εύκολη διερεύνηση της γενετικής σύνθεσης των πληθυσμών.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Γενικά

Ο αλευρώδης του καπνού, *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Homoptera:Aleyrodidae) (Εικόνα 1 και 2) είναι ένα ευρέως πολυφάγο έντομο που τρέφεται με περισσότερα από 500 είδη φυτών από 24 οικογένειες (Kirk, *et al.* 1993).

Οι ξενιστές του περιλαμβάνουν λαχανικά και καλλωπιστικά φυτά και φυτά μεγάλης καλλιέργειας. Είναι ευρέως διαδεδομένο στις εύκρατες και ζεστές περιοχές παγκοσμίως (plantpro,2002). Αποτελεί σήμερα το κυρίαρχο είδος αλευρώδη σε παραμεσόγειες χώρες, ενώ έχει παρατηρηθεί η μετακίνηση του και σε βορειότερες (<http://www.anthesis.gr>). Ανήκει στην οικογένεια Aleyrodidae, στην τάξη Hemiptera και στην υπόταξη Homoptera. Ο αλευρώδης του καπνού, αναφέρθηκε για πρώτη φορά στην Ελλάδα, το 1889 πάνω σε φυτά καπνού από τον Gennadius και επισημάνθηκε για πρώτη φορά στη Κρήτη το 1993 ως δευτερεύουσας σημασίας εχθρός στις θερμοκηπιακές καλλιέργειες της περιοχής της Ιεράπετρας (Kirk, *et al.* 1993).



Εικόνα 1: Ενήλικα άτομα *B. tabaci*.
Εικόνα 2: Πλήθος αλευρώδων του καπνού στην κάτω επιφάνεια του φύλλου.

Εικόνα 2: Πλήθος αλευρώδων του καπνού στην κάτω επιφάνεια του φύλλου.

Το *B. tabaci* αποτελεί ένα σημαντικό αντικείμενο μελέτης ως έντομο αλλά και ως φορέας μετάδοσης ιώσεων σε φυτά που χρησιμοποιούνται για βρώση (πατάτες, τομάτες κ.ά.), για τις ίνες και το φύλλωμα τους (βαμβάκι, καπνά κ.ά.) καθώς και ως καλλωπιστικά (χρυσάνθεμα, πετούνιες κ.ά.). Η δυνατότητα του να εισχωρεί και σε

προστατευμένα περιβάλλοντα (π.χ. θερμοκήπια) του έχει επιτρέψει να επιβιώνει και κατά τη διάρκεια του χειμώνα, εγκαθιδρύοντας την παρουσία του καθ'όλη τη διάρκεια του έτους (De Barro, 1995). Η εντατικοποίηση της μονοκαλλιέργειας, η μείωση της γενετικής ποικιλομορφίας στα καλλιεργούμενα είδη, η αλόγιστη χρήση εντομοκτόνων, καθώς και οι διεθνείς μεταφορές των φυτών, είναι από τους κύριους λόγους που έχουν καταστήσει το *B. tabaci* ως έναν από τους σημαντικότερους εχθρούς των καλλιεργειών (Anthony *et al.*, 2003).

Μορφολογική παραλλακτικότητα αλλά και διαφορές στο εύρος των φυτών ξενιστών, στην ικανότητα μετάδοσης ώσεων αλλά και διαφορές στην ενεργότητα των εστερασών και στην νουκλεοτιδική αλληλουχία του μιτοχονδριακού DNA οδήγησε στην ταυτοποίηση πολλών βιοτύπων στο *B. tabaci* (>19 βιοτύπους).

Η ταυτοποίηση του βιοτύπου με μοριακές τεχνικές αποτελεί το αντικείμενο της παρούσας πτυχιακής μελέτης και έχει πραγματοποιηθεί σε δείγματα πληθυσμών που συλλέκθηκαν από διαφορετικές περιοχές της Ελλάδας.

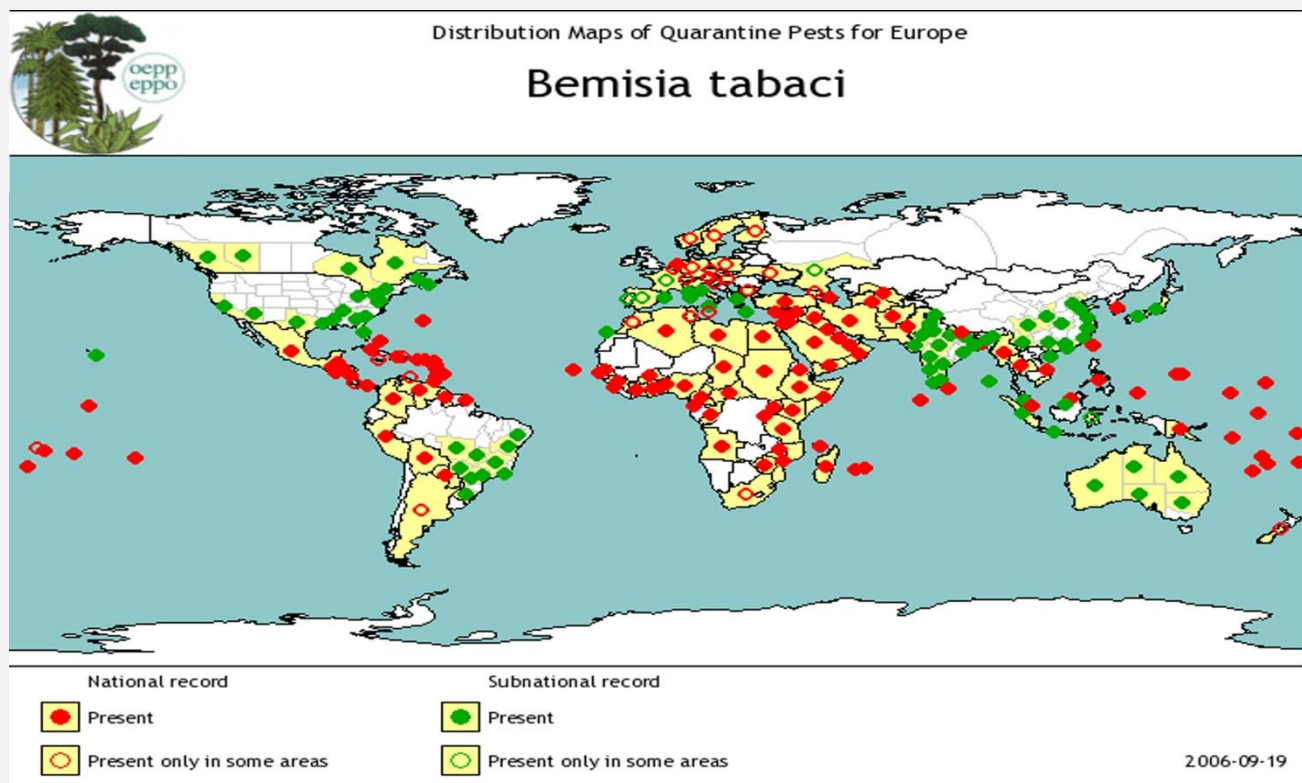
1.2 Φυτά- Ξενιστές

Το *B. tabaci* έχει ως ξενιστές περίπου 600 είδη φυτών τα οποία ανήκουν σε 63 οικογένειες (Mound and Hasley, 1978). Με την ανάπτυξη του ιδιαίτερος πολυφάγου Β βιοτύπου το *B. tabaci* έχει τώρα εξελιχθεί σε έναν εχθρό των θερμοκηπιακών καλλιεργειών σε πολλές περιοχές του κόσμου ιδιαίτερα σε καλλιέργειες όπως *Capsicum*, κολοκύθια (*Cucurbita pepo*), αγγούρια (*Cucumis sativus*), *Hibiscus*, *Gerbera*, *Gloxinia*, μαρούλια (*Lactuca sativa*), ποινσέτια (*Euphorbia pulcherrima*), και τομάτες (*Lycopersicon esculentum*). Το *B. tabaci* μπορεί να μετακινείται χωρίς πρόβλημα από τον ένα ξενιστή στον άλλο και σήμερα υπολογίζεται ότι το εύρος των ξενιστών φτάνει τα 600 είδη φυτών (Asteraceae, Brassicaceae, Convolvulaceae, Cucurbitaceae, Euphorbiaceae, Fabaceae, Malvaceae, Solanaceae, κ.λ.π.) <http://www.bpi.gr/photos/files/cfiles/08o.pdf>. Από κάθε μία απ'αυτές τις οικογένειες ο αριθμός των φυτών ξενιστών μπορεί να ποικίλλει από 99 είδη (π.χ. οικογένεια των Fabaceae) έως μονάχα ένα είδος (π.χ. οικογένεια των Begoniaceae) (Mound and Hasley, 1978).

1.2.1. Γεωγραφική εξάπλωση

Από τις περιοχές του EPPO (European Plant Protection Organisation) είναι παρών και ευρέως διαδεδομένο στην Αλγερία, Κύπρο, Γαλλία, Ελλάδα, Ισραήλ, Ιταλία, Λιβύη, Μάλτα, Μαρόκο, Πορτογαλία, Σλοβακία, Ισπανία, Τουρκία, και Ουκρανία (Εικόνα 3). Με περιορισμένη διάδοση και σχεδόν αποκλειστικά σε καλλιέργειες θερμοκηπίου υπάρχει στην Αυστρία, Βέλγιο, Τσεχία, Δανία, Γαλλία, Γερμανία, Ουγγαρία, Ολλανδία, Νορβηγία, Πολωνία, Ρωσία, Σουηδία, Ελβετία, και Τυνησία. Στην Δανία, Γερμανία, και Ολλανδία, είναι σε ισχύ προγράμματα εκρίζωσης του.

Στη χώρα μας εμφανίζεται στην κεντρική και κυρίως στην νότια και νησιωτική Ελλάδα (Pollini, *et al.*, 2000).



Εικόνα 3: Παγκόσμια γεωγραφική εξάπλωση του *B. tabaci* εκτός της Ανταρκτικής.

1.2.2. Μορφολογικά χαρακτηριστικά και στάδια ανάπτυξης του *B. tabaci*

Ο τρόπος αναπαραγωγής του *B. tabaci* είναι αρρενοτόκος παρθενογένεση. Τα αρσενικά απλοειδή άτομα προέρχονται από αγονιμοποίητα ωά, ενώ τα θηλυκά διπλοειδή προέρχονται από γονιμοποιημένα ωά.

Ο αλευρώδης έχει τέσσερα βιολογικά στάδια: το ωό, τη νύμφη (4 ηλικίες), την ρυπα και το ενήλικο (Εικόνα 4). Ο χρόνος ανάπτυξης του εντόμου από το ωό στο ενήλικο μπορεί να κυμαίνεται από 15-70 μέρες και επηρεάζεται από τη θερμοκρασία και το φυτό ξενιστή. Η ανάπτυξη του παρατηρείται σε θερμοκρασίες από 10-32°C με ιδανική θερμοκρασία ανάπτυξης τους 27°C (Mau *et al.*, 1991).

Αναλυτικότερα τα στάδια ανάπτυξης του *B. tabaci* είναι:

Ωό: Τα θηλυκά εναποθέτουν τα ωά τους στην κάτω επιφάνεια του φύλλου όπου συνήθως είναι σε σειρές και είναι κατά προσέγγιση από 50-400 με μέσο όρο περίπου στα 160. Τα ωά είναι λεία και λευκοκίτρινα ελλειπτικού σχήματος με βραχύ ποδίσκο ο οποίος εισέρχεται μέσα στους ιστούς (Εικόνα 5). Το μήκος του ωού χωρίς τον ποδίσκο είναι 0,26 mm και το πλάτος του 0,12 mm (Paulson and Bearsley, 1985).



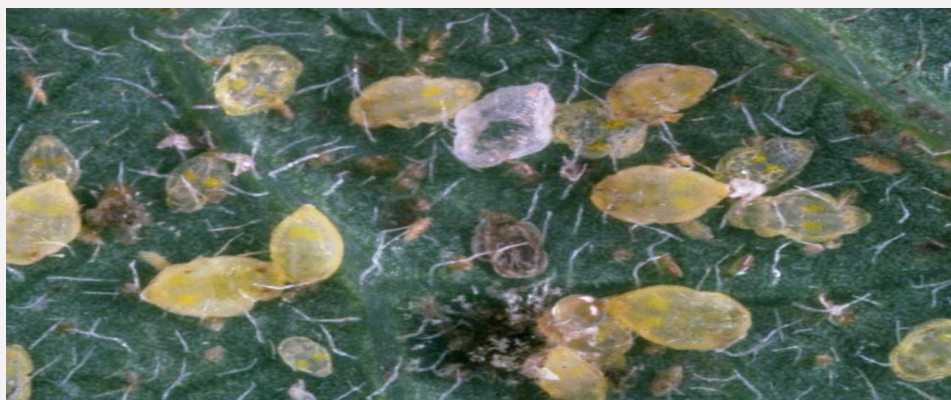
Εικόνα 4: Διάφορα στάδια ανάπτυξης του αλευρώδη του καπνού. (Α) Ωό (Β) Νύμφη δεύτερης ηλικίας (Γ) Ενήλικο

Κάθε ωό προσκολλάται στο μίσχο του φύλλου και είναι κάπως ελλειπτικό σε σχήμα. Σε περιπτώσεις έντονης προσβολής, τα ωά εναποτίθενται με άτακτο τρόπο, καταλαμβάνοντας μεγάλο μέρος του ελάσματος του φύλλου. Η θερμοκρασία τους εξαρτάται από τη θερμοκρασία και το φυτό ξενιστή (Pollini *et al.*, 2000).



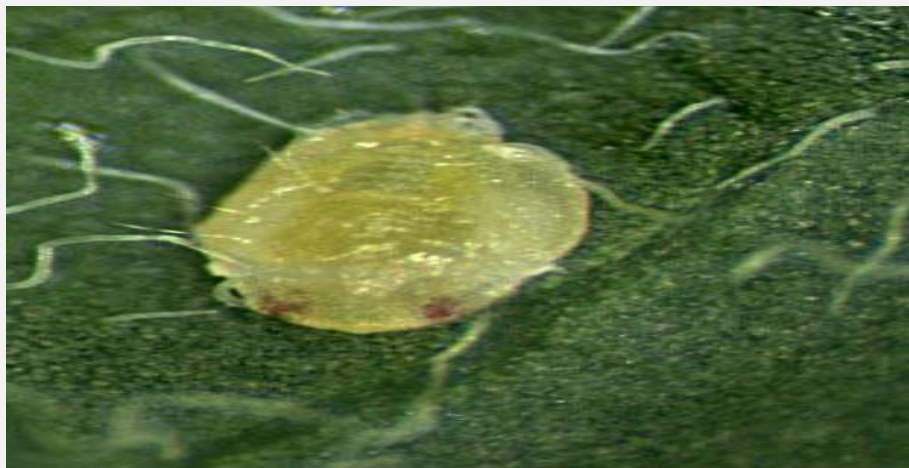
Εικόνα 5: Τα ωά του *B. tabaci* με την χαρακτηριστική όρθια θέση.

