



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**«Κλωνοποίηση γενετικών τύπων που εμπλέκονται στην ανθεκτικότητα
στο**

spinosa στο Δάκο της ελιάς»



ΣΑΡΡΗΓΕΩΡΓΙΟΥ ΙΩΑΝΝΗΣ

ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2014

**«Κλωνοποίηση γενετικού τόπου που εμπλέκεται στην
ανθεκτικότητα στο spinosad στο Δάκο της ελιάς, *Bactrocera
oleae* »**

**«Cloning of locus involved in spinosad resistance in olive fruit
fly, *Bactrocera oleae*»**

ΣΑΡΡΗΓΕΩΡΓΙΟΥ ΙΩΑΝΝΗΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Μαθιόπουλος Κωνσταντίνος: Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας

Καρπούζας Δημήτριος: Επίκουρος καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας

Τσουμάνη Κωσταντίνα: Δρ Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστημιακή Υπότροφος ανάθεσης διδακτικού έργου.

Περίληψη

Το έντομο, *Bactocera oleae*, αποτελεί ένα από τα πιο καταστρεπτικά παρασιτικά έντομα που προσβάλλουν τον καρπό της ελιάς. Η καταπολέμηση του είδους περιλαμβάνει μεθόδους βιολογικής και χημικής καταπολέμησης με συμβατικά εντομοκτόνα όπως οργανοφωσφορικά και πυρεθροειδή. Μια νέα τάξη εντομοκτόνων φιλικότερων προς το περιβάλλον είναι οι νατουραλίτες με κύριο εκπρόσωπό τους το *spinosad*. Η χρήση του εντομοκτόνου στους αγρούς αναμφίβολα, όπως συμβαίνει με όλα τα εντομοκτόνα προάγει την εκδήλωση ανθεκτικότητας. Μεταλλάξεις στην υπομονάδα *ab* του νικοτινικού υποδοχέα της ακετυλοχολίνης έχουν βρεθεί να σχετίζονται με την εμφάνιση υψηλής ανθεκτικότητας στο *spinosad* σε κάποια συγγενικά είδη όπως *B. Dorsalis*. Επίσης σε περιπτώσεις μερικής ανθεκτικότητας έχουν σημειωθεί τροποποιήσεις (up & down regulation) στην έκφραση γονιδίων των οποίων οι πρωτεΐνες εμπλέκονται σε μεταβολικές διαδικασίες όπως κυτοχρώματα και διάφορα ισοένζυμα.

Στη παρούσα πτυχιακή ενισχύσαμε την 5' και 3' αμετάφραστη περιοχή του νικοτινικού υποδοχέα της ακετυλοχολίνης στον ευαίσθητο εργαστηριακό πληθυσμό και αλληλουχήσαμε το γονίδιο της *ab* υπομονάδας του ανθεκτικού εργαστηριακού πληθυσμού. Σύγκριση των υπομονάδων των δυο πληθυσμών (ευαίσθητου και εργαστηριακού) έδειξε μεγάλη ομολογία σε νουκλεοτιδικό επίπεδο ενώ σε πρωτεϊνικό επίπεδο εντοπίστηκαν τρεις αλλαγές αμινοξέων οι οποίες όμως δεν επιφέρουν αλλαγές στη δομή ή στη λειτουργία της πρωτεΐνης. Συμπερασματικά, η *ab* υπομονάδα του νικοτινικού υποδοχέα φαίνεται να μην διαδραματίζει ρόλο στην ανθεκτικότητα του εργαστηριακού μας πληθυσμού ο οποίος και φαίνεται να εμφανίζει μικρή ανθεκτικότητα έναντι του εντομοκτόνου. Η ανθεκτικότητα στον εργαστηριακό πληθυσμό μπορεί να οφείλεται σε αύξηση της δράσης των ενζύμων του μεταβολισμού που φαίνεται να δρουν σαν πρώτο «κύμα» άμυνας για αποτοξικοποίηση του οργανισμού του εντόμου.

Abstract

The olive fly, *Bactrocera oleae*, is the most destructive pest of cultivated olives. Its control has been traditionally based on insecticides, mainly organophosphates and pyrethroids. A new generation insecticide, spinosad, has been used against the olive fly in the recent years. Spinosad is a naturalyte insecticide friendly to the environment but prolonged application is expected to lead to resistance. Mutations in the $\alpha 6$ subunit of the nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) have been implicated in spinosad resistance in relative species like *Bactrocera Dorsalis*.

In the present study we, first, amplified the 5' UTR and the 3' UTR of $\alpha 6$ subunit nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) gene from the susceptible laboratory strain and second, we cloned the $\alpha 6$ -subunit of the nAChR from the spinosad selected resistant line. Nucleotide comparison between the sensitive and the resistant genes showed high similarity while protein comparison showed differences reflected to three conserved amino acid changes. The observed nucleotide differences in the nAChR- $\alpha 6$ subunit between the sensitive and spinosad resistant olive fly strains implicating that additional mechanisms involving enhanced metabolism of detoxification enzymes (such as P450 monooxygenases or mixed function oxidases) may be responsible for spinosad resistance in the laboratory strain.

1. Εισαγωγή

1.1 *Bactrocera oleae*. (Diptera: Tephritidae)

Ο δάκος της ελιάς, *Bactrocera oleae*, είναι από τα πιο σημαντικά και ιδιαίτερα καταστρεπτικά γεωργικά έντομα, προκαλώντας την σημαντική οικονομική ζημία στις καλλιέργειες της ελιάς. Είναι ένα ολομετάβολο έντομο που ανήκει στην οικογένεια *Tephritidae* (τάξη: Δίπτερα). Το έντομο αφθονεί στις ελαιοπαραγωγικές περιοχές της μεσογειακής λεκάνης και οι ζημιές που προκαλεί κυμαίνονται ανάλογα με τη περιοχή. Στις χώρες της Β. Αφρικής οι ζημιές είναι ασήμαντες λόγω υψηλών θερμοκρασιών και υψηλού παρασιτισμού ενώ ακολουθεί με αύξουσα σειρά ζημιών η Ισπανία, η Ιταλία και η Ελλάδα. Η ζημία προέρχεται από την προνύμφη του δάκου η οποία αναπτύσσεται μέσα στον ελαιόκαρπο καθώς και στα νύγματα που σχηματίζονται όταν το ενήλικο έντομο τοποθετεί τα αβγά του. Τα νύγματα αυτά αποτελούν πηγές σήψεις (ξεροβούλα ή σαποβούλα) που προκαλούν πτώση τόσο σε άγουρους όσο και σε ώριμους καρπούς (Πελεκάσης 1980). Με αυτό τον τρόπο προκαλείται σοβαρή ποιοτική υποβάθμιση αφού οι ελαιοποιήσιμες ελιές δίνουν λάδι με αυξημένη οξύτητα ενώ οι επιτραπέζιες χάνουν την εμπορική τους αξία.

Ο δάκος είναι έντομο μονοφάγο και για τον λόγο αυτό η εξάπλωσή του περιορίζεται στις ζώνες καλλιέργειας της ελιάς που παραδοσιακά ήταν η λεκάνη της Μεσογείου. Σήμερα, όμως, η καλλιέργεια της ελιάς εκτείνεται πλέον και σε περιοχές όπως η Νότια Αφρική, η Αυστραλία, η Κίνα και η Αμερική.

Στην Ελλάδα, οι απώλειες μπορούν να φτάσουν και το 30-40% της παραγωγής (Economopoulos, 1979), η συνδυασμένη δράση των εντομοκτόνων όμως τις κρατά στο επίπεδο του 5% (Nardi et al, 2005). Από την άλλη, η χρήση των εντομοκτόνων έχει τις γνωστές αρνητικές συνέπειες τόσο στην ποιότητα του προϊόντος όσο και στο περιβάλλον. Εξαιτίας, ακριβώς της ιδιαίτερης δυσκολίας ως προς την αντιμετώπισή του και του μεγάλου μεγέθους των ζημιών που προκαλούνται από αυτήν, καταβάλλονται πολυετείς και επίπονες προσπάθειες για την ανακάλυψη νέων, βελτιωμένων μεθόδων για την καταπολέμηση του (Tsolakis et. al, 2001).

1.2 Καταπολέμηση του δάκου της ελιάς (*Bactrocera oleae*)

Η καταπολέμηση του πληθυσμού του εντόμου μπορεί να γίνει με χημικές ή μη χημικές μεθόδους και εξαρτάται από την παρακολούθηση του μεγέθους του πληθυσμού του εντόμου. Οι μοντέρνες μέθοδοι περιλαμβάνουν την άμεση ή έμμεση συμμετοχή του ανθρώπου αλλά όχι απαραίτητα τον πιο προηγμένο εξοπλισμό καθώς η πιο απλή μέθοδος μπορεί να είναι και η πιο αποτελεσματική.

1.2.1 Μη χημική καταπολέμηση (βιολογική καταπολέμηση)

Οι άνθρωποι χρησιμοποίησαν ποικίλες μη χημικές μεθόδους για να απομακρύνουν τα παρασιτικά έντομα από τις καλλιέργειες τους. Αυτές οι μέθοδοι μπορούν να είναι από ένα απλό όργωμα για να βγουν στην επιφάνεια τα παρασιτικά έντομα που διαβιούν κάτω από τη γη σε κάποιο αναπτυξιακό τους στάδιο, μέχρι την προσθήκη φυσικών στοιχείων όπως το θείο (Metclaf, 1994).

Μια γνωστή και ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος είναι οι παγίδες, οι οποίες είναι ειδικές κατασκευές, με τις οποίες γίνεται προσέλκυση, παγίδευση και επιλεκτικά θανάτωση των εντόμων. Ανάλογα με το σκοπό της χρησιμοποίησής τους οι παγίδες διαχωρίζονται σε δύο τύπους: αυτές για την προσέλκυση, την κατακράτηση και την παρακολούθηση των πληθυσμών των εντόμων και αυτές για την προσέλκυση και θανάτωση των εντόμων (Laura R. 2011). Η βιολογική καταπολέμηση βασίζεται στη μαζική σύλληψη των ακμαίων του δάκου με τη μέθοδο της παγίδευσης με διάφορα συστήματα παραγωγής. Τα τελευταία χρόνια δε χρησιμοποιείται η παγίδα κίτρινου χρώματος για να μη συλλαμβάνονται και τα ωφέλιμα έντομα. Ως ελκυστικές παγίδες χρησιμοποιούνται η ανθρακική αμμωνία μόνη της ή σε συνδυασμό με φερομόνη φύλου σε παγίδα με κόλλα (Μπούρμας, 2000). Τελευταία έχουν δημιουργηθεί διάφοροι τύποι παγίδων που μπορεί ο οποιοσδήποτε ελαιοπαραγωγός να προμηθευτεί από το εμπόριο και να τις χρησιμοποιήσει στην πράξη καθώς είναι εύκολες στη χρήση τους και χωρίς μεγάλο κόστος.

Μια άλλη βιολογική μέθοδος είναι ο έλεγχος των παρασίτων μέσω της αυτορρύθμισης των πληθυσμών, στα πλαίσια του οικοσυστήματος. Η ύπαρξη πληθυσμών άλλων ειδών που δρουν ως παράσιτα, θηρευτές ή παθογόνα για το είδος – στόχο μπορούν με την κατάλληλη διαχείριση να περιορίσουν τους πληθυσμούς του σε αποδεκτά μεγέθη. Τα είδη αυτά μπορεί να προϋπάρχουν στην περιοχή (φυσικός έλεγχος) ή να εισαχθούν με ανθρώπινη παρέμβαση (κλαστικός έλεγχος).

Μια εξελισσόμενη, επίσης, τεχνική καταπολέμησης είναι η τεχνική στείρωσης των εντόμων (SIT). Η τεχνική αυτή αφορά στην εξαπόλυση στη φύση στερημένων ατόμων εργαστηριακού πληθυσμού με σκοπό τη μείωση του αναπαραγωγικού δυναμικού του φυσικού πληθυσμού, δηλαδή την παρεμπόδιση δημιουργίας απογόνων. Απαραίτητη προϋπόθεση για την εξασφάλιση

της επιτυχίας της μεθόδου αποτελεί η παραγωγή μεγάλου αριθμού στέρων αρσενικών ατόμων που θα μπορούν να συζευχθούν με τα θυληκά έντομα του φυσικού πληθυσμού (Knipling, 1979). Η εφαρμογή της μεθόδου συντελείται στις φάσεις α) παραγωγή των εντόμων υπό ελεγχόμενες συνθήκες, β) ακτινοβόλησή τους σε πηγή ραδιενεργού κοβαλτίου ή άλλη πηγή ακτίνων γ, γ) αποθήκευση σε κατάλληλες συνθήκες ως τη μεταφορά τους, δ) μεταφορά στη περιοχή εξαπόλυσης, ε) εξαπόλυση από το έδαφος και στ) παρακολούθηση της αναλογίας των δύο πληθυσμών (φυσικού και εργαστηριακού) και αξιολόγηση του αποτελέσματος. Η εν λόγω μέθοδος εφαρμόστηκε στην Κασσάνδρα της Χαλκιδικής, σε συνδυασμό με την χημική μέθοδο, με σκοπό την καταπολέμηση του δάκου (Economopoulos et. al, 1977). Με βάση τα αποτελέσματα του πειράματος, πρωτεύοντα ρόλο για την επιτυχία της μεθόδου καταλαμβάνει η έγκαιρη εφαρμογή τόσο των εντομοκτόνων όσο και των εξαπολύσεων. Επίσης, η μέθοδος είχε ικανοποιητικά αποτελέσματα μόνο υπό συνθήκες επαρκούς απομόνωσης των πειραματικών ελαιώνων. Η χρήση εντομοκτόνων καθίσταται απαραίτητη, καθώς παρατηρείται ισχυρή αναπαραγωγική απομόνωση μεταξύ του εργαστηριακού και του φυσικού πληθυσμού. Συγκεκριμένα, καταγράφονται μεταβολές στη συμπεριφορά, αναπαραγωγή και φυσιολογία των εντόμων εργαστηριακής εκτροφής που εξηγούν την μειωμένη αποτελεσματικότητα της μεθόδου αυτής. Η σημαντικότερη διαφορά μεταξύ εργαστηριακών και φυσικών πληθυσμών είναι οι διαφορετικές ώρες σύζευξης μεταξύ των δύο πληθυσμών (Economopoulos et. al, 1977).

Σε κάθε περίπτωση, το περιβάλλον της εργαστηριακής εκτροφής επιφέρει αλλαγές στον φυσικό πληθυσμό, συμπεριλαμβανομένων και γενετικών αλλαγών που συμβαίνουν στις 3-4 γενεές της εργαστηριακής εκτροφής του εντόμου (Zouros et. al, 1982, Loukas et. al, 1985).

Η επιτυχία της μεθόδου αυτής εξαρτάται από: α) το είδος του εντομολογικού εχθρού που πρόκειται να καταπολεμηθεί, β) τη μέθοδο στέρωσης, γ) την αναλογία των στέρων εντόμων που απελευθερώνονται σε σχέση με τα άγρια έντομα που υπάρχουν στη φύση, δ) το αν η ελαιοκαλλιέργεια είναι σε απομονωμένη περιοχή σε σχέση με τις υπόλοιπες καλλιέργειες και ε) την ικανότητα των στέρων εντόμων να εκπληρώσουν το σκοπό για τον οποίο δημιουργήθηκαν. Επειδή τα έντομα τεχνητής εκτροφής μαγαλώνουν σε διαφορετικό περιβάλλον από αυτά που τελικά απελευθερώνονται, διαταράσσονται οι φυσιολογικές και βιολογικές τους συνήθειες. Έτσι, προκύπτει μια διαφορετική συμπεριφορά των εντόμων αυτών και γι' αυτό η μέθοδος αυτή παρουσιάζει αρνητικά αποτελέσματα. Ωστόσο, η τεχνική του στέρου εντόμου εξακολουθεί να αποτελεί αντικείμενο μελέτης, ώστε με τη βελτίωση των παραμέτρων της στο μέλλον να επιφέρει τα επιθυμητά αποτελέσματα στην καταπολέμηση του φυσικού πληθυσμού του δάκου (Estes et. al, 2011).

1.2.2 Χημική καταπολέμηση

Είναι γνωστό, ότι η καταπολέμηση του δάκου της ελιάς βασίζεται, ακόμη και σήμερα, σχεδόν αποκλειστικά στην χρήση χημικών εντομοκτόνων. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται είναι οι δολωματικοί ψεκασμοί από αέρος ή από εδάφους και οι ψεκασμοί καλύψεως. Οι δολωματικοί ψεκασμοί από αέρος πραγματοποιούνται με τη μέθοδο κυρίως του πολύ μικρού όγκου. Οι δολωματικοί ψεκασμοί από εδάφους προκαλούν λιγότερες παρενέργειες στο οικοσύστημα απ' αυτούς που εφαρμόζονται από αέρος. Το κόστος βέβαια εφαρμογής είναι σημαντικά μεγαλύτερο λόγω του κόστους εργασίας και του συγχρονισμού επεμβάσεων σε μεγάλη έκταση. Το 1994 με απόφαση του Υπουργού Γεωργίας καθορίστηκαν περιοχές μη εφαρμογής δολωματικών αεροψεκασμών για την καταπολέμηση του δάκου της ελιάς. Πρόκειται για ελαιοκομικές περιοχές στις οποίες δεν ενδείκνυται η εφαρμογή αεροψεκασμών από τεχνικής, περιβαλλοντικής και δημοσιοϋγειονομικής πλευράς καθώς και για ελαιοκομικές περιοχές για τις οποίες έχει αναγνωρισθεί προστατευόμενη ονομασία προέλευσης ελαιολάδου (Π.Ο.Π.) ή γεωγραφικής ένδειξης (Π.Γ.Ε.).

Γενικά, η χρήση των εντομοκτόνων και άλλων χημικών επεμβάσεων δημιουργεί σοβαρά οικολογικά, τοξικολογικά και οικονομικά προβλήματα. Σε πολλές περιπτώσεις, η συνεχής και εκτεταμένη εφαρμογή των εντομοκτόνων διαταράσσει την υπάρχουσα ισορροπία πληθυσμών μεταξύ εχθρού και παράσιτου ή αρπακτικού σε όφελος του εχθρού. Αυτό εκδηλώνεται με την αύξηση της πυκνότητας του πληθυσμού διάφορων εχθρών που προηγουμένως ήταν σε χαμηλά και μη επιβλαβή επίπεδα. Τέτοιες περιπτώσεις έχουν αναφερθεί στην ελαιοκαλλιέργεια για το λεκάνιο *Saissetia oleae* και άλλα κοκκοειδή τόσο στην χώρα μας (Alexandrakis and Neuenschwander 1980, Karpatos and Fletcher 1983) όσο και σε άλλες Μεσογειακές χώρες (Delrio, 1985).

Ένα άλλο σοβαρό πρόβλημα είναι η μόλυνση προϊόντων άλλων καλλιεργειών που γειτνιάζουν με ελαιώνες και η μόλυνση του εδάφους, των τροφών και των νερών. Επίσης είναι πιθανόν να τεθεί σε άμεσο κίνδυνο η υγεία του ανθρώπου από τυχαία έκθεση σε αυτά τα υψηλής τοξικότητας εντομοκτόνα. Από οικονομικής πλευράς, η παρουσία τοξικών υπολειμμάτων στα προϊόντα της ελιάς δημιουργεί πρόβλημα στην διάθεση των προϊόντων.

1.2.3 Εντομοκτόνα

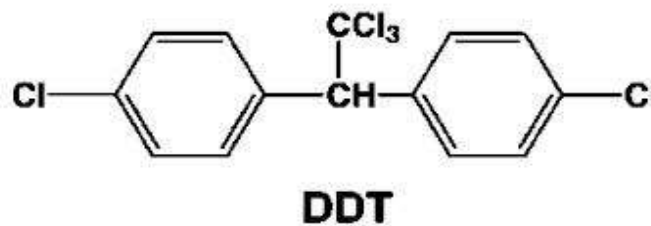
Τα εντομοκτόνα χωρίζονται σε έξι κύριες κατηγορίες ανάλογα με τη χημική τους φύση:

Χλωριωμένοι υδρογονάνθρακες

Αποτελούν την πιο παλιά και ευρέως χρησιμοποιημένη ομάδα συνθετικών οργανικών εντομοκτόνων. Οι χλωριωμένοι υδρογονάνθρακες είναι συγκεκριμένες υδρογονανθρακικές ομάδες που συνδέονται χημικά με άτομα χλωρίου (Matolcsy et al., 1988). Ανάλογα με τα άτομα χλωρίου που περιέχουν παρουσιάζουν και ανάλογες μοριακές ιδιότητες. Ο αριθμός των ατόμων άνθρακα και πώς αυτά είναι διευθετημένα στην τριτοταγή δομή καθορίζουν τις χημικές και φυσικές ιδιότητές τους (**εικόνα 1**).

Το πρώτο εντομοκτόνο αυτής της κατηγορίας είναι το DDT και παρασκευάστηκε το 1874 από τον Othmar Zeidler, ο οποίος όμως δεν αναγνώρισε τις εντομοκτόνες ιδιότητές του.

