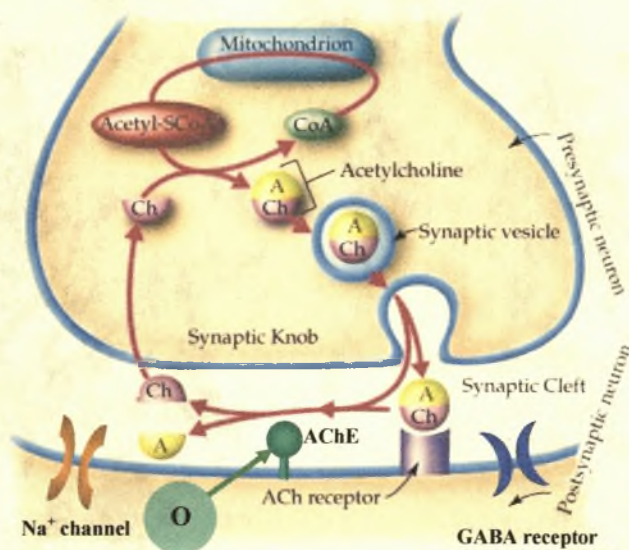




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΟΔΙΑ ΒΑΡΒΑΡΑ

ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΑΚΟ ΤΟΠΟ
ΤΗΣ ΑΚΕΤΥΛΟΧΟΛΙΝΕΣΤΕΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΔΑΚΟΥ ΤΗΣ
ΕΛΙΑΣ, ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΗΝ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ
ΣΤΑ ΟΡΓΑΝΟΦΩΣΦΟΡΙΚΑ ΕΝΤΟΜΟΚΤΟΝΑ



ΛΑΡΙΣΑ 2007



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

Αριθ. Εισ.: 5423/1
Ημερ. Εισ.: 21-07-2009
Δωρεά: Π.Θ.
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ
2007
ΠΟΔ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087209

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

- **ΜΑΤΘΙΟΠΟΥΛΟΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ**
Επίκουρος καθηγητής Μοριακής Βιολογίας του τμήματος Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

- **ΜΑΜΟΥΡΗΣ ΖΗΣΗΣ**
Αναπληρωτής καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών του τμήματος Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

- **ΑΥΓΟΥΣΤΙΝΟΣ ΑΝΤΩΝΗΣ**
Διδάσκων ΠΔ 407 του Τμήματος Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Η παρούσα πτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας του κυρίου Μαθιόπουλου Κωνσταντίνου στο τμήμα Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας στη Λάρισα.

Για αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω καταρχάς τον κ. Μαθιόπουλο Κωνσταντίνο, που με δέχτηκε στο εργαστήριό του και μου παραχώρησε στοιχεία και δείγματα του εργαστηρίου του. Τον ευχαριστώ επίσης για τις συμβουλές, την καθοδήγηση και τη βοήθειά του καθ' όλη τη διάρκεια της πραγματοποίησης της πτυχιακής μου εργασίας.

Ακόμα θα ήθελα να ευχαριστήσω την κυρία Κωστελίδου Καλλιόπη για τις πρακτικές συμβουλές της, όπως και τον κύριο Μαμούρη Ζήση για τη συμβολή του.

Επίσης, ευχαριστώ πολύ τον κύριο Αυγουστίνο Αντώνη για τη βοήθειά του στη συγγραφή της πτυχιακής μου, για τις γνώσεις που μου μετέδωσε σε σχέση με θέματα Πληθυσμιακής Γενετικής και για το ότι ήταν πάντοτε πρόθυμος να ακούσει τις απορίες μου και να με συμβουλέψει με υπομονή ώστε να μπορέσω να ολοκληρώσω την πτυχιακή μου.

Ευχαριστώ τους υποψήφιους διδάκτορες Ζυγουρίδη Νίκο, Κακάνη Ευδοξία και Τσουμάνη Κωνσταντίνα, όπως επίσης και το συμφοιτητή μου Ευσταθίου Γιώργο, για την βοήθειά τους στην ομαλή εισαγωγή μου στον εργαστηριακό χώρο και τις πρακτικές τους συμβουλές καθώς και όλους τους καθηγητές μου για τις γνώσεις που μου μετέδωσαν σε αυτά τα τέσσερα χρόνια φοίτησής μου στο τμήμα.

Τέλος, ένα ευχαριστώ αξίζουν φυσικά οι γονείς και η οικογένειά μου για την ηθική και οικονομική τους συμπαράσταση σε όλη τη διάρκεια της φοίτησής μου αλλά και κατά τη διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας, όπως επίσης και οι πολλοί και καλοί φίλοι που γνώρισα εδώ στη Λάρισα για τη βοήθεια που μου προσέφεραν όταν τους χρειαζόμουν.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη.....	6
I. Εισαγωγή.....	7
I.1. Ο δάκος της ελιάς (<i>Bactrocera oleae</i>).....	8
I.1.1. Περιγραφή του εντόμου.....	8
I.1.2. Βιολογία-Οικολογία.....	9
I.1.3. Κύκλος ζωής του δάκου.....	10
I.1.4. Οικονομική Σημασία.....	12
I.1.5. Τρόποι αντιμετώπισης.....	13
I.2. Τρόπος δράσης οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων.....	14
I.3.Ο ρόλος της ακετυλοχολινεστεράσης στο νευρικό σύστημα των εντόμων.....	16
I.4. Ανάπτυξη ανθεκτικότητας.....	18
I.4.1. Μηχανισμοί ανθεκτικότητας και εξάπλωσή της.....	18
I.5. Οι μεταλλάξεις που προσδίδουν ανθεκτικότητα στο δάκο.....	21
I.6. Πληθυσμιακή ανάλυση.....	23
1.6.1. Η ισορροπία Hardy-Weinberg.....	24
Σκοπός.....	26
II. Υλικά και μέθοδοι.....	27
II.1. Δείγματα που Εξετάστηκαν.....	28
II.2 Απομόνωση DNA.....	29
II.3. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	33
II.3.1. PCR ενίσχυση τμημάτων του γονιδίου της ακετυλοχολινεστεράσης.....	34
II.4. Πέψεις με ένζυμο περιορισμού.....	35

II.4.1. Πέψεις και μεταλλάξεις.....	36
II.5. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.....	37
II.5.1. Ηλεκτροφόρηση DNA δάκου.....	37
II.5.2. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR.....	37
II.5.3. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων πέψων.....	38
III. Αποτελέσματα.....	39
III.1. Έλεγχος Παρουσίας Μεταλλάξεων.....	40
III.2. Πληθυσμιακή Ανάλυση των Δειγμάτων.....	43
IV. Συμπεράσματα-Συζήτηση.....	48
V. Βιβλιογραφία.....	52
VI. Παράρτημα.....	56

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο δάκος της ελιάς, *Bactrocera oleae*, είναι ο σημαντικότερος εχθρός της ελιάς σήμερα, με πολύ μεγάλη εξάπλωση. Προκαλεί μεγάλες καταστροφές στον καρπό της ελιάς και υποβιβάζει την ποιότητά τόσο του καρπού όσο και του λαδιού. Κατά καιρούς έχουν χρησιμοποιηθεί διάφοροι τρόποι για την καταπολέμησή του όπως παγίδες, διάφορες βιολογικές μέθοδοι και χημικά εντομοκτόνα. Τα τελευταία (και κυρίως τα οργανοφωσφορικά) είχαν μέχρι κάποιο διάστημα μεγάλη επιτυχία στον έλεγχο της εξάπλωσης του δάκου. Η ανεξέλεγκτη χρήση τους όμως οδήγησε στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας από τα έντομα με συνέπεια την μεγαλύτερη και μη καταπολεμήσιμη, με τις υπάρχουσες μεθόδους, εξάπλωσή τους.

Σήμερα γίνεται μία προσπάθεια από διάφορα εργαστήρια στον κόσμο για την ανίχνευση του μεγέθους της ζημιάς που έχει προκύψει, της αιτίας της και την εύρεση νέων μεθόδων καταπολέμησης του δάκου, φιλικότερων προς το περιβάλλον και τον άνθρωπο, πιο εξειδικευμένων για τα συγκεκριμένα έντομα και με μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα. Στα πλαίσια αυτά έχουν βρεθεί διάφορες μεταλλάξεις στο γονίδιο της ακετυλοχολινεστεράσης του δάκου που έχουν συμβάλει στην ανθεκτικότητά του στα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα. Οι μεταλλάξεις αυτές είναι αρκετά συχνές στους πληθυσμούς του δάκου, ενώ ερευνώνται και άλλες μεταλλάξεις, στο ίδιο αλλά και σε άλλα γονίδια που κωδικοποιούν ένζυμα που σχετίζονται με το μεταβολισμό των οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων και είναι πιθανόν να έχουν συμβάλει στην ανθεκτικότητα σε αυτά.

Στην παρούσα πτυχιακή αναλύθηκαν 578 άτομα δάκου από Ελλάδα και Κύπρο ως προς τις μεταλλάξεις Gly488Ser και Ile214Val στο γονιδιακό τόπο της ακετυλοχολινεστεράσης οι οποίες σχετίζονται με την ανθεκτικότητα. Η ανάλυση έγινε σύμφωνα με το διαγνωστικό τεστ των Hawkes *et al.*, 2005. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης αυτής μας έδειξαν μία ευρεία εξάπλωση των συγκεκριμένων μεταλλάξεων σε Ελλάδα και Κύπρο ενώ διαπιστώνεται επίσης η ύπαρξη και άλλων παραγόντων που εμπλέκονται στην υπόθεση της ανθεκτικότητας.

I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

I.1. Ο ΔΑΚΟΣ ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ (*Bactrocera oleae*)

Ο δάκος της ελιάς, *Bactrocera oleae*, είναι το κυριότερο παράσιτο του καρπού της ελιάς. Προσβάλλει το μεσοκάρπιο της ελιάς και της αγριελιάς βοηθώντας έτσι τις δευτερογενείς προσβολές τους από μύκητες. Η καταστροφή που προκαλεί είναι μεγάλης οικονομικής σημασίας αφού υποβιβάζει την αξία της επιτραπέζιας ελιάς αλλά και του ελαιολάδου αυξάνοντας την οξύτητά του.

Αναλυτικά, η συστηματική του ταξινόμηση είναι η εξής:

Βασίλειο: Animal
 Φύλο: Arthropoda
 Υπόφυλο: Hexapoda
 Κλάση: Insecta
 Τάξη: Diptera
 Οικογένεια: Tephritidae
 Υποοικογένεια: Dacinae
 Φυλή: Dacini
 Γένος: *Bactrocera*
 Είδος: *Oleae*

Η οικογένεια των Tephritidae περιλαμβάνει έντομα μεγάλης οικονομικής σημασίας καθώς αποτελούν παράσιτα σημαντικών γεωργικών καλλιεργειών. Το γένος *Bactrocera* περιλαμβάνει 28 υπογένη και περίπου 500 διαφορετικά είδη (Drew, 1989; Drew and Hancock, 1994; Drew and Hancock, 2000). Μερικά από αυτά, που προσβάλλουν ποικιλίες φρούτων είναι τα είδη: *Bactrocera tryoni*, *B. Dorsalis* και *B. Cucurbitae* (White and Elson-Harris, 1992).

I.1.1. Περιγραφή του εντόμου

Το ενήλικο έντομο έχει μήκος περίπου 5mm και γενικό χρωματισμό ανοιχτό καστανό ως σκοτεινό καστανό. Το κεφάλι είναι κοκκινο-κίτρινο, ωχρο

στην όψη και κοσμημένο με δύο μαύρα σημάδια πάνω από την κεραία. Ο θώρακας είναι επίσης κοκκινο-κίτρινος, με ένα μαύρο ραχιαίο τμήμα που περιλαμβάνει τέσσερις γκρίζες ταινίες. Η ηβική χώρα είναι κίτρινη. Το ραχιαίο τμήμα και η φολίδα του εντόμου είναι ωχρό κίτρινο. Τα πόδια είναι κοκκινοκίτρινα. Τα πτερύγια είναι διαφανή, με εμφανή νεύρωση και ένα σκούρο στίγμα στην άκρη. Η κοιλιά είναι ανοιχτόχρωμη με ένα μέχρι τέσσερα ευθύγραμμα πλευρικά διακοσμημένα μαύρα σημάδια ποικίλου μεγέθους (Εικόνα 1). Στο θηλυκό έντομο ο ωοθέτης είναι ευδιάκριτος (Εικόνα 2) (Katsoyannos, 1992).



Εικόνα 1. Αρσενικός δάκος



Εικόνα 2. Θηλυκός δάκος. Εμφανής ο ωοθέτης (μέσα στον κόκκινο κύκλο)

Το αυγό είναι υπόλευκο και επίμηκες με μία φυματιοειδή μικρή οπή στο πίσω μέρος. Έχει μήκος 0.7 mm, ενώ η διάμετρος του είναι 0.2 mm.

Η προνύμφη, προς το τέλος της ανάπτυξής της, έχει μήκος 7 mm. Είναι υπόλευκη όταν ζει σε πράσινες ελιές, ενώ όταν ζει σε μαύρες ελιές έχει μία όψη θαμπή-κόκκινη. Το κεφάλι της έχει σχήμα τραπεζοειδές και στο μπροστινό άκρο της φέρει δύο μικροσκοπικές τριμερείς κεραίες (Εικόνα 3).

Το βομβύκιο είναι ωοειδές, με το σχήμα από τα μέρη της προνύμφης που προϋπήρχε να φαίνονται ακόμα. Το χρώμα του ποικίλει από ωχρό κίτρινο έως καφέ και είναι περίπου 4 με 4.5 mm στο μήκος (Εικόνα 3) (Katsoyannos, 1992).

1.1.2. Βιολογία-Οικολογία

Οι ελιές είναι τα μόνα φυτά-ξενιστές που χρησιμοποιούνται για την εκκόλαψη των αυγών του δάκου και αποτελούν ιδανική τροφή για την αύξηση

και ανάπτυξη της προνύμφης. Οι ποικιλίες ελιάς που παράγουν καρπούς μεγάλου μεγέθους προτιμούνται για την εναπόθεση των αυγών από τα θηλυκά, εντούτοις, και μικρότερες καλλιεργούμενες ελιές είναι ευάλωτες. Ενήλικοι δάκοι έχουν παγιδευτεί και σε άλλα φυτά ή σοδειές οπωροφόρων όπου ψάχνουν για τροφή ή καταφύγιο (Vossen *et al.*, 2004).

Οι μύγες της ελιάς επιβιώνουν καλύτερα στα ψυχρά παραλιακά κλίματα, αλλά βρίσκονται επίσης στις ζεστές και ξηρές περιοχές της Ελλάδας, της Ιταλίας, της Ισπανίας, του Μεξικού και της Καλιφόρνιας. (Vossen *et al.*, 2004).

Όπως όλοι οι ζωντανοί οργανισμοί στη φύση έχουν εχθρούς το ίδιο συμβαίνει και με το δάκο. Μεταξύ των φυσικών εχθρών που επιτίθενται στο δάκο στη Μεσόγειο είναι παρασιτικές προνύμφες υμενοπτέρων, περιλαμβανομένου των: *Eupelmus urozonus* Dalm., *Eupelmus martellii* Masi (Eupelmidae), *Pnigalio mediterraneus* Ferr. and Del. (Eulophidae), *Eurytoma martellii* Dom. (Eurytomidae), *Cyrtoptyx latipes* Rond (Pteromalidae) και, συγκεκριμένα, *Opius concolor* Szepi. (Braconidae). Άλλοι φυσικοί εχθροί περιλαμβάνουν τον καταστροφέα του αυγού *Prolasioptera berlesiana* Paoli (Cecidomyiidae), όπως επίσης και μη εξειδικευμένα καταστροφικά έντομα (μυρμηγκία, Carabidae, Staphylinidae) και άλλα ζώα όπως πουλιά, Dermaptera, Scolopendridae, Lithobiidae, τα οποία επιτίθενται κυρίως στο βομβύκιο στο έδαφος (Katsoyannos, 1992).

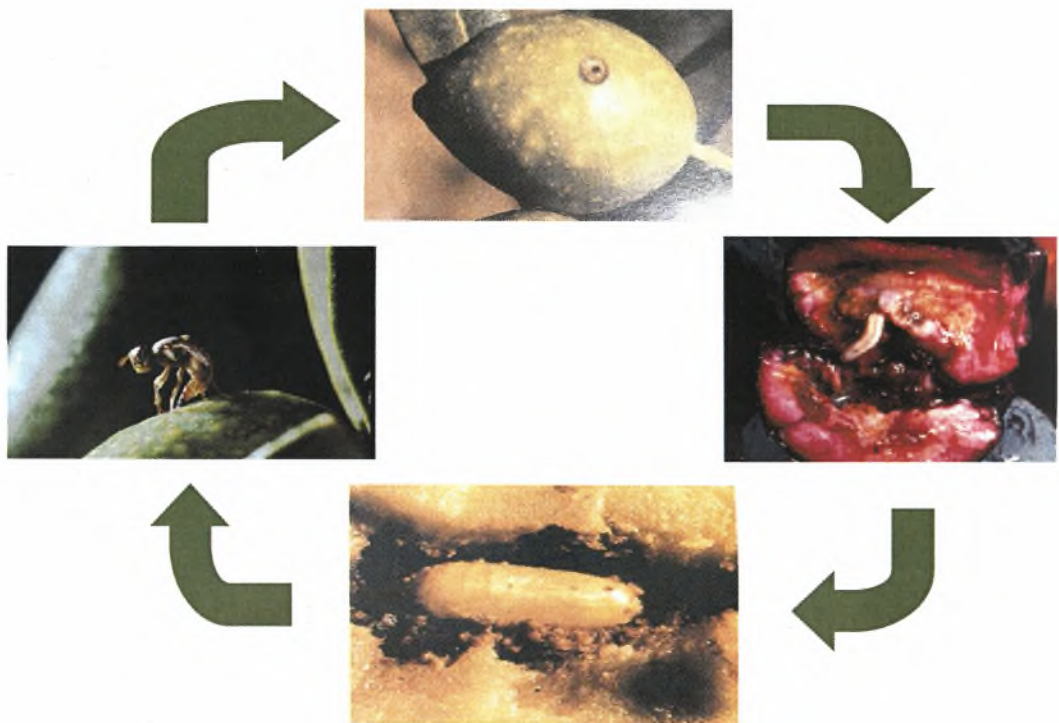
1.1.3. Κύκλος ζωής του δάκου

Ο δάκος έχει 3-4 γενεές το έτος, ανάλογα με τις τοπικές περιβαλλοντικές συνθήκες. Οι ενήλικοι πληθυσμοί μειώνονται σε χαμηλά επίπεδα από το Φεβρουάριο ή Μάρτιο, ενώ καινούρια ενήλικα έντομα από τα βομβύκια που έχουν διαχειμάσει ξεκινούν να εμφανίζονται το Μάρτιο και Απρίλιο. Όταν ο καρπός πλησιάζει στο τελικό του μέγεθος και γίνει μαλακός τότε το θηλυκό ανοίγει με τον ωσθέτη του την σπή ωτοκίας και εισάγει στο μεσοκάρπιο το αυγό. Κατά κανόνα εισάγουν ένα αυγό ανά καρπό, σε περιπτώσεις όμως πολύ πυκνού πληθυσμού ή λίγων καρπών παρατηρούνται και περισσότερες από μία ωσθεσίες ανά καρπό. Οι προνύμφες τρώνε το

μεσοκάρπιο της ελιάς και δημιουργούν το κουκούλι τους κάτω από το φλοιό του καρπού (Vossen *et al.*, 2004).