Νύμφη: Η νυμφική ανάπτυξη ολοκληρώνεται σε 4 ηλικίες (Εικόνα 6). Οι νεοεκολλαπτόμενες νύμφες είναι ανοιχτοπράσινου χρώματος μετακινούνται όπως οι προνύμφες των Diaspididae και μόλις βρουν το κατάλληλο σημείο βυθίζουν τα νύσσοις μυζητικού τύπου στοματικά τους μόρια στο φυτικό ιστό και πίνουν πλέον να μετακινούνται μέχρι της ενηλικιώσεώς τους (Σταμόπουλος, 1999).



Εικόνα 6: Οι νύμφες 1^{ης} έως 4^{ης} ηλικίας.

Η νύμφη δεύτερης ηλικίας σκεπάζεται από κηρώδη νήματα σε μικρό βαθμό, αλλά και από σταγόνα μελιτώδους απεκκρίματος. Οι νύμφες τρίτης και τέταρτης ηλικίας σκεπάζονται με άφθονα αντίστοιχα κηρώδη νήματα. Το τελευταίο στάδιο ονομάζεται pupa (εικόνα 7) απ' όπου εξέρχεται το ακμαίο (Pollini *et al.*, 2000). Η ολοκληρωμένη περίοδος νύμφωσης του αλευρώδη διαρκεί περίπου 2-4 εβδομάδες (Mau *et al.*, 1991).



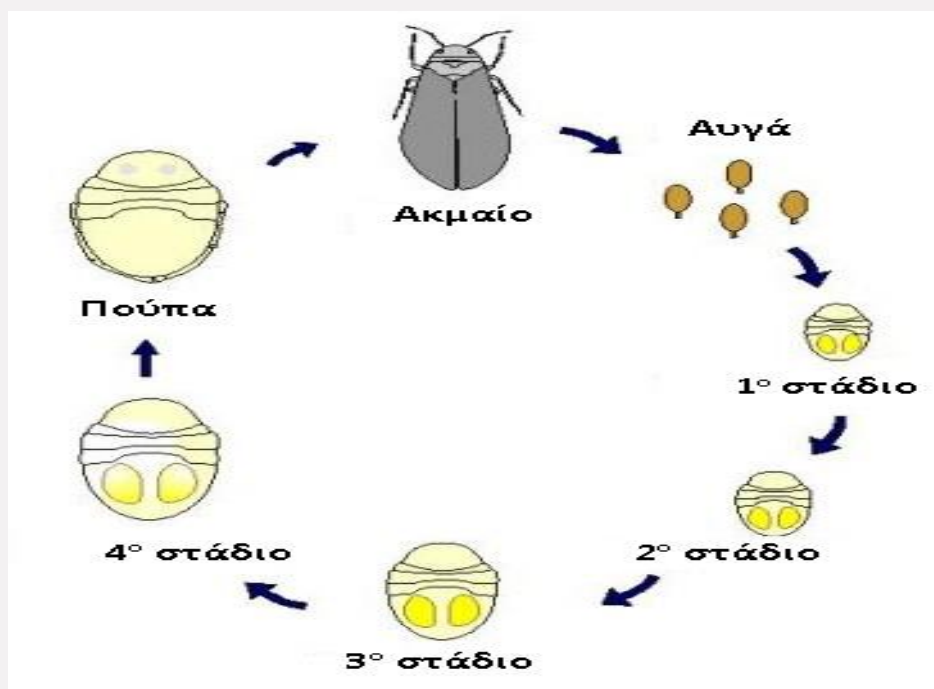
Εικόνα 7: Το στάδιο της pupa. Είναι χαρακτηριστικά τα κόκκινα μάτια.

Ενήλικο: Είναι μικρό περίπου 1 mm με ένα ωχροκίτρινο σώμα και δύο ζευγάρια λευκών πτερύγων που καλύπτονται με μια λεπτή κηρώδη ουσία (εικόνα 9). Σε ακινησία οι πτέρυγες διατηρούνται σε μία ανεστραμμένη στάση V. Τα μάτια τους είναι σύνθετα, κόκκινου χρώματος (Mau *et al.*, 1991).

Οι κεραίες είναι κοντές ή λίγο μακρύτερες από το κεφάλι τους και ρύγχος ελεύθερο. Τα πόδια τους είναι λεπτά και μακριά. Η κοιλιά τους διακρίνεται καλά και καταλήγει στον ωοθέτη (Τζανακάκης, 1998). Τα ενήλικα ξεπροβάλλουν απ' το στάδιο της pupa συνήθως τις πρωινές ώρες και μπορεί να συζευχθούν λίγες ώρες αργότερα ενώ η διάρκεια ζωής τους κυμαίνεται από 6-55 μέρες, αλλά εξαρτάται από τη θερμοκρασία. Τα θηλυκά ζουν μόνο 10-15 μέρες κάτω από τις ζεστές καλοκαιρινές συνθήκες της Νότιας Ευρώπης αλλά μπορούν να ζήσουν αρκετούς μήνες κατά τη διάρκεια του χειμώνα (Mau *et al.*, 1991).

Ο βίος του ενήλικου θηλυκού (εικόνα 8) κυμαίνεται από 15,4 ημέρες στους 28°C έως 30,1 ημέρες στους 16°C, με πρότερη περίοδο εναπόθεσης ωών μεταξύ 2 και 4

ημερών. Ο μέσος όρος γονιμότητας είναι μεταξύ 2,5 και 7,1 ωών/ θηλυκό την ημέρα (Enkegaard, 1990) και η συνολική γονιμότητα είναι 300 ωά/ θηλυκό (Hendi *et al.*, 1987).



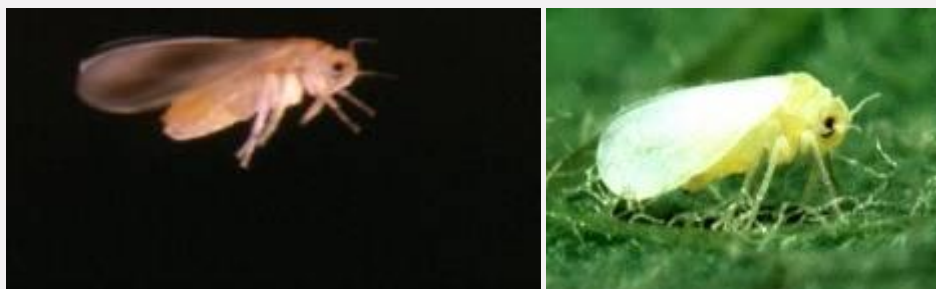
Εικόνα 8: Βιολογικός κύκλος του *B. tabaci*.

Ο αριθμός των γενεών κατ'έτος εξαρτάται από τη θερμοκρασία. Στο θερμοκήπιο ενδέχεται να υπάρχει επικάλυψη γενεών, να εμφανιστούν μέχρι και 12 γενιές σ'ένα χρόνο.



Εικόνα 9: Ζεύγος αλευρωδών. Αριστερά διακρίνεται το αρσενικό και δεξιά το θηλυκό έντομο λόγω του μεγαλύτερου μεγέθους του.

Το κηρώδες έκκριμα του εκκρίνεται από έναν πόρο που βρίσκεται στο τελευταίο τμήμα της κοιλίας. Οι κινήσεις των ποδιών του εντόμου βοηθούν στον διασκορπισμό του κεριού σε όλο το σώμα του. Το κηρώδες αυτό επικάλλυμα χρησιμεύει ως προστατευτικό μέσο (εικόνες 10 και 11). Τα τέλεια έντομα βρίσκονται συνήθως στην κάτω επιφάνεια των φύλλων.



Εικόνα 10 και 11: Δεξιά το *B. tabaci* είναι εμφανή όλα τα μέρη του σώματος του και αριστερά κατά την διάρκεια πτήσης του.

1.2.3. Ζημιές-ιώσεις του *B. tabaci*

Το *B. tabaci* προκαλεί ζημιές από την νύξη των φυτικών ιστών και την απομύζηση των φυτικών χυμών που πραγματοποιούνται σε όλα τα νυμφικά στάδια και το ενήλικο (Pollini *et al.*, 2000). Περισσότερο ζημιογόνες είναι οι νύμφες τρίτης και τέταρτης ηλικίας και τα ενήλικα, όπου τραυματίζουν με τα στοματικά μόρια τους (νύσσοντος μυζητικού τύπου) φυτά, καταστρέφοντας την χλωροφύλλη και μειώνοντας την φωτοσυνθετική ικανότητα τους. Τα προσβεβλημένα φύλλα εμφανίζουν κιτρινοπράσινο χρωματισμό. Υψηλοί πληθυσμοί μπορούν να προκαλέσουν στα νεαρά φυτά ξήρανση των φύλλων και θάνατο του φυτού. Άμεση ζημιά από τον αλευρώδη του καπνού είναι η συγκέντρωση μελιτώματος που παράγεται απ'αυτόν. Αυτό το μελίτωμα αποτελεί υπόστρωμα για την ανάπτυξη καπνιάς στα φύλλα και στους καρπούς. Η καπνιά μειώνει τη φωτοσύνθεση και υποβαθμίζει την εμπορική αξία του προϊόντος (plantpro, 2002).

Από τα 1300 είδη αλευρώδη (120 γένη) που έχουν ταυτοποιηθεί έως σήμερα μονάχα αλευρώδεις του είδους *tabaci* από το γένος *Bemisia* καθώς και τα είδη *vaporariorum*, οι *abutilonea* και *ricini* από το γένος *Trialeurodes* είναι αυτοί που

μεταφέρουν φυτικές ιώσεις. Μεταξύ των βιοτύπων υπάρχουν διαφορετικές δυνατότητες μετάδοσης ιώσεων. Οι πληθυσμοί του *B. tabaci* του βιότυπου B και Q θεωρούνται αυτοί με την μεγαλύτερη δυναμικότητα μετάδοσης ιώσεων λόγω της ταχείας τους ανάπτυξης και του μεγάλου εύρους ξενιστών.

Ο αλευρώδης του καπνού έχει ταυτοποιηθεί ως φορέας 111 ειδών φυτικών ιών που ανήκουν κυρίως στα γένη των *Begomovirus* (Geminiviridae), *Crinivirus* (Closteroviridae), *Carlavirus* ή *Ipomovirus* (Potyviridae), ενώ περιλαμβάνει και άλλους ιούς από απροσδιόριστα γένη. Οι *Begomoviruses* αποτελούν την πλειονότητα των ιών που μεταδίδει το *B. tabaci*, οι οποίοι σύμφωνα με τους Brown και Bird (1992) είναι υπεύθυνοι για καταστροφές στις καλλιέργειες που μπορεί να κυμαίνονται από 20% έως και 100% (Jones, 2003).

Συγκεκριμένα ο ιός του κίτρινου καρουλιάσματος των φύλλων της τομάτας TYLCV είναι μία από τις πιο καταστροφικές ιολογικές ασθένειες σε καλλιέργειες τομάτας. (*Lycopersicon esculentum*) σε τροπικές και υποτροπικές περιοχές παγκοσμίως και απώλειες έως και 100% της παραγωγής είναι συχνές (Moriones and Navas-Castillo, 2000). Τα ενήλικα άτομα και οι νύμφες του αλευρώδη του καπνού προσλαμβάνουν τον ιό τρεφόμενοι από φυτά που έχουν προσβληθεί. Στη συνέχεια τα έντομα – φορείς μετακινούμενα στην καλλιέργεια μεταδίδουν τον ιό και στα υγιή φυτά.



Εικόνα 12: Ιός του κίτρινου καρουλιάσματος των φύλλων της τομάτας (TYLCV). Δεξιά παρουσιάζεται το υγιές φυτό τομάτας, ενώ αριστερά διακρίνεται το προσβεβλημένο με χαρακτηριστικό «κάθισμα» του φυτού, καρουλιάσματος και κίτρινων κηλίδων στα φύλλα.

Τα συμπτώματα της ασθένειας εμφανίζονται στα φύλλα που αποκτούν ένα χαρακτηριστικό καρούλιασμα προς τα πάνω, μείωση της φυλλικής επιφάνειας και κιτρίνισμα σε νεαρά φύλλα μαζί με νανισμό και κάμψη του φυτού (Εικόνα 12).

Οι συνέπειες της προσβολής είναι η γενική μείωση της ανάπτυξης των φυτών, μείωση των αποδόσεων και πολλές φορές προκαλείται ολοκληρωτική καταστροφή της παραγωγής αν τα φυτά έχουν προσβληθεί κατά την διάρκεια της νεαρής ανάπτυξης. Σύμφωνα με τους Cohen and Antignus (1994), οι πρώτες αναφορές των καταστροφών που προκλήθηκαν απ' αυτήν την ασθένεια ήταν απ' το Ισραήλ στα τέλη του 1930 (Cohen and Antignus 1994). Η αιτία των νοσημάτων σύντομα αποδείχθηκε ότι ήταν ο *Geminivirus* και το έντομο *B. tabaci* φαινόταν ότι ήταν ο φυσικός φορέας. Μελέτες έχουν διεξαχθεί χρησιμοποιώντας τα είδη TYLCV-Is και TYLCV-Sar και διαφορετικές πηγές του *B. tabaci* για να καθοριστούν οι απαιτήσεις επιτυχούς μετάδοσης. Τα αρσενικά είναι πολύ λιγότερο αποτελεσματικοί φορείς του ιού σε σχέση με τα θηλυκά και οι νύμφες είναι εξίσου αποτελεσματικές όσο και τα ενήλικα στο να προσλαμβάνουν τον ιό. (Caciagli *et al.*, 1995).

Η διαφορά αλληλεπίδρασης μεταξύ TYLCV και των βιοτύπων του *B. tabaci* έχει τεκμηριωθεί ανάλογα με το είδος του ιού και τον βιότυπο φορέα που μπορεί να οδηγήσει σε βελτίωση της αποτελεσματικότητας της μετάδοσης (MacGrath and Harrison, 1995). Επίσης αυτή η μεταβλητή σχέση έχει χρησιμοποιηθεί για τη διευκρίνιση της μετατόπισης του ιού σε περιοχές όπου συνυπάρχουν ο TYLCV και είδη του *B. tabaci* και έχουν αναφερθεί (Sanchez-Campos *et al.*, 1999).