Η ανακάλυψη των εντομοκτόνων ιδιοτήτων του DDT και η χρήση του ως εντομοκτόνου έγινε πολύ αργότερα, κατά τη δεκαετία του 1930 από τον Paul Hermann Muller ο οποίος βραβεύτηκε με Nobel ιατρικής και φυσιολογίας γι' αυτή την ανακάλυψη, το 1948 (Matolcsy et al., 1988).



Εικόνα 1: Το DDT χρησιμοποιήθηκε σε μεγάλο βαθμό μετά το δεύτερο Παγκόσμιο Πόλεμο, αρχικά λόγω της αποτελεσματικότητάς του απέναντι στα κουνούπια που μετέφεραν μαλάρια και στις ψείρες που μετέφεραν τύφο. Η Παγκόσμια Οργάνωση Υγείας υπολόγισε ότι εκείνη την εποχή σώθηκαν 25 εκατομμύρια άνθρωποι (Carson, 2002).

Οι χλωριωμένοι υδρογονάνθρακες παρεμποδίζουν την αξονική μετάδοση των νευρικών σημάτων, προκαλώντας πολλαπλές εκφορτίσεις, μεγάλη νευρική διέγερση, σπασμούς και τελικά θάνατο. Σε μοριακό επίπεδο κρατούν ανοικτές τις διαύλους των ιόντων νατρίου στις προσυναπτικές μεμβράνες των νευρικών κυττάρων του περιφερειακού νευρικού συστήματος λόγω της προσκόλλησής τους στις πρωτεϊνικές υπομονάδες (Stenersen, 2004).

Η ανθεκτικότητα στο DDT σχετίζεται με τα τασεο-εξαρτώμενα κανάλια Na^+ που αποτελούν το στόχο του και αποδίδεται σε μία μετάλλαξη σε περιοχή της πρωτεΐνης που συμμετέχει στο σχηματισμό του διαύλου του καναλιού (Dong, 2007).

Κυκλοδιένια

Η παραγωγή των κυκλοδιενίων άρχισε κατά τη δεκαετία του '50 και γνωστά μόρια αυτής της κατηγορίας είναι τα aldrin, dieldrin, chlordane και heptachlor (Matolcsy et al, 1988) (εικόνα 2).

Παρ' όλ' αυτά η υπολειμματικότητά τους στο έδαφος και η ανθεκτικότητα που αναπτύχθηκε στα έντομα οδήγησε την EPA να απαγορεύσει τη χρήση των κυκλοδιενίων στην αγροκαλλιέργεια από το 1975 – 1980. Τα κυκλοδιένια είναι σταθερά στο έδαφος και στο υπεριώδες φως, ενώ η τοξικότητά τους αυξάνεται ανάλογα με τη θερμοκρασία (Schlenk and Benson, 2001).

Τα κυκλοδιένια είναι νευροτοξίνες και δρουν στους υποδοχείς GABA (gamma-aminobutyric acid). Οι GABA υποδοχείς αποτελούν ένα χημειοελεγχόμενο κανάλι ιόντων χλωρίου και ο ρόλος τους είναι ανασταλτικός, επιτρέποντας την είσοδο των ιόντων χλωρίου στο κύτταρο. Η είσοδος των αρνητικά φορτισμένων ιόντων χλωρίου δημιουργεί υπερπόλωση στο νευρώνα, η οποία μειώνει τη διεγερσιμότητα του και οδηγεί στη διακοπή της νευρικής ώσης (Stein, 1990) Τα κυκλοδιένια ανταγωνίζονται τη φυσιολογική λειτουργία των GABA αναστέλλοντας τους και εμποδίζοντας με τον τρόπο αυτό την είσοδο των ιόντων χλωρίου στους νευρώνες με συνέπεια να οδηγούν σε υπερδιέγερση του νευρικού συστήματος.

Η ανθεκτικότητα προς αυτά τα εντομοκτόνα έχει αποδοθεί σε μετάλλαξη που εντοπίζεται σε περιοχή της δευτέρας διαμεμβρανικής περιοχής του υποδοχέα, η οποία συμμετέχει στο σχηματισμό του καναλιού και αποτρέπει τη σύνδεση του εντομοκτόνου (Buckingham et al., 2005).

Οργανοφωσφορικά

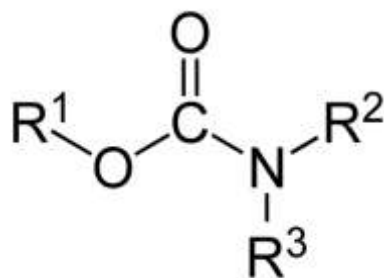
Τα οργανοφωσφορικά είναι μια μεγάλη κατηγορία που περιλαμβάνει όλους τους εστέρες του φωσφορικού οξέος. Παραδείγματα οργανοφωσφορικών είναι τα εντομοκτόνα parathion, malathion, diazinon, fenthion και αέρια νεύρων (Pope, 1999). Πρωτοσυντέθηκαν στις αρχές του 1800 ενώ χρησιμοποιήθηκαν ως εντομοκτόνα κατά το 1917.

Τα εντομοκτόνα αυτής της κατηγορίας δρουν στις χολινεργικές συνάψεις, δηλαδή στις συνάψεις που νευροδιαβιβαστής είναι η ακετυλοχολίνη. Συγκεκριμένα αναστέλλουν μη αναστρέψιμα το ένζυμο ακετυλοχολινεστεράση. Η φυσιολογική λειτουργία του ενζύμου είναι η υδρόλυση της ακετυλοχολίνης σε οξικό οξύ και χολίνη. Αναστολή του ενζύμου έχει σαν αποτέλεσμα την υπέρμετρη συσσώρευση του νευροδιαβιβαστή και τη «βραχυκύκλωση» του συστήματος μετάδοσης των νευρικών μηνυμάτων (Chambers, 1992).

Η ανθεκτικότητα που σχετίζεται με τα οργανοφωσφορικά αποδίδεται στην απευαισθητοποίησή της ακετυλοχολινεστερασης λόγω μεταλλάξεων που προκαλούν αλλαγή της δομής της, ώστε το εντομοκτόνο να μην έχει πρόσβαση στο ενεργό της κέντρο (Smessaert, 1964).

Καρβαμίδια

Τα καρβαμίδια είναι παράγωγα της φυσοστιγμίνης και αποτελούν εντομοκτόνα νεότερης γενιάς από τα οργανοφωσφορικά (**εικόνα 2**) (Cupra, 2005). Τα καρβαμίδια δεσμεύονται, όπως και τα οργανοφωσφορικά, στην ακετυλοχολινεστεράση .



Εικόνα 2: Βασική δομή καρβαμιδίων

Γενικά δρουν κατά κανόνα ως εντομοκτόνα επαφής και στομάχου και δεν έχουν ευρύ φάσμα δράσης. Ο βιοχημικός μηχανισμός δράσης τους είναι η αναστρέψιμη αναστολή της ακετυλοχολινεστεράσης. Συγκεκριμένα προσκολλάται το καρβαμιδικό μέρος στη σερίνη της εστερατικής θέσης του ενζύμου και παρεμποδίζεται η δράση του συνήθως για λίγες ώρες (Matolscy,1988).

Η ανθεκτικότητα στα καρβαμιδικά εντομοκτόνα αναφέρεται σε μεταλλάξεις στο ένζυμο της ακετυλοχολινεστεράσης. Οι μεταλλάξεις αυτές, όπως και στην περίπτωση των οργανοφωσφορικών, αλλάζουν τη δομή της AChE κατά τέτοιο τρόπο, ώστε να μην είναι δυνατή η σύνδεση του εντομοκτόνου και κατά συνέπεια το ένζυμο μπορεί να επιτελεί τη φυσιολογική του λειτουργία (Oakeshott et al., 2005).

Πυρεθροειδή

Τα πυρεθροειδή είναι συνθετικά ανάλογα φυσικών εντομοκτόνων που βρίσκονται στο λουλούδι *Chrysanthemum cinerariaefolium* (Dolinsek, 2007). Χαρακτηρίζονται από μεγάλη εντομοτοξική δράση, μεγάλη λιποδιαλυτότητα και ευρύ φάσμα δράσης εναντίον πολλών εντόμων (Matolscy, 1988). Ο τρόπος δράσης των πυρεθροειδών είναι η προσκόλληση τους στις υπομονάδες των

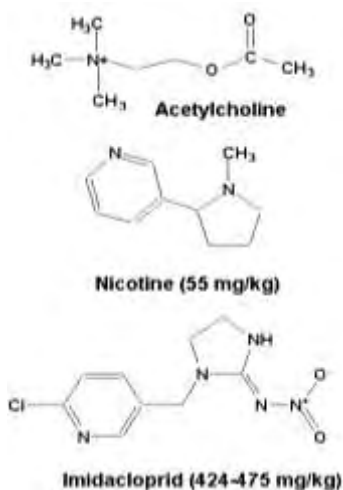
διαύλων ιόντων νατρίου, στις μεμβράνες των τελικών κλώνίων του νευράξονα προκαλώντας παρατεταμένο άνοιγμα των διαύλων (Stenersen, 2004).

Η ανθεκτικότητα στα πυρεθροειδή αποδίδεται σε μεταλλάξεις στα τασεο-εξαρτώμενα κανάλια Na^+ σε περιοχές της πρωτεΐνης που συμμετέχουν στο σχηματισμό των καναλιών Na^+ (Dong, 2007).

Νεονικοτινοειδή

Η ανάπτυξη της ανθεκτικότητας των εντόμων στα εντομοκτόνα των παραπάνω κατηγοριών, δημιούργησε την ανάγκη για την παραγωγή νέων εντομοκτόνων με διαφορετική δράση. Στα πλαίσια αυτά αναπτύχθηκε μια νέα κατηγορία εντομοκτόνων, τα νεονικοτινοειδή. Η νικοτίνη του καπνού χρησιμοποιούταν για πολλούς αιώνες για την απομάκρυνση εντόμων, παρόλο που δεν ήταν πολύ αποτελεσματική ενώ ήταν επικίνδυνη για τον άνθρωπο. Τα νεονικοτινοειδή έχουν παρόμοια δομή με τη νικοτίνη και δρουν ως αγωνιστές στο νικοτινικό υποδοχέα της ακετυλοχολίνης, ο οποίος αποτελεί ιοντικό κανάλι (Tomizawa and Casida, 2005).

Το πρώτο νεονικοτινοειδές εντομοκτόνο είναι η ιμιδακλοπριδίνη που εμφανίστηκε τη δεκαετία του 90' (**Εικόνα 3**). Η δράση του οφείλεται στη δέσμευση των μετασυναπτικών υποδοχέων της ακετυλοχολίνης στο κεντρικό σύστημα των εντόμων με αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της φυσιολογικής μετάδοσης των νευρικών σημάτων μεταξύ των νευρικών κυττάρων (Stenersen, 2004).



Εικόνα 3: Δομή του νευροδιαβιβαστή ακετυλοχολίνης, της νικοτίνης και του εντομοκτόνου ιμιδακλοπριδίνη

Ανθεκτικότητα στην ιμιδακλοπριδίνη αλλά και σε άλλα νεονικοτινοειδή έχει αναφερθεί σε διάφορα είδη όπως στη *Nilaparvata lugens*, παρασιτικό έντομο σε πολλά μέρη της Ασίας. Η ανθεκτικότητα στο έντομο αυτό οφείλεται κυρίως σε μια σημειακή μετάλλαξη σε δυο υπομονάδες του υποδοχέα της ακετυλοχολίνης, Nla1 και Nla3, η οποία μειώνει σημαντικά την πρόσδεση του εντομοκτόνου (Gorman et al., 2008; Tomizawa and Casida, 2009).

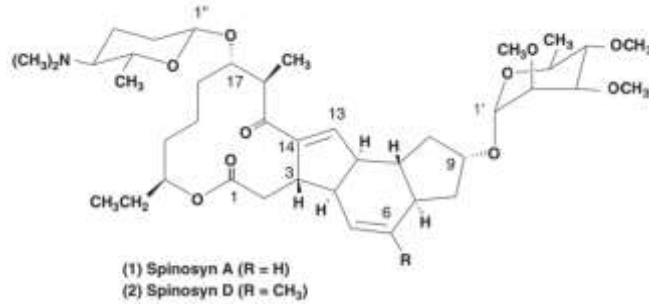
Νατουραλίτες

Με την πάροδο των χρόνων και τη μεγαλύτερη ευαισθητοποίηση της κοινωνίας απέναντι σε περιβαλλοντικά προβλήματα όπως η τρύπα του όζοντος, η βιομηχανία προσηλώθηκε στην παραγωγή εντομοκτόνων φιλικότερων προς το περιβάλλον. Παρατήρησαν ότι τα φυσικά προϊόντα μεταβολισμού μικροοργανισμών μπορούν να έχουν ιδιότητες εντομοκτόνου. Ένα σημαντικό παράδειγμα αυτής της κατηγορίας αποτελεί το προϊόν Spinosad.

1.2.4 Spinosad

Οι νατουραλίτες είναι εντομοκτόνα που έχουν ως βάση φυσικά προϊόντα μεταβολισμού μικροοργανισμών με ιδιότητες εντομοκτόνου. Σημαντικός αντιπρόσωπος τους είναι το Spinosad. Το Spinosad είναι το ενεργές συστατικό του Tracer* Naturalyte* και του Conserve (Salgado, 1998) και βγήκε για πρώτη φορά στην αγορά το 1997 (Thompson et al., 1997; Thompson et al., 2000). Μέχρι σήμερα χρησιμοποιείται σε περισσότερες από 30 χώρες για αντιμετώπιση περισσότερων από 150 είδη εντόμων (Cleveland et al., 2001).

Το Spinosad αποτελεί μίγμα της σπινοςίνης A (κύριο προϊόν) και της σπινοςίνης D (**εικόνα 4**). Οι σπινοςίνες A και D είναι μέλη μιας καινούργιας οικογένειας μακρολύδων που προκύπτουν από ζύμωση του ακτινομύκητα *Saccharopolyspora spinosa* (Bret et al., 1997). Ο ακτινομύκητας αυτός απομονώθηκε πρώτη φορά το 1982 από ένα εγκαταλελειμμένο εργοστάσιο παραγωγής ρουμιού απ' όπου ένας επιστήμονας της Eli Lilly πήρε μερικά εδαφικά δείγματα για διερεύνηση της ύπαρξης βιολογικής δράσης. Στη συνέχεια απομονώθηκαν και χαρακτηρίστηκαν περισσότερες από 20 διαφορετικές σπινοςίνες (A-Y) (Gary D. Thompson et al., 1997).



Εικόνα 4: Χημική δομή σπινოსίνων (A και D)

Δομικά, αυτές οι ενώσεις είναι μακρολίδες και περιέχουν ένα τετρακυκλικό σύστημα όπου είναι ενωμένα δύο σάκχαρα. Μετά τη ζύμωση, το spinosad εξάγεται και μεταποιείται ώστε να σχηματίσει μια υψηλά συμπυκνωμένη υδατική μορφή για ευκολότερη χρήση. Βασικό πλεονέκτημα του spinosad είναι η γρήγορη διάσπασή του στο περιβάλλον. Διασπάτε στα φυσικά συστατικά του μέσω των διαδικασιών της φωτοδιάσπασης και της μικροβιακής διάσπασης με χρόνο ημιζωής που διαρκεί από μία έως δεκαεπτά ημέρες.

Το ενδιαφέρον για τις σπινოსίνες δεν έγκειται μόνο στην μοναδική τους μοριακή δομή αλλά στα υψηλά επίπεδα δραστηριότητας ενάντια σε αγροτικά παράσιτα όπως ο σκωληκας του καπνού, το *Heliothethis viresens* και ο δάκος της ελιάς, το έντομο *Bactrocera oleae* (Diptera: *Tephritidae*). Όλα τα πρώιμα σπινოსοειδή αναγνωρίστηκαν από μειωμένη ή πλήρη έλλειψη της δράσης του *H.vireshens* όταν συγκρίνεται με τη σπινოსίνη A. Πολλά από τα πρώτα σπινოსοειδή και τα ημισυνθετικά ανάλογα τους είναι τουλάχιστον τόσο ενεργά ή ακόμα και περισσότερο από τη σπινოსίνη A.

Παρόλο που ο μηχανισμός δράσης της σπινοςίνης δεν έχει ξεκαθαριστεί πλήρως, μελέτες έχουν δείξει ότι ο μηχανισμός με τον οποίο δρα η σπινοςίνη είναι διαφορετικός από όλους τους υπάρχοντες τρόπους δράσης των εντομοκτόνων. Αποτελέσματα μελετών δείχνουν ότι η προταρχική δράση της σπινοςίνης A επηρεάζει το νευρικό σύστημα καθώς και τη νευρική δραστηριότητα του εντόμου διεγείροντας τα κινητικά νεύρα προκαλώντας μυϊκές συσπάσεις οι οποίες οδηγούν στη παράλυση και τελικά στο θάνατο.

Εν γένει και όπως αναφέρθηκε εξ αρχής, η χρήση εντομοκτόνων και συναφών χημικών παρασκευασμάτων αποτελεί πηγή πρόκλησης σημαντικών οικολογικών και οικονομικών προβλημάτων. Εντούτοις, βασική μέθοδος καταπολέμησης του δάκου παραμένει η χημική (Χανιοτάκης 2003, Μαργαρητόπουλος 2008). Η εφαρμογή των εντομοκτόνων γίνεται με δολωματικούς ψεκασμούς, κυρίως, ενώ για τους τελευταίους ψεκασμούς πριν τη συγκομιδή

επιλέγονται τα πλέον υδατοδιαλυτά σκευάσματα (dimethoate) για την ελαχιστοποίηση των υπολειμάτων.

Το σημαντικότερο πρόβλημα που ανακύπτει είναι η ανάπτυξη ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα, δηλαδή η ικανότητα ενός πληθυσμού εντόμου να επιβιώνει μετά από έκθεση σε δόσεις δραστικής ουσίας που κανονικά θα ήταν θανατηφόρες. Συγκεκριμένα, όταν δεν γίνεται ενδεδειγμένη χρήση των φυτοπροστατευτικών ουσιών, η ένταση και η συχνότητα των ψεκασμών δημιουργούν μία ισχυρή πίεση επιλογής, με αποτέλεσμα να επιλέγονται ανθεκτικά γονίδια που με την πάροδο του χρόνου ο αρχικά ευπαθείς πληθυσμός μετατρέπεται σε ανθεκτικό.

1.3 Ανθεκτικότητα

Η γενετική δεξαμενή ενός φυσικού πληθυσμού περιλαμβάνει όλα τα αλληλόμορφα που αντιστοιχούν στις φαινοτυπικές αναλογίες των ατόμων του και ιδιαίτερη έμφαση δίνεται στο γεγονός ότι τα σπάνια αλληλόμορφα «κρύβονται» στους ετεροζυγώτες. Όταν σε ένα φυσικό πληθυσμό ασκείται μία εξελικτική πίεση, όπως παραδείγματος χάριν η επιλογή με εντομοκτόνο, τότε τα «αδύναμα» ή αλλιώς ευαίσθητα άτομα που φέρουν τα αλληλόμορφα που προσδίδουν τον ευαίσθητο φαινότυπο εξαλείφονται. Τα «ανθεκτικά» αλληλόμορφα εγκαθιδρύονται και αν η επιλογή είναι ισχυρή, τότε είναι τα μόνα που παραμένουν στην γενετική δεξαμενή. Αυτό ουσιαστικά σημαίνει πως η ανθεκτικότητα που αναπτύσσεται λόγω ισχυρής επιλογής σε ένα φυσικό πληθυσμό, δεν είναι de novo δημιουργία αλλά τα αλληλόμορφα των ανθεκτικών ατόμων προϋπήρχαν, επιβιώνουν και εγκαθιδρύονται.

Η νεοδαρβινική θεωρία προβλέπει πως τα χαρακτηριστικά γνωρίσματα αναπτύσσονται ταχύτερα όταν πολλοί γενετικοί τόποι, ο καθένας από τους οποίους συνεισφέρει ελάχιστα, καθορίζουν τον φαινότυπο του ατόμου (J.Mallet, 1989). Σε αντίθεση με αυτό ο μηχανισμός της ανθεκτικότητας στον αγρό, βασίζεται σε λίγα ή σε μοναδιαία γονίδια. Φαίνεται πως η επιλογή που ασκείται υπό την εντομοκτόνο δράση στους πληθυσμούς του αγρού είναι εξαιρετικά μεγάλη ώστε μόνο πολύ σπάνιες μεταλλάξεις μπορούν να επιβιώσουν σε έναν συγκεκριμένο γενετικό τόπο. Αντίθετα η επιλογή στο εργαστήριο, η οποία είναι αναγκαστικά πιο αδύναμη, μπορεί να προάγει μερική/ πολυπαραγοντική ανθεκτικότητα διότι πολλά γονίδια θα έχουν αλληλόμορφα τα οποία θα είναι ασθενέστερα στα αποτελέσματα της ανθεκτικότητας (J.Mallet, 1989). Ωστόσο η ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα που προάγεται από ένα μόνο γονίδιο μπορεί να είναι αποτέλεσμα της εξειδίκευσης του μοριακού τους στόχου ο οποίος και έχει τροποποιηθεί σε ανθεκτικά άτομα.