Η πρώτη γενιά ενηλίκων εμφανίζεται την άνοιξη. Μέσα στους καρπούς μιας χρονιάς μπορούν να αποικίσουν διάφορες γενιές δάκου και σε ορισμένες περιπτώσεις συνεχίζεται η εμφάνιση των ενηλίκων καθ' όλη τη διάρκεια του χρόνου. Μεγάλοι πληθυσμοί μπορούν να αναπτυχθούν πολύ γρήγορα όταν η ιδανική θερμοκρασία ευνοεί την γρήγορη ανάπτυξη τους. Στις περισσότερες περιπτώσεις, η μεγαλύτερη καταστροφή συμβαίνει όταν ο καρπός ξεκινάει να μαλακώνει και αλλάζει χρώμα (Σεπτέμβριο με Νοέμβριο) (Vossen *et al.*, 2004).

Η δεύτερη γενιά εμφανίζεται στην μέση του καλοκαιριού. Τα ενήλικα έντομα μπορούν να ζήσουν από δύο μέχρι έξι μήνες ανάλογα με τη θερμοκρασία και τη διαθεσιμότητα της τροφής. Ένα θηλυκό μπορεί να αποθέσει πενήντα μέχρι τετρακόσα αυγά κατά τη διάρκεια της ζωής του.



Εικόνα 3. Ο κύκλος ζωής του δάκου (αριστερά: αναπόθεση αυγών από θηλυκό ενήλικο δάκο, πάνω: οπή ωοτοκίας στον καρπό της ελιάς, δεξιά: προνύμφη και κάτω: βομβύκιο).

Επιπρόσθετες γενιές δάκου παράγονται κατά τη διάρκεια του τέλους του καλοκαιριού και τους φθινοπωρινούς μήνες μέχρι τον Δεκέμβρη ανάλογα με τη διαθεσιμότητα του καρπού. Οι περισσότερες προνύμφες από την

τελευταία γενιά εγκαταλείπουν τον καρπό για να σχηματίσουν κουκούλι στο έδαφος για αρκετούς μήνες. Οι ενήλικες μύγες μπορούν επίσης να διαχειμάσουν σε προστατευμένες περιοχές, ιδιαίτερα σε μέρη με ήπιες χειμερινές θερμοκρασίες. Οι ελαιόκαρποι που μένουν στα δέντρα μετά τη συγκομιδή μπορούν να παράγουν υψηλούς πληθυσμούς μυγών από τις αρχές του Φθινοπώρου μέχρι νωρίς την άνοιξη (Vossen *et al.*, 2004).

1.1.4. Οικονομική Σημασία

Η οικονομική σημασία του δάκου σχετίζεται άμεσα με την καταστροφή που προκαλεί στον καρπό της ελιάς. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, τα ενήλικα θηλυκά έντομα μπορούν να εναποθέσουν 50-400 αυγά, συνήθως ένα σε κάθε καρπό. Αυτά εκκολάπτονται σε μικροσκοπικές προνύμφες που είναι πολύ δύσκολο να τις εντοπίσει κανείς μέχρι να τραφούν για λίγο και να γίνουν μεγαλύτερες. Ενώσω τρέφονται, «σκάβουν» το μεσοκάρπιο, καταστρέφοντας τη σάρκα και επιτρέποντας την είσοδο και το δευτερογενή παρασιτισμό από βακτήρια και μύκητες που αποσυνθέτουν τον καρπό και αυξάνουν σημαντικά το επίπεδο των ελεύθερων λιπαρών οξέων (οξύτητα) του λαδιού. Οι τρύπες για την εναπόθεση των αυγών που προκαλούνται όταν το θηλυκό αποθέτει τα αυγά μέσα στον καρπό μειώνουν την αξία του επιτραπέζιου καρπού (Vossen *et al.*, 2004). Υπολογίζεται ότι η μείωση στην παραγωγή του λαδιού, συνέπεια του δάκου, μπορεί να φθάσει μέχρι και το 30% της ετήσιας παραγωγής (Katsoyannos, 1992).

Σύμφωνα με το Διεθνές Συμβούλιο Ελαιολάδου (International Olive Oil Council, IOOC), σε ολόκληρο τον κόσμο, καλλιεργούνται 805-810 εκατομμύρια ελαιοδέντρων, σε μια έκταση 9700000 εκταρίων. Περίπου το 98% της καλλιέργειας ελαιοδέντρων τοποθετείται στην περιοχή της Μεσογείου, ενώ περισσότερα από τα μισά αναπτύσσονται στην Ελλάδα (14,7%), την Ιταλία (22,6%) και στην Ισπανία (23,5%). Το υπόλοιπο 32,7% βρίσκεται στις αναπτυσσόμενες Μεσογειακές χώρες (Katsoyannos, 1992).

Ο δάκος εμφανίζεται σε όλες τις Μεσογειακές χώρες που καλλιεργούνται ελαιόδεντρα. Ανατολικά, εκτείνεται μέχρι την Ινδία και δυτικά μέχρι τα Κανάρια Νησιά, ενώ τελευταία εμφανίστηκε και στην Καλιφόρνια και

σε άλλες περιοχές της Αμερικανικής ηπείρου όπου καλλιεργούνται ελιές (Katsoyannos, 1992).



Εικόνα 4. Περιοχές καλλιέργειας της ελιάς.

1.1.5. Τρόποι αντιμετώπισης

Για την αντιμετώπιση του δάκου της ελιάς, σήμερα, χρησιμοποιούνται κυρίως χημικά εντομοκτόνα αλλά για τον έλεγχο των πληθυσμών του έχουν χρησιμοποιηθεί κατά καιρούς και διάφορες παγίδες αλλά και κάποιες βιολογικές μέθοδοι.

Η στρατηγική της μεθόδου των παγίδων βασίζεται στην έλξη του εντόμου από κάποιο θέλγητρο -που μπορεί να είναι μία φερομόνη, υγρή αμμωνία ή κάποιο άλλο υγρό διάλυμα- στην παγίδευση και τελικά στην θανάτωσή του. Οι πιο γνωστές από αυτές τις παγίδες είναι οι παγίδες *McPhail* (Εικόνα 5). Είναι φτιαγμένες είτε από γυαλί είτε από πλαστικό με μία μικρή δεξαμενή για υγρό δόλωμα που περιέχει 4% διάλυμα αμμωνιακών αλάτων (διττανθρακικό ή φωσφορικό αμμώνιο) ως θέλγητρο. Οι μύγες μπαίνουν στη παγίδα και πνίγονται στο διάλυμα. Άλλες παγίδες που είναι γνωστές είναι οι λεγόμενες *Yellow sticky traps* (Κίτρινες κολλώδης παγίδες) (Εικόνα 6) οι οποίες περιέχουν και φερομόνη αλλά και αμμωνία και στοχεύουν στην παγίδευση των ενήλικων δάκων πάνω στην κολλώδη επιφάνειά τους από την οποία δεν μπορούν να απομακρυνθούν κι έτσι



Εικόνα 5. Πλαστική παγίδα McPhail.



Εικόνα 6. Yellow sticky trap.



Εικόνα 7. Lure and kill trap.

πεθαίνουν (Vossen et al, 2004), και οι *Lure and kill traps* (παγίδες έλξης και θανάτου) (Εικόνα 7). Οι παγίδες αυτές διαθέτουν ένα πλαίσιο από χαρτόνι εμποτισμένο με εντομοκτόνο, ενώ περιέχουν επίσης αμμωνία και φερομόνη που έλκουν το έντομο.

Στις βιολογικές μεθόδους περιλαμβάνεται το πρόγραμμα απελευθέρωσης μεγάλου αριθμού στείρων αρσενικών εντόμων (SIT, Sterile Insect Technique) με σκοπό την «άκαρπη γονιμοποίηση» των θηλυκών και την μείωση, μέχρι και εξαφάνιση, των πληθυσμών του δάκου. Το πρόγραμμα αυτό έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για τον έλεγχο των πληθυσμών της Μεσογειακής μύγας αλλά δεν έχει φέρει ακόμα θετικά αποτελέσματα στην προσπάθεια καταπολέμησης του δάκου. Αυτό συμβαίνει γιατί η στείρωση με ακτινοβολία γ κάνει τα «μεταλλαγμένα» αρσενικά ανίκανα να υπερισχύσουν έναντι αυτών του αγρίου τύπου που είναι ήδη εγκατεστημένα στον αγρό. Παρόλα αυτά εξακολουθεί να δέχεται βελτιώσεις κι έτσι αποτελεί μια ελπιδοφόρα τεχνική για την καταπολέμηση διαφόρων ειδών εντόμων στο μέλλον, μεταξύ των οποίων είναι και ο δάκος.

Μία άλλη βιολογική μέθοδος εξόντωσης του δάκου είναι η εγκαθίδρυση στην περιοχή φυσικών εχθρών του εντόμου με σκοπό τον έλεγχο των πληθυσμών του.

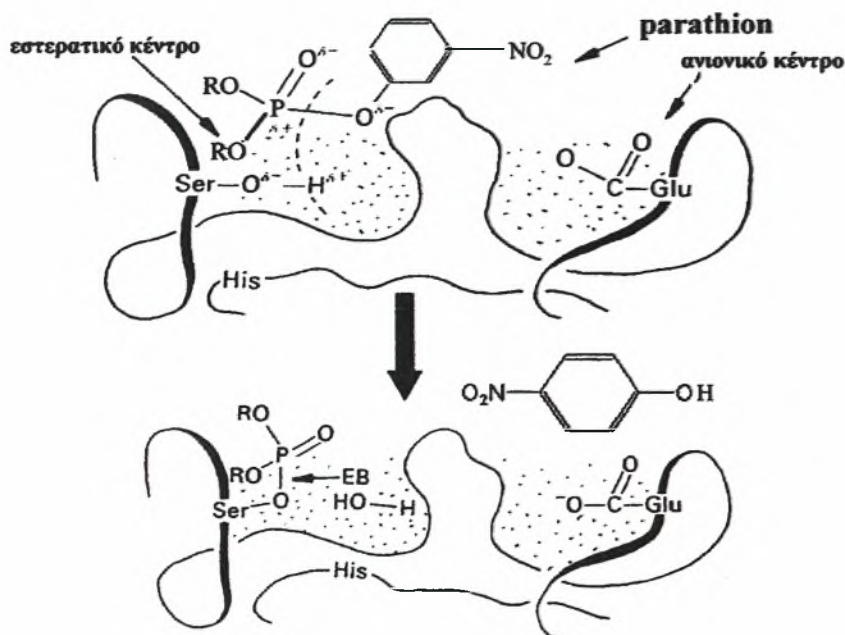
Η μόνη μέθοδος, όμως, που μέχρι και σήμερα έχει τη μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα στην καταπολέμηση του δάκου της ελιάς είναι τα χημικά εντομοκτόνα. Τα πιο διαδεδομένα χημικά εντομοκτόνα στην Ελλάδα είναι τα οργανοφωσφορικά. Ακολουθεί το spinosad της κατηγορίας των νατουραλτών, ενώ παράλληλα γίνονται πειράματα αξιολόγησης άλλων εντομοκτόνων ουσιών όπως είναι οι συνθετικές πυρεθρίνες (b-cyfluthrine, z-cypermethrine, b-cypermethrine, deltamethrine) για την μελλοντική αντικατάσταση των οργανοφωσφορικών που χρησιμοποιούνται τις τελευταίες δεκαετίες.

1.2. ΤΡΟΠΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΟΡΓΑΝΟΦΩΣΦΟΡΙΚΩΝ ΕΝΤΟΜΟΚΤΟΝΩΝ

Η χρήση οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων έχει επικρατήσει στις μέρες μας ως η πιο επιτυχής μέθοδος καταπολέμησης του δάκου, με

αποτέλεσμα εδώ και είκοσι χρόνια να χρησιμοποιείται σχεδόν κατά αποκλειστικότητα από τους περισσότερους καλλιεργητές της ελιάς. Στην αγορά κυκλοφορούν διάφορα οργανοφωσφορικά σκευάσματα δραστικών ουσιών dimethoate, fenthion και parathion.

Τα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα δρουν στις νευρικές συνάψεις των εντόμων παρακωλύοντας την νευρική διαβίβαση. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω αναστολής της δραστηριότητας της ακετυλοχολινεστεράσης, ενός ενζύμου που κατέχει έναν ρόλο κλειδί στη σωστή λειτουργία της νευρικής σύναψης. Πιο συγκεκριμένα, η παρουσία του οργανοφωσφορικού εντομοκτόνου στη νευρική σύναψη έχει ως αποτέλεσμα την φωσφορυλίωση της ακετυλοχολινεστεράσης σε ένα κατάλοιπο σερίνης του ενεργού της κέντρου (Εικόνα 8) (Corbett, 1974). Έτσι, το ένζυμο δεν μπορεί να δράσει και παρατηρείται παρατεταμένη νευρική διέγερση με αποτέλεσμα το θάνατο του εντόμου.



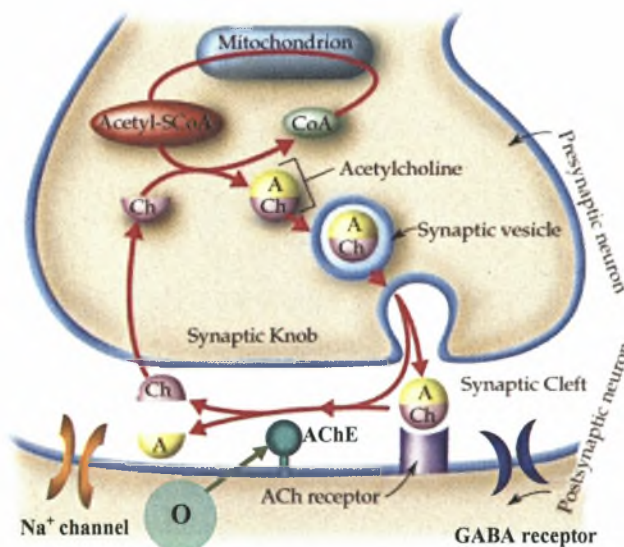
Εικόνα 8. Η ακετυλοχολινεστεράση και η δράση του οργανοφωσφορικού εντομοκτόνου.

Για να καταλάβουμε, όμως, καλύτερα τον τρόπο δράσης των οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων θα μας βοηθήσει η εξέταση του ρόλου της ακετυλοχολινεστεράσης στο νευρικό σύστημα των εντόμων.

1.3. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΑΚΕΤΥΛΟΧΟΛΙΝΕΣΤΕΡΑΣΗΣ ΣΤΟ ΝΕΥΡΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΤΩΝ ΕΝΤΟΜΩΝ

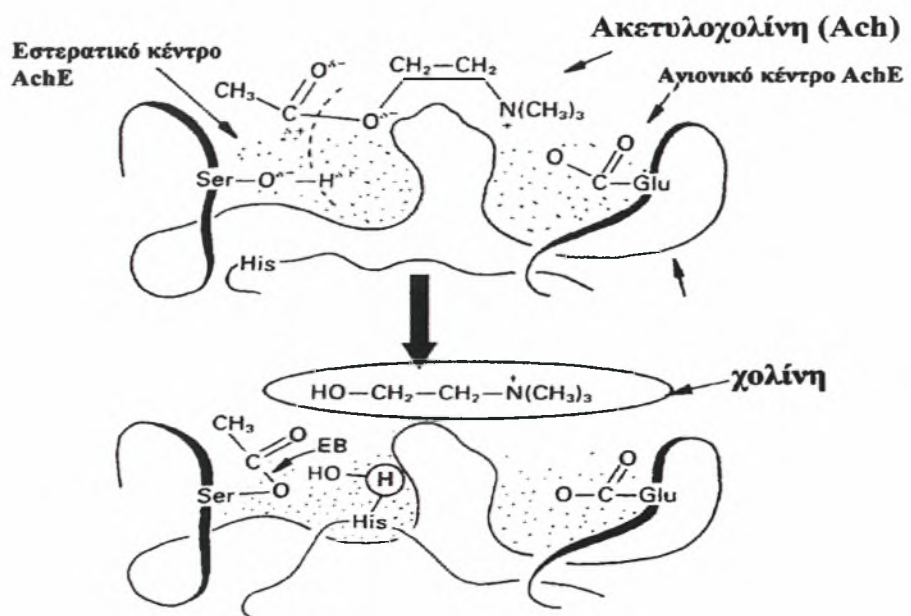
Η ακετυλοχολινεστεράση είναι ένα ένζυμο που διαδραματίζει έναν πολύ σημαντικό ρόλο στη νευρική σύναψη. Ο ρόλος της αυτός έχει να κάνει με την υδρόλυση της ακετυλοχολίνης, ενός νευροδιαβιβαστή που εκκρίνεται στη νευρική σύναψη από τον προσυναπτικό νευρώνα και ενεργοποιεί το μετασυναπτικό.