Τα φυτά που προσβάλλονται από μία ή περισσότερες ώσεις που μεταδίδονται με τον αλευρώδη είναι το μανιόκ, φασόλια, βαμβάκι, καπνός, ντομάτα, πιπεριά, μπάμια, κολοκύθι, πεπόνι, καρπούζι μαρούλι, παπάγια κ.ά. Παρ' ολαυτά οι ιοί του γένους *Geminivirus*, που μολύνουν την τομάτα, φασόλια και μανιόκ έχουν αναφερθεί ότι είναι οι πιο διαδεδομένοι και σημαντικοί (Cohen and Harpaz, 1964).

Στην Ελλάδα η πρώτη αναφορά του TYLCV ήταν στο Τυμπάκι (Κρήτη), το 1992 όπου πρωτοεμφανίστηκε η ασθένεια σε πολύ μικρή έκταση. Αργότερα στο τέλος του καλοκαιριού του 2000 στην Κρήτη οι θερμοκηπιακές καλλιέργειες τομάτας στην Ιεράπετρα, Τυμπάκι και Χανιά έδειξαν συμπτώματα καρούλιασματος φύλλων, μειωμένη φυλλική επιφάνεια, κιτρίνισμα, βραχύτερα μεσογονάτια και θαμνώδη

εμφάνιση. Παρόμοια συμπτώματα παρατηρήθηκαν σε δείγματα τομάτας στον Μαραθώνα (Αττική) και στη Νότια Πελοπόννησο. Όλα τα θερμοκήπια με τα μολυσμένα φυτά είχαν προσβληθεί από μεγάλους πληθυσμούς του *B. tabaci* (Gennadius), το οποίο επίσης παρατηρήθηκε έξω από τα θερμοκήπια σε πολλά ζιζάνια. Πάνω από 100 δείγματα με συμπτώματα στα φυτά τομάτας που συλλέχθηκαν από την Κρήτη και την Νότια Πελοπόννησο έδωσαν θετικές αντιδράσεις όταν εξετάστηκαν από το ELISA χρησιμοποιώντας μονόκλωνα αντισώματα του TYLCV. Τα ορολογικά αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν με PCR ενισχύοντας τα διάφορα μέρη του γονιδιώματος του ιού (Avgelis and Roditakis, 2001).

1.2.4. Αντιμετώπιση του αλευρώδη του καπνού

Τα βιολογικά χαρακτηριστικά που υπογραμμίζουν την δυναμικότητα του αλευρώδη του καπνού ως εχθρού των κηπευτικών και την δυσκολία ανάπτυξης ενός αποτελεσματικού τρόπου διαχείρισης συνοψίζονται παρακάτω :

- Μεγάλος αριθμός γενεών το χρόνο, (12 γενιές σε θερμοκηπιακές καλλιέργειες)
- Υψηλή αναπαραγωγική ικανότητα, (80-300 ωά/θηλυκό) (Gerling *et al.*, 1986).
- Δυνατότητα μετανάστευσης, (σε μεγάλες αποστάσεις) (Byrne 1999)
- Αντοχή σε υψηλές θερμοκρασίες, (max 32°C) (Gerling *et al.*, 1986)
- Μεγάλος αριθμός ξενιστών (> από 500) και
- Ικανότητα να μεταδίδει καταστροφικούς ιούς στα φυτά (Ellsworth *et al.*, 1999).

Δημιουργώντας πρόβλημα σε μια τεράστια ποικιλία φυτών, ο αλευρώδης αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους εχθρούς τους. Η αντιμετώπιση του αλευρώδη του καπνού εφαρμόζεται με τρεις τρόπους :

1. Καλλιεργητικά μέσα:

- απομάκρυνση προσβεβλημένων ξερών τμημάτων του φυτού.
- πλύσιμο του φυτού με νερό μπορεί να απομακρύνει ένα μικρό αριθμό εντόμων.
- φυτά που απωθούν ή παγιδεύουν τους αλευρώδεις: μέντα, καλέντουλα, κάρδαμο.

-κίτρινες χρωμοτροπικές παγίδες.

2.Βιολογική αντιμετώπιση:

Υμενόπτερα παράσιτα των νυμφών του *B. tabaci*:

Eretmocerous eremicus

Eretmocerous mundus

Macrolophus caliginosus (αρπακτικό) (Heteroptera: Myridae)

Verticillium lecanii (εντομοπαθογόνος μύκητας)

Άλατα των λιπαρών οξέων με κάλιο

3.Χημική αντιμετώπιση

Η αντιμετώπιση με εντομοκτόνα είναι εξίσου δύσκολη:

- α) τα ενήλικα και οι νύμφες προσβάλλουν περισσότερο τα χαμηλότερα φύλλα όπου είναι δύσκολο το ψεκαστικό υγρό να καλύψει αυτή την περιοχή του φυτού,
- β) ανάπτυξη ανθεκτικότητας σε 40 και πλέον δραστικές ουσίες (νέες δραστικές όπως τα νεονικοτινοειδή) (Plantpro paprika, 2002).

Είναι δυσχερής λόγω της πτητικής τους ικανότητας, αλλά και της γρήγορης εμφάνισης ανθεκτικότητας σε εντομοκτόνα. Το *B. tabaci* έχει μια μοναδική ικανότητα να αναπτύσσει γρήγορα υψηλά ποσοστά ανθεκτικότητας σε σημαντικές κατηγορίες εντομοκτόνων που οφείλονται σε γενετικούς και βιολογικούς παράγοντες.

Στην Κρήτη τα χημικά σκευάσματα που χρησιμοποιούνται κυρίως ανήκουν στις ομάδες των οργανοφωσφορικών, καρβαμιδικών, πυρεθροειδών και νεονικοτενοειδών. Συγκεκριμένα ανάμεσα στα νεονικοτενοειδή, αυτά που χρησιμοποιούνται περισσότερο είναι τα imidacloprid, thiacloprid και acetamiprid. Όσον αφορά τα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα αυτά που καταγράφονται περισσότερο είναι τα dichloros και pirimiphos-methyl. Άλλα οργανοφωσφορικά και καρβαμιδικά που χρησιμοποιούνται είναι τα cadusafos, malathion, methamidophos, naled, methiocarb, methomyl και oxamyl. Το bifenthrin είναι το πυρεθροειδές που χρησιμοποιείται περισσότερο ακολουθεί μετά το cypermethrin και το deltamethrin (Roditakis *et al.*, 2009).

1.3 Βιοτυπική ταυτότητα του αλευρώδη του καπνού

Η σημαντική ποικιλομορφία των πληθυσμών του *B. tabaci*, οδήγησε στην ταυτοποίηση ενός μεγάλου αριθμού βιοτύπων που συμβολίζονται με τα γράμματα A-T (Bedford *et al.*, 1994; Perring, 2001). Αυτό βασίστηκε σε μελέτες όπου βρέθηκαν διαφορές μεταξύ πληθυσμών, στην βιο-οικολογία, τη συμπεριφορά στην ικανότητα μετάδοσης ιών, την ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα, στο εύρος των ξενιστών και την ικανότητα να επάγουν φυτοτοξικές αντιδράσεις σε συγκεκριμένα είδη φυτών. Οι βιότυποι αυτοί δεν παρουσιάζουν διακριτά μορφολογικά χαρακτηριστικά και ο διαχωρισμός τους απαιτεί την εφαρμογή σύγχρονων εργαστηριακών τεχνικών.

Επιπλέον βιοχημικοί και μοριακοί δείκτες, συμπεριλαμβανομένων αλλοενζύμων, τυχαίος πολλαπλασιασμός πολυμορφικού DNA-πολυμεράσης (RAPD-PCR), πολυμορφισμός μήκους συντεθειμένου τμήματος (AFLP), πολυμορφισμός μήκους τεμαχίων περιορισμού (RFLP) και μικροδορυφόροι, έχουν χρησιμοποιηθεί στο να αποκαλύπτουν τη γενετική απόκλιση των ειδών ώστε να διακρίνουν και να χαρακτηρίζουν τους βιότυπους (Brown J.K. 2000; Cervera *et al.*, 2000, Moya *et al.*, 2001, Abdullahi *et al.*, 2004, De Barro, 2005).

Επιπρόσθετα, οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες από τμήμα του γονιδίου της κυτοχρωμικής οξειδάσης I του μιτοχονδριακού DNA (mtCOI) καθώς και του εσωτερικού μεταγραφικού διαστήματος (ITS) του ριβοσωμικού DNA έχουν δείξει ότι πληθυσμοί του *B. tabaci* από όλο τον κόσμο μπορούν να ομαδοποιηθούν (cluster) σε ομάδες με βάση τη γεωγραφική τους προέλευση (De Barro *et al.*, 1997, Perring, 2001). Οι πιο καλά μελετημένοι βιότυποι είναι οι B και Q εξαιτίας της ευρείας γεωγραφικής τους εξάπλωσης. Στις χώρες της δυτικής Ευρώπης και στην ευρύτερη λεκάνη της Μεσογείου ο κυρίαρχοι βιότυποι είναι ο B και ο Q οι οποίοι χαρακτηρίζονται από ευρύ φάσμα ξενιστών.

Η παρουσία του βιότυπου B έχει επιβεβαιωθεί στην Κύπρο, Γαλλία, Ισραήλ, Ιταλία, Ισπανία, και σε θερμοκήπια της Βόρειας Ευρώπης (π.χ. Ολλανδία) αλλά ακόμα δεν είναι απολύτως σαφείς οι θέσεις που υπάρχει ο βιότυπος B στις περιοχές της EPPO. Έχει βρεθεί ακόμη σε πολλές περιοχές της Ασίας, της Αφρικής, της

Βόρειας, Κεντρικής και Νότιας Αμερικής, της Καραϊβικής και της Ωκεανίας (Vassiliou *et al.*, 2008, Papayannis *et al.*, 2009).

Ο βιότοπος Β φαίνεται να σχετίζεται με την παρουσία συμπτωμάτων φυτοτοξικότητας στα φυτά, όπως η ασημόχρωση της κολοκυθιάς και η ανομοιόμορφη ωρίμανση των καρπών της τομάτας. Έχει μεγάλη αναπαραγωγική ικανότητα, καθώς και μεγάλη ευκολία στη μετάδοση των ιολογικών ασθενειών (Παπαγιάννης *et al.*, 2009).

Η πρώτη αναφορά του Q βιότυπου στις Αμερικάνικες χώρες, ήταν κατά τη διάρκεια του Δεκεμβρίου 2004 σε φυτό ποινσέττιας (*Poinsettia sp.*) στην Αριζόνα. Μέχρι τον Ιανουάριο του 2008, έχουν αναφερθεί 25 πολιτείες που έχει εμφανιστεί ο Q βιότοπος. Μερικές απ'αυτές είναι: Αριζόνα, Καλιφόρνια, Γεωργία, Αλαμπάμα, Νέα Υόρκη, Φλόριντα και άλλες (Hodges G, 2009).

Ο βιότοπος Q του αλευρώδη έχει ανακαλυφθεί στις καλλιέργειες του Queensland της Αυστραλίας. Ο συγκεκριμένος βιότοπος έχει την ικανότητα να αναπτύσσει γρήγορα ανθεκτικότητα σε ορισμένες ομάδες εντομοκτόνων, ιδίως εάν χρησιμοποιούνται επανειλημμένα.

Η παρουσία του βιότυπου Q επιβεβαιώθηκε σε δειγματοληψίες αλευρώδη από καλλιέργειες κηπευτικών στο βόρειο Queensland στα τέλη του 2008 και στο νότιο Queensland και στη βορειοδυτική Ουαλία το 2009.

Αυτοί οι βιότυποι είναι μορφολογικά ομοίοι και μπορούν να διαχωριστούν μόνο με βιοχημικές ή μοριακές τεχνικές.

Ο Q βιότοπος έχει μια τεράστια ποικιλία ξενιστών πάνω από 500 είδη και περιλαμβάνει: (www.dpi.qld.gov).

- *Cucurbitaceae*: πεπονιά, κολοκύθι, κολοκυθάκια, γλυκοκολοκύθα, αγγουριά
- *Solanaceae*: ντομάτα, μελιτζάνα, πατάτα και πιπεριά
- *Brassicaceae*: λάχανο, μπρόκολο, κουνουπίδι
- *Fabaceae*: σόγια, πράσινα φασόλια
- *Malvaceae*: βαμβάκι
- *Convolvulaceae*: γλυκοπατάτα
- Μία μεγάλη ποικιλία καλλωπιστικών ειδών

Σύμφωνα με τους Tsagkarakou *et al.*, (2007) και με βάση την αλληλουχία του mtCOI ο Q βιότυπος από διάφορες περιοχές της Ελλάδας ομαδοποιείται με τους πληθυσμούς από την Ισπανία, Πορτογαλία και Μαρόκο (Q west=Q1), παρά με αυτούς από Τουρκία, Κύπρο και Ισραήλ (Q east=Q2).