Ένα υπολειπόμενο αλληλόμορφο θα αυξήσει τις πιθανότητες εγκαθίδρυσης του στην γενετική δεξαμενή σε μία μόνο γενιά αν η θνησιμότητα των ευαίσθητων εντόμων του χορηγούμενου

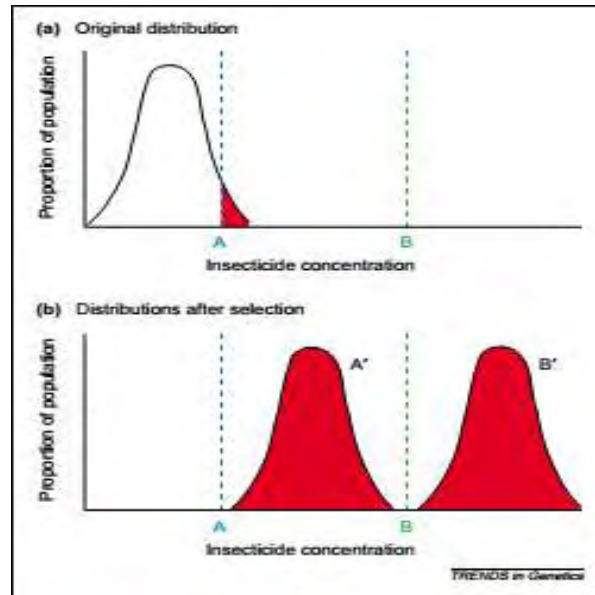
πληθυσμού ήταν 100%. Εφόσον όμως αυτό ποτέ δεν συμβαίνει στον αγρό μπορούμε να υποθέσουμε πως υπάρχουν άτομα (ρεζερβουάρ) στον εξεταζόμενο πληθυσμό στα οποία δεν έχει χορηγηθεί το εντομοκτόνο εφόσον δεν υπάρχει 100% θνησιμότητα.

Υποθέτοντας πως αυτά τα άτομα υπάρχουν, μία σπάνια μετάλλαξη θα κυριαρχήσει στον πληθυσμό πιο εύκολα αν βρίσκεται σε επικρατές γονίδιο παρά σε υπολειπόμενο. Αυτό το γνωστό πληθυσμιακό φαινόμενο επαληθεύεται όταν αυξάνοντας την δόση του εντομοκτόνου μόνο τα «πραγματικά» ανθεκτικά αλληλόμορφα επιβιώνουν (Oakeshott, J.G. et al. 2003).

Τα παραπάνω άτομα του πληθυσμού στα οποία δεν χορηγήθηκε το εντομοκτόνο μπορεί να υφίστανται για δύο λόγους: πρώτον είναι δύσκολο να ψεκαστεί το εντομοκτόνο ομοιόμορφα σε όλη την έκταση του αγρού και δεύτερον τα άτομα αυτά μπορεί να μην υπήρχαν εξ αρχής στον πληθυσμό που χορηγήθηκε το εντομοκτόνο αλλά να εισέβαλλαν σε αυτόν με μετανάστευση. Τα επίπεδα της ανθεκτικότητας ποτέ δεν θα μειωθούν λιγότερο από όσο ήταν πριν την χορήγηση του εντομοκτόνου αν ο πληθυσμός των ατόμων που δεν δέχτηκαν το φάρμακο είναι απείρως μεγάλος ενώ η ανθεκτικότητα θα ήταν πολύ μικρότερη αν δεν υπήρχε μετανάστευση πληθυσμών. Ωστόσο πρακτικά θα υπάρξει ένας ρυθμός μετανάστευσης κατά τον οποίο τα επίπεδα της ανθεκτικότητας θα αυξηθούν σημαντικά και πλέον ο πληθυσμός θα αυξάνεται ανεξάρτητα από τον αριθμό των ανθεκτικών αλληλομόρφων της γενετικής δεξαμενής.

Τα τελευταία χρόνια γίνεται εντατική προσπάθεια για την αναλυτικότερη προσέγγιση της μοριακής βάσης της ανθεκτικότητας σε έντομα απέναντι σε διάφορους εντομοκτόνους παράγοντες. Τα γονίδια στόχοι των εν λόγω εντομοκτόνων βρίσκονται κυρίως στο νευρικό σύστημα και πολλά από αυτά έχουν αναγνωρισθεί και κλωνοποιηθεί στη *Drosophila melanogaster* ενώ παράλληλα πολλοί παράγοντες που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα έχουν αναλυθεί σε διάφορα πειραματικά δεδομένα και σε άλλα έντομα (French-Constant, R.H. et al. 1993).

Η ανθεκτικότητα είναι ένας ανθρωπο-διαμορφωμένος παράγοντας ο οποίος ουσιαστικά προσδιορίζει την φυσική επιλογή, ενώ το εύρος και η ισχύ της σε έναν πληθυσμό είναι αποτέλεσμα διαφόρων παραγόντων των οποίων η μελέτη έχει τόσο θεωρητική όσο και χρηστική σημασία στην επιστήμη. Θεωρητικά προβλέπεται πως ο αριθμός των εμπλεκόμενων γονιδίων που προσδιορίζουν την ανθεκτικότητα εξαρτάται από το αν η επιλογή δρα εντός ή εκτός ενός συγκεκριμένου εύρους φαινοτυπικών αναλογιών των ατόμων ενός εξεταζόμενου πληθυσμού (εικόνα 6).



Εικόνα 6: Επιλογή εντός και εκτός του φυσικού εύρους απόκρισης ενός πληθυσμού εντόμων. Η επιλογή εντός μιας φυσιολογικής κατανομής της ανοχής προς το εντομοκτόνο με όριο συγκέντρωσης την διακεκομμένη γραμμή -A- αποτέλεσε στην επιβίωση μεγάλου αριθμού ατόμων. Τα άτομα αυτά έδειξαν μία οριακή αύξηση της ανοχής στο εντομοκτόνο μετά από επιλογή (κατανομή A'). Στον ίδιο πληθυσμό, μετά από επανειλημμένη χορήγηση εντομοκτόνου, οι ίδιες δόσεις οδήγησαν σε πολλά διαφορετικά χαρακτηριστικά ανθεκτικότητας με μικρή επίδραση το καθένα που δρουν συσσωρευτικά (πολυπαραγοντική ανθεκτικότητα). Η επιλογή εκτός της φυσιολογικής κατανομής της ανοχής (με όριο συγκέντρωσης τη γραμμή B) αποτέλεσε στην επιλογή σπάνιων μεταλλάξεων σε μοναδιαία γονίδια (μονογονιδιακή ανθεκτικότητα). Αυτά τα άτομα είχαν μια κατανομή ανοχής (κατανομή B') εκτός των πρότυπων ορίων. Η συχνότητα αυτών των σπάνιων μεταλλάξεων στο εργαστήριο μπορεί να αυξηθεί με μεταλλαξηγένηση. Επιπλέον, τα περισσότερα άτομα που επιλέχθηκαν στο εργαστήριο, από μικρούς ομοιόμορφους πληθυσμούς με ή χωρίς μεταλλαξιγένεση, έδειξαν πολυπαραγοντική ανθεκτικότητα, όταν αντιθέτως τα περισσότερα ανθεκτικά άτομα από τον αγρό έδειξαν μονογονιδιακή ανθεκτικότητα, υπό την προϋπόθεση πως δεν είχε πραγματοποιηθεί πρόσθετη επιλογή στο εργαστήριο. Σημειώνεται πως οι δόσεις που χρησιμοποιούνται στον αγρό είναι σχεδιασμένες ώστε να θανατώσουν όλα τα έντομα και συγκλίνουν στις δόσεις B, ενώ η επαναλαμβανόμενη επιλογή στο εργαστήριο προϋποθέτει την επιβίωση κάποιων ατόμων και συγκλίνει στις δόσεις A.

Μια επιλογή των ατόμων των οποίων ο φαινότυπος είναι εντός του φυσιολογικού εύρους των φαινοτυπικών αναλογιών αφορά μια πολυπαραγοντική ανθεκτικότητα η οποία συνδυάζεται με

προϋπάρχοντες παράγοντες ανθεκτικότητας οι οποίοι έχουν μείζονα ρόλο σε αυτήν, όπως π.χ. το μέγεθος του σώματος. Σε αντίθεση όταν ο φαινότυπος της ανθεκτικότητας είναι εκτός των φυσιολογικών ορίων του εύρους των φαινοτυπικών αναλογιών στον πληθυσμό τότε αυτή οφείλεται σε μία τροποποίηση ενός μόνο γονιδίου η οποία και έχει τον υπερέχοντα ρόλο σε αυτήν. Αναλύσεις πειραμάτων που έχουν γίνει σε έντομα του αγρού δείχνουν συχνά την σημαντικότητα αυτών των τροποποιήσεων (μεταλλάξεων) σε μοναδιαία γονίδια και τον υπερέχοντα ρόλο τους στην ανθεκτικότητα του πληθυσμού (McKenzie, J.A. et al. 1994).

1.4 Ανθεκτικότητα στο spinosad

Μελέτη της ανθεκτικότητας στο spinosad σε διάφορα έντομα στόχους

Το spinosad στοχεύει σε ένα μεγάλο εύρος των λεπιδόπτερων και των δίπτερων και μέχρι σήμερα αποδεικνύεται ασφαλές για τους οργανισμούς οι οποίοι δεν αποτελούν στόχους γι' αυτό. Κύριος στόχος του εντομοκτόνου με βάση το Spinosad είναι ο νικοτινικός υποδοχέας της ακετυλοχολίνης (nAChRs) αλλά είναι ικανό να επιδρά και στον υποδοχέα GABA (Moulton, 2000). Παρόλο που τα έντομα έχουν μικρότερο αριθμό nAChRs απ' ό,τι τα σπονδυλωτά, η ποικιλομορφία των nAChRs των εντόμων οφείλεται κυρίως στο εναλλακτικό μάτισμα, στον αποκλεισμό εξονίων και στο A-to -I mRNA editing. Για παράδειγμα έχει υπολογισθεί πως για την υπομονάδα Da6 του nAChR της *D. Melanogaster* είναι θεωρητικά πιθανό να παραχθούν περισσότερες από 30.000 διαφορετικές υπομονάδες και υπάρχουν τουλάχιστον 18 μετάγραφα τα οποία έχουν ταυτοποιηθεί για την υπομονάδα Tcasab του *T.castaneum* (Rinkevich F, Scott J 2009).

Πολύ σημαντικό είναι ότι το spinosad δεν συνδέεται στην ίδια θέση με την ακετυλοχολίνη αλλά σε μια αλλοστερική. Πρόσφατες μελέτες μεταλλαξιγένεσης στη *Drosophila* έδειξαν ότι το spinosad συνδέεται στην α6 υπομονάδα (Perry et. al., 2007) του υποδοχέα ενώ είναι συνδεδεμένη η ακετυλοχολίνη δηλ. συνδέεται όταν το κανάλι είναι σε ενεργή κατάσταση. Η σύνδεση του spinosad εμποδίζει την απομάκρυνση της ακετυλοχολίνης από τον υποδοχέα, με αποτέλεσμα την απενεργοποίηση του καναλιού και τη συνεχή είσοδο ιόντων Na^+ , η οποία οδηγεί στην υπερόπλωση του κυττάρου και τελικά στο θάνατο.

Η φαινοτυπική δράση του spinosad είναι αρχικά η ανύψωση του σώματος του εντόμου, η οποία οφείλεται στην επιμήκυνση των ποδιών του. Όσο η επίδραση του εντομοκτόνου προχωρά, τα πόδια του εντόμου επιμηκύνονται ασύμμετρα, με αποτέλεσμα να προκαλείται αναστροφή του εντόμου και τρέμουλο όπου ακολουθείται από παράλυση. Το έντομο δεν μπορεί να ανακάμψει σε

κανένα στάδιο και τα συμπτώματα παραμένουν τα ίδια είτε αν χορηγηθεί μέσω ένεσης, είτε μέσω επαφής (Salgado, 1997). Τα δεδομένα αυτά υποστηρίζουν το γεγονός πως τροποποιήσεις στις περιοχές πρόσδεσης των υποδοχέων αυτών ως αποτέλεσμα της ανάπτυξης ανθεκτικότητας σε άλλα εντομοκτόνα δεν θα προκαλέσει επικαλυπτόμενη (cross-resistance) ανθεκτικότητα και στο spinosad (Shono & Scott 2003). Παρόλο που όλες οι ανθεκτικές σε εντομοκτόνα αποικίες παρασιτικών εντόμων έδειξαν λίγη ή και καθόλου επικαλυπτόμενη ανθεκτικότητα στη σπινοσίνη/spinosad είναι σχεδόν σίγουρο ότι η εξελικτική πίεση που ασκείται πάνω σε αυτούς τους πληθυσμούς θα οδηγήσει στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας και το spinosad δεν αποτελεί εξαίρεση σε αυτό.

Υπάρχει μια πιθανότητα για επικαλυπτόμενη ανθεκτικότητα από εντομοκτόνα όπως το naled και το malathion που προκύπτει από ανθεκτικές μύγες (*B. Dorsalis*) στο spinosad. Μελέτες έχουν δείξει ότι οι ανθεκτικές σειρές τόσο του naled όσο και του malathion έχουν 5 X επικαλυπτόμενη ανθεκτικότητα στο spinosad. Υπάρχει επίσης ένα στοιχείο επικαλυπτόμενης ανθεκτικότητας στο spinosad σε μύγες (*B. Dorsalis*) οι οποίες συλλέχτηκαν από περιοχές όπου το malathion και το naled χρησιμοποιούνταν για χρονική περίοδο 50 χρόνων (Ju-Chun hsu & Hai-Tung Feng 2006).

Η προοπτική ανάπτυξης της ανθεκτικότητας σε εντομοκτόνα με αυξανόμενη συχνότητα και εξάπλωση εξαρτάται από το εάν η ανθεκτικότητα βρίσκεται σε ετεροζυγώτες. Σημαντικό σε αυτή τη περίπτωση είναι ότι οι ετεροζυγώτες έχουν δείξει να είναι περισσότερο ανθεκτικοί. Για το λόγο αυτό σε χαμηλές δόσεις εντομοκτόνου οι ετεροζυγώτες έχουν επιλεκτικό πλεονέκτημα. Η επιλογή με το spinosad οδηγεί στην αύξηση της συχνότητας του ανθεκτικού αλληλόμορφου.

1.4.1 *Drosophila melanogaster*

Στη *Drosophila melanogaster* η ανθεκτικότητα στο spinosad έχει βρεθεί πως προκαλείται από μια μετάλλαξη στην Da6 υπομονάδα του νικοτινικού υποδοχέα η οποία προκαλεί απουσία της υπομονάδας στον υποδοχέα. Ανάλογες μεταλλάξεις σε ορθόλογα γονίδια της Da6 μπορεί να οδηγήσουν σε ανάπτυξη ανθεκτικότητας στο spinosad σε άγριους πληθυσμούς παρασιτικών εντόμων (Perry et al., 2007). Στην εργασία τους οι Trent Perry et al., μελέτησαν ένα στέλεχος της *Drosophila* τα οποία αναπτύχθηκε στο Bloomington Stock Centre, USA και στο οποίο το γονίδιο της a6 υπομονάδας αποσιωπούνταν (CyO), καθώς και εργαστηριακά controls. Τόσο τα controls όσο και το στέλεχος που συλλέχθηκε αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό μέσο που περιείχε διάφορες

δόσεις εντομοκτόνου (Spinosad). Στα πειράματα που ακολούθησαν παρατήρησαν ότι το στέλεχος (CyO) παρουσίασε μεγάλη ανθεκτικότητα προς το spinosad (1181 φορές περισσότερο ανθεκτικά συγκρινόμενο με το ανθεκτικό στέλεχος) απουσιάζει η υπομονάδα Da6. Εντόπισαν μια ανεμηνεύσιμη μετάλλαξη στην υπομονάδα Da6 με αποτέλεσμα την αύξηση της ανθεκτικότητας του εντόμου στο Spinosad. Συγκεκριμένα ανάλυση της ανθεκτικής σειράς της *Drosophila melanogaster* έδειξε «διακοπή» του γονιδίου της Da6 λόγω της εισαγωγής ενός μεταθετού στοιχείου στο εξόνιο 8, με αποτέλεσμα τη διακοπή της μεταγραφής του γονιδίου. Αυτό είχε ως συνέπεια να παράγεται μια μη λειτουργική υπομονάδα Da6, η οποία διαθέτει τις διαμεμβρανικές περιοχές TM1 και TM2 αλλά στερείται τις διαμεμβρανικές περιοχές TM3 και TM4, την κυτταροπλασματική θηλιά και την εξωκυτταρική καρβοξυτελική ουρά (Perry, 2007).

Από τη στιγμή που το knock-out γονίδιο της Da6 προσδίδει υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας η υπομονάδα αυτή είναι εκείνη η οποία εμπλέκεται στη περιοχή πρόσδεσης του spinosad ή τουλάχιστον είναι η απαραίτητη περιοχή στην οποία επιδρά το εντομοκτόνο αυτό. Είναι πιθανό ότι υπάρχουν και άλλοι νικοτινικοί υποδοχείς στους οποίους επιδρά το spinosad όταν εκτίθενται σε υψηλές δόσεις ή παρουσιάζουν μειωμένη ανταπόκριση που εξηγεί την έλλειψη μειωμένης ανθεκτικότητας. Η Da6 σχετίζεται με την A7-like του νικοτινικού υποδοχέα (Grauso et al. 2002; Littleton & Ganetzky 2000). Στη τάξη αυτή εμφανίζονται ομοπενταμερές και ετεροπενταμερές υπομονάδες υποδοχέων (Couturier et al. 1990).

Σε μια πληθώρα περιπτώσεων η ανθεκτικότητα έχει παρατηρηθεί ότι είναι ημιτελώς υπολειπόμενη με τα επίπεδα ανθεκτικότητας σε ένα παρόμοιο επίπεδο με αυτά που παρατηρήθηκαν στο DA6 knock-out (Sayyed et al. 2004; Shono & Scott 2003; Wyss et al. 2003; Zhao et al. 2002). Επιπλέον το ορθόλογο γονίδιο της Da6 μπορεί να είναι το ανθεκτικό γονίδιο στα είδη αυτά όπως και σε άλλα στα οποία αναπτύσσεται η ανθεκτικότητα.

1.4.2 *Musca domestica*

Η ανθεκτικότητα στο εντομοκτόνο μελετήθηκε και στη *Musca domestica* όπου εντοπίστηκε ένας παράγοντας που επηρεάζει την ανθεκτικότητα στο αυτόσωμα 1. Ένα άλλο γνωστό γονίδιο ανθεκτικότητας στο αυτόσωμα 1 είναι το γονίδιο που συσχετίζεται με την ανθεκτικότητα μέσω CYP6D1 (Shono, 2003). Η ανθεκτικότητα όμως στο Spinosad δεν προκαλείται από το ίδιο γονίδιο γιατί η ανθεκτικότητα μέσω της μονοοξυγενάσης μπορεί να αντιμετωπισθεί με χορήγηση PBO και κληρονομείται ως επικρατές χαρακτηριστικό.

1.4.3 *Plutella xylostella*

Στο έντομο *P. Xylostella* η ανθεκτικότητα στο spinosad βρέθηκε πως προκαλείται λόγω ενός αυτοσωμικού υπολοιπούμενου γονιδίου. Το ορθόλογο γονίδιο της Da6 υπομονάδας του nAChR στο *P. Xylostella* είναι το Pxa6 και έχει 92% ομολογία με αυτό της Da6 υπομονάδας του nAChR της *Drosophila*.

Είδο-ειδικοί εκκινητές κατασκευάστηκαν για τον εντοπισμό του γονιδίου σε ανθεκτικές σειρές του *P. Xylostella* (Simon W. Baxter, et. al. 2010). Όταν το γονίδιο εντοπίστηκε βρέθηκε μια σημειακή μετάλλαξη στη 5' αμετάφραστη περιοχή του ιντρονίου 9 η οποία οδηγούσε στη προσθήκη 40 βάσεων επιπλέον στο τελικό μετάγραφο στις ανθεκτικές σειρές. Αυτή η μετάλλαξη οδηγεί στη δημιουργία ενός κωδικονίου λήξης το οποίο τερματίζει πρόωρα την μεταγραφή μεταξύ των διαμεμβρανικών περιοχών 3 και 4 παράγοντας μια μη λειτουργική υπομονάδα (Baxter, 2010). Η αποκοπή της αλληλουχίας στο γονίδιο της Pxa6 του nAChR μετά το εξόνιο 9 υποδεικνύει ότι το spinosad αλληλεπιδρά με τον αγρίως τύπου nAChR στην ενδοκυτταρική θηλιά του υποδοχέα, μεταξύ των περιοχών TM3 και TM4, η οποία αφαιρείται από το τελικό μετάγραφο.