Η φυσιολογική σύνθεση της ακετυλοχολίνης επιτυγχάνεται με εστεροποίηση του ακέτυλο-CoA και της χολίνης από το ένζυμο ακετυλοτρανσφεράση της χολίνης. Μετά τη σύνθεση, η ακετυλοχολίνη αποθηκεύεται στα κυστίδια στις απολήξεις των χολινεργικών νευρώνων (προσυναπτικοί νευρώνες). Εκπόλωση της μεμβράνης του προσυναπτικού νευρικού κυττάρου οδηγεί σε έκκριση της ακετυλοχολίνης από τα κυστίδια αποθήκευσης στην συναπτική σχισμή. Αφού εκκριθεί, η ακετυλοχολίνη συνδέεται με τον υποδοχέα της στη μετασυναπτική μεμβράνη, οδηγώντας στην ενεργοποίηση του μετασυναπτικού νευρώνα (Εικόνα 9). Στη συνέχεια υδρολύεται από το ένζυμο ακετυλοχολινεστεράση που είναι συνδεδεμένο στη μεμβράνη του μετασυναπτικού κυττάρου. Αναστολή της δραστηριότητας της ακετυλοχολινεστεράσης οδηγεί σε παρατεταμένη χολινεργική διέγερση.



Εικόνα 9. Νευρική σύναψη. Σχηματισμός ακετυλοχολίνης, απελευθέρωσή της στη συναπτική σχισμή, δράση και μεταβολισμός της. Θέση δράσης των οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων. (CoA: συνένζυμο A, Ch: χολίνη, AchE: ακετυλοχολινεστεράση, O: οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα).

Από τη στιγμή που η ακετυλοχολίνη θα εισέλθει στο ενεργό κέντρο της ακετυλοχολινεστεράσης, που είναι μία κοιλότητα βάθους 20 Å με μία ενεργή σερίνη στον πυθμένα (Εικόνα 11), υδρολύεται. Από την υδρόλυση αυτή η χολίνη που παράγεται ελευθερώνεται στη συναπτική σχισμή και επαναπροσλαμβάνεται από τον προσυναπτικό νευρώνα. Αντίθετα η ακετυλομάδα παραμένει συνδεδεμένη με το κατάλοιπο σερίνη του ενεργού κέντρου (Εικόνα 11). Πραγματοποιείται, έτσι, μία ακετυλίωση του ενζύμου η οποία όμως είναι αντιστρεπτή. Σύντομα, η ακετυλομάδα απομακρύνεται από το ένζυμο το οποίο μπορεί πλέον να υδρολύσει άλλα μόρια ακετυλοχολίνης.



Εικόνα 10. Υδρόλυση ακετυλοχολίνης.

Τα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα είναι ανάλογα υποστρώματος της ακετυλοχολίνης. Όπως το φυσικό υπόστρωμα, έτσι και αυτά εισέρχονται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Όπως συμβαίνει και με την ακετυλοχολίνη, το εντομοκτόνο υδρολύεται και το ένζυμο φωσφορυλιώνεται. Η διαφορά στη συμπεριφορά του υποστρώματος βρίσκεται στο επόμενο βήμα: όταν το ακυλο-ένζυμο υδρολύεται γρήγορα για να ξαναδημιουργηθεί το ελεύθερο ένζυμο. Η αντίστοιχη αποφωσφορυλίωση (Εικόνα 10) είναι μία πολύ αργή διαδικασία σε σημείο που να θεωρείται μη αντιστρεπτή. Ωστόσο, ως φωσφορυλιωμένο το ένζυμο δεν μπορεί να υδρολύσει το νευροδιαβιβαστή και

έτσι παρατείνει την παραμονή και τη δράση του, στη συναπτική σχισμή (Boublik *et al.*, 2002).

I.4. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ

Η χρήση χημικών εντομοκτόνων, όπως ήδη αναφέρθηκε, είχε καλά αποτελέσματα στην καταπολέμηση του δάκου και έτσι για αρκετά χρόνια χρησιμοποιούνταν με μεγάλο ενθουσιασμό από τους παραγωγούς. Σε ορισμένες περιπτώσεις μάλιστα ενώ γίνονταν ελεγχόμενοι ψεκασμοί από δημόσιους και δημοτικούς φορείς οι παραγωγοί πραγματοποιούσαν επιπλέον ψεκασμούς με δική τους πρωτοβουλία (ένα φαινόμενο που παρατηρείται ακόμα και σήμερα, δηλαδή ο υπερβολικός ψεκασμός). Έτσι, λοιπόν, με τον καιρό, εμφανίστηκαν κάποια άτομα δάκου, που παρά τους ψεκασμούς με εντομοκτόνα, παρέμεναν ζωντανά. Τα ανθεκτικά αυτά άτομα είχαν, όπως φαίνεται, ένα πλεονέκτημα επιβίωσης έναντι των δάκων αγρίου τύπου. Το γεγονός αυτό έδωσε στους ανθεκτικούς δάκους τη δυνατότητα να επικρατήσουν στις καλλιέργειες στις οποίες οι ψεκασμοί ήταν συχνοί συμβάλλοντας, έτσι, στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας.

Ποιοί μηχανισμοί κρύβονται όμως πίσω από την ανθεκτικότητα; Ποιά ένζυμα συμμετέχουν και πώς; Η εμφάνιση ανθεκτικότητας στο δάκο ήταν ένα μεμονωμένο περιστατικό ή έχει παρατηρηθεί και σε άλλα έντομα;

I.4.1. Μηχανισμοί ανθεκτικότητας και εξάπλωσή της

Οι μηχανισμοί της ανθεκτικότητας είναι ως επί το πλείστον δύο. Ο ένας περιλαμβάνει την ακετυλοχολινεστεράση και ο άλλος το μεταβολικό μηχανισμό αποτοξίνωσης του εντόμου.

Οι μηχανισμός που περιλαμβάνει την ακετυλοχολινεστεράση έχει να κάνει με σημειακές μεταλλάξεις στο γονίδιο της. Οι μεταλλάξεις αυτές παρατηρούνται σε περιοχές του ενζύμου που σχετίζονται με την πρόσδεση και την δράση των εντομοκτόνων. Οι σημειακές μεταλλάξεις που προσδιορίζονται συνήθως ως υπεύθυνες για την ανθεκτικότητα στα

εντομοκτόνα συνοδεύονται συχνά με τροποποίηση των κινητικών παραμέτρων της υδρόλυσης της ακετυλοχολίνης (Mutero *et al.*, 1994; Zhu *et al.*, 1996; Devonshire *et al.*, 1998; Walsh *et al.*, 2001; Kozaki *et al.*, 2001) Περιλαμβάνουν, κυρίως, αντικαταστάσεις τοποθετημένες σε σημεία κλειδιά που βρίσκονται μέσα στην κοιλότητα του ενεργού κέντρου του ενζύμου. Τα αμινοξέα που προκύπτουν από τις αντικαταστάσεις αυτές (που είναι συνήθως μεγαλύτερου μοριακού βάρους από τα αμινοξέα αγρίου τύπου) έχουν μια στερεοχημική επίδραση ή αλλάζουν τον προσανατολισμό των καταλοίπων του ενεργού κέντρου. Η μόνη τεκμηριωμένη εξαίρεση σε αυτό είναι στο σκαθάρι της πατάτας του Κολοράντο *Leptino-tarsa decemlineata*, όπου μια αντικατάσταση ενός αμινοξέος σε ένα άλλο μικρότερου μοριακού βάρους, μακριά από την καταλυτική περιοχή του ενζύμου, έχει συνδεθεί με την απευαισθητοποίηση του στα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα (Zhu *et al.*, 1996). Γενικά, τα επίπεδα ανθεκτικότητας στα οργανοφωσφορικά που παρέχονται από κάθε μεμονωμένη αντικατάσταση είναι χαμηλά, αλλά σε συνδυασμό παράγουν όλο και περισσότερο ανθεκτικά ένζυμα (Mutero *et al.*, 1994; Walsh *et al.*, 2001). Πολλές πιθανές σημειακές μεταλλάξεις που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα μπορούν να οδηγήσουν σε απευαισθητοποίηση της AChE, χωρίς να μειώσουν σημαντικά την καταλυτική αποδοτικότητα της, όπως επιβεβαιώνεται από μελέτες κατευθυνόμενων σημειακών μεταλλάξεων (Vaughan *et al.*, 1997; Villatte *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2001). Εντούτοις, ενώ αυτές οι μελέτες δείχνουν ότι τα έντομα μπορούν να αποκτήσουν την ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα μέσω σημειακών μεταλλάξεων στην AChE, μέχρι σήμερα τέτοιες αλλαγές έχουν αναφερθεί μόνο στην *Drosophila melanogaster* (Mutero *et al.*, 1994), *Musca domestica* (Devonshire *et al.*, 1998; Walsh *et al.*, 2001; Kozaki *et al.*, 2001), *L. decemlineata* (Zhu *et al.*, 1996) και *B. oleae* (Vontas *et al.*, 2002). Η απομόνωση και σύγκριση των ακολουθιών της AChE από άλλα είδη όπως *Nephotettix cincticeps* και *Boophilus microplus*, καταδεικνύει έναν φαινότυπο ανθεκτικής AChE που δεν προκύπτει από αντικαταστάσεις αμινοξέων στην πρωτεΐνη της AChE, αλλά εμφανίζεται ως αποτέλεσμα άλλων μηχανισμών μεταξύ των οποίων είναι το εναλλακτικό μάτισμα (Baxter & Barker, 1998; Tomita *et al.*, 2000).

Άλλοι μηχανισμοί ανθεκτικότητας περιλαμβάνουν το μεταβολικό σύστημα του εντόμου και ειδικότερα την ικανότητα του για αποτοξίνωση από τα εντομοκτόνα. Τρία ενζυμικά συστήματα, οι εστεράσες, η S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης και οι μονοοξυγενάσες, περιλαμβάνονται στην αποτοξίνωση των τεσσάρων σημαντικών κατηγοριών εντομοκτόνων (οργανοχλωριωμένα, οργανοφωσφορικά, καρβαμυδικά και πυρεθροειδή). Αυτά τα ένζυμα δρουν μεταβολίζοντας γρήγορα το εντομοκτόνο στα μη τοξικά προϊόντα του, ή με τη γρήγορα δέσμευση και τον πολύ αργό ρυθμό αποδέσμευσης (turning over) του εντομοκτόνου.

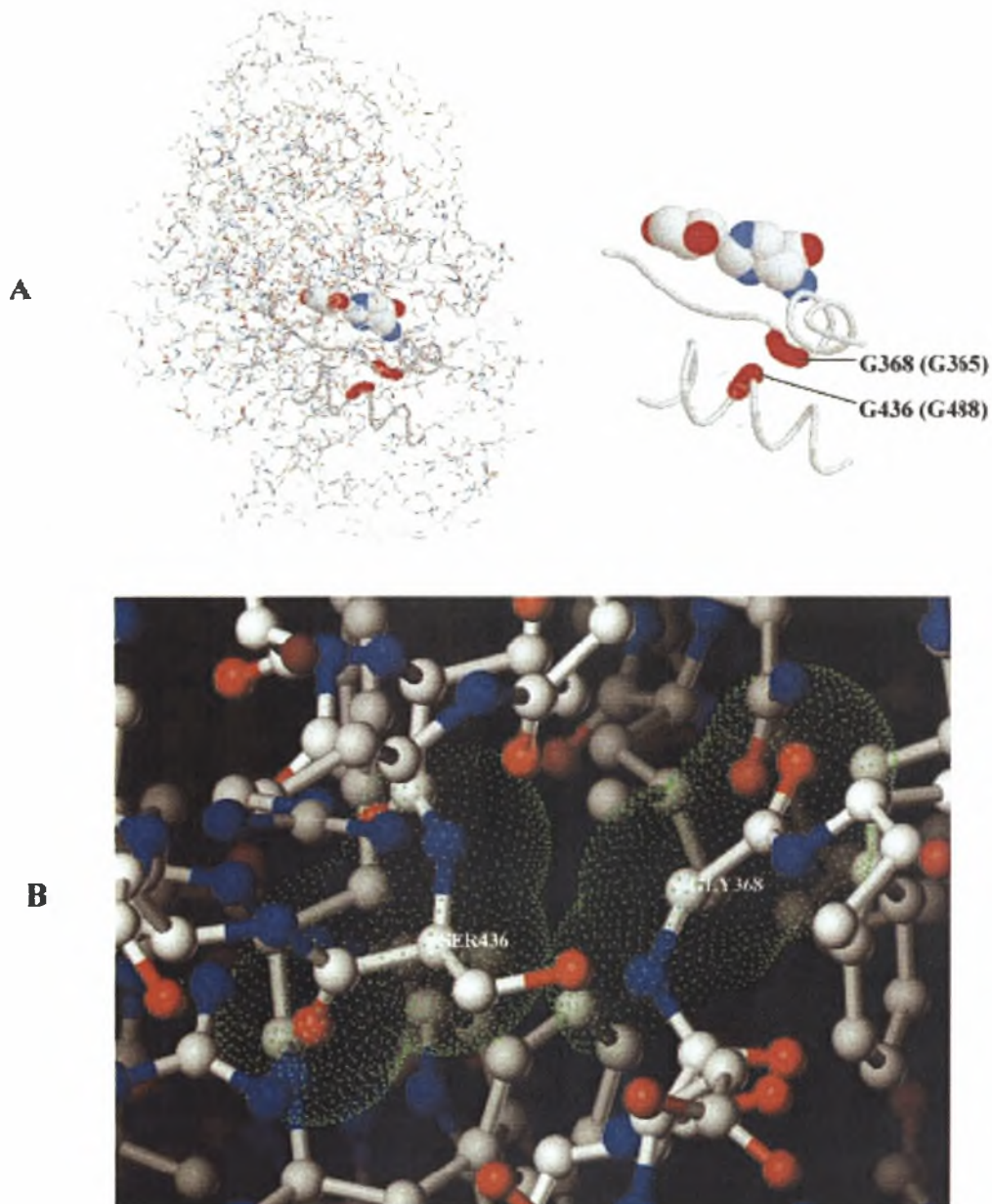
Οι μηχανισμοί ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα που σχετίζονται με τις εστεράσες και έχουν χαρακτηριστεί μέχρι σήμερα περιλαμβάνουν κυρίως αύξηση της δραστηριότητας των εστερασών διαμέσου ενίσχυσης γονιδίων επιτρέποντας την αύξηση των επιπέδων απομάκρυνσης του εντομοκτόνου, ή σημειακές μεταλλάξεις μέσα στα δομικά γονίδια των εστερασών τα οποία μεταβάλουν την εξειδίκευσή τους για τα υποστρώματα. Οι ενισχυμένες εστεράσες υπόκεινται σε διάφορους τύπους γονιδιακής ρύθμισης σε διάφορα είδη εντόμων. Στα κουνούπια του γένους *Culex*, ο πιο κοινός μηχανισμός ανθεκτικότητας στα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα προκαλείται από την συνεργιακή δράση δύο εστερασών. Οι ανθεκτικές εστεράσες ρυθμίζονται διαφορετικά από τις εστεράσες αγρίου τύπου. Όλες οι ανθεκτικές εστεράσες στα διαφορετικά είδη *Culex* δρουν μέσω δέσμευσης. Οι ρυθμοί με τους οποίους συνδέονται με τα εντομοκτόνα στα ανθεκτικά έντομα είναι γρηγορότεροι από ότι στα ευπαθή έντομα. Αντίθετα, η ανθεκτικότητα που σχετίζεται με την εστεράση στα άτομα που ανήκουν στο γένος *Anopheles* βασίζεται στις αλλαγές στην εξειδίκευση του υποστρώματος και σε αυξανόμενους ρυθμούς αποδέσμευσης ενός μικρού υπολείμματος των εντομοκτόνων (Hemingway *et al.*, 1998).

Ένα άλλο ενζυμικό σύστημα που συμβάλει στην αποτοξίνωση των εντόμων είναι η S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης. Στην περίπτωση αυτή ο μηχανισμός της ανθεκτικότητας περιλαμβάνει αύξηση της δραστηριότητας της S-τρανσφεράσης της γλουταθειόνης μέσω αυξορρύθμισης (up regulation) πολλαπλών ενζύμων που ανήκουν σε μία ή περισσότερες κατηγορίες S-τρανσφερασών της γλουταθειόνης ή σπανιότερα με αυξορρύθμιση ενός μοναδικού ενζύμου. Η ταυτόχρονη αυξορρύθμιση (up regulation) των S-

τρανσφερασών της γλουταθειόνης και των μονοοξυγενασών στα ανθεκτικά κουνούπια οφείλεται στη δράση ενός σημαντικού γονιδίου σε κάθε περίπτωση. Τα προϊόντα αυτών των σημαντικών γονιδίων ελέγχουν ένα ευρύ φάσμα ενζύμων αυξάνοντας τη μεταγραφή τους. Η ποικιλομορφία των S-τρανσφερασών της γλουταθειόνης που παράγεται από τα κουνούπια του γένους *Anopheles* αυξάνεται με το μάτισμα διαφορετικών 5' άκρων των γονιδίων, με ένα μοναδικό 3' άκρο, μέσα σε μια τάξη ενζύμων αυτής της οικογένειας (Hemingway *et al.*, 1998).