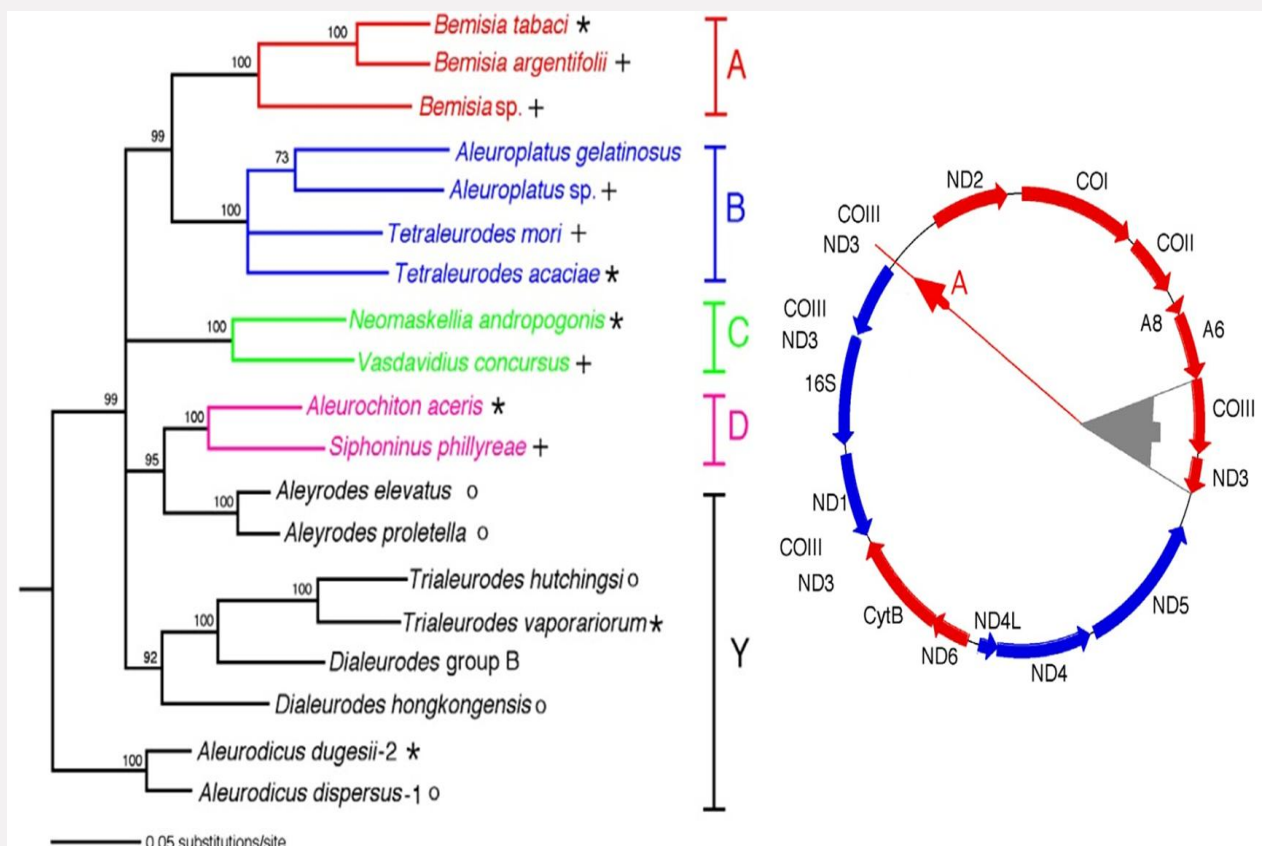
1.4 Μοριακές μέθοδοι

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος RFLP μέσω μιας αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) για την ταυτοποίηση του Q βιότυπου και συγκεκριμένα του Q1/Q2 βιότυπου.

1.4.1. Μιτοχονδριακό DNA

Τα μιτοχόνδρια αποτελούν πολύπλοκα οργανίδια των ευκαρυωτικών κυττάρων με κύρια λειτουργία τους την αερόβια αναπνοή, δηλαδή την παραγωγή χημικών μορίων (ATP) που θα μεταφραστούν σε ενέργεια για τον οργανισμό όπου ανήκουν. Λόγω των μηχανισμών που καταλύουν βρίσκονται σε μεγαλύτερους αριθμούς σε κύτταρα που καταναλώνουν μεγάλες ποσότητες ενέργειας, όπως είναι τα μυϊκά κύτταρα, τα κύτταρα της καρδιάς κλπ. Διαθέτουν το δικό τους γενετικό υλικό, συνθέτουν τις δικές τους πρωτεΐνες και πολλαπλασιάζονται ταχύτατα, όμως για να εκτελέσουν πλήρως τις λειτουργίες τους εξαρτώνται και απ' το πυρηνικό DNA. Το μιτοχονδριακό DNA (mtDNA) υπάρχει σε πολλά αντίγραφα, είναι κυκλικό και μικρό σε μέγεθος και περνά στην επόμενη γενιά, από τον θηλυκό γονέα (μητρική προέλευση ή κληρονομικότητα). Συγκριτικά με το πυρηνικό DNA εξελίσσεται πολύ πιο γρήγορα, δεν παράγει πρωτεΐνες που αφορούν την αντιγραφή, μεταγραφή και μετάφρασή του (Adams, 2005). Το μιτοχονδριακό DNA (mtDNA) (εικόνα 13) είναι ένας διάσημος μοριακός δείκτης και σημαντικό εργαλείο σε ποικίλες μελέτες εξέλιξης των ζώων, συμπεριλαμβανομένου φυλογενετικά συμπεράσματα, αναγνώριση προέλευσης των ειδών, γεωγραφία του φύλου, ανάλυση της δομής και της δυναμικής του πληθυσμού και μοριακή εξέλιξη. Το mtDNA εκτός απ'τα παραπάνω χαρακτηριστικά συνέβαλε σε μεγάλο βαθμό και απασχόλησε διαφόρους

τομείς της έρευνας και ιδιαίτερα σε πληθυσμιακές μελέτες (De-Xing Zhang & Godfrey M. Hewitt, 1997)



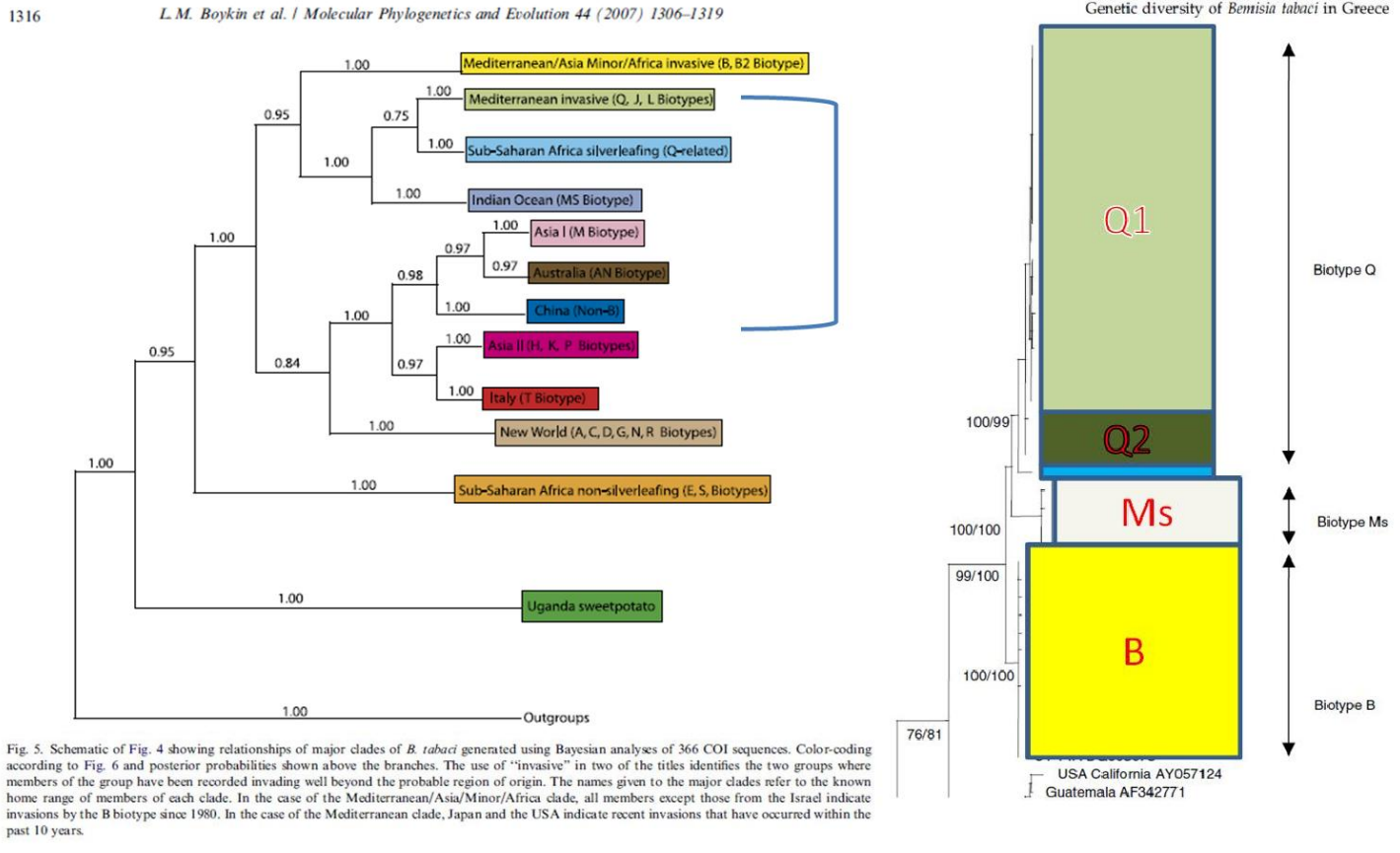
Εικόνα 13: Φυλογενετικό δένδρο γενών της οικογένειας Aleurodidae με βάση την πλήρη νουκλεοτιδική αλληλουχία του μιτοχondριακού DNA. Δεξιά η δομή και οργάνωση των γονιδίων στο μιτοχondριακό DNA του *B. tabaci*. (MyLo LThao *et al.*, 2004)

1.4.2. Μιτοχondριακό DNA του *B. tabaci*

Η μιτοχondριακή κυτοχρωμική οξειδάση I (mtCOI), είναι μια υψηλά κατατοπιστική αλληλουχία με σταθερές διαφορές μεταξύ των βιοτύπων. Έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για την μελέτη γενετικής ποικιλομορφίας εντός του *B. tabaci* και συντέλεσε στη ταυτοποίηση γενετικών ομάδων που κατά κανόνα ακολούθησαν την γεωγραφική καταγωγή των πληθυσμών αλλά και τον βιότυπο που ανήκουν (εικόνα 14A και B). Βασίζόμενοι στις σταθερές διαφορές που εντοπίστηκαν με τη σύγκριση περίπου 90 δημοσιευμένων αλληλουχιών mtCOI από γνωστούς

βιότυπους του *B. tabaci* (Q, B, Ms, A, E, G, C), οι Tsagkarakou *et al.*, 2007 ανέπτυξαν δύο μοριακές διαγνωστικές δοκιμές που χρησιμοποιούνται σε ρουτίνα για την ανίχνευση των βιοτύπων συμπεριλαμβανομένων των B και Q (Q1 και Q2) και που περιγράφονται αναλυτικά στο κεφάλαιο υλικά και μέθοδοι.

Νουκλεοτιδική αλληλουχία ενός τμήματος του μιτοχondριακού DNA (COI)



A

B

Εικόνα 14 A: Γενετικές σχέσεις *Bemisia tabaci* (Hemiptera:Aleyrodidae) που αποκαλύπτονται χρησιμοποιώντας Bayesian ανάλυση του μιτοχondριακής κυτοχρωμικής οξειδάσης, COI από δείγματα παγκόσμιας προέλευσης (Boykin *et al.*, 2007). B: Ειδικά ο βιότυπος Q διακλαδίζεται περαιτέρω σύμφωνα με τις πιο πρόσφατες μελέτες σε δύο ομάδες που ονομάστηκαν Q1 και Q2 (Tsagkarakou *et al.*, 2007).

1.5 PCR- Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης

Η τεχνική της PCR ανακαλύφθηκε το 1983 από τον Kary Mullis, ο οποίος έλαβε βραβείο Νόμπελ Ιατρικής το 1993 (Βερβερίδης και Ταμπακάκη, 2006).

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction-PCR) είναι μια τεχνική που επιτρέπει τον πολλαπλασιασμό ειδικών τμημάτων δίκλωνου DNA μέσα σε λίγες ώρες. Είναι εξαιρετικά επιλεκτική και ευαίσθητη μέθοδος, έχει δυνατότητα ανίχνευσης και ενός μόνο DNA μορίου σε ένα μείγμα. Μικροποσότητες RNA μπορούν επίσης να αναλυθούν με τον ίδιο τρόπο, μετά τη μεταγραφή τους σε DNA από την ανάστροφη τρανσκριπτάση (RT-PCR- reverse transcription PCR).

Η τεχνική αυτή έφερε επανάσταση στο χώρο της μοριακής βιολογίας, της ιατροδικαστικής και κλινικής έρευνας καθώς και σε άλλα πεδία. Πολύ σημαντικό είναι ότι συντελεί στη διάγνωση γενετικών ασθενειών και στην ανίχνευση λοιμωδών νόσων (ιώσεων, μικροβιακών λοιμώξεων κτλ.). Επιπλέον, στην ιατροδικαστική από ένα απλό ίχνος αίματος ή άλλων ιστών (ακόμα και από ένα κύτταρο) μπορεί να αναγνωριστεί η ταυτότητα ενός ατόμου (γενετικό αποτύπωμα-genetic fingerprint)

Όσον αφορά την εφαρμοσμένη εντομολογία η εφαρμογή μοριακών διαγνωστικών βασισμένων σε PCR μας δίνει την δυνατότητα να αναγνωρίσουμε τις μεταλλαγές που είναι υπεύθυνες για την μείωση της ευαισθησίας των εντόμων στα εντομοκτόνα, ακόμη και αν αυτή είναι σε πολύ μικρές συχνότητες σ'ένα πληθυσμό (Tzagkarakou *et al.*, 2009). Η έγκαιρη διάγνωση της ανθεκτικότητας δίνει την δυνατότητα διορθωτικών κινήσεων στην εφαρμοζόμενη στρατηγική φυτοπροστασίας, για την αποφυγή απωλειών στη γεωργική παραγωγή και τη διατήρηση της αποτελεσματικότητας των φυτοπροστατευτικών προϊόντων.

1.5.1. Η αντίδραση PCR

Με την PCR μια συγκεκριμένη περιοχή του γονιδιώματος μπορεί να πολλαπλασιαστεί μέχρι και δισεκατομμύρια φορές, δεδομένου ότι είναι γνωστή η νουκλεοτιδική του αλληλουχία τουλάχιστον των σημείων όπου συνδέονται οι εκκινητές. Η αλληλουχία του γονιδίου (ή «θραύσματος DNA») είναι απαραίτητη για τον σχεδιασμό των συνθετικών DNA ολιγονουκλεοτιδίων, το καθένα συμπληρωματικό με μία από τις αλυσίδες του δίκλωνου DNA. Τα ολιγονουκλεοτίδια

που θα χρησιμοποιηθούν ως εκκινητές πρέπει να δεσμεύονται σε θέσεις αντίθετες από την αλληλουχία που πρόκειται να ενισχυθεί, με άλλα λόγια καθορίζουν τα άκρα του θραύσματος DNA που πρόκειται να ενισχυθεί.