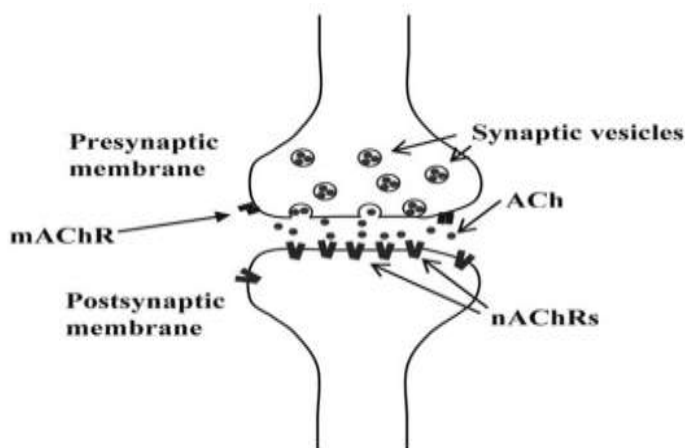
1.4.4 *Bactrocera dorsalis*

Στη Ταϊβάν εντοπίστηκαν ανθεκτικά στελέχη στο εντομοκτόνο spinosad σε υψηλά επίπεδα, πάνω από 2000X χωρίς επικαλυπτόμενη ανθεκτικότητα. Χρησιμοποιώντας μεθόδους PCR και RACE απομόνωσαν ολόκληρο το γονίδιο του α6 νικοτινικού υποδοχέα της ακετυλοχολίνης σε ένα ευαίσθητο εργαστηριακό στέλεχος οποίο αποτελείται από ένα ανοικτό πλαίσιο 1467bp και κωδικοποιεί μια φυσιολογική νικοτινική υπομονάδα. Στο ανθεκτικό στέλεχος όλα τα μετάγραφα που απομονώθηκαν κωδικοποιούσαν μια μη λειτουργική πρωτεΐνη με μικρές απαλοιφές βάσεων και πρόωρα κωδικόνια λήξης στο εξόνιο 7. Ανάλυση του γενομικού DNA (ιντρόνιο 2 και εξόνια 3-6) έδειξε απουσία ολόκληρου του εξονίου 5. Το RNA editing δεν συμμετείχε στην ανθεκτικότητα (Hsu et al., 2006).

1.6 Νικοτινικοί υποδοχείς - nAChRs

Η χολινεργική οδός είναι ένα από τα πιο σημαντικά διεγερτικά συστήματα μεταγωγής σήματος στο νευρικό σύστημα των εντόμων. Ο νευροδιαβιβαστής ακετυλοχολίνη (ACh), ο οποίος συντίθεται από τους χολινεργικούς νευρώνες, είναι ευρέως κατανομημένος σε όλο το νευρικό σύστημα και παίζει ένα ρόλο κλειδί στη συναπτική μεταγωγή του σήματος στα έντομα (εικόνα 7). Δύο τύποι υποδοχέων ACh έχουν βρεθεί: οι μουσκαρινικοί υποδοχείς της ακετυλοχολίνης (mAChRs) και οι νικοτινικοί υποδοχείς της ακετυλοχολίνης (nAChRs).

Πολυάριθμες μελέτες έχουν αποκαλύψει τις φαρμακολογικές ιδιαιτερότητες των μουσκαρινικών και των νικοτινικών υποδοχέων στη συναπτική σχισμή (Noda et al.; 1982; Boulter et al., 1986, 1990; Goldmann et al., 1987; Deneris et al., 1988; Nef et al., 1988). Οι mAChRs έχει αναφερθεί πως αποτελούν κρίσιμο εργαλείο ρύθμισης της έκκρισης ACh στη συναπτική σχισμή στο νευρικό σύστημα των εντόμων. Ως γνωστό η ACh συνδέεται σε μετασυναπτικούς νικοτινικούς υποδοχείς, ενώ η ύπαρξη mAChRs προσυναπτικά αποδείχθηκε ηλεκτροφυσιολογικά (Hue B, Lapied B, Malecot CO. 1989). Σε αυτή τη περίπτωση, οι φαρμακολογικές ιδιότητες των mAChRs συγκλίνουν με αυτές των σπονδυλωτών M2 mAChRs- υπομονάδων οι οποίες εμπλέκονται στη ρύθμιση της έκκρισης ACh στα προσυναπτικά άκρα (Le Corronec H, Lapied B, Hue B. 1991).



Εικόνα 7: σε μια συναπτική σχισμή ο νευροδιαβιβαστής ακετυλοχολίνη βρίσκεται σε προσυναπτικά κυστίδια. Με την ενεργοποίηση των μουσκαρινικών υποδοχέων προσυναπτικά απελευθερώνεται η ακετυλοχολίνη που δεσμεύεται από τους nACRs μετασυναπτικά.

Όπου υπάρχει νευρομυϊκή σύναψη στα σπονδυλωτά και σε μερικά ασπόνδυλα είναι χολινεργική ενώ, η συναπτική μεταγωγή σήματος στη νευρομυϊκή σύναψη των εντόμων είναι γλουταμινεργική (Usherwood 1994).

Τα έντομα επίσης διαφέρουν από τα σπονδυλωτά στη σχετική σημασία της ακετυλοχολίνης και της γλουταμίνης ως κύριοι νευροδιαβιβαστές του νευρικού συστήματος. Στον εγκέφαλο των θηλαστικών, η γλουταμίνη είναι ο κύριος νευροδιαβιβαστής ενώ τον ρόλο αυτό έχει στα έντομα η ακετυλοχολίνη.

Στο μετασυναπτικό επίπεδο, οι nAChRs αποτελούν πρωτεΐνες μεγάλου ενδιαφέροντος αφού έχει δηχθεί πως 1) εμπλέκονται στη γρήγορη διεγερτική συναπτική μετάδοση του σήματος και 2) αποτελούν τους μοριακούς στόχους ομάδων εντομοκτόνων (Matsuda K, Buckingham SD, Kleier D et al. 2001).

Τα τελευταία χρόνια, διάφοροι τύποι nAChRs έχουν παρατηρηθεί με ηλεκτρο-φαρμακολογικές μελέτες και κλωνοποιηθεί. Οι nAChRs αποτελούνται από πέντε υπομονάδες διατεταγμένες κυκλικά δημιουργώντας ένα ιοντικό κανάλι. Από τη στιγμή που οι υπομονάδες που συγκροτούν τον υποδοχέα καθορίζουν τις λειτουργικές και φαρμακολογικές του ιδιότητες, η ύπαρξη οικογενειών γονιδίων υποδοχέων που περιλαμβάνουν γονίδια που κωδικοποιούν τις διάφορες υπομονάδες τους, παρέχει μια λειτουργική βάση για την ευρύτερη λειτουργική ποικιλομορφία (Andrew K. Jones et al. 2010). Παρόλο που οι οικογένειες γονιδίων των nAChRs των εντόμων είναι ανάμεσα στις πιο μικρές από όσες γνωρίζουμε, η ποικιλομορφία των υποδοχέων μπορεί να αυξηθεί σημαντικά μέσω μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων όπως το εναλλακτικό μάτισμα (alternative splicing) και το mRNA A-to-I editing τα οποία δυνητικά μπορούν να παράγουν νέα πρωτεϊνικά αντίγραφα που ξεπερνούν και τον αριθμό των γονιδίων των nAChRs. Αυτές οι δύο διαδικασίες μπορούν επίσης να παράγουν ειδο-ειδικές ισομορφές υπομονάδων.

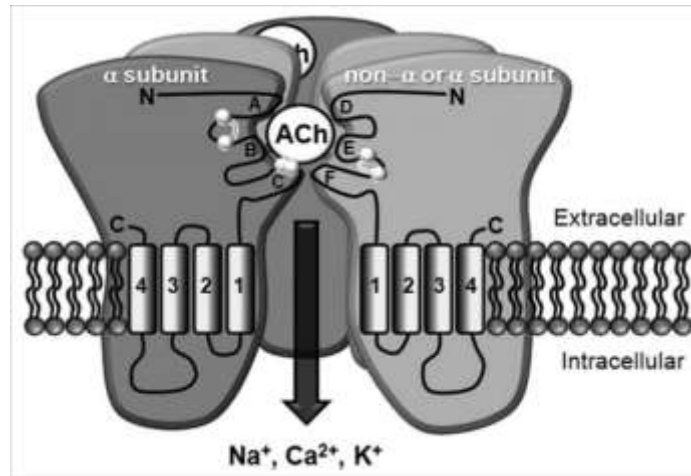
Ανάλυση ολοκληρωμένων οικογενειών γονιδίων nAChR έδειξε πως τα έντομα έχουν τουλάχιστον μία αποκλίνουσα υπομονάδα, πράγμα που υποδεικνύει χαμηλή ομολογία των γονιδίων αυτής με όλα τα άλλα γνωστά γονίδια των υπομονάδων (λιγότερο από 29% ομολογία). Σε αντίθεση με τις βασικές ομάδες των υπομονάδων, ανάλογες αποκλίνουσες υπομονάδες είναι δύσκολο να βρεθούν σε διαφορετικά είδη εντόμων.

Στη πραγματικότητα, κάθε έντομο κατέχει τουλάχιστον μία υψηλά αποκλίνουσα υπομονάδα του nAChR η οποία πιθανόν να έχει ειδο-ειδικές λειτουργίες. Αυτές οι ειδο-ειδικές υπομονάδες προσφέρονται ως πολλά υποσχόμενος στόχος για τον μελλοντικό ορθολογιστικό σχεδιασμό νέων εξειδικευμένων εντομοκτόνων τα οποία θα θανατώνουν τα επιθυμητά παράσιτα αλλά θα εξασφαλίζουν την επιβίωση των ωφέλιμων ειδών (Le Nove`re et al. 2002; Millar 2003).

1.6.1 Δομή και λειτουργία

Οι nAChRs είναι μέλη της υπεροικογένειας Cys-loop προσδετο-εξαρτώμενων ιοντικών καναλιών η οποία περιλαμβάνει επίσης και τους ιονοτροπικούς υποδοχείς GABA (γλυκίνη και σεροτονίνη) (Connolly CN, Wafford KA. 2004). Οι nAChRs αποτελούνται από πέντε ομόλογες υπομονάδες διατεταγμένες κυκλικά γύρω από ένα ιοντικό κανάλι. Ενεργούν ως ένας μοριακός διακόπτης ο οποίος αλλάζει διαμόρφωση όταν δεσμεύεται στον υποδοχέα κάποιος αγωνιστής όπως η ACh επιτρέποντας την ροή συγκεκριμένων ιόντων διαμέσου του καναλιού (Changeux JP, Taly A. 2008). Κάθε υπομονάδα έχει τέσσερις διαμεμβρικές περιοχές (TM1-4) και ένα αμινοτελικό εξωκυτταρικό άκρο το οποίο περιέχει το χαρακτηριστικό Cys-loop μοτίβο αποτελούμενο από δύο δυσουλφιδικούς δεσμούς μεταξύ κυστεινών οι οποίες απέχουν μεταξύ τους κατά 13 αμινοξικά κατάλοιπα. Η Cys-loop διαμόρφωση παίζει σημαντικό ρόλο στη συγκρότηση του υποδοχέα και στην κινητική των ιόντων δια μέσω του καναλιού. Η περιοχή πρόσδεσης της ACh βρίσκεται μεταξύ δύο γειτονικών υπομονάδων και διαμορφώνεται από έξι διακριτές περιοχές (loops A-F) στο αμινοτελικό εξωκυτταρικό άκρο (Corringier PJ, Le Novere N, Changeux JP. 2000), με τις loops A, B και C να συντελούνται από μία α υπομονάδα και τις loops D, E και F να συντελούνται από μια α ή non- α υπομονάδα. Οι υπομονάδες οι οποίες περιέχουν τις δύο κυστείνες, οι οποίες είναι σημαντικές για την δέμωση της ACh, στη περιοχή loop C, ορίζονται ως α υπομονάδες, ενώ όσες από τις υπομονάδες δεν περιέχουν τις δύο κυστείνες ορίζονται ως non- α υπομονάδες (β, δ, ϵ ή γ).

Οι nAChRs μπορούν να υπάρξουν ως ομομερή α υπομονάδων ή ως ετερομερή δύο ειδών α υπομονάδων ή πιο συχνά μιας ποικιλίας συνδυασμών α και non- α υπομονάδων (Millar NS, Gotti C. 2009). Η σύνθεση των υπομονάδων καθορίζει τις λειτουργικές και φαρμακολογικές ιδιότητες του υποδοχέα και επί πλέον η ποικιλομορφία των υπομονάδων προάγεται από τα πολλαπλά γονίδια που τις κωδικοποιούν σε έναν οργανισμό. **(εικόνα 8)**



Εικόνα 8: Δομή του νικοτινικού υποδοχέα της ακετυλοχολίνης. Σχηματική αναπαράσταση του ετερομερή υποδοχέα που αποτελείται από δύο α (σκούρο γκρι) και τρεις non- α υπομονάδες (ελαφρύ γκρι). Στο πολυπεπίτιδιο το οποίο εξέρχεται από τις δύο υπομονάδες επισημαίνονται, η loop C περιοχή (δύο άσπροι κύκλοι ενωμένη με μία διπλή άσπρη γραμμή), οι δύο κυστείνες στη loop C οι οποίες προσδιορίζουν τις α υπομονάδες και οι τέσσερις διαμεμβρανικές περιοχές (TM1-4) με μία μεγάλη ενδοκυτταρική θηλιά μεταξύ της TM3 και TM4 περιοχής. Οι έξι περιοχές πρόσδεσης (A-F) οι οποίες συντελούν την δέσμευση του προσδέτη φαίνονται στο σχήμα καθώς και δύο μόρια ACh τα οποία είναι προσδεδεμένα στον υποδοχέα αυτόν. Οι πέντε υπομονάδες που συνιστούν τον υποδοχέα είναι διατεταγμένες γύρω από ένα κεντρικό ιοντικό κανάλι.

Οι πρώτες nAChR υπομονάδες που αλληλουχίθηκαν ήταν αυτές του *Torpedo californica* και του *Torpedo marmorata* οι οποίες δημοσιεύθηκαν στις αρχές του 1980 (Sumikawa K, Houghton M, Smith JC et al. 1982). Μεταγενέστερα δείχθηκε πως οι υπομονάδες του nAChR σε μία ποικιλία οργανισμών έχουν υψηλή ομολογία και μοιράζονται μεγάλο αριθμό πανομοιότυπων αμινοξέων (Corringer PJ, Le Novere N, Changeux JP. 2000). Το συμπέρασμα αυτό οδήγησε στη χρήση του *Torpedo* DNA για τη δημιουργία ανιχνευτών σχεδιασμένων για την απομόνωση κλώνων γονιδίων υποδοχέων της *D.melanogaster* με υβριδισμό όπου τελικά καθορίστηκε και αλληλουχήθηκε η πρώτη υπομονάδα nAChR εντόμων (Hermans-Borgmeyer I, Zopf D, Ryseck RP et al. 1986).

Παρόλο που κανένας συνδυασμός από τις 7 κλωνοποιημένες αρχικά α υπομονάδες (Da1, Da2, Da3, Da4, D β 1, D β 2, D β 3) (εικόνα 9) δεν έδινε πλήρως λειτουργικό nAChR ή μιας υψηλής συγγένειας περιοχή πρόσδεσης για τον νικοτινικό προσδέτη, αυτό επιτεύχθηκε όταν οι υπομονάδες αυτές εκφράστηκαν (πρωτεΐνες χίμαιρες) μαζί με non- α υπομονάδες σπονδυλωτών (Bertrand et al. 1994; Lansdell et al. 1997; Schulz et al. 1998; Lansdell and Millar 2000). Από τότε και σε συνδυασμό με την αλληλούχιση όλου του γονιδιώματος της *D.melanogaster* έχει δειχθεί πως η οικογένεια των nAChRs περιέχει δέκα υπομονάδες από τις οποίες οι επτά είναι α (Da1-Da7) και οι τρεις είναι non- α (D β 1-D β 3). Βέβαια όπως έχει αναφερθεί, το εναλλακτικό μάτισμα και το RNA editing αυξάνει ραγδαία τον αριθμό των πρωτεϊνικών nAChR προϊόντων.

Subunit Name	Technique Used to Identify Subunit	Year Published
D β 1 or ARD (acetylcholine receptor <i>Drosophila</i>)	Hybridisation screen using Torpedo α and γ nAChR subunit probes	1986 ³⁸
Da1 or ALS (alpha-like subunit)	Hybridisation screen using chicken α 2 nAChR subunit probe	1988 ³⁹
Da2 or SAD (second alpha-like subunit <i>Drosophila</i>)	Hybridisation screen using Da1 nAChR subunit probe ⁴¹ or conserved 10 amino acid region preceding TM4 ⁴⁴	1990 ^{41,44}
D β 2 or SBD (second beta-like subunit <i>Drosophila</i>)	Hybridisation screen using genomic clone probe isolated in ref. ⁴⁴	1990 ⁴⁵
Da3	Hybridisation screen using Da1 nAChR subunit probe and conserved 10 amino acid region preceding TM4	1998 ⁴⁶
Da4	PCR using primers based on an EST clone	2000 ⁴²
D β 3	Sequencing of an EST clone based on a gene predicted in the <i>D. melanogaster</i> genome	2002 ⁴³
Da5	BLAST analysis ¹²⁴ against <i>D. melanogaster</i> genome sequence	2002 ⁴⁰
Da6	BLAST analysis ¹²⁴ against <i>D. melanogaster</i> genome sequence	2002 ⁴⁰
Da7	BLAST analysis ¹²⁴ against <i>D. melanogaster</i> genome sequence	2002 ⁴⁰

Εικόνα 9: οι υπομονάδες του νικοτινικού υποδοχέα της ακετυλοχολίνης στο έντομο της *Drosophila M.* και οι τεχνικές με τις οποίες αυτές απομονωθήκαν.

1.7 Σκοπός

Το spinosad είναι ένα σχετικά νέο εντομοκτόνο της κατηγορίας των νατουραλυτών και παρουσιάζει μεγάλη δραστικότητα ως προς τα έντομα-στόχους, χαμηλή τοξικότητα ως προς τους ωφέλιμους και άλλους μη-επιζήμιους οργανισμούς και μικρή υπολειμματική δράση. Ανάμεσα στα έντομα-στόχους του spinosad συγκαταλέγεται και ο δάκος της ελιάς, *Bactrocera oleae*. Η μακροχρόνια όμως επιλογική δράση του spinosad, όπως παρατηρείται για κάθε συμβατικό εντομοκτόνο, θα οδηγήσει αναπόφευκτα σε ανάπτυξη ανθεκτικότητας. Με την ακετυλοχολίνη να είναι ο αφθονότερος νευροδιαβιβαστής στο νευρικό σύστημα των εντόμων, οι νικοτινικοί υποδοχείς της ακετυλοχολίνης αποτελούν σημαντικό στόχο των εντομοκτόνων.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η ολοκλήρωση της κλωνοποίησης των 5'UTR και 3'UTR του γονιδίου της α6 υπομονάδας του ευαίσθητου εργαστηριακού πληθυσμού καθώς και η κλωνοποίηση της υπομονάδας του νικοτινικού υποδοχέα της ακετυλοχολίνης του ανθεκτικού εργαστηριακού πληθυσμού δάκου μέσα στα πλαίσια της διερεύνησης του ρόλου του γονιδίου στην πίεση επιλογής του spinosad και σύγκρισής του με το ήδη υπάρχον γονίδιο του ευαίσθητου εργαστηριακού πληθυσμού.

2. Υλικά- Μέθοδοι

2.1 Εργαστηριακός πληθυσμός εντόμων

Ο εργαστηριακός πληθυσμός εντόμων προέρχεται από την αποικία του εργαστηρίου εντομολογίας ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος» με κωδικό ΑΤ που εγκαθιδρύθηκε στο εντομοτροφείο πριν από περίπου 40 χρόνια. Η εκτροφή του εντόμου γίνεται σε σταθερή θερμοκρασία 23-25 °C, σχετικής υγρασίας 65% και φωτοπερίοδο 12:12 (φως: σκοτάδι).

Ο ανθεκτικός εργαστηριακός πληθυσμός αναπτύχθηκε στο Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Προέρχεται από την ανάμιξη του στελέχους Δημόκριτος με άτομα από φυσικούς πληθυσμούς, τόσο διαφορετικών περιοχών της Ελλάδας όσο και της Καλιφόρνιας. Το στέλεχος αυτό αναπτύχθηκε κάτω από συνθήκες επιλογής, προσθέτοντας συνεχώς αυξανόμενες δόσεις του εντομοκτόνου Spinosad Success 8000 στο νερό εκτροφής. Μετά από 36 γενιές συνεχούς επιλογής η ανθεκτικότητα υπολογίστηκε στο ~30X.

2.2 Απομόνωση ολικού RNA από ενήλικα έντομα *Bactrocera oleae*

Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε προέρχεται από την εταιρία Invitrogen και αποτελεί βελτίωση της μεθόδου που περιγράφηκε το 1987 από τους Chomczynski και Sacchi «Single step RNA isolation».