I.5. ΟΙ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΠΟΥ ΠΡΟΣΔΙΔΟΥΝ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΟ ΔΑΚΟ

Στο δάκο έχουν παρατηρηθεί τα τελευταία χρόνια δύο μεταλλάξεις που είναι έντονα συσχετισμένες με τον μηχανισμό ανθεκτικότητας στα οργανοφωσφορικά (Vontas *et al.*, 2001). Η μία αφορά την αντικατάσταση γλυκίνης-σερίνης (G488S) σε ένα ιδιαίτερα συντηρημένο αμινοξύ μεταξύ των ζωντανών οργανισμών (ένδειξη της σπουδαιότητάς του στην σωστή λειτουργία του ενζύμου). Η μετάλλαξη αυτή βρέθηκε στο έκτο εξόνιο του γονιδίου της ακετυλοχολινεστεράσης και είναι αποτέλεσμα μιάς αντικατάστασης στη βάση 1462, η οποία από G (γουανίνη) μετατρέπεται σε A (αδενίνη). Η μεταστροφή αυτή έχει ως αποτέλεσμα τη μετατροπή της τριπλέτας GGC σε AGC κι επομένως την G488S μετάλλαξη. Η G488 είναι γειτονική με το ενεργό κέντρο του ενζύμου (Εικόνα 11) που καταδεικνύει (μαζί με την υψηλή της συντήρηση) ότι ίσως προσφέρει άμεση δομική υποστήριξη ή είναι σημαντική στην διασφάλιση του σχήματος του ενεργού κέντρου. Είναι ενδιαφέρον ότι η G488 βρίσκεται πολύ κοντά στην πρόσφατα χαρακτηρισμένη μετάλλαξη G365A στη *M. domestica*, που μειώνει με όμοιο τρόπο την καταλυτική αποδοτικότητα του ενζύμου και παρέχει συγκρίσιμα επίπεδα ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα (Vontas *et al.*, 2001; Walsh *et al.*, 2001). Τα δύο κατάλοιπα (ισοδύναμα με τα G368 και G436 στην AChE της *Drosophila*) είναι παράλληλα το ένα με το άλλο στις παρακείμενες έλικες στη δομή της AChE της *Δροσόφιλας* αγρίου τύπου. Η απόσταση μεταξύ των ατόμων των άλφα ανθράκων τους είναι μόνο 3,5 Å. Αυτό σημαίνει ότι οποιαδήποτε μετάλλαξη σε αυτήν την περιοχή μιας πλευρικής αλυσίδας, ανεξάρτητα από το



Εικόνα 11. Θέση και διαμόρφωση της μετάλλαξης G488S του *Bactrocera oleae*. (A) Στερεοχημική αναπαράσταση που παρουσιάζει τις θέσεις των καταλοίπων G488 (ισοδύναμο με G396 στο *Torpedo* και G436 στη *Drosophila*) και G365 (ισοδύναμο με G290 στο *Torpedo* και G368 στη *Drosophila*) σε σχέση με το ενεργό κέντρο της AChE στη *drosophila*. (B) Η στικτή επιφάνεια των δυνάμεων Van der Waals (πράσινο) στα κατάλοιπα G436 και G368 της *Drosophila* (ισοδύναμο με G488 και G365) δείχνοντας την στενή εγγύτητά τους το ένα με το άλλο στη δομή της AChE της *Drosophila* αγρίου τύπου (Harel *et al.*, 2000), με τη μετάλλαξη G436S (G488S στο *B. olea*) διαμορφωμένη με τη χρησιμοποίηση SYBYL, παρουσιάζοντας σαφώς ότι η στερεοχημική παρεμπόδιση προκύπτει από αυτήν την μετάλλαξη (Vontas *et al.*, 2002).

πόσο μικρή είναι, θα επιβάλει κάποιο στερεοχημικό εμπόδιο στη στενή εγγύτητα των δύο ελίκων, με συνέπεια τη μετατόπισή τους, και μια επακόλουθη αναδιοργάνωση της δομής. Η εικόνα 11B παρουσιάζει τη στενή εγγύτητα και την επικάλυψη των δεσμών Van der Waals των επιφανειών των

δύο γλυκινών, και καταδεικνύει το στερεοχημικό εμπόδιο που προκύπτει, χρησιμοποιώντας ως μοντέλο του καταλοίπου S488, την AChE της *Drosophila* (S436).

Η δεύτερη πολύ συχνή μετάλλαξη στους ανθεκτικούς πληθυσμούς του δάκου αφορά την αντικατάσταση I214V, που αντιστοιχεί στην καλά χαρακτηρισμένη I199V μετάλλαξη που συνδέεται με την ανθεκτικότητα της Δροσόφιλα, που παρέχει χαμηλά επίπεδα ανθεκτικότητας στα οργανοφωσφορικά από μόνη της, συγκριτικά με τα υψηλότερα επίπεδα που παρουσιάζει όταν βρίσκεται σε συνδυασμό με άλλες μεταλλάξεις (Mutero *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 2001), επίσης παρούσες στο γονίδιο της ακετυλοχολινεστεράσης του *B. oleae*. Η μετάλλαξη αυτή, που βρίσκεται στο τρίτο εξόνιο του γονιδίου της ακετυλοχολινεστεράσης, προκαλείται από μια αντικατάσταση A(αδενίνη) → G(γουανίνη) στη βάση 640 με αποτέλεσμα την μετατροπή της τριπλέτας ATA σε GTA.

1.6. ΠΛΗΘΥΣΜΙΑΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Η πληθυσμιακή ανάλυση μας βοηθάει να κατανοήσουμε καλύτερα διάφορα θέματα που σχετίζονται με τον προς εξέταση πληθυσμό και να βγάλουμε συμπεράσματα όσον αφορά κάποια χαρακτηριστικά του. Μερικά χαρακτηριστικά που μας ενδιαφέρουν όταν εξετάζουμε έναν πληθυσμό είναι η προέλευση του είδους και η πορεία εξάπλωσης του ή η παρουσία μεταλλάξεων και η συχνότητα με την οποία εμφανίζονται στον πληθυσμό. Η εμφάνιση μεταλλάξεων είναι ένα πολύ σημαντικό γεγονός στην πορεία των πληθυσμών ενός είδους γιατί μπορεί να προσδώσει στον πληθυσμό αυτό νέα χαρακτηριστικά και δυνατότητες προσαρμογής σε καινούριες περιβαλλοντικές συνθήκες. Στις περιπτώσεις αυτές η πληθυσμιακή ανάλυση μας βοηθάει να κατανοήσουμε καλύτερα τις διάφορες παραμέτρους που σχετίζονται με την καθιέρωση της μετάλλαξης στον πληθυσμό και τα αποτελέσματά της.

1.6.1. Η ισορροπία Hardy-Weinberg

Η ισορροπία Hardy-Weinberg εκφράζεται από ένα τύπο που μας δίνει τις αναμενόμενες γενοτυπικές αναλογίες των απογόνων σε γαμετικές αλληλομορφικές συχνότητες του γονικού γονιδιακού αποθέματος. Έστω, για παράδειγμα, ένα ζευγάρι αλληλομόρφων (A και α). Αν p είναι η εκατοστιαία αναλογία του αλληλομόρφου A, και q η εκατοστιαία αναλογία του α, τότε από τη μέθοδο του αβακίου μπορούμε να πάρουμε όλους τους δυνατούς τυχαίους συνδυασμούς των γαμετών αυτών.

♀ \ ♂	p A	q α
p A	p^2 AA	pq Aα
q α	pq Aα	q^2 αα

Με την προϋπόθεση ότι οι εκατοστιαίες αναλογίες των γαμετών A και α δίνουν με πρόσθεση 100% και καλύπτουν όλους τους γαμέτες στο γονιδιακό απόθεμα, θα ισχύει $p+q=1$. Οι αναμενόμενες γενοτυπικές (ζυγωτικές) συχνότητες μπορούν τότε να συνοψιστούν ως εξής: $(p+q)^2 = p^2+2pq+q^2 = 1$, όπου p^2 είναι το μέρος της γενιάς που αναμένεται να είναι ομόζυγο για το υπερέχον γονίδιο (AA), $2pq$ το μέρος που αναμένεται να είναι ετερόζυγο (Aα) και q^2 το μέρος που αναμένεται να είναι υποτελές (αα). Όλα αυτά τα επιμέρους ποσοστά των γενοτύπων πρέπει με πρόσθεση να δίνουν τη μονάδα, ώστε να καλύπτουν όλους τους γενοτύπους στον πληθυσμό των απογόνων.

Για την επίτευξη της γενετικής ισορροπίας, όπως εκφράζεται στην εξίσωση Hardy-Weinberg, είναι απαραίτητες οι παρακάτω προϋποθέσεις:

- 1) Ο πληθυσμός να είναι άπειρα μεγάλος και οι διασταυρώσεις να γίνονται τυχαία (παμμεικτικός πληθυσμός).
- 2) Να μην υπάρχει επιλογή, δηλαδή κάθε γενότυπος που εξετάζεται να μπορεί να επιβιώσει ακριβώς όπως οποιοσδήποτε άλλος (χωρίς διαφορετική θνησιμότητα) και κάθε γενότυπος να είναι εξίσου

παραγωγικός ως προς τους απόγονους (χωρίς διαφορική αναπαραγωγή).

- 3) Ο πληθυσμός να είναι κλειστός, δηλαδή να μην επιτρέπεται μετανάστευση ατόμων από άλλο πληθυσμό ούτε και μετανάστευση ατόμων από τον πληθυσμό που μελετάται.
- 4) Να μην υπάρχει μετάλλαξη από μία αλληλομορφική κατάσταση σε μία άλλη. Η μετάλλαξη μπορεί να επιτρέπεται, αν οι ρυθμοί της μετάλλαξης και της επαναμετάλλαξης είναι ίσοι.
- 5) Η μείωση να είναι κανονική έτσι ώστε η τύχη να είναι ο μόνος παράγοντας που λειτουργεί στη γαμετογένεση (Stansfield, 1983).

Οι προϋποθέσεις αυτές αντιπροσωπεύουν έναν ιδανικό πληθυσμό και είναι από σπάνιο έως αδύνατον να ισχύουν και οι πέντε ταυτόχρονα σε έναν φυσικό πληθυσμό.

ΣΚΟΠΟΣ

Η εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε με σκοπό να δούμε την κατανομή των δύο βασικών μεταλλάξεων, που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα του δάκου στα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα, σε διάφορους πληθυσμούς δάκου σε Ελλάδα και Κύπρο. Με τον έρευνα αυτή μπορούμε στη συνέχεια να αποφανθούμε σχετικά με το πόσο διαδεδομένες είναι οι μεταλλάξεις αυτές, αν σχετίζονται πράγματι και απόλυτα με την ανθεκτικότητα και τα ποσοστά ανθεκτικότητας που προκύπτουν από την παρουσία της κάθε μίας ξεχωριστά ή και των δύο μαζί. Τέλος μπορούμε να προσδιορίσουμε τα αναμενόμενα ποσοστά αυτών των μεταλλάξεων σε επόμενες γενιές.

II. ΥΛΙΚΑ

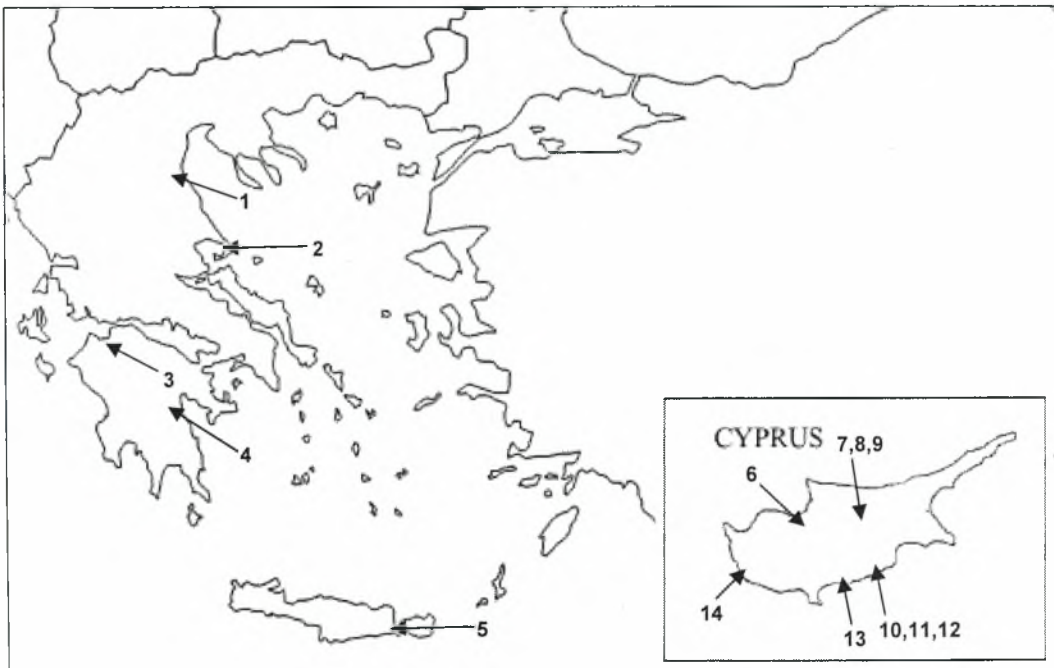
ΚΑΙ

ΜΕΘΟΔΟΙ

II.1. ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΠΟΥ ΕΞΕΤΑΣΤΗΚΑΝ

Τα δείγματα που εξετάστηκαν συλλέχθηκαν κατά το παρελθόν, από Ελλάδα και Κύπρο, για το εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας του τμήματος Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας στη Λάρισα, και συντηρήθηκαν είτε σε ψυγεία στους 4°C είτε σε καταψύκτες στους -20°C. Επίσης, το ερευνητικό κέντρο «Δημόκριτος» μας παραχώρησε κάποια εργαστηριακά στελέχη από την Κρήτη που είχαν συλλεχθεί εδώ και 20 χρόνια. Αναλυτική παρουσίαση των δειγμάτων βρίσκεται στους Πίνακες 1 και 2 του Παραρτήματος ενώ στους παρακάτω χάρτες φαίνονται οι περιοχές από όπου συλλέχθηκαν τα δείγματα.

Οι πληθυσμοί από Δρέπανο, Αργολίδα, Κατερίνη, Ιεράπετρα, Δράκεια και Μαζωτό 1 ήταν πλήρης, δηλαδή αναλύθηκαν ολόκληροι. Αντίθετα, από τους πληθυσμούς από Αγγλισίδες, Αθαλάσσα, Αλαμίнос, Ανάγια, Δευτερά, Ευρύχου, Ζύγι, Μενεού, Πάφο και Μαζωτό 2 επιλέχθηκαν και αναλύθηκαν μόνο τα ανθεκτικά έντομα, ενώ ο εργαστηριακός πληθυσμός της Κρήτης περιείχε μόνο ευπαθή έντομα.



Χάρτης 1. Περιοχές συλλογής δειγμάτων (1. Κατερίνη, 2. Δράκεια, 3 Δρέπανο, 4. Αργολίδα, 5. Ιεράπετρα, 6. Ευρύχου, 7. Δευτερά, 8. Ανάγια, 9. Αθαλάσσα, 10. Μαζωτός, 11. Ζύγι, 12. Αλαμίнос, 13. Αγγλισίδες, 14. Πάφος.

II.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA

Για την απομόνωση του DNA τα έντομα τοποθετήθηκαν χωριστά σε eppendorf των 1.5mL. Τα πρωτόκολλα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τρία:

1. Η απομόνωση DNA του δείγματος από την περιοχή του Μαζωτού έγινε με το παρακάτω πρωτόκολλο:

Υλικά

- Διάλυμα ομογενοποίησης (100mM NaCl, 200mM sucrose, 100mM Tris pH 7,4 , 50mM EDTA)
- KAc 8M
- Αιθανόλη 100% και 70%
- CH₃COONa 2,31M, pH 5,2
- H₂O απιονισμένο και αποστειρωμένο (ddH₂O)

Πειραματική Διαδικασία

- ✓ Προστίθενται 50μl διαλύματος ομογενοποίησης στα eppendorf με το δάκο και ομογενοποιούνται με έμβολα.
- ✓ Τα έμβολα ξεπλένονται με 50μl διάλυμα ομογενοποίησης.
- ✓ Τα δείγματα φυγοκεντρώνται για 10 δευτερόλεπτα στη μικροφυγόκεντρο και στη συνέχεια επωάζονται για 45 λεπτά στους 65°C.
- ✓ Μετά την επώαση, και ενώ τα eppendorf είναι ακόμα ζεστά, προστίθενται 14μl KAc ώστε η τελική του συγκέντρωση στο διάλυμα να είναι περίπου 0,98M.
- ✓ Ακολουθεί επώαση στον πάγο για 45 λεπτά και φυγοκέντρηση για 15 λεπτά.
- ✓ Το υπερκείμενο, με τελικό όγκο 100μl, μεταφέρεται προσεκτικά σε νέα eppendorf και προστίθενται 500μl H₂O.
- ✓ Στη συνέχεια προστίθεται ίσος όγκος (600μl) φαινόλης-χλωροφορμίου (300μl φαινόλη και 300 χλωροφόρμιο), πραγματοποιείται ανάδευση για

να αναμειχθούν οι φάσεις και φυγοκεντρώνται για 4 λεπτά στις 14000rpm.

- ✓ Το υπερκείμενο (580μl) μεταφέρεται σε νέα erpendorf και προστίθεται ίσος όγκος χλωροφορμίου.
 - ✓ Τα δείγματα φυγοκεντρώνται για 4 λεπτά, το υπερκείμενο (560μl) μεταφέρεται σε νέα erpendorf και προστίθεται ίσος όγκος χλωροφορμίου για δεύτερη φορά ώστε να απομακρυνθούν τα υπολείμματα φαινόλης που τυχόν έχουν παραμείνει στο διάλυμα.
 - ✓ Πραγματοποιείται φυγοκέντρωση για 4 λεπτά και το υπερκείμενο (540μl) μεταφέρεται σε νέα erpendorf που περιέχουν 70μl CH₃COONa (τελική συγκέντρωση στο διάλυμα περίπου 0,3M) και 2 όγκους αιθανόλης 100% (θερμοκρασίας -20°C).
 - ✓ Το διάλυμα αναδεύεται και τοποθετείται για 15 λεπτά στον πάγο.
 - ✓ Ακολουθεί φυγοκέντρωση για 15 λεπτά και απομάκρυνση του υπερκειμένου.
 - ✓ Προσθήκη 300μL αιθανόλης 70% (θερμοκρασίας -20°C) και φυγοκέντρωση για 5 λεπτά.
 - ✓ Απομάκρυνση του υπερκειμένου και παραμονή τους σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να στεγνώσουν.
 - ✓ Επαναδιάλυση σε 100μL H₂O με τη χρήση Vortex.
2. Η απομόνωση DNA των δειγμάτων από τις περιοχές της Κατερίνη της Δράκειας Πηλίου έγινε με το πρωτόκολλο που παρατήθεται παρακάτω (Koukidou *et al.*, 2006; Laird *et al.*, 1991):

Υλικά

- Διάλυμα ομογενοποίησης (50mM Tris-HCl pH 8.0, 100mM EDTA, 1% SDS, 100mM NaCl, 20mg/ml Proteinase K)
- KAc 8M
- Ισοπροπανόλη
- Αιθανόλη 70%
- CH₃COONa 2,31M, pH 5,2
- ddH₂O

Πειραματική Διαδικασία

- Προστίθενται 150μl διαλύματος ομογενοποίησης στα errendorf με το δάκο και ομογενοποιούνται με έμβολα.
- Τα έμβολα ξεπλένονται με 100μl διάλυμα ομογενοποίησης.
- Τα δείγματα φυγοκεντρούνται για 1 spin στη μικροφυγόκεντρο και στη συνέχεια επωάζονται για 4 ώρες στους 55°C.
- Το υπερκείμενο, με τελικό όγκο 250μl, μεταφέρεται προσεκτικά σε νέα errendorf και προστίθενται 350μl H₂O.
- Στη συνέχεια προστίθεται ίσος όγκος (600μl) φαινόλης-χλωροφορμίου (300μl φαινόλη και 300 χλωροφόρμιο), πραγματοποιείται ανάδευση για να αναμειχθούν οι φάσεις και φυγοκεντρούνται για 8 λεπτά στις 14000rpm.
- Το υπερκείμενο (580μl) μεταφέρεται σε νέα errendorf και προστίθεται ίσος όγκος χλωροφορμίου.
- Τα δείγματα φυγοκεντρούνται για 8 λεπτά, το υπερκείμενο (560μl) μεταφέρεται σε νέα errendorf και προστίθεται ίσος όγκος χλωροφορμίου για δεύτερη φορά ώστε να απομακρυνθούν τα υπολείμματα φαινόλης που τυχόν έχουν παραμείνει στο διάλυμα.
- Πραγματοποιείται φυγοκέντρηση για 8 λεπτά και το υπερκείμενο (~540μl) μεταφέρεται σε νέα errendorf που περιέχουν 70μl CH₃COONa (τελική συγκέντρωση στο διάλυμα περίπου 0,3M) και 1 όγκο ισοπροπανόλης (θερμοκρασίας -20°C).
- Το διάλυμα αναδεύεται και παραμένει για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 15 λεπτά και απομάκρυνση του υπερκειμένου.
- Προσθήκη 200μL αιθανόλης 70% (θερμοκρασίας -20°C) και φυγοκέντρηση για 5 λεπτά.
- Απομάκρυνση του υπερκειμένου και παραμονή τους σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να στεγνώσουν.
- Επαναδιάλυση σε 100μL H₂O με τη χρήση Vortex.