Η PCR πραγματοποιείται σε τρία κύρια βήματα τα οποία επαναλαμβάνονται 20-40 φορές και εκτελούνται σε ένα αυτοματοποιημένο κυκλοποιητή, ο οποίος μπορεί να θερμάνει και να ψύχει τα δοκιμαστικά σωληνάκια σε πολύ μικρό χρονικό διάστημα:

1. Αποδιάταξη του DNA στους 94°C: Αρχικά, το DNA που περιέχει το τμήμα πρόκειται να πολλαπλασιαστεί, θερμαίνεται για να μετουσιωθεί (δηλ. να ανοίξει το δίκλωνο μόριο του DNA). Ένας πλήρης τέτοιος κύκλος περιλαμβάνει επώαση των δειγμάτων σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες και γίνεται αυτόματα από ειδικά μηχανήματα τους θερμοκυκλωτές (thermal cyclers). Σε μια τυπική αντίδραση, το δίκλωνο DNA αποδιατάσσεται με θέρμανση στους 95°C.

2. Σύνδεση (annealing) στους 50-60°C: Το μίγμα αντίδρασης ψύχεται στην παρουσία περίσσειας δύο μονόκλωνων ολιγονουκλεοτιδίων, που ονομάζονται εκκινητές (τμήματα DNA μεγέθους 15-30 νουκλεοτιδίων), οι οποίοι είναι συμπληρωματικοί με τις δύο αλυσίδες του DNA και οριοθετούν το τμήμα DNA-στόχο. Στη συνέχεια οι εκκινητές σε περίσσεια προσαρμόζονται με υβριδισμό στις συμπληρωματικές αλληλουχίες του DNA εκμαγείου με ψύξη του δείγματος στους 50-60°C.

3. Επιμήκυνση (elongation) στους 72°C: Στο βήμα αυτό πραγματοποιείται η σύνθεση του DNA με τη βοήθεια μίας θερμοσταθερής πολυμεράσης, η οποία προστίθεται στο διάλυμα μαζί με 4 τριφωσφορικά δεσοξυροβονουκλεοτίδια (dNTPs: Dntp, Dctp, Dgtp, Dttp), έτσι ώστε να συντεθούν δύο νέες αλυσίδες DNA που είναι πανομοιότυπες με το αρχικό DNA (template DNA). Η πολυμεράση προσθέτει νουκλεοτίδια στο 3^ο άκρο του κάθε εκκινητή με κατεύθυνση 5 προς 3.

Στη διάρκεια της PCR, επειδή και οι δύο αλυσίδες του DNA αντιγράφονται, υπάρχει μια εκθετική αύξηση στον αριθμό των αντιγράφων που παράγονται. Αν τα τρία παραπάνω βήματα (αποδιάταξη, σύνδεση, επιμήκυνση) επαναληφθούν πολλές φορές (περίπου 30-40) τότε το τμήμα του δίκλωνου DNA που οριοθετείται από τις αλληλουχίες των εκκινητών θα πολλαπλασιαστεί σε εκατομμύρια αντίγραφα μέσα σε λίγες ώρες. Αν υποθέσουμε ότι αρχικά υπάρχει ένα αντίγραφο του DNA στόχου

τότε μετά από ένα κύκλο θα υπάρχουν 2 αντίγραφα, μετά από 2 κύκλους 4 αντίγραφα, μετά από 3 κύκλους 8 κ.ο.κ.

Καθώς η διαδικασία επαναλαμβάνεται, οι νεοσύστατοι κλώνοι με τη σειρά τους χρησιμοποιούνται ως εκμαγεία για τη *in vitro* σύνθεση του DNA. Μετά από μερικούς κύκλους το επικρατές προϊόν είναι ένα DNA θραύσμα το μέγεθος του οποίου αντιστοιχεί στην μεταξύ των δύο αρχικών εκκινητών απόσταση. Στη πράξη 20 με 30 κύκλοι της αντίδρασης είναι αρκετοί για την αποτελεσματική ενίσχυση του DNA θραύσματος. Σε κάθε κύκλο που διαρκεί περίπου πέντε λεπτά η ποσότητα του DNA διπλασιάζεται. (Βερβερίδης και Ταμπακάκη, 2006).

1.5.2. RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphisms)

Πρόκειται για πολυμορφισμούς οι οποίοι δημιουργούνται από τις τυχαίες νουκλεοτιδικές αλλαγές που μπορεί να συμβούν σε μια περιοχή του DNA, με αποτέλεσμα καταστροφή της θέσης αναγνώρισης μιας συγκεκριμένης ενδονουκλεάσης περιορισμού. Επομένως μόνο δύο αλληλόμορφα υπάρχουν για τους δείκτες αυτού του τύπου, παρουσία ή απουσία της θέσης αναγνώρισης.

Τα RFLPs κληρονομούνται ως Μεντελικοί δείκτες, γεγονός πολύ σημαντικό εφόσον υπάρχει η δυνατότητα διάκρισης των ομοζυγωτικών από τα ετεροζυγωτικά άτομα. Είναι επίσης άφθονα στο γονιδίωμα των περισσότερων ευκαρυωτικών οργανισμών. Ένα όμως μειονέκτημα αυτής της ομάδας των γενετικών δεικτών είναι ότι μόνο ένα μικρό μέρος του συνολικού γονιδιώματος μπορεί να εξεταστεί ταυτόχρονα, ενώ η απαίτηση για μεγάλη ποσότητα DNA την καθιστά δύσχρηστη σε πληθυσμιακές μελέτες.

Για την ανίχνευση των πολυμορφισμών που προκύπτουν μετά από πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες υπάρχουν δύο εναλλακτικές μέθοδοι. Σκοπός και των δύο μεθόδων είναι να διακριθεί το συγκεκριμένο τμήμα στο οποίο υπάρχει αλλαγή στη θέση αναγνώρισης του ενζύμου μεταξύ του συνόλου των τμημάτων που προκύπτουν μετά από μια τέτοια πέψη. Σύμφωνα λοιπόν με την πρώτη μέθοδο, η ανάλυση κατά Southern των τμημάτων χρησιμοποιώντας ως ανιχνευτή μια αλληλουχία αναγνώρισης του ενζύμου περιορισμού, επιτρέπει το διαχωρισμό των ατόμων στα οποία υπάρχει η θέση αναγνώρισης του ενζύμου από εκείνα στα οποία

λόγω κάποιας μετάλλαξης δεν υπάρχει πια. Όσον αφορά την δεύτερη μέθοδο, έχει αναπτυχθεί τα τελευταία χρόνια και βασίζεται στην ανίχνευση RFLP δεικτών. Η συγκεκριμένη μέθοδος εφαρμόζεται στην παρούσα πτυχιακή εργασία, η οποία βασίζεται στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Karl and Avise, 1993). Σε αυτήν την περίπτωση σχεδιάζονται εκκινητές για τις αλληλουχίες που περιβάλλουν τη θέση αναγνώρισης του περιοριστικού ενζύμου και το προϊόν της PCR πέπτει με τη συγκεκριμένη ενδονουκλεάση περιορισμού (*AluI*). Μετά από ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της πέψης σε πήκτωμα αγαρόζης, το άτομο στο οποίο η θέση αναγνώρισης έχει καταστραφεί εμφανίζει άθικτο το ενισχυόμενο από την PCR τμήμα. Με τη μέθοδο αυτή εξασθενούν πολλά από τα αρχικά μειονεκτήματα, διευκολύνοντας τη χρησιμοποίηση των RFLPs στην πληθυσμιακή ανάλυση (Karl and Avise, 1993). Οι μορφολογικές ομοιότητες αλλά και οι φαινολογικές διαφορές μεταξύ πληθυσμών/βιοτύπων του *B. tabaci* έχουν τονίσει την σημασία της ύπαρξης εύχρηστων μοριακών δοκιμών για την εξακρίβωση των βιοτύπων εξασφαλίζοντας την γενετική ταυτοποίηση των πληθυσμών. Αυτό είναι προαπαιτούμενο, για ένα αποτελεσματικό και διαρκή έλεγχο τόσο των επιβλαβών εντόμων όσο και των ασθενειών των φυτών που συνδέονται μ'αυτά.

Οι μοριακές διαγνωστικές δοκιμές έχουν ήδη αναπτυχθεί (Tsagkarakou *et al.*, 2007) και περιγράφω στην συνέχεια, δίνουν την δυνατότητα της γρήγορης και ακριβούς ταυτοποίησης των βιοτύπων.

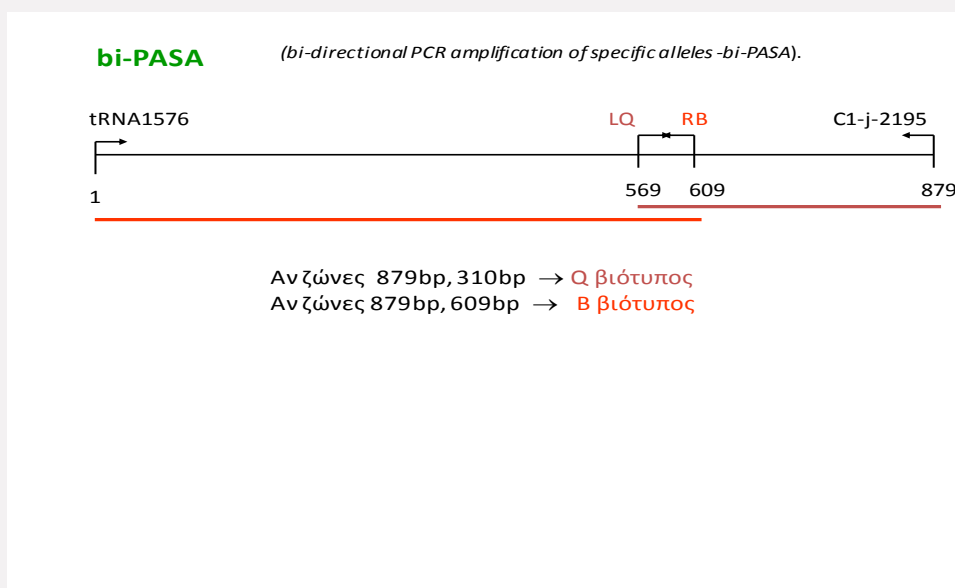
1.5.3. Περιγραφή 1ης διαγνωστικής δοκιμής

Με τη μέθοδο αυτή έχουμε τον πολυμερισμό με αλυσιδωτή αντίδραση ενός τμήματος 879 βάσεων του μιτοχονδριακού κυτοχρώματος της οξειδάσης I (mtCOI) με τη χρήση των 'εξωτερικών εκκινητών'(tRNA1576 και C1-J-2195). Δύο 'εσωτερικοί εκκινητές' LQ και RB με αντίθετη κατεύθυνση θα χρησιμοποιήσουν τον ένα από τους δύο εξωτερικούς εκκινητές για να δώσουν εκείνο το τμήμα βάσεων που αντιστοιχεί στον ανάλογο βιότυπο (Tsagarakou *et al.*, 2007) (εικόνα 15).

Συγκεκριμένα οι δύο εσωτερικοί εκκινητές LQ (5' AAG GGG CCT GAA TTT ATT G 3') και RB (5' CTA CTT TGG GTG GAA TAA AGT CT 3') είναι εξιδεικευμένοι για τον Q και B βιότυπο αντίστοιχα. Θα ενισχύσουν τμήματα 310bp

και 609bp όταν συνδυαστούν. Ο LQ συνδυαζόμενος με τον C1-J-2195 θα ενισχύσει τμήματα 310bp και ο RB θα ενισχύσει τμήμα 609bp όταν συνδυαστεί με τον tRNA1576 όταν το άτομο ανήκει στον Q ή B βιότυπο αντίστοιχα.

Η συγκεκριμένη διαγνωστική δοκιμή δεν επιτρέπει τον διαχωρισμό του Q1 και Q2 βιότυπου αλλά μόνο του Q από τους υπόλοιπους, γι' αυτό το λόγο στην παρούσα πτυχιακή μελέτη χρησιμοποιήθηκε η δεύτερη διαγνωστική δοκιμή.



Εικόνα 15: Σχηματική περιγραφή της αμφίδρομης PCR διαγνωστικής δοκιμής.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν

Χημικά αντιδραστήρια

Ένζυμα

Εκκινήτες

2.1.1 Χημικά αντιδραστήρια

H₂O

MgCl₂ (25 mM)

Buffer (10x)

dNTPs (2 mM)

Για τις ηλεκτροφορήσεις:

100ml 1X TAE ρυθμιστικό διάλυμα

2 μl βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr)

3 gr agarose

2.1.2 Ενζυμα

Taq polymerase

2.1.3 Εκκινητές

C1-J-₂₁₉₅ (10 μM)

tRNA1576 (10 μM)

2.1.4 Μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν

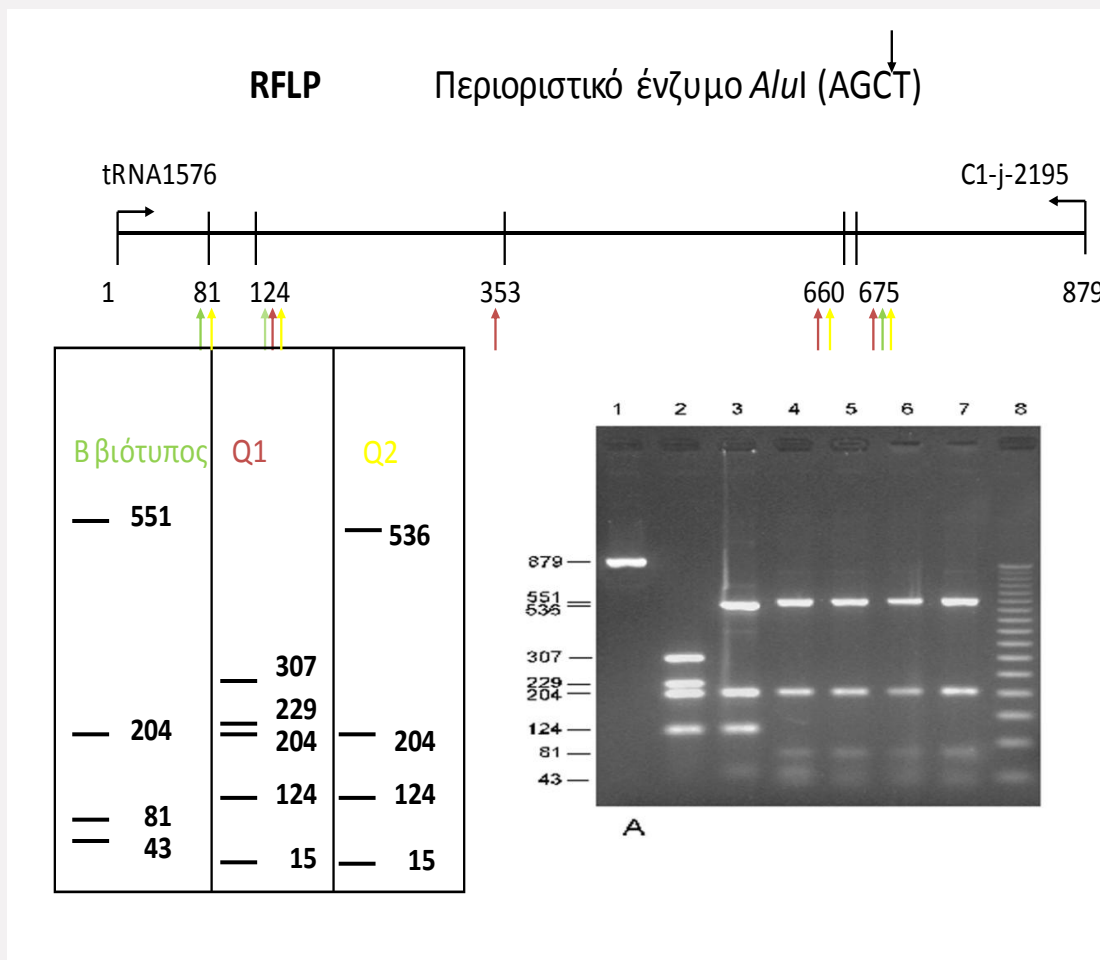
Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε ήταν η δεύτερη διαγνωστική δοκιμή με ενίσχυση της PCR ενός τμήματος της μιτοχondριακής κυτοχρωμικής οξειδάσης I όπου περιγράφεται στην συνέχεια.