Η μέθοδος αποτελείται από τέσσερα στάδια : ομογενοποίηση του εντόμου, διαχωρισμός φάσεων RNA/DNA/πρωτεΐνες, κατακρήμνιση και καθαρισμός. Η διαδικασία βασίζεται στο αντιδραστήριο TRIsure™ το οποίο αποτελεί ένα μονοφασικό μείγμα φαινόλης, ισοθειοκυανίνη και άλλων ουσιών που υποβοηθούν την απομόνωση RNA. Σημαντικό πλεονέκτημα της μεθόδου είναι η ανασταλτική δράση του TRIsure™ Reagent στις RNAσες προστατεύοντας το RNA και αυξάνοντας έτσι την απόδοση της μεθόδου.

Υλικά:

- TRIsure™
- Χλωροφόρμιο
- Ισοπροπανόλη
- Αιθανόλη 70%

Μέθοδος:

1. Ομογενοποίηση του ιστού σε 1ml TRIsure™ ανά 50-100mg ιστού. Ο ιστός πρέπει να είναι μικρότερος από το 10% του όγκου του υγρού.
2. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά ώστε να γίνει διάχυση των ενδοκυτταρικών μορίων στο διάλυμα.
3. Φυγοκέντρηση στις 12000rpm για 15 λεπτά στους 4 °C για να απομακρυνθούν τα κυτταρικά υπολείμματα.
4. Μεταφορά του υπερκείμενου σε 1.5ml eppendorf και προσθήκη χλωροφορμίου. Για 1ml TRIsure™ προστίθεται 200μl χλωροφορμίου.
5. Ανακίνηση και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 3 λεπτά.
6. Φυγοκέντρηση στις 12000rpm για 15 λεπτά στους 4 °C όπου γίνεται ο διαχωρισμός σε τρεις διακριτές φάσεις. Η πρώτη φάση (από τη βάση του eppendorf) είναι χρώματος κυανού (όπως το ατιδραστήριο TRIsure™) και περιέχει όλα τα οργανικά στοιχεία του ομογενοποιημένου (πρωτεΐνες), μια μεσόφαση που περιέχει το DNA και μια υδατική-διαφανής φάση όπου περιέχεται το RNA. Η υδατική φάση αντιστοιχεί στο 60% του όγκου TRIsure™ που χρησιμοποιήθηκε.
7. Μεταφορά της πάνω υδατικής φάσης σε καινούριο eppendorf.
8. Προσθήκη ισοπροπανόλης (500μl για 1 ml TRIsure™) και ανακίνηση.
9. Επώαση για 10-60 λεπτά στους -80 °C.
10. Φυγοκέντρηση στις 12000rpm για 30 λεπτά, 4 °C.
11. Αφαίρεση του υπερκείμενου και καθαρισμός του ιζήματος με 75% αιθανόλη. Προσθήκη 1ml αιθανόλης για 1ml TRIsure™.
12. Ελαφριά ανακίνηση με vortex και φυγοκέντρηση στις 7500rpm για 5 λεπτά, 4 °C.
13. Αφαίρεση του υπερκείμενου και στέγνωμα του ιζήματος για 10 λεπτά. Το ίζημα γίνεται διαφανές.
14. Αναδιάλυση του ιζήματος στην επιθυμητή ποσότητα ddH₂O. Για καλύτερη αναδιάλυση πραγματοποιείται επώαση για 10 λεπτά στους 55-60 °C.
15. Το απομονωμένο RNA αποθηκεύεται στους -80 °C.

2.3 Σύνθεση μονόκλωνου cDNA από ολικό RNA

Η μέθοδος πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο της κατασκευάστριας εταιρείας «First strand synthesis with M-MuLV reverse transcriptase». Το ένζυμο αντίστροφη

μεταγραφάση M-MuLV έχει την ικανότητα να μετατρέπει τη μονόκλωνη αλυσίδα του RNA να προσθέτει τα συμπληρωματικά νουκλεοτίδια δημιουργώντας δίκλιωνα μόρια. Τα μόρια αυτά είναι DNA διότι το ένζυμο απέναντι από κάθε νουκλεοτίδιο αδενίνης που συναντά στο RNA προσθέτει το νουκλεοτίδιο της θυμίνης το οποίο είναι το συμπληρωματικό νουκλεοτίδιο στο DNA και όχι το νουκλεοτίδιο της ουρακίλης που φυσιολογικά θα πρόσθετε αν ήταν RNA. Μικρές ποσότητες ριβονουκλεασής (RNase) μπορεί μερικές φορές να παραμείνουν ως υπολείμματα στο δείγμα με το απομονωμένο RNA και να θέσουν σε κίνδυνο τις περαιτέρω διαδικασίες. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήσαμε το ένζυμο RNase inhibitor ως προληπτικό μέτρο στους ενζυματικούς χειρισμούς του RNA για την αναστολή και τον έλεγχο των ριβονουκλεασών.

Υλικά:

- ολικό RNA
- dNTP mix
- GSP εσωτερικό εκκινητή: σχεδιάστηκαν εκκινητές με φορά προς το 5 άκρο (5GSP1, 5GSP2) και φορά προς το 3' άκρο (3GSP1, 3GSP2)
- 10X RT Buffer
- RNase inhibitor
- M-Mulv Reverse Transcriptase

Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία εκκινητή
5GSP1	GTC-CTT-AGA-TTT-CAG-CTA-CC
5GSP2	GGG-CGG-GTG-GGT-ATA-AGT-AT
3GSP1	CAC-AAC-GGT-GGA-GGA-GCA-TC
3GSP2	CCG-ATG-ATG-AGG-CGG-AAT-TG

Μέθοδος:

1. Σε ένα PCR tube προστίθεται:

Ολικό RNA	2 μ l	
dNTPs	5 μ l	
Buffer	2 μ l	
GSP1	2 μ l	Conc=10 μ mol/ μ l
RT-M-Mulvn	1 μ l	
RNAse inhibitor	1 μ l	
H ₂ O	<u>11 μl</u>	
Υτελ.	20μl	

2. Τοποθετούνται σε πρόγραμμα RT- PCR:

25°C για 7 min

42°C για 3min

48°C για 30min

95°C για 5min

2.4 RNAse treatment

Ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο της εταιρείας Biolabs. Πραγματοποιήσαμε το βήμα του RNAse treatment προσθέτοντας το ένζυμο RNAse H. Η RNAse H προστίθεται για να απομακρυνθεί το RNA από το δίκλωνο DNA:RNA που σχηματίστηκε μετά από την διαδικασία της RT-PCR.

Υλικά:

- cDNA
- RNase H 30 units
- Buffer RNase 10X ->1X

Μέθοδος:

1. Σε ένα PCR tube προστίθεται:

cDNA	20μl
RNase H	6μl (30units)
Buffer 10X	3μl 1X
H ₂ O	1μl
Υτελ.	30μl

2. Επώαση στους 37 °C για 1 ώρα
3. Επώαση στους 65 °C για 20 λεπτά για την απενεργοποίηση του ενζύμου.

2.5 Κατακρήμνιση cDNA

Ακολουθήθηκε ένα πρωτόκολλο τροποποιημένο από το *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, J.Sambrook, E.F. Fritisch, T. Maniatis, 1989.

Στόχος αυτής της μεθόδου είναι η κατακρήμνιση των νουκλεϊκών οξέων με αιθανόλη με σκοπό τη συμπύκνωση των νουκλεϊκών οξέων ή την απομάκρυνση αλάτων, ολιγονουκλεοτιδίων ή άλλων προσμίξεων.

Υλικά:

- Ισοπροπανόλη
- Διάλυμα οξικού νατρίου (CH₃COONa)
- Αιθανόλη 70%
- Γλυκογόνο

Μέθοδος:

1. Προσθήκη στο δείγμα ενός όγκου ισοπροπανόλης 100%, CH₃COONa 3M για τελική συγκέντρωση 0,3M (ασθενές αλάτι του οποίου τα ιόντα Na⁺ θα συνδεθούν με το αρνητικά φορτισμένο DNA) και 0,5μλ γλυκογόνο(μεγαλομόριο με πόρους που παρασύρου το DNA).
2. Επώαση για περίπου 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
3. Φυγοκεντρώμε στις μέγιστες στροφές για 15-20 λεπτά.
4. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και γίνεται προσθήκη μισού όγκου αιθανόλης 70% ώστε να απομακρυνθούν τα άλατα.
5. Φυγοκέντρωση για 5 λεπτά στις μέγιστες στροφές
6. Το υπερκείμενο απορρίπτεται
7. Αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου το erpendorf μέχρι να ξηραθεί το ίζημα του DNA.
8. Επαναδιάλυση του ιζήματος σε υδατικό διάλυμα.

2.6 A- Tailing

Η προσθήκη της πολύ -AAA ουράς γίνεται με την χρήση του ενζύμου TdT καθώς και την προσθήκη στο δείγμα μας νουκλετιδίων αδενίνης. Το ένζυμο έχει την ικανότητα να προσθέτει επαναλαμβανόμενα νουκλεοτίδια (στη δική μας περίπτωση αδενίνης) στα άκρα του cDNA.

Υλικά:

- cDNA
- dATPs
- TdT
- Buffer
- H₂O

Μέθοδος:

1. Σε ένα PCR tube προστίθεται:

cDNA	15μl
dATPs	0,8μl Καρχ= 100mu
TdT	0,5μl
Buffer	4μl
H ₂ O	<u>0</u>
Ντελ.	20μl

2. επώαση στους 37 °C για 15 λεπτά

3. επώαση στους 70 °C για 10 λεπτά

2.7 Race PCR

Η Race PCR είναι μία προέκταση της κλασικής PCR με την διαφορά ότι σε αυτή χρησιμοποιείται ένας εκκινητής σχεδιασμένος για γνωστή μικρού μήκους αλληλουχία και ένας oligodNTP εκκινητής. Η κατεύθυνση της αντίδρασης στο γονίδιο αφορά το σχεδιασμό του εκκινητή της γνωστής αλληλουχίας και μπορεί να είναι προς την 5' (5' Race PCR) ή προς τη 3' (3' Race PCR).

Υλικά:

- ✓ cDNA
- ✓ dNTPs
- ✓ oligoDT (primer)
- ✓ adapDT
- ✓ GSP2
- ✓ Taq polymerase III

Μέθοδος:

1. Σε ένα PCR tube προστίθεται:

cDNA	3μl	
dNTPs	0,5μl	Caρχ= 100mu
Buffer	2,5μl	
oligoDT	0,9μl	Caρχ= 10pcmol/μl
adapDT	1,8μl	Caρχ= 10pcmol/μl
GSP2	0,8μl	Caρχ= 10pcmol/μl
Taq pol.	0.3μl	
H ₂ O	14,2	
Ντελ.	25μl	

2. Πρόγραμμα PCR: RACE

94 °C -> 5 min

49/52 °C -> 5 min

72 °C -> 30 min

94 °C -> 0,30 min

49/52 °C -> 0,45 min

72 °C -> 2 min

94 °C -> 0,4 min

49/52 °C -> 0,45 min

72 °C -> 15 min

3. Αποθήκευση δειγμάτων στους 4 °C.

2.8 Ηλεκτροφόρηση

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό, την απομόνωση και την ταυτοποίηση μορίων DNA (Sambrook et al., 1989). Όταν εφαρμοστεί ηλεκτρικό πεδίο στα άκρα του πηκτώματος τότε το DNA θα μετακινηθεί προς το θετικό πόλο λόγω του αρνητικού φορτίου που φέρει σε ουδέτερο pH.

Η μετακίνηση του DNA είναι αντιστρόφως ανάλογη του λογαρίθμου του μοριακού του βάρους. Όσο πιο μικρό το μέγεθος του DNA τόσο πιο γρήγορα μετακινείται προς το θετικό πόλο. Μόρια DNA μεγέθους 200 bp έως 50 kb μπορούν να διαχωριστούν σε πηκτώματα αγαρόζης διαφόρων συγκεντρώσεων. Όσο πιο πυκνή η συγκέντρωση του πηκτώματος σε αγαρόζη τόσο πιο υψηλή η διαχωριστική ικανότητα του πηκτώματος.

Το DNA είναι ορατό σε υπεριώδες φως, με τη βοήθεια του βρωμιούχου αιθιδίου, το οποίο δεσμεύεται στη διπλή έλικα του DNA σε ποσότητα ίση με τη συγκέντρωσή του. Άρα με βάση το φθορισμό των μορίων του βρωμιούχου αιθιδίου μπορεί να ποσοτικοποιηθεί και το γενετικό υλικό. Επίσης μπορούμε να υπολογιστεί το μέγεθος του DNA έχοντας ως «χάρακα» ένα μάρτυρα μοριακού βάρους (ladder).

Υλικά:

- Ρυθμιστικό διάλυμα TBE 5X 1L: 54g Tris-base, 27,5g Boric acid, 20ml EDTA 0,5M (pH 8.0)
- Αγαρόζη
- Ladder
- Διάλυμα φόρτωσης (Loading buffer) 10X: 0,25% μπλε της βρωμοφαινόλης, 0,25% κυανού της ξυλόλης, 15% φικκόλη σε νερό
- Βρωμιούχο αιθίδιο

Μέθοδος:

Για την παρασκευή 100ml πηκτώματος αγαρόζης 1% με 0,5X TBE:

1. Προσθήκη 1gr αγαρόζης σε μια κωνική φιάλη.
2. Προσθήκη 100ml TBE 0,5X.

3. Θέρμανση της κωνικής φιάλης με συνεχή παρακολούθηση μέχρι να πραγματοποιηθεί πλήρης διάλυση της αγαρόζης
4. Προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου και ανακίνηση
5. Το διάλυμα αγαρόζης τοποθετείται στις ειδικές βάσεις ηλεκτροφορητικής συσκευής.
6. Αναμονή μέχρι να στερεοποιηθεί.

Για την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων:

1. Τοποθέτηση του πηκτώματος στη συσκευή ηλεκτροφόρησης.
2. Προσθήκη διαλύματος TBE 0,5X ώστε να καλυφθούν τα πηγαδάκια ηλεκτροφόρησης.
3. Προσθήκη διαλύματος φόρτωσης στα δείγματα και ανάδευση.
4. Μεταφορά των δειγμάτων και του μάρτυρα μοριακού βάρους στα πηγαδάκια.

Η παρακολούθηση της ηλεκτροφόρησης γίνεται με παρατήρηση μέσω υπεριώδους ακτινοβολίας του πηκτώματος. Την κινητικότητα των τμημάτων DNA στο πήκτωμα επηρεάζει η συγκέντρωση της αγαρόζης. Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα του DNA (μ) και η συγκέντρωση της αγαρόζης στο πήκτωμα (τ) συνδέονται με τον τύπο $\mu = \log \mu_0 - K\tau$ όπου μ_0 είναι η ηλεκτροφορητική κινητικότητα του DNA και K ο συντελεστής επιβράδυνσης.

2.9 Ανάκτηση μορίων DNA από πήκτωμα αγαρόζης

Η μέθοδος πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο της κατασκευάστριας εταιρείας Promega με όνομα «First strand synthesis with M-MuLV reverse transcriptase».

Στόχος αυτής της διαδικασίας είναι η απομόνωση του DNA από το πήκτωμα αγαρόζης ώστε να χρησιμοποιηθούν για άλλες πειραματικές διαδικασίες όπως re-PCR, κλωνοποίηση.

Υλικά:

- Membrane binding solution
- Διάλυμα πλύσης Μεμβράνης (Membrane wash solution)
- Υδατικό διάλυμα ελεύθερο Νουκλεασών (Nuclease-free water)
- Δείγμα του πηκτώματος

Μέθοδος:

1. Η επιθυμητή ζώνη του πηκτώματος αγαρόζης τοποθετείται σε ένα σωληνάκι τύπου eppendorf 1,5ml.
2. Υπολογισμός του βάρους του gel και προσθήκη 10μl από το διάλυμα Membrane Binding Solution ανά 10mg gel. Μέσα σε αυτό το διάλυμα θα διαχυθεί το γενετικό υλικό από το πήκτωμα. Όταν το βάρος του πηκτώματος είναι πάνω από 500mg, το πήκτωμα μοιράζεται σε δυο κομμάτια σε διαφορετικά eppendorfs.
3. Ανάδευση και επώαση 50-65°C μέχρι να διαλυθεί το πήκτωμα.
4. Όταν διαλυθεί πλήρως το διάλυμα μεταφέρεται στη στήλη (SV mini column). Η στήλη είναι τοποθετημένη μέσα στο σωλήνα συλλογής (tube collection). Επώαση για ένα λεπτό.
5. Φυγοκέντρηση στις μέγιστες στροφές για ένα λεπτό. Απορρίπτεται το έκλουσμα από το σωλήνα συλλογής και επανατοποθετείται η στήλη στο σωλήνα συλλογής.
6. Προσθήκη 700μl Membrane Wash Solution. Το διάλυμα αυτό περιέχει και 95% αιθανόλη.
7. Φυγοκέντρηση στις μέγιστες στροφές για ένα λεπτό.
8. Το έκλουσμα απορρίπτεται από το σωλήνα συλλογής.
9. Προσθήκη 500μl Membrane Wash Solution και φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις μέγιστες στροφές.
10. Απορρίπτεται το έκλουσμα και πραγματοποιείται φυγοκέντρηση για ένα λεπτό για να απομακρυνθεί η αιθανόλη.
11. Μεταφορά της στήλης προσεκτικά σε καθαρό σωληνάκι τύπου eppendorf.
12. Προσθήκη 25μl Nucleases-free water στο κέντρο της στήλης χωρίς να αγγίζει το φίλτρο. Το Nucleases free Water προθερμίνεται σε υδατόλουτρο 50-65 °C.
13. Επώαση για ένα λεπτό και φυγοκέντρηση για ένα λεπτό.
14. Επανάληψη των βημάτων 11 και 12.

Αποθήκευση του DNA στους 4 °C.

2.10 Αλυσιδωτή ατίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η PCR αποτελεί μια γρήγορη, εύκολη και οικονομική τεχνική που επιτρέπει τον ενζυμικό πολλαπλασιασμό επιλεγμένων αλληλουχιών DNA. Τα πρώτα πρωτόκολλα για τη μέθοδο αυτή παρουσιάστηκαν στα μέσα της δεκαετίας του '80, ενώ το 1993 ο K.Mullis τιμήθηκε με το βραβείο Νόμπελ Χημείας για την καθοριστική συμβολή του στην ανάπτυξη της τεχνικής PCR (Mullis et al., 1986).

Η μέθοδος βασίζεται σε επαναλαμβανόμενους κύκλους με εναλλαγές στη θερμοκρασία που έχουν ως στόχο:

- α. Την αποδιάταξη του δίκλωνου DNA-στόχου σχηματίζοντας δυο μονόκλωνες αλυσίδες ώστε να υβριδοποιηθούν οι εκκινητές. Η αποδιάταξη πραγματοποιείται σε υψηλή θερμοκρασία, 94-95 °C.
- β. Την υβριδοποίηση των εκκινητών (primers) με τις μονόκλωνες αλυσίδες DNA. Η υβριδοποίηση πραγματοποιείται σε θερμοκρασία περίπου 5 °C κάτω από τη θερμοκρασία τήξης (Tm) των εκκινητών (Ta= Tm-5). Η θερμοκρασία τήξης υπολογίζεται σύμφωνα με τον τύπο των Thein και Wallace $Tm = 4 * (\text{αριθμός βάσεων G+C}) + 2 * (\text{αριθμός βάσεων A+T})$.
- γ. Τον πολυμερισμό- επιμήκυνση των νεοσυντιθέμενων αλυσίδων σε θερμοκρασία 72-74 °C. Για τον πολυμερισμό χρησιμοποιείται η Taq DNA πολυμεράση.

Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος	Κύκλος
Αποδιάταξη	94°C	4min	1
Αποδιάταξη	94°C	30sec	30
Υβριδισμός	Ta°C	30sec	
Πολυμερισμός	72°C	1kb/min	
Τελικός πολυμερισμός	72°C	5min	1
Διατήρηση	4°C	-	-

Τα παραπάνω βήματα επαναλαμβάνονται για αρκετούς κύκλους (συνήθως 30 κύκλοι), έως ότου συντεθεί αρκετό προϊόν. Η αντίδραση είναι εκθετική και ένα μόριο DNA δίνει μετά από 30 επαναλήψεις της αντίδρασης περίπου 10^9 μόρια DNA.

Το πρόγραμμα μιας τυπικής αντίδρασης PCR είναι:

Υλικά:

- ✓ DNA
- ✓ Buffer
- ✓ MgCl₂
- ✓ dNTPs
- ✓ Taq polí
- ✓ Βοα6Fc/Rc (Primers)

Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία εκκινητή	Tm εκκινητή
Βοα6Fc	AGA-TTA-GTG-ACA-GCA-TAA-CCG	60
Βοα6Rc	TCT-ATC-CAC-AAC-CAT-TGC-CGC	64

Μέθοδος:

1. Σε μια τυπική αντίδραση PCR τελικού όγκου 20 µl προστίθενται:

Υλικά	Σαρχ.	Στελ	Ποσότητα
DNA		10-40ng	-
Buffer	10X	1X	2 µl
MgCl₂	50mM	1,5mM	0,6 µl
dNTPs	10Mm each	0,2Mm each	0,4 µl
Fc	10pcmol/µl	0,4-0,6µM	0,7 µl
Rc	10pcmol/µl	0,4-0,6µM	0,7 µl
Taq	5Unit/µl	1unit	0,2 µl
ddH₂O			Μέχρι Vτελ= 20µl
Τελικός όγκος			20µl

2. Τα σωληνάκια PCR τοποθετούνται σε θερμοκυκλοποιητή με το κατάλληλο πρόγραμμα.