3. Τέλος, η απομόνωση DNA των δειγμάτων από Αργολίδα και Δρέπανο έγινε με το Wizrd Genomic DNA Purification Kit της Promega:

Υλικά

- Nuclei Lysis Solution
- Protein Precipitation Solution
- Ισοπροπανόλη
- Αιθανόλη 70%
- DNA Rehydration Solution

Πειραματική Διαδικασία

- ✓ Προστίθενται 200μl Nuclei Lysis Solution στα erpendorf με το δάκο και ομογενοποιούνται με έμβολα.
- ✓ Τα έμβολα ξεπλένονται με 200μl από το ίδιο διάλυμα.
- ✓ Τα δείγματα επωάζονται για 30 λεπτά στους 65°C.
- ✓ Παραμένουν για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- ✓ Προστίθενται 135μl Protein Presipitation Solution και πραγματοποιείται δυνατό vortex για 20 δευτερόλεπτα.
- ✓ Στη συνέχεια, τα δείγματα τοποθετούνται στον πάγο για 5 λεπτά και φυγοκεντρώνονται για 4 λεπτά στις 14000rpm.
- ✓ Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο erpendorf που περιέχει 400μl ισοπροπανόλης (θερμοκρασίας δωματίου).
- ✓ Το διάλυμα αναδεύεται και παραμένει για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- ✓ Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 1 λεπτό και απομάκρυνση του υπερκειμένου.
- ✓ Προσθήκη 500μL αιθανόλης 70% (θερμοκρασίας δωματίου) και φυγοκέντρηση για 1 λεπτό.
- ✓ Απομάκρυνση του υπερκειμένου και παραμονή τους σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να στεγνώσουν.
- ✓ Προσθήκη 100μl DNA Rehydration Solution και επαναδιάλυση στους 65°C για 1 ώρα με τακτική ανάδευση.

II.3. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)

Η PCR είναι μία μέθοδος που χρησιμοποιείται για την απομόνωση ενός γονιδίου με τον *in vitro* ενζυμικό πολλαπλασιασμό επιλεγμένων αλληλουχιών DNA (DNA-στόχου) από ελάχιστη αρχική ποσότητα δείγματος. Στηρίζεται στην κινητική επανασύνδεσης θερμικά αποδιαταγμένου δίκλωνου DNA. Έτσι, από αρχική ποσότητα δείγματος DNA μη ανιχνεύσιμου με κλασσικές τεχνικές υβριδοποίησης (Southern blotting), το DNA ενισχύεται με την PCR ώστε να γίνεται εύκολα ανιχνεύσιμο.

Για την πραγματοποίηση της τεχνικής αυτής απαιτείται η χρήση:

- Μικρής ποσότητας DNA εκμαγείου
- Ενός ζεύγους συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων 15-30 βάσεων (εκκινητικά μόρια ή primers)
- Κατάλληλου διαλύματος ελεύθερων 5' τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs)
- Ειδική Taq πολυμεράση που έχει απομονωθεί από το θερμόφιλο βακτήριο *Thermus aquaticus* και είναι θερμοσταθερή διατηρώντας τη δραστηρότητά της σε θερμοκρασίες έως και 95°C.
- Ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα για την Taq πολυμεράση.
- Κατάλληλη συγκέντρωση διαλύματος MgCl₂.

Η PCR πραγματοποιείται σε κύκλους. Ξεκινάει με έναν αρχικό κύκλο αποδιάταξης και ακολουθούν περίπου 30 κύκλοι (ανάλογα με την ενίσχυση που απαιτείται) καθένας από τους οποίους περιλαμβάνει: αποδιάταξη του δίκλωνου DNA, υβριδοποίηση των εκκινητικών μορίων και επέκταση του DNA. Σε κάθε κύκλο από ένα αρχικό μόριο DNA παράγονται δύο νέα μόρια. Οπότε ο πολλαπλασιασμός των μορίων DNA σε μία αντίδραση PCR ακολουθεί εκθετική μορφή με αποτέλεσμα την τελική παραγωγή 2ⁿ μορίων DNA, όπου n είναι ο αριθμός των κύκλων αντίδρασης.

II.3.1. PCR ενίσχυση τμημάτων του γονιδίου της ακετυλοχολινεστεράσης

Σε όλα τα δείγματα πραγματοποιήθηκαν δύο διαφορετικές αντιδράσεις PCR. Η πρώτη αφορούσε την ενίσχυση τμήματος του 3^{ου} εξονίου του γονιδίου της ακετυλοχολινεστεράσης και περιελάμβανε τα εξής:

DNA (10-40ng)	0,5 μl
Buffer (10x) (Promega)	3,0 μl
MgCl ₂ (25mM)	0,9 μl
dNTPs (2.5mM το καθένα)	1,2 μl
Boace 3F (forward primer)(10pmol/μl)	0,7 μl
Boace 3R (reverse primer)(10pmol/μl)	0,7 μl
Taq πολυμεράση (5u/μl)	0,1 μl
ddH ₂ O	7,9 μl
Τελικός όγκος	15,0 μl

Η αντίδραση ολοκληρώνεται σε 30 κύκλους, ενώ οι συνθήκες πραγματοποίησης της είναι οι παρακάτω:

Αρχικός κύκλος αποδιάταξης	94°C για 5 λεπτά	} 30 κύκλοι
Αποδιάταξη	95°C για 1 λεπτό	
Υβριδοποίηση	60°C για 30 δευτερόλεπτα	
Επέκταση	72°C για 45 δευτερόλεπτα	
Τελικός πολυμερισμός	72°C για 5 λεπτά	

Η PCR ενίσχυση του 6^{ου} εξονίου του γονιδίου της ακετυλοχολινεστεράσης περιλαμβάνει τα εξής:

DNA (10-40ng)	0,5 μ l
Buffer (10x) (Promega)	3,0 μ l
MgCl ₂ (25mM)	0,9 μ l
dNTPs (2.5mM το καθένα)	1,2 μ l
Boace 6F (forward primer)(10pmol/ μ l)	0,7 μ l
Boace 6R (reverse primer)(10pmol/ μ l)	0,7 μ l
Taq πολυμεράση (5u/ μ l)	0,1 μ l
ddH ₂ O	7,9 μ l
Τελικός όγκος	15,0 μ l

Η αντίδραση ολοκληρώνεται σε 30 κύκλους, ενώ οι συνθήκες πραγματοποίησης της είναι οι παρακάτω:

Αρχικός κύκλος αποδιάταξης	94°C για 5 λεπτά	} 30 κύκλοι
Αποδιάταξη	95°C για 1 λεπτό	
Υβριδοποίηση	60°C για 30 δευτερόλεπτα	
Επέκταση	72°C για 45 δευτερόλεπτα	
Τελικός πολυμερισμός	72°C για 5 λεπτά	

II.4. ΠΕΨΕΙΣ ΜΕ ΕΝΖΥΜΑ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΥ

Μέσα σε κάθε βακτηριακό κύτταρο υπάρχουν ένζυμα που το προστατεύουν από την είσοδο, στο εσωτερικό του, ξένου DNA. Τα ένζυμα αυτά ονομάζονται ένζυμα περιορισμού και ο μηχανισμός δράσης τους περιλαμβάνει την αναγνώριση συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA και τον τεμαχισμό του (τα ένζυμα αυτά δεν κόβουν το μεθυλωμένο DNA του βακτηρίου). Υπάρχουν διάφορα ένζυμα περιορισμού το καθένα από τα οποία αναγνωρίζει και μια διαφορετική αλληλουχία DNA. Η απομόνωση και η χρήση τους έχει βοηθήσει πολύ στην χαρτογράφηση γονιδιωμάτων διαφόρων

οργανισμών όπως επίσης και στην αναγνώριση πολυμορφισμών ή σημειακών μεταλλάξεων σε γνωστά γονίδια.

II.4.1. Πέψεις και μεταλλάξεις

Για την αναγνώριση της παρουσίας ή απουσίας των χαρακτηρισμένων μεταλλάξεων που σχετίζονται με ανθεκτικότητα σε όλα τα δείγματα πραγματοποιήθηκαν πέψεις.

Για την ανίχνευση της μετάλλαξης στο 3^ο εξόνιο του γονιδίου της ακετυλοχολινεστεράσης η πέψη έγινε με το ένζυμο *AccI*, που αναγνωρίζει τις αλληλουχίες: 5'...G TnA T A C...3' και 5'...G TnC G A C...3' ως εξής:



DNA	12,0 μl
<i>AccI</i> (10u/μl)	0,5 μl
Buffer (10x)	2,0 μl
ddH ₂ O	5,5 μl
Τελικός όγκος	20,0 μl

Η επώαση πραγματοποιείται σε θερμοκρασία 37°C για 2 ώρες.

Ενώ για την ανίχνευση της παρουσίας της μετάλλαξης στο 6^ο εξόνιο του γονιδίου της ακετυλοχολινεστεράσης η πέψη έγινε με το ένζυμο *BssHII*, που αναγνωρίζει την αλληλουχία: 5'...GnC G C G C...3' ως εξής:



DNA	12,0 μl
<i>BssHII</i> (4u/μl)	1,0 μl
Buffer (10x)	2,0 μl
ddH ₂ O	5,5 μl
Τελικός όγκος	20,0 μl

Η επώαση πραγματοποιείται σε θερμοκρασία 50°C για 2 ώρες.

II.5. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Η ηλεκτροφόρηση είναι μία μέθοδος που χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό, την αναγνώριση και τον καθαρισμό μορίων (DNA, RNA, πρωτεϊνών). Για τον διαχωρισμό τμημάτων DNA σε πήκτωμα αγαρόζης απαιτείται η παρουσία ενός πήκτωματος αγαρόζης, συγκέντρωσης αντιστρόφως ανάλογης με το μέγεθος των τμημάτων DNA που θέλουμε να διαχωρίσουμε, μίας χρωστικής που θα μας επιτρέψει να δούμε τα δείγματά μας στο πήκτωμα, μιας συσκευής ηλεκτροφόρησης και ενός ηλεκτρολυτικού διαλύματος.

Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα του DNA εξαρτάται κυρίως από τέσσερις παραμέτρους: το μέγεθος του DNA, τη συγκέντρωση της αγαρόζης, τη στερεοδιάταξη του DNA και την ένταση του ρεύματος.

Για την παρούσα εργασία χρησιμοποιήσαμε τριών ειδών πήκτωμα, ενώ η χρώση γίνονταν σε κάθε περίπτωση με τη χρήση βρωμιούχου αιθιδίου.

II.5.1. Ηλεκτροφόρηση DNA δάκου

Κατά την διάρκεια της εργασίας αυτής μετά από κάθε απομόνωση DNA πραγματοποιούνταν συνήθως ηλεκτροφόρηση ποσότητας των δειγμάτων, για τον ποσοτικό προσδιορισμό του DNA. Τα πήκτωμα που χρησιμοποιούνταν για τον σκοπό αυτό κατασκευάζονταν έτσι ώστε να περιέχουν 1% αγαρόζης, 0,5x TBE (10mM Tris base, 10mM Boric acid, 0,2mM EDTA) και 1,2μl βρωμιούχο αιθίδιο συγκέντρωσης 10mg/ml. Στο πήκτωμα φορτώνονταν 3μl από κάθε δείγμα αναμεμιγμένο με 1,5μl loading buffer 6x (0,25% μπλε της βρωμοφαινόλης, 0,25% xylene cyanol FF, 15% φικόλη σε νερό). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιούνταν σε ένταση ηλεκτρικού ρεύματος 80 V.

II.5.2. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR

Τα δείγματα των PCR ηλεκτροφορούνταν και αυτά για τον έλεγχο της παρουσίας προϊόντων. Τα πήκτωμα που χρησιμοποιούνταν και στην περίπτωση αυτή ήταν περιεκτικότητας 1% σε αγαρόζη, 0,5x TBE (10mM Tris

base, 10mM Boric acid, 0,2mM EDTA) και 1,2μl βρωμιούχου αιθιδίου (10mg/ml). Η ποσότητα από τα δείγματα που φορτώνονταν στο πήκτωμα ήταν 3μl ενώ δεν χρησιμοποιούνταν loading buffer αφού το buffer της PCR το αντικαθιστούσε επαρκώς. Η ένταση του ηλεκτρικού ρεύματος ήταν και πάλι 80V.

II.5.3. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων πέψεων

Μετά τις πέψεις τα δείγματα ηλεκτροφορούνταν για την τελική ανίχνευση της παρουσίας των μεταλλάξεων. Η ηλεκτροφόρηση αυτή πραγματοποιούνταν σε πήκτωμα αγαρόζης 2%, 1x TBE (20mM Tris base, 20mM Boric acid, 0,4mM EDTA) και 3μl βρωμιούχου αιθιδίου (10mg/ml). Στην περίπτωση αυτή φορτώνονταν και τα 20μl του δείγματος ενώ η ένταση του ηλεκτρικού ρεύματος ήταν στα 80 V.

III.

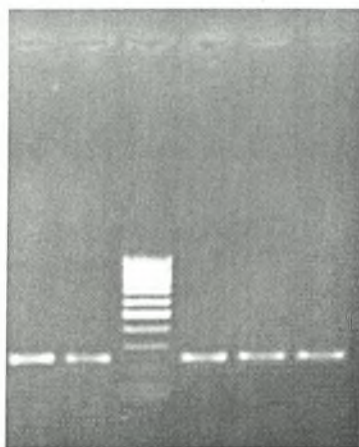
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

III.1. ΈΛΕΓΧΟΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ

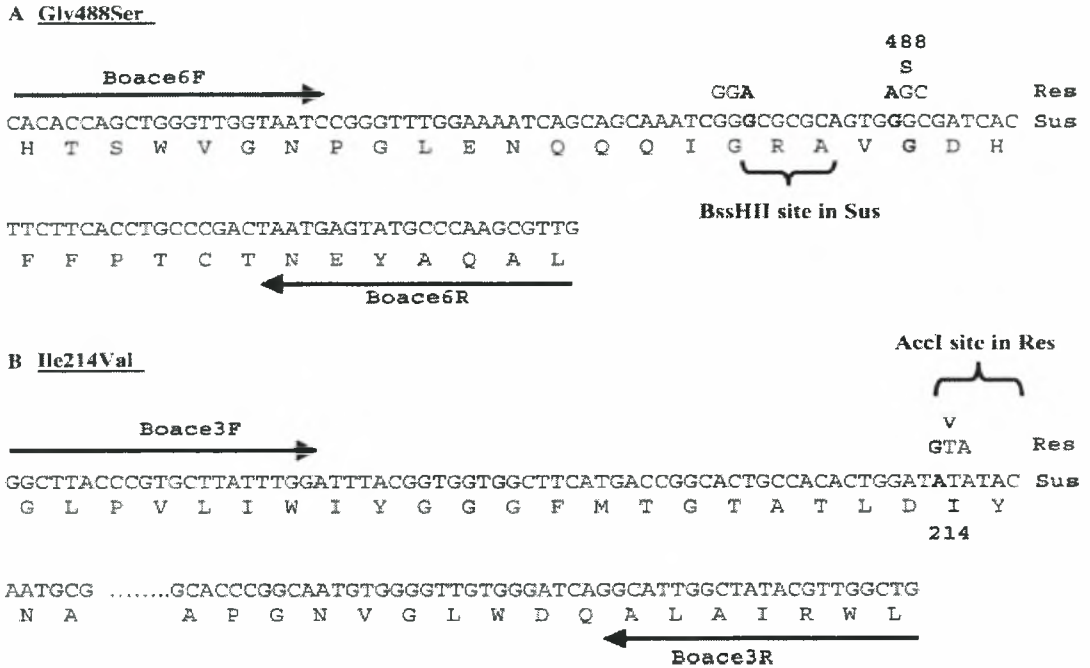
Αφού προηγήθηκε η απομόνωση του DNA των δειγμάτων μας (όπως αναφέρεται στα «Υλικά και μέθοδοι») ακολούθησε ο έλεγχος για την παρουσία των μεταλλάξεων σύμφωνα με το PCR-RFLP διαγνωστικό τεστ που περιγράφεται από τους Hawkes *et al.*, (2005).

Σύμφωνα με αυτό το τεστ, ο έλεγχος της παρουσίας ή απουσίας των μεταλλάξεων του γονιδίου της ακετυλοχολινεστεράσης που προσδίδουν ανθεκτικότητα στο δάκο γίνεται με PCR σε τμήματα των εξονίων 3 και 6 του γονιδίου αυτού και στη συνέχεια με πέψεις των προϊόντων με τα ένζυμα περιορισμού *AccI* και *BssHII* αντίστοιχα (Hawkes *et al.*, 2005).