2.2 Περιγραφή 2^{ns} διαγνωστικής δοκιμής

Η δεύτερη διαγνωστική δοκιμή αποτελείται από την ενίσχυση με PCR ενός τμήματος του γονιδίου της COI (879bp) χρησιμοποιώντας τους primers tRNA-1576 και C1-J-2195 και την μετέπειτα πέψη με μια ενδονουκλεάση, του *Alu1* που κόβει σε διαφορετικές θέσεις για κάθε βιότυπο. Το ένζυμο *Alu1* το οποίο αναγνωρίζει και κόβει την αλληλουχία AG/CT, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να διακρίνει όχι μόνο ανάμεσα στον Q και B βιότυπο, αλλά επίσης ανάμεσα στον Q, B, Ms, A,E και G βιότυπο. Επιπλέον, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την διάκριση των Q1 και Q2 βιοτύπων κάτι που δεν κάνει η προηγούμενη διαγνωστική δοκιμή (2.1). Συγκεκριμένα το *Alu1* αναγνωρίζει τέσσερις περιοριστικές θέσεις στην νουκλεοτιδική αλληλουχία του τμήματος της COI που ενισχύεται με τους εκκινητές

tRNA-1576 και C1-J-2195 (879bp) στον Q1 βιότυπο. Δύο απ'αυτές επίσης βρέθηκαν στον B βιότυπο μαζί με μια τρίτη που υπάρχει στην αλληλουχία μόνο του B βιότυπου (εικόνα 16A). Η πέψη αναμένεται να αποδώσει τέσσερα θραύσματα DNA (μπάντες) στα έντομα του B βιοτύπου (551bp, 204bp, 81bp και 43bp) και πέντε θραύσματα DNA στα έντομα του Q1 βιοτύπου (307bp, 229bp, 204bp, 124bp και 15bp) (εικόνα 15B) Το *Alu1* στις αλληλουχίες εντόμων Q2 (αρχικά προερχομένων από Ισραήλ και Τουρκία) αναγνωρίζει τρεις θέσεις με τέσσερα θραύσματα προϊόντα πέψης (536bp, 204bp, 124bp και 15bp) που διαφοροποιούνται απ'αυτά του Q1 (εικόνα 15B) και διαφοροποιείται απ'την αλληλουχία του Q1 βιότυπου. Η συγκεκριμένη διαγνωστική δοκιμή RFLP σε πριόντα PCR (PCR-PFLP) είναι αυτή που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα πτυχιακή εργασία διότι διακρίνει επιπλέον τον Q1 και Q2 βιότυπο.

A



A.....B

Εικόνα 16A και B

A. Τα βελάκια με το πράσινο χρώμα διακρίνουν τα κομμάτια του B βιότυπου, με το μωβ χρώμα, τα κομμάτια του Q1 βιότυπου και με το κίτρινο χρώμα, τα κομμάτια του Q2 βιότυπου.

Τα προϊόντα της PCR διαχωρίζονται σε gel αγαρόζης 2,5%.

B. PCR RFLP πείραμα με την *A* *lu*1 που χρησιμοποιήθηκε για τον διαχωρισμό ανάμεσα στον B, Q1 και Q2 βιοτύπων. Γραμμή 1: άκοπο κομμάτι της PCR. Γραμμή 2: Q1 βιότυπος. Γραμμή 3: Q2 βιότυπος. Γραμμή 4-7 B βιότυπος.. Γραμμή 8: 50 bp size marker.

Ο σκοπός της παρούσας πτυχιακής μελέτης είναι να προσδιορίσει την βιοτυπική ταυτότητα των ελληνικών πληθυσμών του *B. tabaci* αναλύοντας δείγματα από διάφορες περιοχές της Ελλάδας. Οι μοριακές δοκιμές που χρησιμοποιήθηκαν έδωσαν τη δυνατότητα για μία γρήγορη και αξιόπιστη ταυτοποίηση του Q και B βιότυπου στα έντομα που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διεξαγωγή του πειράματος

2.3 Πληθυσμοί *B. tabaci*

Χρησιμοποιήθηκαν δείγματα που προέρχονται από την ηπειρωτική Ελλάδα και τα νησιά Κρήτη και Σχοινούσα την περίοδο 2002, 2003, 2004 και 2007. Η προέλευση των δειγμάτων και ο αριθμός των ατόμων που χρησιμοποιήθηκαν για την κάθε ανάλυση φαίνονται στον πίνακα 1.

Απ' τους 12 πληθυσμούς του *B. tabaci* οι δύο είχαν συλλεχθεί από μη καλλιεργούμενα φυτά (ζιζάνια κυρίως *Amaranthus retroflexus* και *Solanum nigrum*), ένας από καλλωπιστικό φυτό (*Ibiscus mutabilis*) και οι υπόλοιποι εννιά από καλλιεργούμενα φυτά (αγγουριά, φασολιά, πεπόνι, τομάτα) ή μη εδώδιμες καλλιέργειες (καπνός). Δύο δείγματα ήταν από φυτά θερμοκηπίου και τα υπόλοιπα ήταν υπαίθρια. Σε κάθε τοποθεσία, οι ενήλικες αλευρώδεις συλλέχθηκαν από διάφορα φυτά μέσα στο ίδιο χωράφι (υπαίθρια ή θερμοκήπια) και είχαν αποθηκευτεί μέχρι να χρησιμοποιηθούν ο καθένας, στους -80°C ή σε 70% αιθανόλη.

Στην εικόνα 17 φαίνονται οι περιοχές από τις οποίες προέρχονται τα δείγματα και στον Πίνακα 1 επιπλέον πληροφορίες για κάθε δείγμα.

Εικόνα 17



100 Km

Στον παρακάτω πίνακα αναγράφονται οι πληθυσμοί από διάφορες περιοχές της Ελλάδας, τα φυτά-ξενιστές, η ημερομηνία συλλογής τους καθώς και ο αριθμός των απόμων.

Κωδικός	Περιοχή	Φυτό ξενιστής	Ημ/νια συλλογής	N	
Νότια Κρήτη					
A	13	Ιεράπετρα	<i>Amaranthus retroflexus</i>	Ιούν-2002	13
A	189	Ιεράπετρα	<i>Solanum nigrum</i>	Μάιος-2007	12
Θ	187	Άρβη	Αγγούρι	Μάιος-2007	10
A	191	Άρβη	Φασόλι	Ιούν-2007	12
Θ	195	Τυμπάκι	Πεπόνι	Ιούν-2007	10
A	211	Τυμπάκι	Ντομάτα	Σεπτ-2007	11
Βόρεια Κρήτη					
A	54	Χανιά	Πεπόνι	Ιούν-2003	11
A	215	Ασήμι	Αγγούρι	Οκτ-2007	11
Σχοινούσα					
A	201	Σχοινούσα	<i>Ibiscus mutabilis</i>	Σεπτ-2007	4
Ηπειρωτική Ελλάδα					
A	80	Αγρίνιο	Καπνός	Ιούν-2004	15
A	70	Άργος	Καπνός	Ιούν-2004	4
A	96	Γόθαιο	Αγγούρι	Αύγ-2004	12

Πίνακας 1. Γεωγραφική προέλευση, φυτά-ξενιστές και ημερομηνία συλλογής των πληθυσμών *Bemisia tabaci*. Α: Αγρός, Θ: Θερμοκήπιο, Ν: Αριθμός ατόμων *B. tabaci* που συμμετείχαν στο πείραμα.

2.4 Απομόνωση ολικού γενομικού DNA

Απομονώθηκε γενομικό DNA (gDNA) από 125 μεμονωμένα ακμαία θηλυκά από 12 διαφορετικούς ελληνικούς πληθυσμούς (201, 187, 195, 189, 191, 54, 215, 96, 80, 13, 211, 70,) σύμφωνα με τους Tsagkarakou *et al.*, 2007.

Συγκεκριμένα το πρωτόκολλο απομόνωσης του DNA ήταν ως ακολούθως:

1. Προετοιμασία δειγμάτων: Ομογενοποίηση ενός ακμαίου θηλυκού ατόμου, με ειδικό ομογενοποιητή που εφαρμόζει σε 1.5 ml eppendorf tube, στο παρακάτω μείγμα (50μl):

5M NaCl	1.0 μl
1M Tris HCl PH:8	0,5 μl

και 2μl proteinase K
(10mg/ml)

2. Επώαση του δείγματος για 1 ώρα στους 55°C και ακολούθως 5 λεπτά στους 85°C.

3. Φυγοκέντρωση για 5 λεπτά στα 10000g

4. Μεταφορά υπερκείμενου διαλύματος σε νέο καθαρό σωληνάριο για περαιτέρω χρήση.

2.5 Διαδικασία PCR

Αλληλουχία εκκινητών

Εμπρόσθιος εκκινητής (C1-j-2195): 5' TTGATTTTTTGGTCATCCAGAAT 3'

Οπίσθιος εκκινητής (tRna1576): 5' TATAAATCTTAAATTTACTGCA 3'

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε 15μl τελικό όγκο όπως περιγράφεται παρακάτω: συστατικά που περιγράφονται στον παρακάτω πίνακα:

ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ PCR	
H ₂ O	6.10 μl
Buffer (10x)	1.50 μl
dNTPs (2 mM)	1.50 μl
MgCl ₂ (25 mM)	1.00 μl
C1-J-_2195 (10 μM)	0.75 μl
tRNA1576 (10 μM)	0.75 μl
polymerase	0.40 μl

Ως εκμαγείο (template) χρησιμοποιήθηκαν 3 μl γενομικού DNA. Το αναμενόμενο μέγεθος της αντίδρασης ήταν 879 bp. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε 35 κύκλους ενίσχυσης σύμφωνα με το πρόγραμμα:

1. T = 95 °C για 5'
2. T = 94 °C για 30''
3. T = 52 °C για 1'
4. T = 72 °C για 1'
5. Επιστροφή στο βήμα 2 και επανάληψη των βημάτων (2-4) 34 φορές
6. T = 72°C για 10'
7. Παραμονή στους 8°C

2.6 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση είναι μια συνηθισμένη εργαστηριακή τεχνική για τον διαχωρισμό θραυσμάτων DNA βάσει μεγέθους φορτίου και διαμόρφωσης. Για να εξακριβώσουμε την «επιτυχία» της PCR ένα μέρος από τα προϊόντα (5 μl) τα «τρέξαμε» σε πήκτωμα αγαρόζης 1% πριν την πέψη.

Για την παρασκευή 1%w/v χρησιμοποιήθηκαν:

- 1 gr agarose,

- 2 μl βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr),
- 100ml 1X TAE ρυθμιστικό διάλυμα

Εντός κωνικής φιάλης διαλύθηκε 1 gr αγαρόζη σε 100ml ddH₂O. Ακολούθησε θέρμανση του διαλύματος έως ότου αυτό έγινε διαφανές. Ακολούθησε προσθήκη 2μl βρωμιούχο αιθίδιο (2% w/v) και μεταφορά του σε ειδικά εκμαγεία που έφεραν προσαρμοσμένα χτένια (combs) έως ότου πήξει. Μεταφορά του gel σε συσκευή ηλεκτροφόρησης γεμάτη με ρυθμιστικό διάλυμα 1X TAE. Προσθήκη στα προϊόντα της PCR 10%w/v loading buffer και ακολούθησε φόρτωμα των δειγμάτων στις εσοχές που είχαν σχηματιστεί από τα ειδικά χτένια. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε στα 70 - 80mV.

Στη συνέχεια κάποια από τα άτομα της PCR έγιναν ορατά μετά την έκθεση του gel σε συσκευή εκτομής υπέρυθρης ακτινοβολίας και στη συνέχεια φωτογραφήθηκαν.

Κατόπιν με βάση τα άτομα τα οποία επιλέχτηκαν και δούλεψαν από τη διαδικασία της PCR, χρησιμοποιήθηκαν όλα τα άτομα στην τεχνική του RFLP για την διαδικασία πέψης του DNA, για την ταυτοποίηση των βιοτύπων.

2.7 Διαδικασία RFLP-κόψιμο με *Alu1*

Η αντίδραση RFLP έγινε ως εξής:

ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ RFLP	
PCR product	7 μl
Buffer 10x	2 μl
<i>Alu1</i>	0.7 μl
H ₂ O	10.3 μl
Συνολικός όγκος	20μl

2.8 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Τα προϊόντα της πέψης υποβλήθηκαν στη διαδικασία ηλεκτροφόρησης με πήκτωμα αγαρόζης 2% για την ταυτοποίηση των βιοτύπων σε συγκεκριμένες αλληλουχίες.