Η απόδοση μιας PCR αντίδρασης εξαρτάται από μια σειρά παραγόντων όπως η συγκέντρωση των Mg^{2+} , ο αριθμός των κύκλων και η χρονική τους διάρκεια, η πολυμεράση που χρησιμοποιείται, η θερμοκρασία υβριδοποίησης των εκκινητών στις μονόκλωνες αλυσίδες του DNA-στόχου και τέλος ο σωστός σχεδιασμός των εκκινητών.

2.11 Εκχύλιση του DNA με φαινόλη- χλωροφόρμιο

Πρωτόκολλο τροποποιημένο από Molecular Cloning: A Laboratory Manual, J.Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis, 1989).

Στόχος της μεθόδου είναι η απομάκρυνση πρωτεϊνών από διαλύματα νουκλεϊκών οξέων χρησιμοποιώντας δυο οργανικούς διαλύτες, τη φαινόλη και το χλωροφόρμιο.

Υλικά

- Φαινόλη
- Χλωροφόρμιο

Μέθοδος

1. Προσθήκη μισού όγκου (σε σχέση με τον όγκο του δείγματος) φαινόλης (αποδιατάσσει και διαχωρίζει τις πρωτεΐες μαζί με τα λιπίδια από τα νουκλεϊκά οξέα) και χλωροφορμίου (διευκολύνει το διαχωρισμό των φάσεων λόγω της μεγάλης πυκνότητας που προσδίδει στην οργανική φάση και απομακρύνει τυχόν υπολείμματα φαινόλης από το διάλυμα) στο δείγμα.
2. Ανακίνηση ώστε να πάρει γαλακτώδη μορφή το μείγμα.
3. Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις μέγιστες τροφές ώστε να σχηματιστούν δύο φάσεις (οργανική και υδατική).
4. Μεταφορά προσεκτικά της υδατικής φάσης με πιπέτα σε καινούριο σωληνάκι τύπου eppendorf.
5. Προσθήκη ίσου όγκου χλωροφορμίου και απαλή ανάδευση.
6. Επανάληψη των βημάτων 3-5.
7. Μεταφορά προσεκτικά της υδατικής φάσης με πιπέτα σε καινούριο σωληνάκι τύπου eppendorf.

2.12 Αντίδραση σύνδεσης μορίων DNA σε πλασμιδιακό φορέα (ligation)

Η αντίδραση σύνδεσης πραγματοποιείται μέσω μιας διαμοριακής αντίδρασης στην οποία το ένα άκρο ενός γραμμικού πλασμιδιακού φορέα συνδέεται με το ένα άκρο του ενθέματος με την δράση του ενζύμου DNA λιγάσης ώστε να πραγματοποιηθεί κυκλοποίηση και σχηματισμός ενός ανασυνδιασμένου πλασμιδίου.

Οι DNA λιγάσες είναι ζωτικής σημασίας ένζυμα απαραίτητα για σημαντικές κυτταρικές διαδικασίες όπως αναδιπλασιασμό και επιδιόρθωση του DNA και ανασυνδιασμό.

Στη συγκεκριμένη περίπτωση χρησιμοποιείται η T4 DNA λιγάση διότι έχει την ικανότητα να καταλύει τη σύνδεση άκρων όλων των ειδών (τυφλά, προεξέχοντα 3' ή 5') (Sgaramella and Elrich, 1978).

Για να πραγματοποιηθεί αντίδραση σύνδεσης μεταξύ ενός κομματιού DNA και ενός φορέα απαραίτητο είναι να έχουν μεταξύ τους συμπληρωματικά άκρα. Στη συγκεκριμένη περίπτωση χρησιμοποιήθηκε φορέας pBlueScript II SK ο οποίος διαθέτει T-άκρα. Σε περιπτώσεις όπου το ένθεμα είναι προϊόν PCR με απλή Taq πολυμεράση, το ένθεμα λόγω της δράσης του ενζύμου περιέχει άκρα αδενίνης A. Έτσι διαθέτει συμπληρωματικά άκρα με τον φορέα και πραγματοποιείται απλή αντίδραση σύνδεσης. Σε περιπτώσεις όπου το ένθεμα είναι προϊόν πέψης ή άλλης αντίδρασης και δεν διαθέτει άκρα θυμίνης πραγματοποιείται προσθήκη άκρων θυμίνης.

Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του DNA πραγματοποιείται με τον εξής τύπο:

$$[(ng \text{ φορέα} \times bp \text{ ενθέματος}) / bp \text{ φορέα}] \times \text{αναλογία ενθέματος:φορέα} = ng \text{ ενθέματος}$$

Η αναλογία ενθέματος: φορέα κυμαίνεται από 3:1 – 8:1. Το ένζυμο που χρησιμοποιείται είναι η T4 λιγάση η οποία έχει την ικανότητα να καταλύει τη σύνδεση άκρων όλων των ειδών σε αντίθεση με τη λιγάση της E.coli που καταλύει τη σύνδεση μόνο τυφλών άκρων και σε μια απλή αντίδραση λιγάσης προστίθεται 1U.

Υλικά:

- Ρυθμιστικό διάλυμα (Buffer) T4 λιγάσης 10X
- Ένζυμο T4 λιγάση
- pBlueScript II SK

Μέθοδος:

1. Σε σωληνάκι τύπου erpendorf προστίθεται η υπολογισμένη ποσότητα ενθέματος με βάση τον τύπο, ποσότητα φορέα (συνήθως 50ng), ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος T4 λιγάσης για τελική συγκέντρωση 1X και 1Unit T4 λιγάσης.
2. Επώαση για 2.5 ώρες στους 22°C.

2.13 Παρασκευή Δεκτικών κυττάρων για ηλεκτροδιάτρηση

Η μέθοδος της ηλεκτροδιάτρησης χρησιμοποιήθηκε πρώτη φορά για την εισαγωγή DNA σε ευκαρυωτικά κύτταρα.

Το στέλεχος DH5a της *E.Coli* που χρησιμοποιήθηκε στη συγκεκριμένη διπλωματική εργασία είναι εύκολο στην καλλιέργεια, στη διατήρηση και στην αποθήκευση. Για τον διαχωρισμό των μετασηματισμένων κυττάρων (περιέχουν και το φορέα με το ένθεμα) από των μη μετασηματισμένων εφαρμόζεται η μέθοδος α συμπληρωματικότητας καθώς εκφράζουν το καρβοξυτελικό τμήμα της β γαλακτοσιδάσης.

Υλικά:

- Θρεπτικό υλικό LB Broth 1L: περιέχει 10gr Bactrotrytone, 5gr Yeast extract και 5gr NaCl.
- *E. coli* DH5a κύτταρα.
- Γλυκερόλη 10%

Μέθοδος:

1. Σε αποστειρωμένο δοκιμαστικό σωλήνα προστίθεται με πιπέτα 1ml θρεπτικού υλικού κάτω υπό ασηπτικές συνθήκες.
2. Ενοφθαλμισμός του θρεπτικού με *E. coli* DH5a κύτταρα.
3. Επώαση στις 220 στροφές, στους 37°C για 12-16 ώρες.
4. Μετά το τέλος της επώασης γίνεται μεταφορά της βακτηριακής καλλιέργειας σε αποστειρωμένη κωνική φιάλη που περιέχει 200ml θρεπτικού υλικού
5. Επώαση στους 37°C στις 210 στροφές μέχρι η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας να είναι μεταξύ 0.450-0.550 σε 600nm.
6. Μεταφορά της καλλιέργειας σε τέσσερα παγωμένα falcon των 50ml και επώαση για 10min στον πάγο.

7. Φυγοκέντρηση στις 4000g στους 4°C για 15min.
8. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και γίνεται επαναδιάλυση του ιζήματος σε 50ml H₂O.
9. Επανάληψη βημάτων 7 και 8.
10. Φυγοκέντρηση στις 4000g στους 4°C για 15min και επαναδιάλυση του ιζήματος σε 10% γλυκερόλη.
11. Φυγοκέντρηση σε 4200g, στους 4°C για 10min.
12. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα επαναδιαλύεται σε 250μl 10% γλυκερόλης ανά falcon.
13. Τα κύτταρα μοιράζονται σε κλάσματα σε παγωμένα erpendorfs (από 40μl).
14. Αποθήκευση στους -80°C.

Για να υπολογιστεί η απόδοση των δεκτικών κυττάρων γίνεται μετασχηματισμός με ηλεκτροδιάτρηση χρησιμοποιώντας πλασμίδια γνωστής συγκέντρωσης.

1. Μετασχηματισμός κυττάρων με την προσθήκη 10pg πλασμιδίου pUC19.
2. Προσθήκη 700μl SOC.
3. Σε 2μl, 4μl και 8μl από τα μετασχηματισμένα βακτήρια προστίθεται 198μl, 196μl, 192μl ddH₂O για τελικό όγκο 200μl και γίνεται επίστρωση σε τριβλία.
4. Επώαση στους 37°C για 12-16 ώρες.
5. Μετά την επώαση μετριοούνται οι αποικίες στα τριβλία και γίνεται αναγωγή σε μονάδες pfu/μg.

2.14 Ηλεκτροδιάτρηση

Η ηλεκτροδιάτρηση είναι μια μηχανική μέθοδος η οποία χρησιμοποιείται ευρέως για την εισαγωγή DNA σε δεκτικά κύτταρα μέσω της κυτταρικής μεμβράνης. Κατά τη μέθοδο αυτή ηλεκτρικοί παλμοί αποδιοργανώνουν τη φωσφολιπιδική στοιβάδα προκαλώντας το σχηματισμό πόρων επιτρέποντας το DNA να εισέλθει στο εσωτερικό του κυττάρου (*Neuman et al., 1982*).

Η μέθοδος αυτή έχει αρκετά πλεονεκτήματα συγκριτικά με άλλες μεθόδους α. είναι πολύ αποτελεσματική β. χρειάζεται μικρή ποσότητα DNA γ. μπορεί να πραγματοποιηθεί σε ιστούς που δεν έχουν υποστεί καμία επεξεργασία. Σημαντική παράμετρος που είναι αναγκαίο να ληφθεί υπόψη είναι ότι πρέπει η ένταση του ρεύματος που διέρχεται στο κύτταρο να είναι ελεγχόμενη. Εάν οι παλμοί δεν έχουν την κατάλληλη τάση τότε μπορεί οι πόροι που θα σχηματιστούν να είναι πολύ μεγάλοι ή να μην μπορούν να κλείσουν με αποτέλεσμα να προκληθεί ζημιά στο κύτταρο και η μέθοδος να αποτύχει.

Υλικά:

- Στερεό θρεπτικό μέσο LB agar 1L: 10g Tryptone, 15g agar, 15g Yeast extract, 5g NaCl.
- Αμπικιλίνη
- Θρεπτικό υλικό SOC 1L: 20g Tryptone, 5g Yeast extract, 0,5g NaCl, 20ml glucose 1M.
- X-Gal 20mg/ml
- IPTG 200mg/ml

Μέθοδος:

1. Τοποθέτηση των δεκτικών κυττάρων στον πάγο.
2. Αραίωση της αντίδρασης σύνδεσης 1:10.
3. Προσθήκη 2μl από την αραίωση στα δεκτικά κύτταρα.
4. Επώαση για ένα λεπτό στον πάγο.
5. Μεταφορά του μίγματος (δεκτικά και ανασυνδισμένο πλασμίδιο) σε ειδική κυψελίδα ηλεκτροδιάτρησης.
6. Τοποθέτηση της κυψελίδας στην ειδική θέση στην συσκευή ηλεκτροδιάτρησης οπότε και διέρχεται ρεύμα εντάσεως 13.8Kv/ cm για 5-6 msec.
7. Προσθήκη 700μl SOC σε λιγότερο από 1 λεπτό.
8. Ανάδευση με πιπέτα και μεταφορά όλης της ποσότητας σε αποστειρωμένο σωλήνα.
9. Επώαση στους 37°C στις 175 στροφές για μια ώρα.

Μετά το τέλος της επώασης πραγματοποιείται επίστρωση των τριβλίων υπό ασηπτικές συνθήκες:

1. Παρασκευή της επιθυμητής ποσότητας στερεού θρεπτικού υλικού LB agar. Απαραίτητη η αποστείρωση του θρεπτικού υλικού και προσθήκη της κατάλληλης ποσότητας αμπικιλίνης (100 μg/ml) όταν η θερμοκρασία του θρεπτικού φτάσει σχεδόν θερμοκρασία δωματίου.
2. Το LB agar τοποθετείται στα τρυβλία υπό ασηπτικές συνθήκες για να στερεοποιηθεί
3. Προσθήκη στην επιθυμητή ποσότητα μετασχηματισμένων κυττάρων της καλλιέργειας 30μl X-gal και 3μl IPTG και επίστρωση των τριβλίων.
4. Επώαση στους 37°C για 12-16 ώρες.

2.15 Δημιουργία stock γλυκερόλης

Η αποθήκευση γίνεται στους -80 °C και χρησιμοποιείται γλυκερόλη η οποία προστατεύει τους οργανισμούς που φυλάγονται εμποδίζοντας το σχηματισμό κρυστάλλων πάγου.

Υλικά:

- Γλυκερόλη 100%
- Βακτηριακή καλλιέργεια
- LB Broth με αμπικιλίνη

Μέθοδος:

1. Προσθήκη σε σωληνάκι τύπου erpendorf 850μl βακτηριακής καλλιέργειας και 150μl γλυκερόλης.
2. Ανάδευση και αποθήκευση στους -80 °C.

Η ανάκτηση βακτηρίων από stock γλυκερόλης:

1. Σε αποστειρωμένο δοκιμαστικό σωλήνα προσθήκη 3ml θρεπτικού υλικού LB Broth με αμπικιλίνη.
2. Ενοφθαλμισμός με μικροβιολογικό κρίκο ποσότητα βακτηρίων από το stock στον δοκιμαστικό σωλήνα.
3. Επώαση στους 37°C στις 210 στροφές για 12-16 ώρες.

2.16 Διάκριση ανασυνδιασμένων και μη ανασυνδυασμένων κλώνων

Για να γίνει διάκριση των ανασυνδιασμένων κλώνων έχουμε δυο σημεία επιλογής. Πρώτο σημείο επιλογής είναι ο διαχωρισμός των δεκτικών κυττάρων που έχουν λάβει το πλασμίδιο (ανεξάρτητα αν περιέχει ένθεμα) και δεύτερο σημείο επιλογής είναι ο διαχωρισμός των δεκτικών κυττάρων που περιέχουν ένθεμα και αυτών που δεν περιέχουν ένθεμα.

Το πρώτο σημείο επιλογής οφείλεται στην παρουσία του αντιβιοτικού αμπικιλίνης. Η αμπικιλίνη είναι αντιβιοτικό το οποίο προκαλεί το θάνατο των δεκτικών κυττάρων. Το πλασμίδιο περιέχει γονίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό. Άρα η παρουσία πλασμιδίου στα κύτταρα προσδίδει ανθεκτικότητα και επιβίωση. Αντίθετα αν στα δεκτικά κύτταρα δεν περιέχεται πλασμίδιο τότε δεν υπάρχει ανθεκτικότητα και προκαλείται θάνατος.

Το δεύτερο σημείο επιλογής, ο διαχωρισμός των δεκτικών κυττάρων που περιέχουν πλασμίδιο με ένθεμα και αυτών που δεν περιέχουν πλασμίδιο με ένθεμα, γίνεται με βάση το χρώμα των αποικιών. Αν έχουμε ανασυνδιασμένους κλώνους (που περιέχουν το πλασμίδιο με το ένθεμα) τότε οι αποικίες μας είναι λευκές. Αντίθετα αν έχουμε μη ανασυνδιασμένους κλώνους τότε έχουμε μπλε αποικίες. Αυτό οφείλεται

στην παραγωγή ή όχι ενός ενζύμου, της β-γαλακτοσιδάσης. Η β-γαλακτοσιδάση υπό φυσιολογικές συνθήκες μεταβολίζει τη λακτόζη σε γαλακτόζη και γλυκόζη. Η γαλακτόζη σε υψηλές ποσότητες λειτουργεί και ως επαγωγέας.

Το πλασμίδιο περιέχει το οπερόνιο της λακτόζης το οποίο κωδικοποιεί το ένζυμο β-γαλακτοσιδάση. Η θέση που θα εισαχθεί το ένθεμά μας βρίσκεται ανάμεσα στο οπερόνιο. Αν σε ένα πλασμίδιο έχουμε την εισαγωγή ενός ενθέματος τότε το οπερόνιο διακόπτεται και δεν μπορεί να μεταγραφεί και να μεταφραστεί με αποτέλεσμα να μην έχουμε παραγωγή β-γαλακτοσιδάσης. Άρα οι αποικίες με το ένθεμα παραμένουν λευκές. Αντίθετα πλασμίδια χωρίς ένθεμα έχοντας το IPTG ως επαγωγέα εκφράζουν το γονίδιο *lacZ* μεταβολίζοντας το X-gal δίνοντας μπλε αποικίες.

2.17 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με αλκαλική λύση

Σκοπός αυτής της μεθόδου είναι η απομόνωση πλασμιδιακού DNA με αλκαλική λύση και περιλαμβάνει:

- την ανάπτυξη βακτηριακών μακρομορίων, β. την τήρηση συνθηκών οι οποίες καταστρέφουν τα διάφορα αποικοδομητικά ένζυμα που απελευθερώνονται κατά την λύση των βακτηριακών κυττάρων και γ. το διαχωρισμό του πλασμιδιακού DNA από το χρωμοσωμικό DNA και τις πρωτεΐνες (Birnboim and Doly 1979).

Υλικά:

- Διάλυμα I (GET): 50mM glucose, 25mM TrisCl (pH 8.0), 10mM EDTA (pH 8.0)
- Διάλυμα II (alkali): 0.2N NaOH, 1% SDS.
- Διάλυμα III: 5 M potassium acetate (CH₃COOK) 60 ml, glacial acetic acid 11,5ml, dH₂O 28,5 ml.
- Ρυθμιστικό Διάλυμα TE: Περιέχει RNάση A σε συγκέντρωση 20μg/ml.

Μέθοδος:

1. Ήπια ανάδευση της καλλιέργειας.
2. Εισαγωγή 1,5ml καλλιέργειας σε αποστειρωμένο σωλήνα τύπου eppendorf.
3. Φυγοκέντρηση στις 3000rpm για 3 λεπτά.
4. Απόρριψη του υπερκείμενου και εισαγωγή 100μl παγωμένου διαλύματος I.
5. Ανάδευση και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.
6. Τοποθέτηση σε πάγο και εισαγωγή 200μl διάλυμα II (alkali).
7. Επώαση στον πάγο για 7- 8 λεπτά και ανάδευση ανά διαστήματα με αργές κινήσεις.
8. Εισαγωγή 150μl παγωμένου διαλύματος Διάλυμα III (CH₃COOK).

9. Επώαση του *erppendorf* στον πάγο για 7- 8 λεπτά και ανάδευση με έντονες κινήσεις ανά διαστήματα.
10. Φυγοκέντρωση για 9 λεπτά στις μέγιστες στροφές και μεταφορά του υπερκείμενου σε καθαρό σημασμένο *erppendorf*.
11. Εκχύλιση του διαλύματος με φαινόλη/χλωροφόρμιο και κατακρήμνιση του πλασμιδιακό DNA με ισοπροπανόλη.
12. Επαναδιάλυση του ιζήματος σε ρυθμιστικό διάλυμα 50μl Ρυθμιστικό διάλυμα TE.
13. Το DNA αποθηκεύεται σε θερμοκρασία 4°C.

2.18 Επεξεργασία αποτελεσμάτων

Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε μέσω υπολογιστικής δύναμης και προγραμμάτων βιοπληροφορικής.

Το πρόγραμμα **BLAST** (Basic Local Alignment Search) είναι ένα εργαλείο το οποίο χρησιμοποιεί έναν αλγόριθμο για την σύγκριση των πρωτογενών βιολογικών αλληλουχιών, όπως τις αλληλουχίες των αμινοξέων διαφορετικών πρωτεϊνών ή την νουκλεοτιδική αλληλουχία μεταξύ δύο νουκλεϊκών οξέων. Η αναζήτηση πληροφοριών γίνεται σε μία βιβλιοθήκη ή σε μια βάση δεδομένων των αλληλουχιών η οποία παρέχει την ταυτοποίηση όμοιων αλληλουχιών σε ποσοστιαίες μονάδες. Το πρόγραμμα BLAST χρησιμοποιήθηκε για την σύγκριση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας μεταξύ του ευαίσθητου εργαστηριακού και του ανθεκτικού γονιδίου nAChR που αλληλουχίσαμε.

Το διάγραμμα dot plot είναι μια γραφική μέθοδος που επιτρέπει τη σύγκριση των δύο βιολογικών αλληλουχιών και την ταυτοποίηση των περιοχών που παρουσιάζουν ομοιότητα μεταξύ τους. Το πρόγραμμα **OMIGA** μας έδωσε το dot plot της σύγκρισης των δύο γονιδίων.