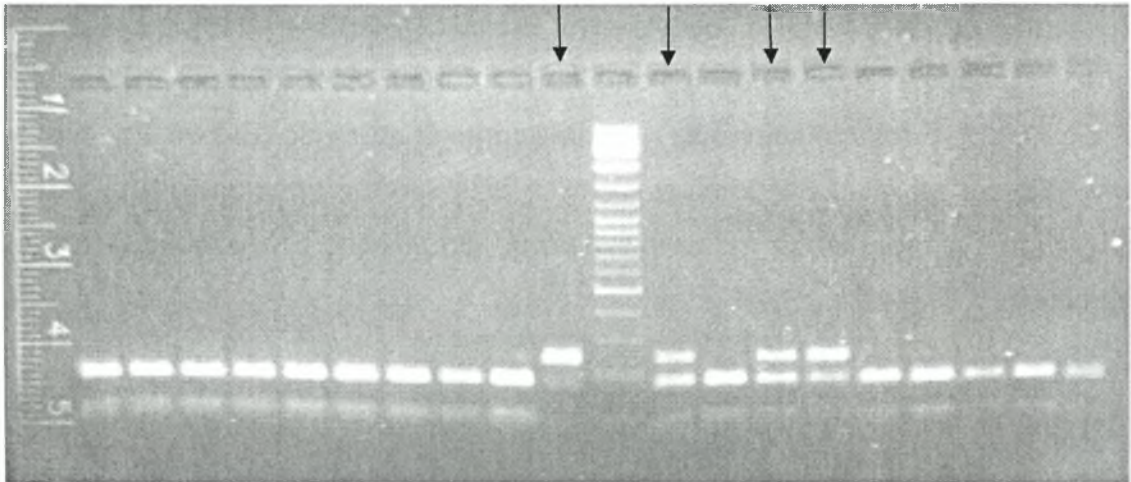
Όσον αφορά το 3^ο εξόνιο, από την PCR ενίσχυση με τους εκκινητές Boace 3F (5' GCTTACCCGTGCTTATTTGG) και Boace 3R (5' AGCCAACGTATAGCCAATGC) προκύπτει τμήμα 232 βάσεων (Εικόνα 1) το οποίο φυσιολογικά δεν περιέχει θέση κοπής για το ένζυμο *AccI* (Σχήμα 2B). Η μετάπτωση που παρατηρείται στα ανθεκτικά έντομα στη βάση 640 του γονιδίου της ακετυλοχολινεστεράσης που έχει σαν αποτέλεσμα την μετατροπή της τριπλέτας ATA σε GTA, οδηγεί στην μετάλλαξη Ile214Val. Η μετάλλαξη αυτή δημιουργεί θέση αναγνώρισης του ενζύμου *AccI* (Σχήμα 1B), τα προϊόντα της οποίας δίνουν δύο ηλεκτροφορητικές μπάντες (Εικόνα 2)· μία των 168 και μία των 64 βάσεων. Αυτή η θέση κοπής χρησιμοποιείται για ανίχνευση της παρουσίας της συγκεκριμένης μετάλλαξης στο γονιδίωμα του δάκου.



Εικόνα 1. Προϊόντα PCR ενίσχυσης τμήματος του 3^{ου} εξονίου του γονιδίου της ακετυλοχολινεστεράσης του δάκου, με τους εκκινητές Boace 3F και 3R.



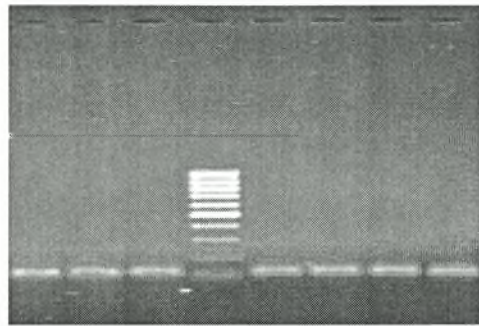
Σχήμα 1(A και B). Διαγραμματική αναπαράσταση της θέσης των εκκινήτων και των περιοριστικών τμημάτων που σχετίζονται με τις μεταλλάξεις στα προϊόντα ενίσχυσης των εξονίων 6 (Σχήμα A) και 3 (Σχήμα B) της AchE του *B. oleae* (Vontas *et al.*, 2004).



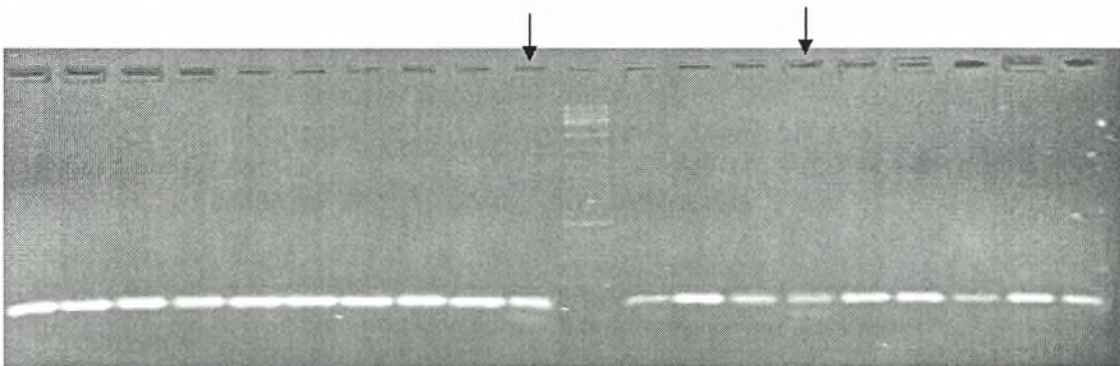
Εικόνα 2. Πέψεις των προϊόντων ενίσχυσης του 3^{ου} εξονίου του γονιδίου της AchE του *B. oleae*, με Accl. Οι ετεροζυγώτες για τη μετάλλαξη υποδεικνύονται με τα βέλη.

Στο 6^ο εξόνιο η PCR γίνεται με τους εκκινήτες Boace 6F (5' ACACCAGCTGGGTTGGTAATC) και 6R (5' AACGCTTGGGCATACTCATT) και το τμήμα που προκύπτει από την ενίσχυση αυτή είναι 106 βάσεων (Εικόνα 3) με μία θέση αναγνώρισης του ενζύμου περιορισμού *BssHII* που δίνει δύο ηλεκτροφορητικές μπάντες 50 και 56 βάσεων (Εικόνα 4). Στο εξόνιο αυτό

έχουν παρατηρηθεί δύο μεταλλάξεις οι οποίες είναι συνδεδεμένες. Η μία είναι η G484A ενώ η άλλη είναι η G488S της οποίας η παρουσία έχει συσχετιστεί με την ανθεκτικότητα του δάκου στα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα. Η διάγνωση της παρουσίας των μεταλλάξεων αυτών γίνεται μέσω της μετάλλαξης G484A η οποία βρίσκεται στην θέση αναγνώρισης του ενζύμου *BssHII* και η παρουσία της έχει σαν αποτέλεσμα την αδυναμία αναγνώρισης και κοπής της συγκεκριμένης αλληλουχίας από το ένζυμο αυτό. Επειδή οι δύο αυτές μεταλλάξεις παρουσιάζονται σε κοντινές αποστάσεις στο ίδιο εξόνιο του γονιδίου της ακετυλοχολινεστεράσης είναι συνδεδεμένες και η παρουσία της μίας συνεπάγεται και την παρουσία της άλλης (Σχήμα 1Α).



Εικόνα 3. Προϊόντα PCR ενίσχυσης τμήματος του 6^{ου} εξονίου του γονιδίου της ακετυλοχολινεστεράσης του δάκου, με τους εκκινητές Boace 6F και 6R.



Εικόνα 4. Πέψεις των προϊόντων ενίσχυσης του 6^{ου} εξονίου του γονιδίου της AchE του *B. oleae*, με *BssHII*. Οι ετεροζυγώτες για τη μετάλλαξη υποδεικνύονται με τα βέλη.

Συνολικά αναλύθηκαν 578 άτομα από δείγματα που συλλέχθηκαν από Ελλάδα και Κύπρο. Σε όλα μας τα δείγματα, εκτός από τα 9 συγκεκριμένα εργαστηριακά δείγματα της Κρήτης, προηγήθηκαν βιοδοκιμές οι οποίες πραγματοποιήθηκαν με τοπική εφαρμογή dimethoate στο μεσονότο του κάθε

ενήλικου εντόμου (Dimethoate 40EC, Άλφα Γεωργικά Εφόδια). Συνήθως, περιλαμβάνονταν 5-8 δόσεις, για κάθε μία από τις οποίες χρησιμοποιούνταν 20-30 ενήλικα άτομα. Είκοσι τέσσερις ώρες αργότερα γινόταν καταμέτρηση των ζωντανών και των νεκρών ατόμων και στη συνέχεια υπολογίζονταν η θνησιμότητα LD₅₀ (δηλαδή η δόση του εντομοκτόνου στην οποία παρατηρείται θνησιμότητα 50% των εντόμων) (Skouras *et al.*, 2007).

Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν στη πτυχιακή αυτή χωρίζονται σε δύο κατηγορίες: (1) τα **πλήρη** δείγματα αποτελούνται από το σύνολο των εντόμων της δειγματοληψίας από τις περιοχές Αργολίδα, Δράκεια, Δρέπανο, Ιεράπετρα, Κατερίνη, Μαζωτό 1 και το εργαστηριακό δείγμα από Κρήτη, ενώ (2) τα **δείγματα ανθεκτικών εντόμων βιοδοκιμών** περιλαμβάνουν μόνο τα άτομα εκείνα που επιβίωσαν σε μεγάλες δόσεις εντομοκτόνων από τις περιοχές Αγγλισίδες, Αθαλάσσα, Αλαμίνος, Ανάγια, Δευτερά, Ευρύχου, Ζύγι, Μαζωτός 2, Μενεού και Πάφο (Skouras *et al.*, 2007).

III.2. ΠΛΗΘΥΣΜΙΑΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Τα αποτελέσματα από τις διαδικασίες που περιγράφονται παραπάνω επεξεργάστηκαν στο πρόγραμμα πληθυσμιακής ανάλυσης Popgene (Yeh *et al.*, 1999). Αρχικά υπολογίστηκαν οι γενοτυπικές συχνότητες και η απόκλιση από την ισορροπία κατά Hardy-Weinberg. Τα αποτελέσματα φαίνονται στους Πίνακες 1, 2, 3 και 4.

Πίνακας 1. Γενοτυπικές συχνότητες και αποκλίσεις από ισορροπία H-W, σύμφωνα με τα κριτήρια χ^2 και G^2 , για επίπεδο σημαντικότητας 5% που αφορούν στο 3^ο εξόνιο στα πλήρη δείγματα.

ΔΕΙΓΜΑ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΤΟΜΩΝ	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ RR	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ RS	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ SS	H-W χ^2 / G^2
ΔΡΕΠΑΝΟ	148	91,2	8,8	-	+/+
ΑΡΓΟΛΙΔΑ	26	100	-	-	X
ΚΑΤΕΡΙΝΗ	46	91,3	8,7	-	+/+
ΔΡΑΚΕΙΑ	15	66,7	33,3	-	+/+
ΙΕΡΑΠΕΤΡΑ	129	69,0	31,0	-	-/-
ΜΑΖΩΤΟΣ 1	53	84,9	15,1	-	+/+
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΚΡΗΤΗΣ	9	-	-	100	X

Πίνακας 2. Γενοτυπικές συχνότητες και αποκλίσεις από ισορροπία H-W, σύμφωνα με τα κριτήρια χ^2 και G^2 , για επίπεδο σημαντικότητας 5% που αφορούν στο 6^ο εξόνιο στα πλήρη δείγματα.

ΔΕΙΓΜΑ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΤΟΜΩΝ	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ RR	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ RS	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ SS	H-W χ^2/G^2
ΔΡΕΠΑΝΟ	148	91,2	8,8	-	+/+
ΑΡΓΟΛΙΔΑ	26	100	-	-	X
ΚΑΤΕΡΙΝΗ	46	91,3	8,7	-	+/+
ΔΡΑΚΕΙΑ	15	86,7	13,3	-	+/+
ΙΕΡΑΠΕΤΡΑ	131	69,2	30,8	-	-/-
ΜΑΖΩΤΟΣ 1	53	84,9	15,1	-	+/+
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΚΡΗΤΗΣ	7	-	-	100	X

Παρατηρούμε ότι όλα τα πλήρη δείγματα ανεξάρτητα από το πλήθος των ατόμων, έχουν την μετάλλαξη και στα δύο εξόνια. Δεν βρέθηκε κανένα άτομο που να έχει το αλληλόμορφο αγρίου τύπου σε ομοζυγωτία, αντίθετα όλα τα άτομα περιέχουν την μετάλλαξη είτε σε ομοζυγωτία είτε σε ετεροζυγωτία. Το δείγμα από Δρέπανο αλλά και αυτό από Κατερίνη παρουσιάζουν μικρό ποσοστό ετεροζυγωτών για την μετάλλαξη σε αντίθεση με το δείγμα από Ιεράπετρα, τόσο για το 3^ο, όσο και για το 6^ο εξόνιο στο οποίο παρατηρείτε πολύ μεγαλύτερο ποσοστό ετεροζυγωτών. Το δείγμα από Ιεράπετρα είναι επίσης το μοναδικό που βρίσκεται εκτός ισορροπίας κατά Hardy-Weinberg και για τα δύο εξόνια. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι σύμφωνα με τις συχνότητες των ετεροζυγωτών περιμένουμε να δούμε στο δείγμα αυτό και δύο ομοζυγώτες για το αλληλόμορφο αγρίου τύπου τους οποίους όμως δεν βλέπουμε. Τέλος, το δείγμα από Αργολίδα είναι μονομορφικό και περιλαμβάνει μόνο ομοζυγώτες για την μετάλλαξη, ενώ ομοζυγώτες για το αλληλόμορφο αγρίου τύπου παρατηρούμε μόνο στο εργαστηριακό δείγμα της Κρήτης, το οποίο δεν περιέχει καθόλου τη μετάλλαξη.

Πίνακας 3. Γενοτυπικές συχνότητες και αποκλίσεις από ισορροπία H-W, σύμφωνα με τα κριτήρια χ^2 και G^2 , για επίπεδο σημαντικότητας 5% που αφορούν στο 3^ο εξόνιο στα δείγματα ανθεκτικών εντόμων βιοδοκιμών.

ΔΕΙΓΜΑ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΤΟΜΩΝ	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ RR	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ RS	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ SS	H-W χ^2/G^2
ΑΓΓΛΙΣΙΔΕΣ	15	73,3	26,7	-	+/+
ΑΘΑΛΑΣΣΑ	15	66,7	33,3	-	+/+
ΑΛΑΜΙΝΟΣ	15	80	20	-	+/+
ΑΝΑΓΙΑ	15	93,3	6,7	-	+/+
ΔΕΥΤΕΡΑ	15	80	20	-	+/+
ΕΥΡΥΧΟΥ	15	93,3	6,7	-	+/+
ΖΥΓΙ	15	80	20	-	+/+
ΜΑΖΩΤΟΣ 2	15	73,3	26,7	-	+/+
ΜΕΝΕΟΥ	15	100	-	-	X
ΠΑΦΟΣ	15	93,3	6,7	-	+/+

Πίνακας 4. Γενοτυπικές συχνότητες και αποκλίσεις από ισορροπία H-W, σύμφωνα με τα κριτήρια χ^2 και G^2 , για επίπεδο σημαντικότητας 5% που αφορούν στο 6^ο εξόνιο στα δείγματα ανθεκτικών εντόμων βιοδοκιμών.

ΔΕΙΓΜΑ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΤΟΜΩΝ	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ RR	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ RS	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ SS	H-W χ^2/G^2
ΑΓΓΛΙΣΙΔΕΣ	15	73,3	26,7	-	+/+
ΑΘΑΛΑΣΣΑ	15	66,7	33,3	-	+/+
ΑΛΑΜΙΝΟΣ	15	80	20	-	+/+
ΑΝΑΓΙΑ	15	93,3	6,7	-	+/+
ΔΕΥΤΕΡΑ	15	80	20	-	+/+
ΕΥΡΥΧΟΥ	15	93,3	6,7	-	+/+
ΖΥΓΙ	15	80	20	-	+/+
ΜΑΖΩΤΟΣ 2	15	73,3	26,7	-	+/+
ΜΕΝΕΟΥ	15	100	-	-	X
ΠΑΦΟΣ	15	93,3	6,7	-	+/+

Στους πίνακες 3 και 4 έχουμε δείγματα τα οποία περιέχουν μόνο ανθεκτικά έντομα σε υψηλές δόσεις εντομοκτόνου. Παρατηρούμε ότι οι συχνότητες των αλληλομόρφων για το 3^ο και το 6^ο εξόνιο ταυτίζονται. Όλα τα ανθεκτικά μας δείγματα αποτελούνται από τον ίδιο αριθμό ατόμων ενώ οι συχνότητες των ομοζυγωτών για την μετάλλαξη κυμαίνονται από 66,7-100%.

Ακολούθως, υπολογίστηκαν οι τιμές της παρατηρούμενης και της αναμενόμενης ετεροζυγωτίας (Πίνακες 5 και 6).

Πίνακας 5. Παρατηρούμενη και αναμενόμενη ετεροζυγωτία για το 3^ο και 6^ο εξόνιο που αφορά στα πλήρη δείγματα.

ΔΕΙΓΜΑ	3 ^ο ΕΞΟΝΙΟ		6 ^ο ΕΞΟΝΙΟ	
	ΠΑΡΑΤΗΡΟΥΜΕΝΗ ΕΤΕΡΟΖΥΓΩΤΙΑ	ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΗ ΕΤΕΡΟΖΥΓΩΤΙΑ	ΠΑΡΑΤΗΡΟΥΜΕΝΗ ΕΤΕΡΟΖΥΓΩΤΙΑ	ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΗ ΕΤΕΡΟΖΥΓΩΤΙΑ
ΔΡΕΠΑΝΟ	8,78	8,43	8,78	8,43
ΑΡΓΟΛΙΔΑ	0,00	0,00	0,00	0,00
ΚΑΤΕΡΙΝΗ	8,70	8,41	8,70	8,41
ΔΡΑΚΕΙΑ	33,33	28,74	20,00	18,62
ΙΕΡΑΠΕΤΡΑ	31,01	26,30	30,83	26,17
ΜΑΖΩΤΟΣ 1	15,09	14,09	15,09	14,09

Πίνακας 6. Παρατηρούμενη και αναμενόμενη ετεροζυγωτία για το 3^ο και 6^ο εξόνιο που αφορά στα δείγματα ανθεκτικών εντόμων βιοδοκιμών.