Για την παρασκευή 2% w/v χρησιμοποιούνται:

- 2gr agarose
- 2 μl βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr)
- 100ml 1X TAE ρυθμιστικό διάλυμα

Κατόπιν τα προϊόντα της πέψης έγιναν ορατά μετά την έκθεση του gel σε συσκευή εκπομπής υπέρυθρης ακτινοβολίας και στη συνέχεια φωτογραφήθηκαν.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η μελέτη για το χαρακτηρισμό του βιότυπου των πληθυσμών του *B. tabaci* βασίστηκε στις διαφορές που εντοπίζονται μεταξύ των εκάστοτε ατόμων στο γονίδιο της κυτοχρωμικής οξειδάσης I (mtCOI). Χρησιμοποιώντας τους κατάλληλους εκκινητές (Tsagkarakou *et al.*, 2007) πολλαπλασιάζεται ένα τμήμα της μιτοχondριακής οξειδάσης I η οποία επιτρέπει στο περιοριστικό ένζυμο *Alu1* να αναγνωρίσει και να κόψει εκείνες τις αλληλουχίες που θα διαφοροποιήσουν το πρότυπο των κομματιών με βάση τον βιότυπο που αναγνωρίστηκε. Έτσι, σε περίπτωση που έχουμε τον B βιότυπο, το ένζυμο θα δώσει τέσσερα θραύσματα (551bp, 204bp, 81bp και 43bp), όταν αναγνωριστεί ο Q1 βιότυπος θα δώσει πέντε θραύσματα (307bp, 229bp, 204bp, 124bp και 15bp), ενώ εφόσον αναγνωριστεί ο Q2 βιότυπος θα δώσει τέσσερα θραύσματα (536bp, 204bp, 124bp και 15bp).

Με βάση τη διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω προέκυψαν τα παρακάτω αποτελέσματα κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων της PCR και RFLP όπου είναι εμφανής η ταυτοποίηση όλων των δειγμάτων με τον Q1 βιότυπο. Σημειώνεται ότι κάθε φορά χρησιμοποιήσα και άτομα αναφοράς που ανήκαν σε B, Q1 και Q2 βιότυπους ήδη χαρακτηρισμένους.

Στους παρακάτω πίνακες αναγράφονται οι πληθυσμοί που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία καθώς και τα αποτελέσματα τους, όπου έδειξαν την ταυτοποίηση και επικράτηση του Q1 βιότυπου.

	ΑΤΟΜΑ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ 187	ΒΙΟΤΥΠΟΣ
187	187.27	Q1
	187.28	Q1
	187.29	Q1
	187.21	Q1
	187.24	Q1
	187.25	Q1
	187.1	Q1
	187.2	Q1
	187.3	Q1
	187.5	Q1

	ΑΤΟΜΑ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ 195	ΒΙΟΤΥΠΟΣ
195	195.33	Q1
	195.40	Q1
	195.43	Q1
	195.30	Q1
	195.39	Q1
	195.36	Q1
	195.12	Q1
	195.13	Q1
	195.14	Q1
	195.15	Q1

	ΑΤΟΜΑ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ 189	ΒΙΟΤΥΠΟΣ
--	--------------------------------	-----------------

189	189.4	Q1
	189.7	Q1
	189.8	Q1
	189.9	Q1
	189.11	Q1
	189.13	Q1
	189.14	Q1
	189.15	Q1
	189.16	Q1
	189.1	Q1
	189.2	Q1
	189.3	Q1

	ΑΤΟΜΑ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ 191	ΒΙΟΤΥΠΟΣ
191	191.10	Q1
	191.11	Q1
	191.12	Q1
	191.14	Q1
	191.15	Q1
	191.16	Q1
	191.17	Q1
	191.18	Q1
	191.19	Q1
	191.1	Q1
	191.3	Q1
	191.4	Q1

	ΑΤΟΜΑ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ 215	ΒΙΟΤΥΠΟΣ
215	215.1	Q1
	215.2	Q1

	215.3	Q1
	215.5	Q1
	215.6	Q1
	215.7	Q1
	215.8	Q1
	215.9	Q1
	215.12	Q1
	215.14	Q1
	215.15	Q1

	ΑΤΟΜΑ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ 54	ΒΙΟΤΥΠΟΣ
54	54.19	Q1
	54.20	Q1
	54.21	Q1
	54.22	Q1
	54.23	Q1
	54.24	Q1
	54.26	Q1
	54.27	Q1
	54.30	Q1
	54.31	Q1
	54.32	Q1

	ΑΤΟΜΑ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ 211	ΒΙΟΤΥΠΟΣ
211	211.1	Q1
	211.4	Q1
	211.5	Q1
	211.6	Q1
	211.7	Q1
	211.8	Q1

	211.9	Q1
	211.10	Q1
	211.11	Q1
	211.12	Q1
	211.13	Q1

	ΑΤΟΜΑ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ 13	ΒΙΟΤΥΠΟΣ
13	13.8	Q1
	13.9	Q1
	13.10	Q1
	13.11	Q1
	13.12	Q1
	13.14	Q1
	13.1	Q1
	13.2	Q1
	13.3	Q1
	13.4	Q1
	13.5	Q1
	13.6	Q1
	13.7	Q1

	ΑΤΟΜΑ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ 80	ΒΙΟΤΥΠΟΣ
80	80.1	Q1
	80.2	Q1
	80.3	Q1
	80.4	Q1
	80.5	Q1
	80.6	Q1
	80.7	Q1
	80.8	Q1

	80.9	Q1
	80.10	Q1
	80.11	Q1
	80.12	Q1
	80.13	Q1
	80.14	Q1
	80.15	Q1

	ΑΤΟΜΑ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ 96	ΒΙΟΤΥΠΟΣ
96	96.23	Q1
	96.2	Q1
	96.3	Q1
	96.6	Q1
	96.22	Q1
	96.1	Q1
	96.24	Q1
	96.25	Q1
	96.26	Q1
	96.27	Q1
	96.28	Q1
	96.29	Q1

	ΑΤΟΜΑ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ 201	ΒΙΟΤΥΠΟΣ
201	201.11	Q1
	201.12	Q1
	201.13	Q1
	201.3	Q1

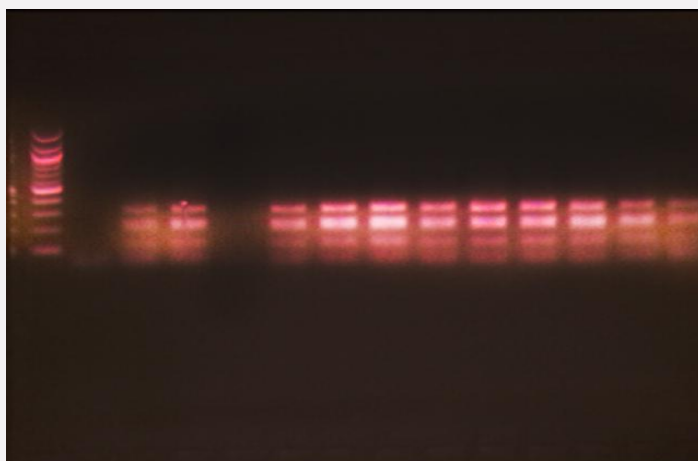
	ΑΤΟΜΑ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ 70	ΒΙΟΤΥΠΟΣ
--	-------------------------------	-----------------

70	70.9	Q1
	70.10	Q1
	70.11	Q1
	70.12	Q1

Στις παρακάτω φωτογραφίες φαίνονται τα αποτελέσματα των ηλεκτροφορήσεων σε πηκτώματα αγαρόζης απ' όπου αναγνωρίστηκαν τα χαρακτηριστικά για τον Q1 προφίλ πέψης.

1^ο gel:

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14



— 307
 — 229
 = 204
 — 124
 — 15

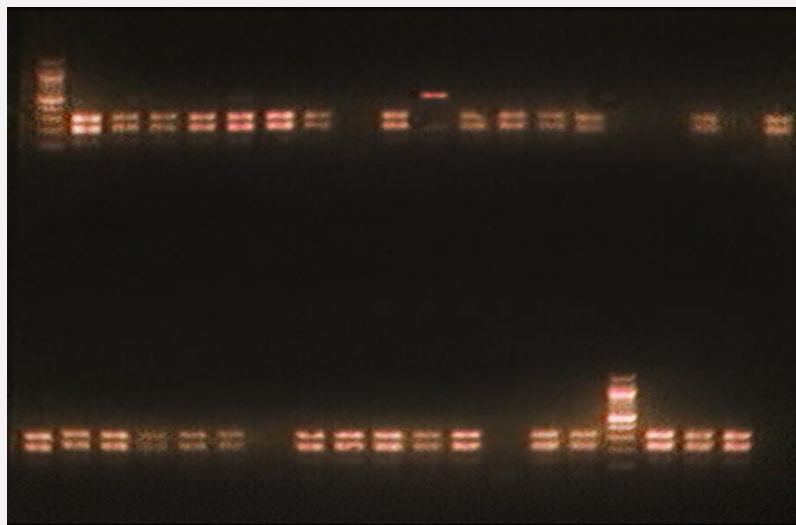
Στο gel, διακρίνουμε άτομα του Q1 βιότυπου:

Θέση 1: size marker, **2:** το άτομο 215.13 δεν δούλεψε, **3:** άτομο 215.14, **4:** άτομο 215.15, **5:** το άτομο 215.16 δεν δούλεψε, **6-12:** άτομα 211.7-211.13, **13:** άτομο από πληθυσμό αναφοράς για Q1 και **14:** άτομο 211.1.

Δεξιά διακρίνονται τα 5 θραύσματα του Q1 βιότυπου (15, 124, 204, 229, 307) όπου ταυτοποιήθηκαν όλοι οι πληθυσμοί του αλευρώδη του καπνού που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία και φαίνονται στα gel αγαρόζης.

2^ο gel:

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20



Επίσης και σ' αυτό το gel διακρίνουμε άτομα του Q1 βιότυπου. Στην πάνω γραμμή: **Θέση 1:** size marker, **2:** άτομο 13.7, **3:** άτομο από πληθυσμό αναφοράς για Q1, **4-8:** άτομα 13.8-13.12, **9:** το άτομο 13.13 δεν δούλεψε, **10:** άτομο 13.14, **11:** άτομο από πληθυσμό αναφοράς για Q2, **12-15:** άτομα 70.9- 70.12, **16-17:** τα άτομα 201.4, 201.2 δεν δούλεψαν, **18:** άτομο 201.3, **19:** το άτομο 201.1 δεν δούλεψε και **20:** άτομο 187.1.

Στην κάτω γραμμή αντίστοιχα διακρίνουμε άτομα του Q1 βιότυπου από τους πληθυσμούς 187, 189, 195, 191 και 54, τον size marker στη θέση 16, καθώς και στις θέσεις 7, 13 και 20 τα άτομα τα οποία δεν δούλεψαν.

4. ΣΥΣΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Ο σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας, ήταν η μελέτη της βιοτυπικής ταυτοποίησης του εντόμου *B. tabaci* από διάφορες τοποθεσίες της Ελλάδας. Αυτό πραγματοποιήθηκε διερευνώντας την ποικιλομορφία της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας της μιτοχondριακής κυτοχρωμικής οξειδάσης I (mtCOI) μέσω μιας μοριακής διαγνωστικής δοκιμής PCR-RFLP με την ενδονουκλεάση *Alu1*.

Η διαγνωστική δοκιμή που εφαρμόστηκε στην παρούσα εργασία ήταν βασισμένη στις αμετάβλητες διαφορές των αλληλουχιών της μιτοχondριακής κυτοχρωμικής οξειδάσης I μεταξύ των βιοτύπων.

Ο Β και ο Q βιότυπος έχουν αναφερθεί ως οι επικρατέστεροι στις Μεσογειακές χώρες. με τη διερεύνηση συγκεκριμένων βιοτύπων mtCOI κομματιών και την ενζυματική κοπή της PCR mtCOI κομματιών πολλαπλασιασμού από την ενδοκλεάση *Alu1*. Τα αποτελέσματα και των 12 ελληνικών πληθυσμών που μελετήθηκαν έδειξαν ξεκάθαρα την απουσία του Β βιότυπου και την παρουσία του Q και συγκεκριμένα την παρουσία του Q1 βιότυπου και όχι του Q2. Βασιζόμενοι στο γεγονός ότι εξετάσαμε 125 άτομα από διάφορες τοποθεσίες της Ελλάδας, συμπεραίνουμε ότι ο Q1 βιότυπος είναι ο επικρατέστερος και ότι οι άλλοι βιότυποι αν είναι παρόντες πρέπει να είναι σε μικρότερη συχνότητα. Το αποτέλεσμα αυτό είναι σε συμφωνία με τα αποτελέσματα των Tsagkarakou *et al.*, 2007 και των Roditakis *et al.*, 2009 όπου σ'ένα πολύ μεγαλύτερο δείγμα πληθυσμών από την Κρήτη και την ηπειρωτική Ελλάδα ο Q1 βιότυπος βρέθηκε να είναι ο επικρατέστερος. Παρ'όλα αυτά η ταυτόχρονη παρουσία των Β και Q βιοτύπων σε μία χώρα και μάλιστα στην ίδια περιοχή δεν είναι σπάνια, όπως έχει αναφερθεί σε άλλες Μεσογειακές χώρες (Guirao *et al.*, 1997).

Το 2000 το *B. tabaci* που είναι φορέας μετάδοσης του ιού TYLCV, προκάλεσε σημαντικές απώλειες καλλιεργειών τομάτας στην Κρήτη και στην Νότια Πελοπόννησο. Παρ'όλο που η εμφάνιση του Β βιοτύπου συσχετίζεται συχνά με την ικανότητα του αλευρώδη του καπνού να μεταδίδει ιώσεις, δεν ήταν γνωστό αν είχε σχέση το ξαφνικό ξέσπασμα του TYLCV με την εισαγωγή του Β βιότυπου στην Ελλάδα, ή ήταν υπεύθυνοι οι αυτόχθονοι πληθυσμοί (Tsagkarakou *et al.*, 2007).

Σε πιο πρόσφατη έρευνα (Papayiannis *et al.*, 2008) το ξέσπασμα του ιού του κίτρινου καρουλιάσματος της τομάτας, (TYLCV) που συνέβη σε καλλιέργειες τομάτας στη Ρόδο βρέθηκε ότι τα προσβεβλημένα φυτά είχαν κατακλυστεί απ'το Β βιότυπο του *B. tabaci* σε θερμοκηπιακές αλλά και υπαίθριες καλλιέργειες τομάτας που μεταδόθηκε απ'το TYLCV, που εισήχθηκε απ'τη μέση Ανατολή. Αυτή είναι και η πρώτη αναφορά του Β βιότυπου του *B. tabaci* στην Ελλάδα.