Αποτελεί ένα διάγραμμα στο οποίο κάθε άξονας αντιστοιχείται σε ένα από τα γονίδια και η γραφική παράσταση είναι η ευθεία που δημιουργεί η αντιστοίχιση των νουκλεοντιδίων αναλόγως της θέσης τους στο γονιδίου.

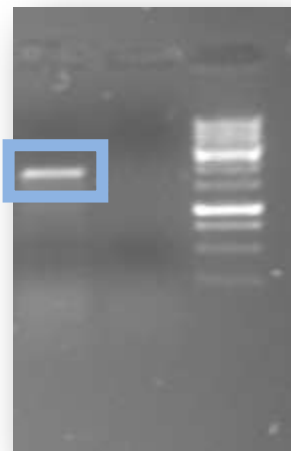
Το **ClustalW** είναι ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο πρόγραμμα ευθυγράμμισης πολλαπλών αλληλουχιών. Για την αμινοξική σύγκριση των μεταγράφων του ευαίσθητου και του ανθεκτικού γονιδίου χρησιμοποιήσαμε το προγράμματος ClustalW το οποίο μετατρέπει την νουκλεοτιδική αλληλουχία σε αμινοξική στα δύο γονίδια. Το αποτέλεσμα είναι η αντιστοίχιση των δύο αμινοξικών αλληλουχιών και η υπόδειξη αναντιστοιχιών μεταξύ τους.

3. Αποτελέσματα

Σκοπός της εργασίας αυτής είναι η κλωνοποίηση των 5'UTR και 3'UTR του γονιδίου της α6 υπομονάδας του ευαίσθητου εργαστηριακού πληθυσμού με στόχο την ολοκλήρωση της αλληλούχησης του γονιδίου αυτού και η κλωνοποίηση του γονιδίου της α6 υπομονάδας του νικοτινικού υποδοχέα της ακετυλοχολίνης στον εργαστηριακό ανθεκτικό πληθυσμό του *spinosad*.

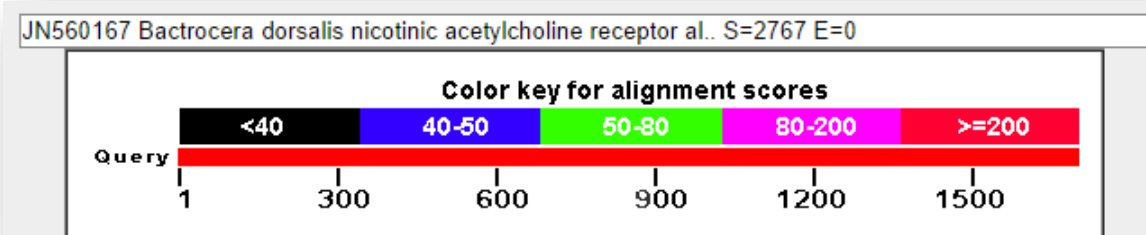
3.1 Κλωνοποίηση του γονιδίου α6 του νικοτινικού υποδοχέα της ακετυλοχολίνης του ανθεκτικού πληθυσμού

Αρχικά απομονώσαμε το ολικό mRNA από κεφάλια 4 εντόμων του ανθεκτικού πληθυσμού. Πραγματοποιήσαμε RT-PCR με τυχαίους εκκινητές για την κατασκευή ολικού cDNA. Στη συνέχεια πραγματοποιήσαμε PCR με τη χρήση ειδικών εκκινητών BoaFc (AGA-TTA-GTG-ACA-GCA-TAA-CCG)/ BoarC (TCT-ATC-CAC-AAC-CAT-TGC-CGC) που έχουν σχεδιαστεί με βάση την αλληλουχία του νικοτινικού υποδοχέα του ευαίσθητου στελέχους *Bactrocera oleae* προηγούμενων εργασιών του εργαστηρίου (Εικόνα 3.1).



Εικόνα 3.1: Αποτέλεσμα ενίσχυσης α6 νικοτινικού υποδοχέα του ανθεκτικού στελέχους

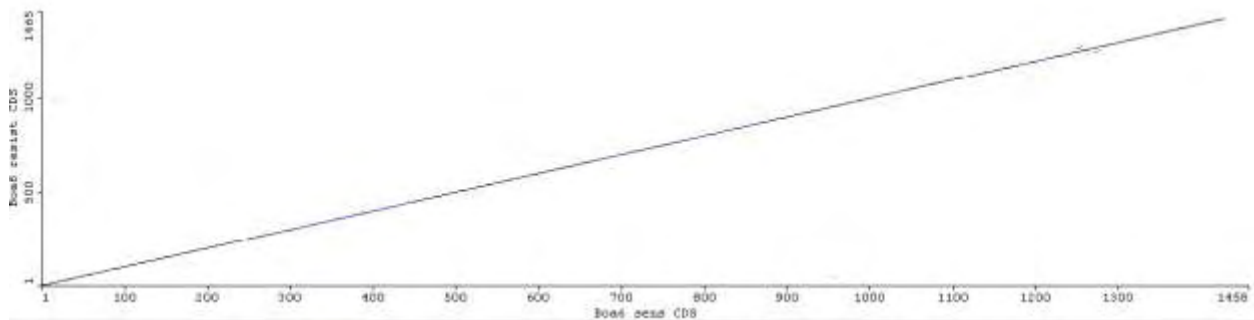
Τα προϊόντα απομονώθηκαν και στάλθηκαν για αλληλούχηση. Μέσω του προγράμματος Blast επιβεβαιώθηκε η ενίσχυση του νικοτινικού υποδοχέα ακετυλοχολίνης με 99% ομολογία με το νικοτινικό υποδοχέα του συγγενικού είδους *Bactrocera dorsalis* (εικόνα 3.2).



Bactrocera dorsalis nicotinic acetylcholine receptor alpha 6 subunit isoform II (nAChR alpha6) mRNA, nAChR alpha8-3b/9a allele, complete cds, alternatively sp	2767	2767	99%	0.0	96%	JN560167.1
Bactrocera dorsalis nicotine acetylcholine receptor subunit alpha 6 mRNA, complete cds	2693	2693	98%	0.0	96%	JF974072.1

Εικόνα 3.2: Αποτέλεσμα Blast της αλληλουχίας του α6 νικοτινικού υποδοχέα που ανακτήθηκε από τον ανθεκτικό εργαστηριακό πληθυσμό

Στη συνέχεια κάναμε σύγκριση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του υποδοχέα του ανθεκτικού πληθυσμού με την αλληλουχία του ευαίσθητου πληθυσμού μέσω του προγράμματος Ompiga (Εικόνα 3.3) και σύγκριση των αμινοξικών αλληλουχιών των υποδοχέων ανθεκτικού και ευαίσθητου πληθυσμού στο πρόγραμμα ClustalW (Εικόνα 3.4).



Εικόνα 3.3: Dot plot των δυο νουκλεοτιδικών αλληλουχιών ανθεκτικού και ευαίσθητου εργαστηριακού πληθυσμού.

```

sensitive      MDPSSLVVL IFLVIKESCQGPHEKRLLNHLLSTYNTLERPVANESEPL EVKFGTLQQI 60
resistance    MDPSSLVVL IFLVIKESCQGPHEKRLLNHLLSTYNTLERPVANESEPL EVKFGTLQQI 60
*****

sensitive      IDVDEKNQLLITNLWLSLEWNDYNLRWNESEYGGVKDLRITPNKLWKPDVLMYNSADEGF 120
resistance    IDVDEKNQLLITNLWLSLEWNDYNLRWNESEYGGVKDLRITPNKLWKPDVLMYNSADEGF 120
*****

sensitive      DGYHTNIVVKHGGSCLYVPPAIFKSTCKMDITWFPFDDQHCEMKFGSWTYDGNQLDLVL 180
resistance    DGYHTNIVVKHGGSCLYVPPGIFRSFCRMDITWFPFDDQHCEMKFGSWTYDGNQLDLVL 180
*****

sensitive      SSEDGGDLSDFITNGEWYLAHPGKNTIYACCEPYVDVFTTIQIRRRRLYYFNLIVPC 240
resistance    SSEDGGDLSDFITNGEWYLAHPGKNTIYACCEPYVDVFTTIQIRRRRLYYFNLIVPC 240
*****

sensitive      VLISSMALLGFTLPPDSGKLT LGVTILLSLTWFLNLVAETLPQVSDAIPLIGTYFNCIM 300
resistance    VLISSMALLGFTLPPDSGKLT LGVTILLSLTWFLNLVAETLPQVSDAIPLIGTYFNCIM 300
*****

sensitive      FMVASSVVLTVVVLNYHHRRTADIHEMPPWIKSVFLQWLPWILRMGGPGRKITRKTILLSN 360
resistance    FMVASSVVLTVVVLNYHHRRTADIHEMPPWIKSVFLQWLPWILRMGGPGRKITRKTILLSN 360
*****

sensitive      RMKEL ELKERSSKLLANVLDIDDDFRHTISGSQTAIGSSASFGRPTTVEEHHNTIGCNH 420
resistance    RMKEL ELKERSSKLLANVLDIDDDFRHTISGSQTAIGSSASFGRPTTVEEHHNTIGCNH 420
*****

sensitive      KDLHLILKELQFITSRMRKSDDEAELISDWKFAAMVVDRFCLIVFTLFTIIATVTVLLSA 480
resistance    KDLHLILKELQFITSRMRKSDDEAELISDWKFAAMVVDRFCLIVFTLFTIIATVTVLLSA 480
*****

sensitive      PHIIVQ 486
resistance    PHIIVQ 486
*****

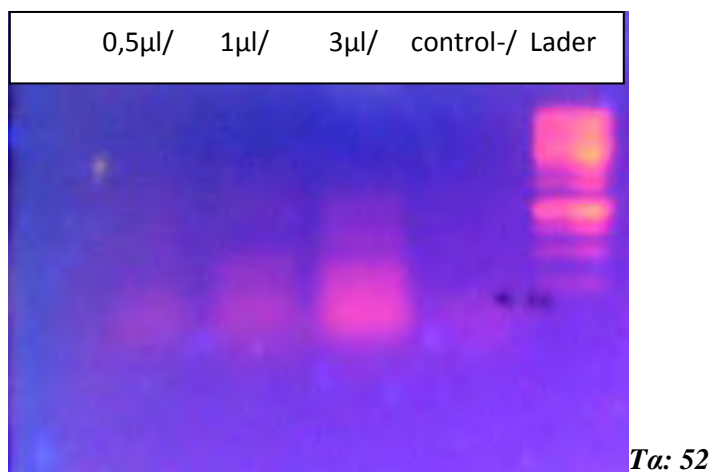
```

Εικόνα 3.4: Αμινοξική σύγκριση των αλληλουχιών. Εντοπίσαμε τρεις αμινοξικές διαφορές στις υπομονάδες αυτές.

3.1 Κλωνοποίηση της 5'UTR του α6 νικοτινικού υποδοχέα της ακετυλοχολίνης του ευαίσθητου εργαστηριακού πληθυσμού

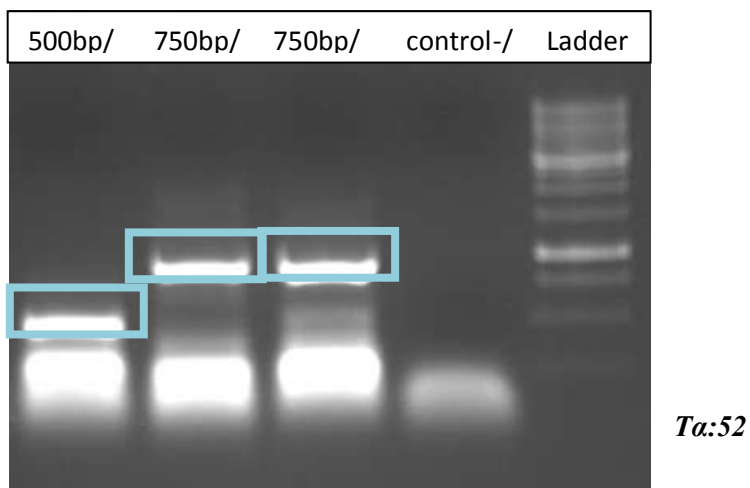
Αρχικά απομονώσαμε ολικό RNA από κεφάλια 4 εντόμων με την χρήση του εκκινητή 5GSP1. Στη συνέχεια προσθέσαμε μία πολύ -AAA ουρά στο ένα άκρο του cDNA μέσω της αντίδρασης tailing χρησιμοποιώντας τον εσωτερικό εκκινητή 5GSP1 (GTCCTTAGATTTTCAGCTACC). Έπειτα πραγματοποιήσαμε Race PCR με τη χρήση του εκκινητή 5GSP2 (GGGCGGGTGGGTATAAGTAT) και ενός oligodT εκκινητή. Πραγματοποιήσαμε τρεις Race PCRs όπου στην πρώτη εισάγαμε 0.5 μl στη δεύτερη 1μl και στην τρίτη 3μl cDNA. Τα αποτελέσματα της Race PCR όπως αναμένονταν είχαν ένα έντονο smear. Στη συνέχεια πραγματοποιήσαμε Re PCR στα δείγματά μας τα αποτελέσματα των οποίων φαίνονται στις εικόνες 3.5 και 3.6.

RACE 5'UTR



Εικόνα 3.5

Re- PCR 5'UTR



Εικόνα 3.6: Τα προϊόντα της Re PCR είναι διακριτές μπάντες μεγέθους 500bp και 750bp

Πραγματοποιήσαμε gel extraction για τις μπάντες της Re PCR της 5'UTR και μετά από την ανάκτησή τους τα στείλαμε για αλληλούχηση.

Στην αλληλουχία των 500bp που πήραμε εντοπίστηκε αρχικά ο εκκινητής που χρησιμοποιήσαμε για ενίσχυση του 5' άκρου και στο τέλος μια μικρή πολύ-A ουρά οπότε επιβεβαιώσαμε την ενίσχυση 300bp (Εικόνα 3.7)

```

GGGCGGGTGG GTATAAGTAT AATCCCAGCA CTTTGGAGGC TGAGGCGGGC 50
CCCGCCCACC CATATTCATA TTAGGGTCGT GAAACCTCCG ACTCCGCCCCG
GGATCACGAG GTCAGGAGTT CAAGACCAGC CTGGTCAACA TGGTGAAATC 100
CCTAGTGCTC CAGTCCTCAA GTTCTGGTTCG GACCAGTTGT ACCACTTTAG
CCGTCTCTAC TAAAAATACA AAAATTAGCC AGGCGTGGTG GCAGGCGCCT 150
GGCAGAGATG ATTTTTATGT TTTTAATCGG TCCGCACCAC CGTCCGCGGA
GTAGTCCCAG CTACTCAGGA GGCTGAGGCA GGACAATCTC TTGAAAACCTG 200
CATCAGGGTC GATGAGTCCT CCGACTCCGT CCTGTTAGAG AACTTTTGAC
GAAGGCAGAG GTTGACAGTGA GCTGAGATCG AGCCATGGCA CTCCAGCCTG 250
CTTCCGTCTC CAACGTCACT CGACTCTAGC TCGGTACCGT GAGGTCGGAC
GGTCAAAGAG CGAAACTCCA TCTCAAAAAA AAAAAAAAAA AA 300
CCACTTTCTC GCTTTGAGGT AGAGTTTTTT TTTTTTTTTT TT

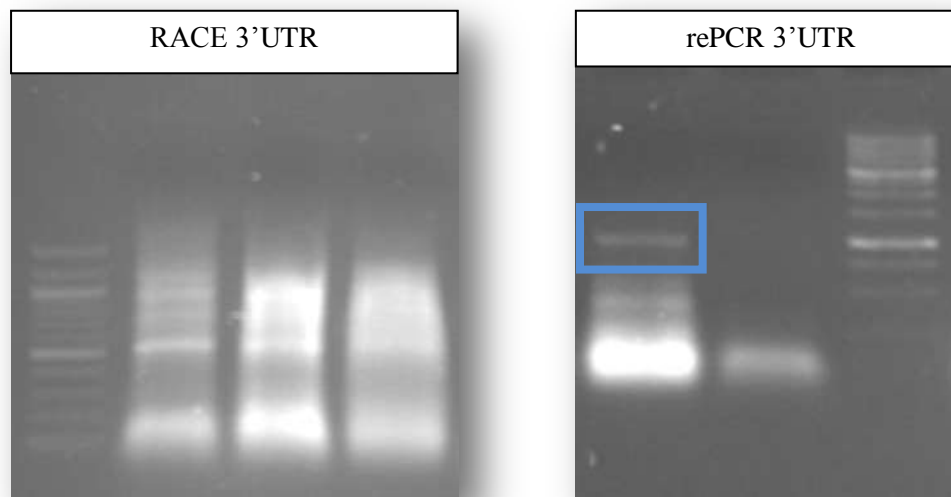
```

Εικόνα 3.7: Με κίτρινη επισήμανση φαίνεται η αλληλουχία του εκκινητή 3GSP2 και στο τέλος της αλληλουχίας μια πολύ-A ουρά που προστέθηκε μέσω της αντίδρασης A-tailing τεχνικά.

3.2 Κλωνοποίηση της 3'UTR της α6 nAChR του ευαίσθητου πληθυσμού

Η 3' περιοχή του γονιδίου της α6 υπομονάδας του ευαίσθητου εργαστηριακού πληθυσμού που μελετάμε όπως και κάθε άλλη 3' περιοχή κατά τη διαδικασία της μεταγραφής στον πυρήνα του κυττάρου σηματοδοτεί την λήξη της μεταγραφής του γονιδίου ολόκληρου. Η διαδικασία αυτή της λήξης της μεταγραφής ολοκληρώνεται φυσιολογικά με την προσθήκη πολύ -AAA ουράς στο τέλος του μεταγράφου. Έτσι το πρωτόκολλο που ακολουθήσαμε για τη κλωνοποίηση της 3' UTR είναι το ίδιο με αυτό της 5' UTR παραβλέποντας το βήμα του Tailing.

Με την χρήση του εκκινητή 3GSP1 (CACAAACGGTGGAGGAGCATC) ακολουθήσαμε την διαδικασία της RT-PCR. Στη συνέχεια πραγματοποιήσαμε Race PCR στα προϊόντα του cDNA της 3'UTR με την χρήση του εκκινητή 3GSP2 (CCGATGATGAGGCGGAATTG) και ενός oligodT εκκινητή. Λόγω του ότι τα προϊόντα της Race PCR έδωσαν την εικόνα smear στο gel της ηλεκτροφόρησης (1% αγαροζη), πραγματοποιήσαμε Re PCR στο δείγμα μας και τα αποτελέσματα των ηλεκτροφορήσεων δίνονται στην **εικόνα 3.8**



Εικόνα 3.8: αριστερά το προϊόν της Race PCR της 3'UTR και δεξιά το προϊόν της Re PCR 3'UTR.

Πραγματοποιήσαμε gel extraction για την μπάντα της RePCR ~1000bp. Μετά την απομόνωση της το δείγμα μας στάλθηκε για αλληλούχιση. Στην αλληλουχία που ανακτήθηκε εντοπίστηκε ο εκκινητής που χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση της 3' UTR και μετά από 600bp μια μικρή πολύ-A ουρά (Εικόνα 3.9).