ΔΕΙΓΜΑ	3 ^ο ΕΞΟΝΙΟ		6 ^ο ΕΞΟΝΙΟ	
	ΠΑΡΑΤΗΡΟΥΜΕΝΗ ΕΤΕΡΟΖΥΓΩΤΙΑ	ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΗ ΕΤΕΡΟΖΥΓΩΤΙΑ	ΠΑΡΑΤΗΡΟΥΜΕΝΗ ΕΤΕΡΟΖΥΓΩΤΙΑ	ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΗ ΕΤΕΡΟΖΥΓΩΤΙΑ
ΑΓΓΛΙΣΙΔΕΣ	26,67	23,91	26,67	23,91
ΑΘΑΛΑΣΣΑ	33,33	28,74	33,33	28,74
ΑΛΑΜΙΝΟΣ	20,00	18,62	20,00	18,62
ΑΝΑΓΙΑ	6,67	6,67	6,67	6,67
ΔΕΥΤΕΡΑ	20,00	18,62	20,00	18,62
ΕΥΡΥΧΟΥ	6,67	6,67	6,67	6,67
ΖΥΓΙ	20,00	18,62	20,00	18,62
ΜΑΖΩΤΟΣ 2	26,67	23,91	26,67	23,91
ΜΕΝΕΟΥ	0,00	0,00	0,00	0,00
ΠΑΦΟΣ	6,67	6,67	6,67	6,67

Από τον Πίνακα 5 προκύπτει ότι η παρατηρούμενη ετεροζυγωτία για το τρίτο εξόνιο που αφορά στα πλήρη δείγματα κυμαίνεται από 0,00% για την Αργολίδα έως 33,33% για τη Δράκεια, ενώ η αναμενόμενη από 0,00% για την Αργολίδα μέχρι 28,74% για τη Δράκεια. Αντίστοιχα για το έκτο εξόνιο η παρατηρούμενη ετεροζυγωτία κυμαίνεται από 0,00% για την Αργολίδα έως 30,83% για την Ιεράπετρα και η αναμενόμενη από 0,00% για την Αργολίδα έως 26,17% για την Ιεράπετρα.

Στο Πίνακα 6 που αφορά στα δείγματα ανθεκτικών εντόμων βιοδοκιμών, και για τα δύο εξόνια η παρατηρούμενη ετεροζυγωτία κυμαίνεται από 0,00% για το δείγμα από Μενεού έως 33,33% για το δείγμα από Αθαλάσσα, ενώ για την αναμενόμενη ετεροζυγωτία οι τιμές κυμούνται από 0,00% για το δείγμα από Μενεού έως 28,74% για το δείγμα από Αθαλάσσα.

Στη συνέχεια, ελέγχθηκε η υπόθεση του κατά πόσο τα δείγματά μας μπορούν να αποτελούν κομμάτι ενός ομοιογενούς, παμμεικτικού πληθυσμού. Ο έλεγχος έγινε με το τεστ ομοιογένειας (homogeneity test), του προγράμματος Popgene (Yeh *et al.*, 1999). Το τεστ πραγματοποιήθηκε και για τα δύο εξόνια, αρχικά για όλα τα δείγματα μαζί, στη συνέχεια ξεχωριστά για τα δείγματα από Ελλάδα και από Κύπρο και τέλος για τα πλήρη δείγματα και τα δείγματα ανθεκτικών εντόμων βιοδοκιμών (επιλεγμένα). Στα τεστ αυτά

δεν περιλαμβάνονται τα εργαστηριακά δείγματα από Κρήτη. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 7.

Πίνακας 7. Τεστ ομοιογένειας μεταξύ των δειγμάτων σύμφωνα με τα κριτήρια χ^2 και G^2 , για επίπεδο σημαντικότητας 5% που αφορούν και στα δύο εξόνια.

	ΟΛΑ ΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ	ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΑΠΟ ΕΛΛΑΔΑ	ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΑΠΟ ΚΥΠΡΟ	ΠΛΗΡΗ ΔΕΙΓΜΑΤΑ	ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ
ΤΕΣΤ ΟΜ. 3 ^ο εξόνιο (χ^2/G^2)	-/-	-/-	+/+	-/-	+/+
ΤΕΣΤ ΟΜ. 6 ^ο εξόνιο (χ^2/G^2)	-/-	-/-	+/+	-/-	+/+

Τα αποτελέσματα αυτά μας δείχνουν ότι τα δείγματα από Κύπρο, καθώς και τα δείγματα ανθεκτικών εντόμων βιοδοκιμών (που αποτελούν επίσης συλλογές εντόμων από Κύπρο) εμφανίζουν ομοιογένεια μεταξύ τους και επομένως μπορούν να αποτελούν τμήμα ενός παμμεικτικού πληθυσμού. Αντίθετα, το τεστ ομοιογένειας για όλα τα δείγματα μαζί, για τα δείγματα από Ελλάδα και για τα πλήρη δείγματα απορρίπτει την συγκεκριμένη υπόθεση καταδεικνύοντας ότι τα δείγματα αυτά δεν μπορούν να θεωρηθούν ως τμήμα ενός παμμεικτικού πληθυσμού.

IV. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η ανθεκτικότητα του δάκου στα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα είναι ένα θέμα μείζονος οικονομικής σημασίας για τις περιοχές που καλλιεργείται η ελιά στις οποίες ανήκει και η χώρα μας. Η ανακάλυψη των μεταλλάξεων Gly488Ser και Ile214Val στο έκτο και τρίτο εξόνιο αντίστοιχα του γονιδίου της ακετυλοχολινεστεράσης του δάκου που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα (Vontas *et al.*, 2002) αποτέλεσε την αρχή μίας προσπάθειας εξιχνίασης των παραγόντων που οδηγούν στην ανθεκτικότητα. Το γεγονός αυτό είναι πολύ σημαντικό γιατί τα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα μέχρι πρότινος αποτελούσαν τον πιο αποτελεσματικό τρόπο καταπολέμησης του δάκου, ενώ αυτή τη στιγμή έχει μειωθεί σημαντικά η αποτελεσματικότητά τους και έχουμε οδηγηθεί στην αναζήτηση άλλων μεθόδων για την καταπολέμηση του δάκου. Ταυτόχρονα όμως γίνεται μία προσπάθεια εξιχνίασης των μηχανισμών της ανθεκτικότητας που θα μας βοηθήσει στην ορθολογικότερη χρήση των υπάρχοντων εντομοκτόνων ή την παρασκευή πιο αποτελεσματικών.

Στην παρούσα διπλωματική αναλύθηκαν συνολικά 578 άτομα δάκου, από διάφορες περιοχές της Ελλάδας και της Κύπρου, για την παρουσία των δύο συγκεκριμένων μεταλλάξεων. Τα αποτελέσματα από την ανάλυση αυτή έδειξαν ότι η μετάλλαξη ευνοήθηκε από την εξελικτική πίεση των εντομοκτόνων και σήμερα μπορούμε να πούμε ότι έχει εγκαθιδρυθεί στους πληθυσμούς του δάκου παντού, αφού το ποσοστό του ανθεκτικού αλληλομόρφου στα πλήρη δείγματα που εξετάστηκαν κυμαίνονταν, για το τρίτο εξόνιο από 83,33% στη Δράκεια έως 100% στην Αργολίδα, και για το έκτο εξόνιο από 84,59% στην Ιεράπετρα έως 100% στην Αργολίδα.

Αναλυτικότερα, παρατηρούμε ότι τα δείγματά μας, εκτός από αυτό της Ιεράπετρας, βρίσκονται σε ισορροπία κατά Hardy-Weinberg γεγονός που δείχνει ότι οι συχνότητες των αλληλομόρφων για τον συγκεκριμένο γενετικό τύπο δεν αλλάζουν από γενιά σε γενιά. Το δείγμα της Ιεράπετρας βρίσκεται εκτός ισορροπίας κατά Hardy-Weinberg και για τις δύο μεταλλάξεις. Αυτό συμβαίνει γιατί ενώ οι συχνότητες των ετεροζυγωτών για τη μετάλλαξη δείχνουν ότι θα έπρεπε για καθένα από τα δύο εξόνια να υπάρχουν τρία ομόζυγα άτομα για το αλληλόμορφο αγρίου τύπου, αυτά δεν εμφανίζονται στο δείγμα μας. Αυτό δικαιολογείται γιατί κάτω από την εξελικτική πίεση των εντομοκτόνων ο φαινότυπος των ομόζυγων ατόμων για το αλληλόμορφο

αγρίου τύπου είναι ευπαθής ενώ των ετεροζυγωτών προσδίδει ένα βαθμό ανθεκτικότητας.

Το γεγονός ότι στο εργαστηριακό δείγμα δεν υπάρχει καθόλου η μετάλλαξη μπορεί να ερμηνευθεί με δύο τρόπους. Ο ένας είναι απόρροια του γεγονότος ότι τα άτομα αυτά συλλέχθηκαν από τον αγρό πριν από περίπου είκοσι χρόνια. Την εποχή εκείνη η ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα δεν είχε πάρει τόσο μεγάλη έκταση όσο στις μέρες μας, και ως εκ τούτου είναι πιθανόν τα έντομα αυτά να μην είχαν ποτέ τις μεταλλάξεις που εξετάζουμε. Ο άλλος είναι ότι ακόμα και αν κάποια από αυτά είχαν τις μεταλλάξεις που συζητάμε, στο περιβάλλον του εργαστηρίου όπου αναπτύχθηκαν, δεν τους προσέδιδαν κανένα εξελικτικό πλεονέκτημα (μπορεί μάλιστα να αποτελούσαν μειονέκτημα κάτω από αυτές τις συνθήκες) κι έτσι χάθηκαν με το πέρασμα από τη μία γενιά στην άλλη. Σε κάθε περίπτωση όμως επιβεβαιώνεται η αρχική παρατήρηση ότι οι μεταλλάξεις αυτές ευνοούνται στον αγρό λόγω της ανθεκτικότητας που προσδίδουν στα έντομα απέναντι στα εντομοκτόνα.

Μία ακόμη αξιολογη παρατήρηση που προκύπτει από την ανάλυση των αποτελεσμάτων μας είναι ότι τα άτομα που φέρουν τη μετάλλαξη στο τρίτο εξόνιο την έχουν ταυτόχρονα και στο έκτο σε ένα ποσοστό περίπου 70%, ενώ για δείγματα ανθεκτικών εντόμων βιοδοκιμών (Skouras *et al.*, 2007) το ποσοστό αυτό είναι 100%. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνει το ότι ενώ η παρουσία της μετάλλαξης στο τρίτο εξόνιο του γονιδίου της ακετυλοχολινεστεράσης προσδίδει χαμηλά επίπεδα ανθεκτικότητας στα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα από μόνη της, η παρουσία και των δύο προσδίδει ακόμα μεγαλύτερα επίπεδα ανθεκτικότητας (Vontas *et al.*, 2002).

Επίσης, συγκρίνοντας τα αποτελέσματα από τα πλήρη δείγματα με αυτά από τα δείγματα ανθεκτικών εντόμων βιοδοκιμών θα περιμέναμε να δούμε σημαντικές αποκλίσεις. Τα δείγματα ανθεκτικών εντόμων βιοδοκιμών (Skouras *et al.*, 2007), που αποτελούνται μόνο από άτομα που παρέμεναν ζωντανά σε υψηλές δόσεις οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων (ανθεκτικά), θα έπρεπε να έχουν τις μεταλλάξεις σε μεγαλύτερα ποσοστά από ότι τα πλήρη δείγματα, που αποτελούνται και από νεκρά (άρα ευπαθή) και από ζωντανά (ανθεκτικά) άτομα. Παρόλα αυτά όμως βλέπουμε ότι τα ποσοστά των μεταλλαγμένων αλληλομόρφων είναι παρόμοια στις δύο αυτές κατηγορίες που εξετάστηκαν. Το γεγονός αυτό μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι ενώ

αρχικά η εμφάνιση των συγκεκριμένων μεταλλάξεων στο γονιδιακό τόπο της ακετυλοχολινεστεράσης προσέδωσαν πλεονέκτημα στα άτομα που τις είχαν, στη συνέχεια, προστέθηκαν και άλλοι παράγοντες (νέες μεταλλάξεις στο γονίδιο της ακετυλοχολινεσταράσης ή σε άλλους γονιδιακούς τόπους) που συνεισφέρουν στην ανθεκτικότητα υψηλών δόσεων οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων, καταδεικνύοντας την εμπλοκή και άλλων μηχανισμών ανθεκτικότητας. Μερικοί από αυτούς είναι ήδη γνωστό ότι προσδίδουν ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα σε άλλα έντομα, όπως στα είδη *Nephotettix cincticeps* και *Boophilus microplus* όπου παρατηρήθηκαν φαινότυποι ανθεκτικών ακετυλοχολινεστερασών που προέκυπταν από εναλλακτικό μάτισμα στο ίδιο το γονίδιο της ακετυλοχολινεστεράσης (Baxter & Barker, 1998; Tomita *et al.*, 2000). Επίσης, είναι πιθανόν να εμπλέκονται στην υπόθεση της ανθεκτικότητας και άλλες μεταλλάξεις στο γονιδιακό τόπο της ακετυλοχολινεστεράσης ή μεταλλάξεις στα γονίδια των εστερασών του δάκου, όπως έχει παρατηρηθεί και στα κουνούπια του γένους *Culex* και *Anopheles* (Hemingway *et al.*, 1998).

Παρόμοια με τη δική μας ανάλυση με μικρότερο αριθμό ατόμων ανά δείγμα, αλλά πιο εκτεταμένη γεωγραφικά έχει γίνει από τους Hawkes *et al.*, (2005) και Nardi *et al.*, (2006). Και στις δύο αυτές αναφορές παρατηρούμε ότι για τις περιοχές της Ελλάδας και της Ιταλίας οι μεταλλάξεις που εξετάζουμε υπάρχουν σε όλα τα έντομα και σε ποσοστά μεγαλύτερα του 60% (έως και 100%). Σε δείγματα από Γαλλία και Τουρκία καθώς και σε δύο δείγματα από την Αμερικανική ήπειρο το ποσοστό των μεταλλάξεων βρέθηκε αρκετά μειωμένο (10-50% και 30-40% αντίστοιχα). Τέλος, σε δείγματα από Ισπανία και Αφρική δεν βρέθηκε καμία από τις δύο οι μεταλλάξεις. Τα αποτελέσματά μας από Ελλάδα συμφωνούν με τα αποτελέσματα αυτών των μελετών, ενώ τα αποτελέσματα της ανάλυσης των δειγμάτων από Κύπρο δείχνουν μεγαλύτερη ομοιότητα με τα Ελληνικά και τα Ιταλικά.

V. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Baxter, G.D. and Barker, S.C. (1998) Acetylcholinesterase cDNA of cattle tick, *Boophilus microplus*: characterization and role in organophosphate resistance. *Insect Biochem Mol Biol* **28**: 581–589.
- Boublik Yv., Saint-Aguet P., Lougarre An., Arnaud M., Villate F., Estrada-Mondaca S., Fournier D., Acetylcholinesterase engineering for detection of insecticide residues (2002).
- Chen, Z.Z., Newcomb, R., Forbes, E., McKenzie, J. and Batterham, P. (2001) The acetylcholinesterase gene and organophosphorus resistance in the Australian sheep blowfly, *Lucilia cuprina*. *Insect Biochem Mol Biol* **31**: 805–816.
- Corbett, J.R. (1974) The Biochemical Mode of Action of Pesticides, pp. 102–130. Academic Press, London, UK.
- Devonshire, L., Byrne, F.J., Moores, G.D. and Williamson, M.S. (1998) Biochemical and molecular characterisation of insecticide-insensitive acetylcholinesterases in resistant insects. In *Structure and Function of Cholinesterases and Related Proteins* (Doctor, B.P., Taylor, P., Quinn, D.M., Rotundo, R.L. and Gentry, M.K., eds), pp. 491–496. Plenum Press, New York.
- Drew RAI (1989) The tropical Fruit Flies (Diptera: Tephritidae: Dacinae) of the Australasian and Oceanic regions. *Mem. Queensl. Mus*, **26**: 1-521.
- Drew RAI and Hancock DL (1994) The *Bactrocera dorsalis* complex of fruit flies in Asia. *Bulletin of Entomological Research*, **2**: 1-68.
- Drew RAI and Hancock DL (2000) Phylogeny of the tribe Dacini based on morphological, distributional and biological data. In: *Fruit Flies (Tephritidae): Phylogeny and Evolution of Behavior*. CRC Press, Boca Raton, FL, 491-504.
- Harel, M., Kryger, G., Rosenberry, T.L., Mallender, W.D., Lewis, T., Fletcher, R.J., Guss, J.M., Silman, I. and Sussman, J.L. (2000) Three-dimensional structures of *Drosophila melanogaster* acetylcholinesterase and its complexes with two potent inhibitors. *Prot Sci* **9**: 1063–1072.
- Hawkes, N.J., Janes, R.W., Hemingway, J., Vontas, J., (2005) Detection of resistance-associated point mutations of organophosphate-insensitive acetylcholinesterase in the olive fruit fly, *Bactrocera oleae* (Gmelin). *Pesticide Biochemistry and Physiology*. **81** (3): 154-163 MAR.