Παρ'όλο που η παρούσα εργασία στους ελληνικούς πληθυσμούς του αλευρώδη του καπνού έδειξε ταυτοποίηση του Q βιοτύπου και συγκεκριμένα του Q1, δεν μπορεί να αποκλείσει την παρουσία του Β βιότυπου ή άλλων βιοτύπων σε άλλες περιοχές της Ελλάδας. Επιπλέον δεδομένου ότι η σύνθεση των πληθυσμών του *B.*

tabaci σε μια περιοχή είναι κάτι δυναμικό, γίνεται κατανοητό ότι η μοριακή διαγνωστική δοκιμή που χρησιμοποίησα στην πτυχιακή μου μελέτη αποτελεί πολύτιμο εργαλείο για την γρήγορη και έγκυρη διαπίστωση της ταυτότητας του βιοτύπου απόμων του *B. tabaci*.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ξενόγλωσση:

- Abdullahi, I., Atiri, G.I., Thottappilly, G. & Winter, S.** (2004) Discrimination of cassava- associated *Bemisia tabaci* in Africa from polyphagous populations, by PCR-RFLP of the internal transcribed spacer regions of ribosomal DNA. *Journal of Applied Entomology* **128**, 81-87
- Adams, J.** (2005) Nuclear and mitochondrial DNA in the courtroom. *Journal of Law and Policy* **13**, 69-97,
- Anthony, B., Palaniswami, M.S. & Henneberry, T.J.** (2003). *Encarsia transversa* (Hymenoptera: Aphelinidae) development on different *Bemisia tabaci* Gennadius (Homoptera: Aleyrodidae) instars. *Environmental Entomology*, **32**, 584-591
- Avgelis, A.D. & Reditakis N.** (2001) First Report of Tomato yellow leaf curl virus on Tomato Crops in Greece. *Plant disease* Vol.85 No 6.
- Avise, J.C.** (2000) Phylogeography: The history and formation of species. *Cambridge, Massachusetts, Harvard University Press.* **447**.
- Bedford, I.D., Briddon, R.W., Brown, J.K., Rosell, R.C. & Markham, P.G.** (1994) Geminivirus transmission and biological characterization of *Bemisia tabaci* (Gennadius) biotypes from different geographic regions. *Annals of Applied Biology* **125**, 311-325.
- Bellows, TS Jr., Perring, T.M., Gill, R.J. & Headrick, DH.** (1994) Description of a new species of *Bemisia* (Homoptera: Aleyrodidae). *Annals of the Entomological Society of America* **87**, 195-206.
- Boykin, Laura M., Shatters JR, Robert G., Rosell, Rosemarie C., Cindy L., Mckenzie., Ruth Ann Bagnail, Paul De Barro. & Donald R Frohlich** (2007)

- Global Relationships of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) revealed using Bayesian analysis of mitochondrial COI DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **44**, 1316-1319.
- Brown, J.K. & Bird, J.** (1992) Whitefly-transmitted geminiviruses and associated disorders in the Americas and the Caribbean Basin. *Plant Disease* **76**, 220–225
- Brown, J.K.** (2000) Molecular markers for the identification and global tracking of whitefly vector-*Begomovirus* complexes. *Virus Research* **71**, 233-260.
- Byrne, D. N.** (1999) "Migration and dispersal by the sweet potato whitefly, *Bemisia tabaci*. *Agricultural and forest meteorology* **97** (4): 309-316.
- Caciagli, P., Bosco D. & Al-Bitar, L.** (1995) Relationships of the Sardinian isolate of tomato yellow leaf curl geminivirus with its whitefly vector *Bemisia tabaci*. *European Journal of Plant Pathology*. **101**, 163-170.
- Cervera, M.T., Cabezas, J.A., Simon, B., Martínez-Zapater, J.M., Beitia, F. & Cenis, J.L.** (2000) Genetic relationships among biotypes of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) based on AFLP analysis. *Bulletin of Entomological Research* **90**, 391-396.
- Cohen, S. & Antignus, Y.** (1994) Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV), a whitefly-borne geminivirus of tomatoes. *Advantages and Disadvantages of Vector Research*. **10**, 259-288.
- Cohen, S. & Harpaz, I.** (1964) Periodic, rather than continual acquisition of a new tomato virus by its vector, the tobacco whitefly (*Bemisia tabaci* Gennadius). *Entomologia Experimentalis et Applicata*. **7**, 155-156.
- De Barro, P.J.** (2005) Genetic structure of the whitefly *Bemisia tabaci* in the Asia-Pacific region revealed using microsatellite markers. *Molecular Ecology* **14**, 3695-3718.
- De Barro P.J. & Driver F.** (1997) Use of RAPD PCR to distinguish the B biotype from other biotypes of *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae). *Australian Journal of Entomology*. **36**, 149-152.
- De Barro, P.J.** (1995) *Bemisia tabaci* biotype B; A Review of its Biology, Distribution and Control, 2nd edn, CSIRO *Division of Entomology*, Technical Paper No. 36. CSIRO, Canberra, Australia

- De-Xing Zhang & Godfrey M. Hewitt** (1997) Insect Mitochondrial Control Region: A review of its structure, evolution and usefulness in evolutionary studies *Biochemical Systematics and Ecology* **25**, 99-120.
- Ellsworth, P. C., D. H. Siegl, et al.** (1999) Monitoring *Bemisia* susceptibility to Applaud (buprofezin) during the 1998 cotton season. Cotton, A College of Agriculture Report. J. C. Silvertooth. Tucson, AZ, University of Arizona, College of Agriculture. **116**, 361-375.
 Διαθέσιμο on line: <http://ag.arizona.edu/pubs/crops/az1123/az11237g.pdf>
- Enkegaard, A.** (1990) Age-specific fecundity and adult longevity of the cotton whitefly, *Bemisia tabaci* (Genn.) (Homoptera: Aleurodidae) on poinsettia (*Euphorbia pulcherrina*) at different temperatures **13**, 55-60.
- Gerling, D., A.R. Horowitz, et al.** (1986) Agriculture, Ecosystems and Environment *Crop Protection* **17**: 5-19.
- Guirao, P., Beitia, F. & Cenis, J.L.** (1997) Biotype determination of Spanish populations of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleurodidae). *Bulletin of Entomological Research* **87**, 587-593.
- Hendi, A., Abel-Fattah, M.I. & El-Sayed, A.** (1987) Biological study on the whitefly, *Bemisia tabaci* (Genn.) (Homoptera: Aleurodidae). *Bulletin de la societe Entomologique d’Egypte* **65**, 101-108.
- Hodges, G.** (2009) *Bemisia tabaci* (Gennadius) (biotype Q): A potential new biotype for Florida’s vegetable and ornamental crops. (Hemiptera: Aleurodidae) διαθέσιμο on line:
<http://www.doacs.state.fl.us/pi/enpp/ento/b.tabaci.html>
- Jones, D.R.** (2003) Plant viruses transmitted by whiteflies. *European Journal of Plant Pathology*. **109** (3): 195-219.
- Karl, S.A. & Avise, J.C.** (1993) PCR-based assays of Mendelian polymorphisms from anonymous single-copy nuclear DNA: Techniques and applications for population genetics. *Molecular Biology and Evolution.*, **10**, 342-361.
- Kirk, A.A., & L. A. Lacey.** (1993) The status of *Bemisia tabaci* (Hom, Aleurodidae), *Trialeurodes vaporariorum* (Hom, Aleurodidae) and their natural enemies in Crete.” *Entomophaga* **38** (3): 405-410.

- Mau, Roland F., L. & Dick Tsuda.** (1991) Sweetpotato whitefly *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Homoptera: Aleyrodidae).
- McGrath, P.F. & Harrison, B.D.** (1995) Transmission of tomato yellow leaf curl geminivirus by *Bemisia tabaci*: effects of virus isolate and vector biotype. *Annals of Applied Biology*. **126**, 307-316.
- Moriones, E. & J. Navas-Castillo** (2000) Tomato yellow leaf curl virus, an emerging virus complex causing epidemics worldwide. *Virus research* **71**: 123-124.
- Mound L., A. and S., H. Hasley.** (1978) *Bemisia tabaci* (Gennadius). In Whitefly of the World, A Systematic Catalog of the Aleyrodidae (Homoptera) with Host Plant and Natural Enemy Data. British Museum (Natural History) and John Wiley & Sons, Chichester, New York, Brisbane, Toronto. **340**, 118-124.
- Moya, A., Guirao, P., Cifuentes D., Beitia, F. & Cenis, J.L.** (2001) Genetic diversity of Iberian populations of *Bemisia tabaci* (Hemiptera:Aleyrodidae) based on random amplified polymorphic DNA- polymerase chain reaction. *Molecular Ecology* **10**, 891-897.
- Mylo L, Thao., Linda Baumann. & Paul, Baumann.** (2004) Organization of the mitochondrial genomes of whiteflies, aphids, and psyllids (Hemiptera, Sternorrhyncha) *BMC Evolutionary Biology* **4:25**, 10.
- Papayiannis, L.C., Brown, J.K., Seraphides, N.A., Hadjistyli, M., Ioannou, N. & Katis, N.I.** (2009) A real-time PCR assay to differentiate the B and Q biotypes of the *Bemisia tabaci* complex in Cyprus. *Bulletin of Entomological Research* **99**, 573-582.
- Papayiannis, L.C., Brown, J.K., Hadjistyli, M. & Katis, N.I.** (2008) *Bemisia tabaci* Biotype B Associated with Tomato Yellow Leaf Curl Disease Epidemics on Rhodes Island, Greece. *Phytoparasitica* **36(1)**, 20-22.
- Paulson, G.S. & Beardsley, J.M.** (1985) White fly (Hemiptera:Aleyrodidae) egg pedicel insertion into host plant stomata. *Annals of the Entomological Society of America*. **78**, 505-508.
- Perring, T.M.** (2001) The *Bemisia tabaci* species complex. *Crop Protection*.**20**, 725-737.

- Pollini, A., I. Ponti, & Laffi, F.** (2000) Εχθροί Των Κηπευτικών. Εκδόσεις ΖΕΥΣ ΑΕ (2000).
- Roditakis, E., Grispu, M., Morou, E., Kristoffersen, JB., Roditakis, N., Nauen, R., Vontas, J. & Tsagkarakou, A.** (2009) Current status of insecticide resistance in Q biotype *Bemisia tabaci* populations from Crete. *Pest Management Science*.
- Sanchez-Campos, S., Navas-Castillo, J., Camero, R., Soria, C., Diaz, J.A. & Moriones, E.** (1999) Displacement of tomato yellow leaf curl virus (TYLCV)-Sr by TYLCV-Is in tomato epidemics in Spain. *Phytopathology* **89**, 1038-1043.
- Tsagkarakou, A., Tsigenopoulos C.S., Gorman K., Lagnel, J. & Bedford I.D.** (2007) Biotype status and genetic polymorphism of the whitefly *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleurodidae) in Greece: mitochondrial DNA and microsatellites. *Bulletin of Entomological Research* **97**, 29-40.
- Tsagkarakou, A., Roditakis E., Sharvit M., Morin S. & Vontas I.** (2009) Molecular diagnostics for detecting pyrethroid and organophosphate resistance-associated point mutations in the whitefly *Bemisia tabaci*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **94**, 49-54.
- Vassiliou, V.A., Jagge, C., Grispu, M., Pietrantonio, P.V. & Tsagkarakou, A.** (2008) Biotype status of *Bemisia tabaci* from various crops in Cyprus, *Entomolgy*, **36**, 400-404.

Ελληνική:

- Βερβερίδης Φίλιππος & Αναστασία Ταμπακάκη** (2006) Εργαστηριακές Ασκήσεις και Θεωρία Βιοτεχνολογίας Φυτών Εκδόσεις ΤΕΙ Κρήτης σελ. **60**
- Σταμόπουλος, Δημ. Κ.** (1999) Έντομα αποθηκών μεγάλων καλλιεργειών & λαχανικών. Εκδόσεις ΖΗΤΗ (1995) έδρα Θεσσαλονίκη **137-139**.
- Τζανακάκης, Μ. Ε. Κ., Β. Ι.** (1998) Έντομα Καρποφόρων Δέντρων Και Αμπέλου. Εκδόσεις Αγρότυπος ΑΕ (2003).

Ιστοσελίδες:

Παπαγιάννης Λ, Σεραφείδης Ν. 2009 , «Η Γεωργική μας έρευνα». Ο αλευρώδης του καπνού και οι ασθένειες που μεταδίδει στην Κύπρο
[http://www.cyprus.gov.cy/moa/Agriculture.nsf/All/4EC5A26141787A19C22576510033B844/\\$file/53_nikH_GEORGIKH_ERE.pdf?OpenElement](http://www.cyprus.gov.cy/moa/Agriculture.nsf/All/4EC5A26141787A19C22576510033B844/$file/53_nikH_GEORGIKH_ERE.pdf?OpenElement)

(Τελευταία πρόσβαση: Σεπτέμβριος 2010)

http://www.plantprotection.hu/modulok/gorog/melon/silverleaf_mel.htm

(Τελευταία πρόσβαση: Σεπτέμβριος 2010)

http://www.anthesis.gr/index.php?option=com_virtuemart&page=shop.browse&category_id=77&Itemid=28

ANTHESIS ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΤΙΚΟ & ΘΕΡΜΟΚΗΠΙΑΚΟ ΥΛΙΚΟ ΠΡΟΙΟΝΤΑ

Copyright 2010 Anthesis Designed by Consult IT

(Τελευταία πρόσβαση: Σεπτέμβριος 2010)

<http://www.bpi.gr/photos/files/cfiles/08o.pdf>

Κατευθυντήριες οδηγίες μακροσκοπικών ελέγχων για τη διαπίστωση ή μη του επιβλαβός οργανισμού *Bemisia tabaci* Gennadius

(Τελευταία πρόσβαση: Σεπτέμβριος 2010)

http://www.dpi.qld.gov.au/26_13528.htm

Primary industries and fisheries plants

The state of Queensland department of Employment, Economic Development and Innovation 1995-2011 Queensland Government

(Τελευταία πρόσβαση: Σεπτέμβριος 2010)

<http://www.google.gr/images?hl=el&biw=1280&bih=685&q=bemisia%20tabaci&um=1&ie=UTF-8&source=og&sa=N&tab=wi>

(Τελευταία πρόσβαση: Αύγουστος 2010)

<http://www.ari.gov.cy/research/VasilisPDF.pdf>

Ανθεκτικότητα του αλεύρωδη Bemisia tabaci -1 Διερεύνηση της ανθεκτικότητας του αλευρώδη Bemisia tabaci (Gennadius) (Hemiptera: Aleurodidae) στις διάφορες ομάδες εντομοκτόνων

Agriculture and Food, Government of Western Australia,, 2008. •

Καλλιεργούμενα και καλλωπιστικά είδη. • Σολανώδη, σταυρανθή, κολοκυνθοειδή, ψυχανθή.

(Τελευταία πρόσβαση: Σεπτέμβριος 2010)