- Hemingway, J., Hawkes, N., Prapanthadara, L., Jayawardenal, KG, Ranson, H., (1998). The role of gene splicing, gene amplification and regulation in mosquito insecticide resistance. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. October 29; 353(1376): 1695–1699.
- Katsoyannos P. (1992) *Olive pests and their control in the Near East*. FAO Plant Production and Protection Paper No115, FAO Rome.
- Koukidou, M., Klinakis, A., Reboulakis, C., Zagoraiou, L., Tavernarakis, N., Livadaras, I., Economopoulos, A. and Savakis, C. (2006) Germ line transformation of the olive fly *Bactrocera oleae* using a versatile transgenesis marker, *Insect Molecular Biology* 15(1), 95–103.
- Kozaki, T., Shono, T., Tomita, T. and Kono, Y. (2001) Fenitroxon insensitive acetylcholinesterases of the housefly, *Musca domestica* associated with point mutations. *Insect Biochem Mol Biol* 31: 991–997.
- Laird, P., Zijderveld, Al., Linders, K., Rudnicki, M., Jaenisch, R. and Berns, An. (1991) Simplified mammalian DNA isolation procedure, *Oxford University Press, Nucleic Acids Research*, Vol. 19, No. 15 4293.
- Mutero, A., Pralavorio, M., Bride, J.M. and Fournier, D. (1994) Resistance-associated point mutations in insecticide-insensitive acetylcholinesterase. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 5922–5926.
- Nardi, F., Carapelli, A., Vontas, J. G., Dallai, R., Roderick, G. K. and Frati F. (2006) Geographical distribution and evolutionary history of organophosphate-resistant Ace alleles in the olive fly (*Bactrocera oleae*). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 36 593–602.
- Skouras, P.J., Margaritopoulos, J.T., Seraphides, N.A., Ioannides, I.M., Kakani, E.G., Mathiopoulos, K.D. and Tsitsipis, J.A. (2007) Organophosphate resistance in olive fruit fly, *Bactrocera oleae*, populations in Greece and Cyprus. Society of Chemical Industry. *Pest Manag Sci* 63:42–48.
- Stansfield, W.D., (1983) *Schaum's Outline of Theory and Problem's of GENETICS*. MCGRAW-HILL, NEW YORK. (Μετάφραση: Καστρίτσης, Κ.Δ., Φώλιας, Ευθ.Δ., (1987) Γενετική. ΕΣΠΙ, ΑΘΗΝΑ.
- Tomita, T., Hidoh, O. and Yoshiaki, K. (2000) Absence of protein polymorphism attributable to insecticide insensitivity of acetyl-

- cholinesterase in the green rice leafhopper, *Nephotettix cincti-ceps*. *Insect Biochem Mol Biol* **30**: 325–333.
- Vaughan, A., Rocheleau, T. and French-Constant, R. (1997) Site-directed mutagenesis of an acetylcholinesterase gene from the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* confers insecticide insensitivity. *Exper Parasit* **87**: 237–244.
- Villatte, F., Ziliani, P., Marcel, V., Menozzi, P. and Fournier, D. (2000) A high number of mutations in insect acetylcholinesterase may provide insecticide resistance. *Pestic Biochem Physiol* **67**: 95–102.
- Vontas, J.G., Cosmidis, N., Loukas, M., Tsakas, S., Hejazi, Ayoutanti, A. and Hemingway, J. (2001) Altered Acetylcholinesterase confers organophosphate resistance in *Bactrocera oleae*. *Pestic Biochem Physiol* **71**: 124–132.
- Vontas, J. G., Hejazi, M. J., Hawkes, N. J., Cosmidis, N., Loukas, M. and Hemingway, J. (2002) Resistance-associated point mutations of organophosphate insensitive acetylcholinesterase, in the olive fruit fly *Bactrocera oleae*. *Insect Molecular Biology* **11**(4), 329–336.
- Vossen P., Valera L., Devarenne AI., Olive fruit fly (2004).
- Walsh, S.B., Dolden, T.A., Moores, G.D., Kristensen, M., Lewis, T., Devonshire, A.L. and Williamson, M.S. (2001) Identification and characterization of mutations in housefly (*Musca domestica*) acetylcholinesterase involved in insecticide resistance. *Biochem J* **359**: 175–181.
- White IM and Elson-Harris MM (1992) Fruit flies of economic significance: their identification and bionomics. *CAB International*, Wallingford, UK.
- Yeh, F.C., Boyle, T., Rongcai, Y., Ye, Z. & Xiyan, J.M. (1999). POPGENE VERSION 1.31 Microsoft Window-based Freeware for Population Genetic Analysis. <http://www.ualberta.ca/~fyeh/>.
- Zhu, K.Y., Lee, S.H. and Clark, M. (1996) A point mutation of acetylcholinesterase associated with azinphosmethyl resistance and reduced fitness in colorado potato beetle. *Pestic Biochem Physiol* **55**: 100–108.

VI. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πίνακας 1: Κατάλογος που περιλαμβάνει τα πλήρη δείγματα, περιοχή προέλευσης και γενότυποι για το 3^ο και 6^ο εξόνιο (R: resistant, S: susceptible).

ΠΕΡΙΟΧΗ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ	ΔΕΙΓΜΑ	ΕΞΟΝΙΟ 3	ΕΞΟΝΙΟ 6
ΑΡΓΟΛΙΔΑ	243	RR	RR
	244	RR	RR
	342	RR	RR
	345	RR	RR
	346α	RR	RR
	346β	RR	RR
	347	RR	RR
	349	RR	RR
	350	RR	RR
	351	RR	RR
	352	RR	RR
	353	RR	RR
	355	RR	RR
	357	RR	RR
	358	RR	RR
	359	RR	RR
	360	RR	RR
	361	RR	RR
	362	RR	RR
	364	RR	RR
	365	RR	RR
	366	RR	RR
	367	RR	RR
368	RR	RR	
369	RR	RR	
373	RR	RR	
ΔΡΑΚΕΙΑ	23	RR	RR
	26	RR	RR
	27	RS	RR
	28	RS	RS
	29	RR	RS
	30	RR	RR
	31	RS	RR
	32	RR	RR
	33	RS	RS
	34	RS	RR
	35	RR	RR
	36	RR	RR
	37	RR	RR
38	RR	RR	
39	RR	RR	
ΔΡΕΠΙΑΝΟ	1	RR	RR
	2	RR	RR
	3	RR	RR
	4	RR	RR
	5	RR	RR
	6	RR	RR
	7	RR	RR
	8	RR	RR
	9	RR	RR
	11	RR	RR
12	RR	RR	

	13	RR	RR
	14	RR	RR
	15	RR	RR
	16	RR	RR
	17	RR	RR
	18	RR	RR
	19	RR	RR
	21	RR	RR
	22	RR	RR
	23	RR	RR
	24	RR	RR
	25	RR	RR
	26	RR	RR
	27	RR	RR
	28	RR	RR
	29	RR	RR
	30	RR	RR
	31	RS	RS
	32	RR	RR
	33	RR	RR
	34	RR	RR
	35	RR	RR
	36	RR	RR
	37	RR	RR
	38	RR	RR
	39	RR	RR
	40	RR	RR
	41	RR	RR
	42	RR	RR
	43α	RS	RS
	43β	RR	RR
	44	RR	RR
	45	RR	RR
	46	RR	RR
	47	RR	RR
	48	RR	RR
	49	RR	RR
	50	RR	RR
	51	RR	RR
	52	RR	RR
	53	RR	RR
	54	RR	RR
	55	RR	RR
	56	RR	RR
	57	RR	RR
	58	RR	RR
	59	RS	RS
	60	RS	RS
	61	RR	RR
	62	RR	RR
	63	RR	RR
	64α	RR	RR
	64β	RR	RR
	65	RR	RR
	66	RR	RS
	67	RR	RR
	68	RR	RR
	69	RR	RR

ΔΡΕΠΑΝΟ

	70	RR	RR
	71	RR	RR
	72	RR	RR
	73	RR	RR
	74	RR	RR
	75	RR	RR
	77	RR	RR
	78	RR	RR
	79	RR	RR
	80	RR	RR
	81	RR	RR
	82	RS	RS
	83α	RS	RS
	83β	RR	RR
	84	RS	RS
	85	RR	RR
	86	RR	RR
	87α	RR	RR
	87β	RR	RR
	88	RR	RR
	89	RS	RS
	90	RR	RR
	92	RR	RR
	95	RR	RR
	96	RR	RR
	97	RR	RR
	98	RR	RR
	99	RS	RS
	100	RR	RR
	101	RR	RR
	102	RS	RS
	103	RR	RR
	104	RR	RR
	108	RR	RR
	109	RR	RR
	110	RR	RR
	111	RR	RR
	112	RR	RR
	113	RR	RR
	114	RR	RR
	115	RR	RR
	116	RR	RR
	117	RR	RR
	118	RR	RR
	119	RR	RR
	121	RR	RR
	122	RR	RR
	123	RR	RR
	124	RR	RS
	125	RS	RR
	126	RR	RR
	127	RR	RR
	128	RS	RR
	129	RR	RR
	130	RR	RR
	131	RR	RR
	132	RR	RR
	133	RR	RR

ΔΡΕΠΑΝΟ

ΔΡΕΠΑΝΟ	134	RR	RR	
	135	RR	RR	
	136	RR	RR	
	137	RR	RR	
	138	RR	RR	
	139	RR	RR	
	141	RR	RR	
	142	RR	RR	
	143	RR	RR	
	144	RR	RR	
	145	RR	RR	
	146α	RR	RR	
	146β	RR	RR	
	147	RR	RR	
	148	RR	RR	
	149	RR	RR	
	150	RR	RR	
	151	RR	RR	
	152	RR	RR	
	153	RR	RR	
	168	RR	RR	
	134	RR	RR	
	135	RR	RR	
	136	RR	RR	
	ΙΕΡΑΠΕΤΡΑ	1	RS	RS
		2	RS	RS
3		RS	RR	
4		RR	RR	
5		RR	RR	
6		RR	RR	
7		RR	RR	
8		RR	RR	
9		RR	RR	
10		RR	RR	
11		RR	RR	
12		RR	RR	
13		RR	RR	
14		RS	RS	
15		RS	RS	
16		RR	RR	
17		RR	RS	
18		RR	RR	
19		RR	RS	
20		RR	RR	
21		RR	RR	
22		RR	RR	
23		RS	RS	
24		RS	RS	
25		RR	RR	
26		RR	RR	
27		RR	RR	
28		RR	RR	
29		RR	RS	
30		RS	RS	
31		RR	RS	
32		RS	RR	
33		RR	RR	
34		RR	RR	

	35	RR	RR
	36	RR	RR
	37	RR	RR
	38	RR	RR
	39	RS	RR
	40	RR	RR
	41	RR	RR
	42	RS	RS
	43	RS	RS
	44	RS	RS
	45	RR	RR
	46	RS	RR
	47	RR	RR
	48	RR	RR
	49	RR	RR
	50	RR	RR
	51	RR	RR
	52	RR	RR
	53	RR	RR
	54	RS	RS
	55	RR	RR
	56	RR	RR
	57	RR	RR
	58	RS	RS
	59	RR	RR
	60	RS	RS
	61	RR	RR
	62	RR	RR
	63	RR	RR
	64	RR	RR
	65	RR	RS
	67	RR	RR
	68	RS	RS
	69	RR	RR
	70	RS	RS
	71	RR	RR
	72	RS	RS
	73	RR	RR
	74	RR	RR
	75	RS	RS
	76	RR	RR
	77	RR	RR
	78	RS	RS
	79	RS	RS
	80	RR	RR
	81	RR	RR
	82	RS	RS
	83	RS	RS
	84	RS	RS
	85	RS	RS
	86	RS	RS
	87	RS	RS
	88	RR	RR
	89	RR	RR
	90	RR	RR
	91	RS	RS
	92	RR	RR
	93	RR	RR

ΙΕΡΑΠΕΤΡΑ

ΙΕΡΑΠΕΤΡΑ	94	RR	RR
	95	RR	RR
	96	RR	RR
	97	RR	RR
	98	RR	RR
	99	RR	RR
	100	RS	RS
	101	RR	RR
	102	RR	RR
	103	RS	
	104	RS	
	105	RR	RR
	106	RR	RR
	107	RR	RR
	108	RR	RR
	109	RR	RR
	110	RR	RR
	111	RS	RS
	112	RR	
	113	RR	RR
	114	RR	RR
	115	RR	RR
	116	RR	RR
	117	RR	RR
	118	RS	RS
	119	RR	RR
	120	RR	RR
	121	RR	
	124	RR	RR
	125	RR	RR
	126	RS	RS
	127	RR	RR
	128	RS	RS
	129	RR	RR
	130	RR	RR
	131	RR	RR
132	RS	RS	
133	RS	RS	
134	RS	RS	
135	RS	RS	
136	RR	RR	
ΚΑΤΕΡΙΝΗ	1	RR	RR
	2	RR	RR
	3	RR	RR
	4	RR	RR
	5	RR	RR
	6	RR	RR
	7	RS	RS
	8	RR	RR
	9	RR	RR
	10	RR	RR
	11	RR	RR
	12	RR	RR
	13	RR	RR
	14	RR	RR
	15	RR	RR
	16	RR	RR
	17	RR	RR

ΚΑΤΕΡΙΝΗ	19	RR	RR
	20	RR	RR
	21	RR	RR
	22	RR	RR
	23	RR	RR
	24	RR	RR
	25	RS	RS
	26	RR	RR
	27	RR	RR
	28	RR	RR
	29	RR	RR
	31	RR	RR
	32	RR	RR
	33	RR	RR
	34	RR	RR
	35	RR	RR
	36	RR	RR
	37	RR	RR
	38	RR	RR
	39	RR	RR
	40	RS	RS
	41	RR	RR
	42	RR	RR
	43	RR	RR
	44	RR	RR
	45	RR	RR
	46	RR	RR
	47	RS	RS
	48	RR	RR
ΜΑΖΟΤΟΣ 1	1	RR	RR
	2	RR	RR
	3	RR	RR
	4	RR	RR
	5	RR	RR
	6	RR	RR
	7	RR	RR
	8	RR	RR
	9	RR	RR
	10	RR	RR
	11	RR	RR
	12	RR	RR
	13	RR	RR
	14	RR	RR
	15	RR	RR
	16	RR	RR
	17	RS	RS
	18	RR	RR
	19	RR	RR
	20	RR	RR
	21	RR	RR
	22	RR	RR
	23	RR	RR
	24	RR	RR
	25	RR	RR
	26	RR	RR
	27	RR	RR
	28	RR	RR
	29	RR	RR

ΜΑΖΟΤΟΣ 1	30	RS	RS
	31	RR	RR
	32	RR	RR
	33	RS	RS
	34	RR	RR
	35	RR	RR
	36	RS	RS
	37	RR	RR
	38	RR	RR
	39	RS	RS
	40	RR	RR
	41	RS	RS
	42	RR	RR
	43	RR	RR
	44	RR	RR
	45	RR	RR
	46	RR	RR
	47	RR	RR
	48	RR	RR
	49	RS	RS
	50	RS	RS
	51	RR	RR
	52	RR	RR
	53	RR	RR
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΚΡΗΤΗΣ	> 1	SS	SS
	> 2	SS	SS
	> 3	SS	SS
	> 5		SS
	> 6	SS	SS
	+ 1	SS	SS
	+ 2	SS	SS
	+ 3	SS	SS
+ 6		SS	

Πίνακας 2: Κατάλογος των δειγμάτων ανθεκτικών εντόμων βιοδοκιμών, περιοχή προέλευσης και γενότυποι για το 3^ο και 6^ο εξόνιο.

ΠΕΡΙΟΧΗ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ	ΔΕΙΓΜΑ	ΕΞΟΝΙΟ 3	ΕΞΟΝΙΟ 6
ΑΓΛΙΣΙΔΕΣ	106	RR	RR
	107	RS	RS
	108	RS	RS
	109	RR	RR
	110	RR	RR
	111	RR	RR
	112	RS	RS
	113	RS	RS
	114	RR	RR
	115	RR	RR
	116	RR	RR
	117	RR	RR
	118	RR	RR
	119	RR	RR
	120	RR	RR

ΑΘΑΛΑΣΣΑ	136	RR	RR
	137	RR	RR
	138	RR	RR
	139	RS	RR
	140	RR	RR
	141	RR	RR
	142	RS	RS
	143	RR	RR
	144	RR	RR
	145	RS	RS
	146	RS	RS
	147	RR	RS
	148	RR	RR
	149	RR	RR
	150	RS	RS
ΑΛΑΜΙΝΟΣ	76	RS	RS
	77	RR	RR
	78	RR	RR
	79	RR	RR
	80	RS	RS
	81	RS	RS
	82	RR	RR
	83	RR	RR
	84	RR	RR
	85	RR	RR
	86	RR	RR
	87	RR	RR
	88	RR	RR
	89	RR	RR
	90	RR	RR
ΑΝΑΓΙΑ	166	RR	RR
	167	RR	RR
	168	RS	RS
	169	RR	RR
	170	RR	RR
	171	RR	RR
	172	RR	RR
	173	RR	RR
	174	RR	RR
	175	RR	RR
	176	RR	RR
	177	RR	RR
	178	RR	RR
	179	RR	RR
	180	RR	RR
ΔΕΥΤΕΡΑ	151	RR	RR
	152	RR	RR
	153	RR	RR
	154	RR	RR
	155	RR	RR
	156	RS	RS
	157	RR	RR
	158	RR	RR
	159	RR	RR
	160	RR	RR
	161	RR	RR
	162	RR	RR
	163	RS	RS

ΔΕΥΤΕΡΑ	164	RS	RS
	165	RR	RR
ΕΥΡΥΧΟΥ	61	RR	RR
	62	RR	RR
	63	RR	RR
	64	RR	RR
	65	RR	RR
	66	RR	RR
	67	RR	RR
	68	RR	RR
	69	RR	RR
	70	RR	RR
	71	RR	RR
	72	RR	RR
	73	RR	RR
	74	RR	RR
	75	RS	RS
ΖΥΓΙ	1	RR	RR
	2	RS	RS
	3	RR	RR
	4	RS	RS
	5	RR	RR
	6	RR	RR
	7	RS	RS
	8	RR	RR
	9	RR	RR
	10	RR	RR
	11	RR	RR
	12	RR	RR
	13	RR	RR
	14	RR	RR
	15	RR	RR
ΜΑΖΟΤΟΣ 2	16	RS	RS
	17	RR	RR
	18	RS	RS
	19	RR	RR
	20	RR	RR
	21	RR	RR
	22	RR	RR
	23	RR	RR
	24	RR	RR
	25	RR	RR
	26	RS	RS
	27	RS	RS
	28	RR	RR
	29	RR	RR
	30	RR	RR
ΜΕΝΕΟΥ	47	RR	RR
	48	RR	RR
	49	RR	RR
	50	RR	RR
	51	RR	RR
	52	RR	RR
	53	RR	RR
	54	RR	RR
	55	RR	RR
56	RR	RR	
57	RR	RR	

ΜΕΝΕΟΥ	58	RR	RR
	59	RR	RR
	60	RR	RR
ΠΑΦΟΣ	121	RR	RR
	122	RR	RR
	123	RS	RS
	124	RR	RR
	125	RR	RR
	126	RR	RR
	127	RR	RR
	128	RR	RR
	129	RR	RR
	130	RR	RR
	131	RR	RR
	132	RR	RR
	133	RR	RR
	134	RR	RR
	135	RR	RR