CCGATGATGA	GCGGGAATTG	CATTACGAGT	AAAGATGCTC	GTTACGCGCG	50
GGCTACTACT	CCGCCTTAAC	GTAATGCTCA	TTTCTACGAG	CAATGCGCGC	
GCAGGACGAA	AAGACCCCGG	GACCTTTACT	ATAGCTTGGC	ATTGGTGTTC	100
CGTCCTGCTT	TTCTGGGGCC	CTGGAAATGA	TATCGAACCG	TAACCACAAG	
GGTTTTGTTT	GTGTAGGATA	GGTGGGAGAC	TGTGAAGCTC	ATGCGCTAGT	150
CCAAAACAAA	CACATCCTAT	CCACCCTCTG	ACACTTCGAG	TACGCGATCA	
GTGGGTGGAG	TCGTTGTTGA	AATACCACTC	TGATGAAATT	GGACTTCTAA	200
CACCCACCTC	AGCAACAAC	TTATGGTGAG	ACTACTTTAA	CCTGAAGATT	
CCTCGGACCA	TGATCTGGTT	TAGGGACAGT	GCCTGGTGGG	TAGTTTAACT	250
GGAGCCTGGT	ACTAGACCAA	ATCCCTGTCA	CGGACCACCC	ATCAAATTGA	
GGGGCGGTTG	CCTCCCAAAG	AGTAACGGAG	GCGCCCAAAG	GTTCCCTCAG	300
CCCCGCCAAC	GGAGGGTTTC	TCATTGCCTC	CGCGGGTTTC	CAAGGGAGTC	
CCTGGTTGGC	AATCAGGTGT	TGAGTGTAAG	TGCACAAGGG	AGCTTGACTG	350
GGACCAACCG	TTAGTCCACA	ACTCACATTC	ACGTGTTCCC	TCGAAGTAC	
TGAGACTGAC	AAGTCGAACA	GGGACGAAAG	TCGGGACTAG	TGATCCGGCA	400
ACTCTGACTG	TTCAGCTTGT	CCCTGCTTTC	AGCCCTGATC	ACTAGGCCGT	
CCGGCTTGTG	GAAGCGGTGT	CGCTCAACGG	ATAAAAGGTA	CCCCGGGGAT	450
GGCCGAACAC	CTTCGCCACA	GCGAGTTGCC	TATTTTCCAT	GGGGCCCCTA	
AACAGGCTGA	TCTTGCCCAA	GAGTCCATAT	CGACGGCATG	GTTTGGCACC	500
TTGTCCGACT	AGAACGGGTT	CTCAGGTATA	GCTGCCGTAC	CAAACCGTGG	
TCGATGTCGA	CTCGAGTCAC	CCGATGATGA	GCGGGAATTG	CTTGAAGTGG	550
AGCTACAGCT	GAGCTCAGTG	GGCTACTACT	CCGCCTTAAC	GAAGTGGACC	
GACCTGGGAG	GCGGAGGTGG	CAGTGAGCCG	AGAAGGCACC	ACTGCACTCC	600
CTGGACCCCTC	CGCCTCCACC	GTCACTCGGC	TCTTCCGTGG	TGACGTGAGG	
AGCCTGGGCT	ACAGAGAGAG	GCTCTGTCTC	AAAAAAAAAA	AAAAAA	650
TCGGACCCGA	TGTCTCTCTC	CGAGACAGAG	TTTTTTTTTT	TTTTTT	

Εικόνα 3.9: Με κίτρινη επισήμανση φαίνεται η αλληλουχία του εκκινήτη 5GSP2 και στο τέλος της αλληλουχίας μια πολύ-Α ουρά

4. Συζήτηση

Η παρούσα πτυχιακή εργασία αναπτύχθηκε σε δύο σκέλη. Στο πρώτο σκέλος αλληλουχήθηκαν οι περιοχές 5'UTR και 3'UTR του ευαίσθητου εργαστηριακού πληθυσμού, δύο περιοχών μεγάλης σημασίας για την φυσιολογική έκφραση του γονιδίου *in vivo*. Οι περιοχές αυτές είναι συντηρημένες στο γονιδίωμα του είδους για το λόγο ότι εμπλέκονται σε ζωτικής σημασίας διαδικασίες όπως η μεταγραφή του γονιδίου. Η αλληλούχισή τους συνεισφέρει στις περαιτέρω αναλύσεις των περιοχών αυτών, σε συγκρίσεις μεταξύ ατόμων ευαίσθητων και ανθεκτικών πληθυσμών καθώς και στη σχεδίαση ειδο-ειδικών εκκινήτων για την μελέτη του γονιδίου της α6 υπομονάδας του νικοτινικού υποδοχέα του Δάκου. Για τον εργαστηριακό πληθυσμό προχωρήσαμε στην αλληλούχιση 300 bp για την 5' UTR περιοχή ανοδικά του κωδικονίου έναρξης και 600 bp για την 3'UTR περιοχή η οποία τελειώνει σε μια poly-A ουρά.

Στο δεύτερο σκέλος αλληλουχήθηκε το γονίδιο της α6 υπομονάδας του νικοτινικού υποδοχέα στον ανθεκτικό εργαστηριακό πληθυσμό του Δάκου. Παραδείγματα προαγωγής ισχυρής ανθεκτικότητας στο *spinosad* που σχετίζονται με μεταλλάξεις του γονιδίου της α6 υπομονάδας του νικοτινικού υποδοχέα έχουν αναφερθεί σε συγγενικά είδη της τάξης των δίπτερων όπως στη *D. melanogaster* (~1200 φορές περισσότερο ανθεκτικό. Perry T, et. al. 2007), στο *B. dorsalis* (>2000 φορές περισσότερο ανθεκτικό. Hsu J-C, et. al. 2012), στο *F. occidentalis* (>350,000 φορές περισσότερο ανθεκτικό. Ruinean AM, et. al. 2013), στον *H. virescens* (1070 φορές περισσότερο ανθεκτικό. Young HP, et. al. 2003) και στην *P. xylostella* (18,600 φορές περισσότερο ανθεκτικό. Baxter SW, et. al.2010, Rinkevich FD, et. al. 2010). Αναλόγως, παραδείγματα μερικής ανθεκτικότητας στο *spinosad* που δεν σχετίζονται με σημειακές μοναδιαίες μεταλλάξεις στον νικοτινικό υποδοχέα ακετυλοχολίνης αλλά διαμορφώνονται πολυπαραγοντικά έχουν επίσης σημειωθεί σε συγγενικά είδη όπως στη *M. domestica* (~150 φορές περισσότερο ανθεκτικό. Shono T, Scott JG: 2003), στην *H. armigera* (20 φορές περισσότερο ανθεκτικό. Wang D, et. al. 2009), στο *S.exigua* (~350 φορές περισσότερο ανθεκτικό. Wang W, et. al. 2006), στο *T. absoluta* (1.8 έως 4.6 φορές περισσότερο ανθεκτικό. Reyes M, et. al. 2012).

Η νουκλεοτιδική σύγκριση των δύο γονιδίων του ευαίσθητου και του ανθεκτικού πληθυσμού στα αποτελέσματά μας, δεν έδειξε κάποια ουσιαστική διαφορά μεταξύ αυτών δίνοντας μια ομολογία της τάξης άνω του 96%. Σε πρωτεϊνικό επίπεδο εντοπίστηκαν 3 αντικαταστάσεις αμινοξέων όπου οδηγούσαν σε ομόλογες σημειακές μεταλλάξεις : μία Αλανίνη (A) σε Γλυκίνη (G) στη θέση 142 και δύο Λυσίνη (K) σε Αργινίνη (R) στις θέσεις 145 και 149. Οι μεταλλάξεις αυτές οριοθετούνται στο αμινο-τελικό άκρο της πρωτεΐνης χωρίς να επηρεάζουν το ενεργό κέντρο αυτής.

Τα αποτελέσματα αυτά καταδεικνύουν πως η μερική ανθεκτικότητα στο *spinosad* που εμφανίζει ο ανθεκτικός εργαστηριακός πληθυσμός που μελετήσαμε στα πειράματά μας δεν οφείλεται σε κάποια μετάλλαξη στο γονίδιο της α6 υπομονάδας του νικοτινικού υποδοχέα (nAChR). Η μερική ανθεκτικότητα

συνήθως εμφανίζεται παράλληλα με έναν αυξημένο μεταβολισμό, δηλαδή με μία αύξηση της μεταγραφής συγκεκριμένων γονιδίων (up-regulation) και πιθανόν την μείωση του ρυθμού μεταγραφής άλλων γονιδίων (down-regulation) τα οποία κωδικοποιούν κομβικές για τον μεταβολισμό πρωτεΐνες. Τα γονίδια αυτά παράγουν ισοένζυμα του μεταβολισμού όπως το κυτόχρωμα P450, εστεράσες και GSTs καθώς και άλλα πρωτεϊνικά προϊόντα όπως οι heat shock πρωτεΐνες, διάφορες πρωτεάσες, κινάσες, πεπτιδία, υποδοχείς, μεταφορείς υποδοχέων, ATPάσες κ.α. (Sagri et al., 2014)

Περαιτέρω αναλύσεις για την διεξαγωγή συμπερασμάτων για τους μηχανισμούς της ανθεκτικότητας σε γονιδιακό επίπεδο είναι αναγκαίες. Ο νικοτινικός υποδοχέας της ακετυλοχολίνης ως μοριακός στόχος του spinosad είναι πιθανόν κάτω από ισχυρή επιλογή με την εντομοκτόνο δράση να επικρατήσει σε μία ανθεκτική δομή όπου η σύνδεση του εντομοκτόνου να καθίσταται αδύνατη με τελικό αποτέλεσμα την εμφάνιση ανθεκτικού φαινότυπου στο έντομο π.χ. στο έντομο *B. dorsalis* παρουσιάστηκε ανθεκτικότητα έως και 2000 φορές περισσότερο. (Hsu J-C, et. al. 2012). Η ανθεκτικότητα αυτή θα είναι ισχυρή και η θνησιμότητα των εντόμων κάτω από την επιλογική δράση με το εντομοκτόνο θα είναι πολύ μικρή. Το γεγονός ότι η χρήση του spinosad για την καταπολέμηση του Δάκου λαμβάνει χώρα τα τελευταία περίπου 18 (Wynetta S. Kollman, 2005) χρόνια σε συνδυασμό με το γεγονός της συνδυαστικής προσέγγισης της καταπολέμησης του με εναλλαγή ανάμεσα τόσο στις χημικές όσο και στις φυσικές μεθόδους είναι κάποιοι από τους λόγους για τους οποίους το *Bactrocera oleae* παραμένει ευαίσθητο και μερικώς ανθεκτικό απέναντι στη δράση του. Η προαγωγή της ανθεκτικότητας είναι αναμφίβολη και τα καταστρεπτικά της αποτελέσματα έχουν φανεί ανά τα χρόνια σε καλλιέργειες διαφόρων προϊόντων και πλέον υπάρχει μία τάση της μείωσης της αλόγιστης χρήσης φαρμάκων τόσο από τους ίδιους τους αγρότες που προσπαθούν να σώσουν τις καλλιέργειες τους όσο και από νομικά πλαίσια τα οποία στηρίζονται σε επιστημονικά δεδομένα που προσπαθούν να διατηρήσουν μια φυσική ισορροπία ανάμεσα στους φυσικούς πληθυσμούς των εντόμων, των παρασίτων τους και των καλλιεργειών.

5. Βιβλιογραφία

- Alexandrakis, V.**, Neauenschwander, P, 1980. *Le role d'Aphytis chlensis [Hym; Aphelinidae], parasite D'Aspidiotus merii [Hom; Diaspididae] sur oliver en Crete.* Entomophaga, 25, 61-71
- Bertrand, D.**, M. Ballivet, M. Gomez, S. Bertrand, B. Phanna Bertrand, D., M. Ballivet, M. Gomez, S. Bertrand, B. 2002. *Phanna receptors reconstituted from the vertebrate beta 2 subunit and Drosophila alpha subunits.* Eur. J. Neurosci. 6: 869–875.
- Bret, B. L.**, Larson, L. L., Schoonover, J. R., Sparks, T. C., Thompson, G. D. 1997. *Biological Properties of Spinosad.* Down to Earth 52: 6-13
- Buckingham SD**, Biggin PC, Sattelle BM, Brown LA, Sattelle DB. 2005. *Insect GABA receptors: splicing, editing, and targeting by antiparasitics and insecticides.* Mol. Pharmacol. 68: 942-951.
- Chambers, J. E.** 1992. *The role of target-site activation of phosphorothionates in acute toxicity.* In Organophosphates Chemistry, Fate, and Effects, pp. 229-239. Academic Press, San Diego.
- Changeux JP. Taly A.** 2008. *Nicotinic receptors, allosteric proteins and medicine.* Trends Mol Med. 14. 93-102
- Cleveland, C.B.**, Mayes, M.A., Cryer, S.A., 2001. *An ecological risk assessment for spinosad use on cotton.* Pest Manag. Sci. 58, 70–84
- Connolly CN, Wafford KA.** 2004. *The Cys-loop superfamily of ligand-gated ion channels: the impact of receptor structure on function.* Biochem Soc Trans. 32, 529-534.
- Couturier S.**, Bertrand D., Matter J. M., Hernandez M. C., Bertrand S., Millar N., Valera S., Barkas T., Ballivet M. 1990. *A neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit ($\alpha 7$) is developmentally regulated and forms a homo-oligomeric channel blocked by α -BTX.* Neuron 5, 847–856.
- D.B. Sattelle**, et. al. 2005. *Edit, cut and paste in the nicotinic acetylcholine receptor gene family of Drosophila melanogaster.* BioEssays 27:366–376
- Delrio, G.** 1985 *Biotechnical methods for olive pest control, in Proceedings of the CEC/FAO/IOBC International Joint Meeting, Integrated Pest Control in Olive Groves, Pisa, 3-6 April 1984 (eds R. Cavalloro, A. Crovetto), A.A. Balkema, Rotterdam, pp. 394-410*

- Dong, K.**, 2007 . *Insect sodium channels and insecticide resistance*, *Invert. Neurosci.* 7, 17-30
- Dolinsek A.** et. al. 2010. *Tissue culture of Pyrethrum (Tanacetum cinerariifolium) and associated microbial contamination*. ACTA BIOLOGICA SLOVENICA LJUBLJANA Vol. 53, St. 1: 63–68
- Economopoulos, A.P.** et. al. 1977. *Experiments on the control of the olive fly, Dacus Oleae, by the combined effect of the insecticides and releases of gamma-ray sterilized insects*. *Z. ang. Ent.*
- Economopoulos, A.P.** 1979. *Attraction of Dacus oleae (Gmelin) (Diptera, Tephritidae) to odor and color traps*. *Z. angew. Ent.*
- F. Cui** et. al. 2007. *Characterization of novel esterases in insecticide-resistant mosquitoes*. Elsevier Ltd
- ffrench-Constant, R.H.** et al. 1993. *A point mutation in a Drosophila GABA receptor confers insecticide resistance*. *Nature* 363, 449–451
- Gary D. Thompson, Scott H. Hutchins, Thomas C. Sparks.** 1997. *Development of Spinosad and Attributes of A New Class of Insect Control Products*. Dow AgroSciences LLC
- Gorman, K., Liu, Z. ., Denholm, I., Bruggen, K-U, Nauen, R.,** 2008. *Neonicotinoid resistance in rice brown planthopper, Nilaparvata lugens*. *Pest Manag. Sci.* 64: 1122-1125.
- Grauso M., Reenan R. A., Culetto E., Sattelle D. B.** 2002 *Novel putative nicotinic acetylcholine receptor subunit genes, Da5, Da6 and Da7. Drosophila melanogaster identify a new and highly conserved target of adenosine deaminase acting on RNA-mediated A-to-I pre-mRNA editing*. *Genetics* 160, 1519–1533
- Hermans-Borgmeyer I, Zopf D, Ryseck RP et. al.** 1986. *Primary structure of a developmentally regulated nicotinic acetylcholine receptor protein from Drosophila*. *EMBO J.* 5:1503-1508.
- Hermans-Borgmeyer, I., D. Zopf, R.-P. Ryseck, B. Hovemann, H. Betz et al.,** 1986 *Primary structure of a developmentally regulated nicotinic acetylcholine receptor protein from Drosophila*. *EMBO J.* 5: 1503–1508.
- HSU AND FENG.** 2006. *Spinosad resistance in B. dorsalis : Development of Resistance to Spinosad in Oriental Fruit Fly (Diptera: Tephritidae) in Laboratory Selection and Cross-Resistance . J. Econ. Entomol.*
- Hsu, J. C., H. T. Feng, W. J. Wu.** 2004. *Resistance and synergistic effects of insecticides in Bactrocera dorsalis (Diptera: Tephritidae) in Taiwan*. *J. Econ. Entomol.* 97: 1682-1688.
- Hsu J.C & Feng H-T.** 2006. *Development of resistance to spinosad in oriental fruit fly (Diptera: Tephritidae) in laboratory selection and cross-resistance*. *Journal of Economic Entomology* 99: 931–936.

I.A.Khan, J. Allgood, L.A. Walker, E.A. Abourashed, D. Schlenk, W.H. Benson. 2001. *Determination of heavy metals and pesticides in ginseng products*. J. AOAC Int. 84: 936-939.

James A. Estes et al. 2011. *Trophic Downgrading of Planet Earth*. Science, 333, 301.

J.-B. Berge et al. 1998. *Cytochrome P450 and resistance*. The Royal Society.

J. Stenersen. 2004. *Chemical Pesticides Mode Of Action And Toxicology*. Acid-free paper .

Knipling, E. F. 1979. *The basic principles of insect population suppression management*. U.S.D.A. Agric. Handbook No. 512. 659 pp.

Lansdell, S. J., N. S. Millar, 2000a *The influence of nicotinic receptor subunit composition upon agonist, α -bungarotoxin and insecticide (imidacloprid) binding affinity*. Neuropharmacology. 39: 671–679.

Lansdell, S. J., N. S. Millar, 2000b *Cloning and heterologous expression of D₄, a Drosophila neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit: identification of an alternative exon influencing the efficiency of subunit assembly*. Neuropharmacology 39: 2604–2614.

Laura Russo. 2011. *The Composite Insect Trap: An Innovative Combination Trap for Biologically Diverse Sampling*. journal pore.

Le Novère N, Corringer PJ, Changeux JP. 2002a. *The diversity of subunit composition in nAChRs: evolutionary origins, physiologic and pharmacologic consequences*. J Neurobiol 53:447-456.

Le Novère N, Grutter T, Changeux JP. 2002b. *Models of the extracellular domain of the nicotinic receptors and of agonist- and Ca²⁺- binding sites*. Proc Natl Acad Sci USA 99:3210-3215.

Littleton J.T., Ganetzky B. 2000. *Ion channels and synaptic organization: analysis of the Drosophila genome*. Neuron 26, 35–43.

Liu et al. 2008. *Insect nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs): Important amino acid residues contributing to neonicotinoid insecticides selectivity and resistance*. Afr. J. Biotechnol

- Mallet, J.** 1989. *Insecticide resistance: have the insects won?* Trends in Ecology and Evolution 4:336-340.
- Mallet, J., Barton, N.H.** 1989. *Strong natural selection in a warning-color hybrid zone.* Evolution 43:421-431
- Matolcy, Gy., et. al.** 1988 *Pesticide Chemistry*, Budapest and Elsevier Sci. Publ., Amsterdam, pp. 15-20
- McKenzie, J.A.** et al. 1994. *The genetic, molecular and phenotypic consequences of selection for insecticide resistance.* Trends Ecol. Evol. 9, 166–169
- Millar, N. S., Gotti, C., Marks, M. J., Wonnacott, S.** 2011. *Nicotinic acetylcholine receptors, introductory chapter.* IUPHAR-DB.
- Ming-Yi Chou et. al.** 2009. *Potential for insecticide resistance in populations of *actrocera dorsalis* in Hawaii: spinosad susceptibility and molecular characterization of a gene associated with organophosphate resistance.* Entomologia Experimentalis et Applicata 134: 296–303
- Motohiro Tomizawa, John E. Casida.** 2002. *Selective Toxicity of Neonicotinoids Attributable to Specificity of Insect and Mammalian Nicotinic Receptores.* Annual Review of Entomology Vol. 48: 339-364
- Moulton, J.K.,** Pepper, D.A., Dennehy, T.J., 2000. *Beet armyworm (*Spodoptera exigua*) resistance to spinosad.* Pest Mgt Sci. 56, 842–848.
- Neil S. Millar** .Z. Ian Denholm. 2007. *Nicotinic acetylcholine receptors: targets for commercially important insecticides.* Invert Neurosci . 7:53–66
- Oakeshott JG,** Horne I, Sutherland TD, Russell RJ .2003. *The genomics of insecticide resistance.* Genome Biology 4: 202.
- Oakeshott, J. G.** et. al. 2005. *Biochemical genetics and genomics of insect sterases* . In: Comprehensive Molecular Insect Science-Pharmacology, vol 5. Elsevier, Oxford, pp. 309-381.
- Perry T.,** McKenzie J. A., Batterham P. 2007. *A *Da6* knockout strain of *Drosophila melanogaster* confers a high level of resistance to spinosad.* Insect Biochem. Mol. Biol. 37, 184–188.
- Pope, C. N.** 1999. *Organophosphorus pesticides: do they all have the same mechanism of toxicity?* J. Toxicol. Environ. Health B. Crit. Rev. 2. 161-181.
- Puinean AM,** Lansdell SJ, Collins T, Bielza P, Millar NS. 2013: *A nicotinic acetylcholine receptor transmembrane point mutation (*G275E*) associated with resistance to spinosad in *Frankliniella occidentalis*.* J Neurochem. 124:590–601.

Rachel Carson. 2002. *Houghton Mifflin Harcourt.*

Reyes M, Rocha K, Alarcón L, Siegwart M, Sauphanor B. 2012: *Metabolic mechanisms involved in the resistance of field populations of Tuta absoluta (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) to spinosad.* Pestic Biochem Physiol. 102:45–50

Richard H. ffrench-Constant. 2004. *The genetics and genomics of insecticide resistance* Elsevier Ltd.

Rinkevich, F. D., Scott, J. G. 2009. *Transcriptional diversity and allelic variation in nicotinic acetylcholine receptor subunits of the red flour beetle, Tribolium castaneum.* Insect Molec. Biol. 18: 233-242.

Rinkevich FD, Chen M, Shelton AM, Scott JG. 2010: *Transcripts of the nicotinic acetylcholine receptor subunit gene PxyLa6 with premature stop codons are associated with spinosad resistance in diamondback moth, Plutella xylostella.* Invert Neurosci. 10:25–33.

Robert L.Metcalf. 1994. *Introduction to Insect Pest Management* . John Wiley & Sons, Inc.

Sagri, E. et. al. 2014. *Olive fly transcriptomics analysis implicates energy metabolism genes in spinosad resistance.* BMC Genomics. 15:714.

Salgado, V. L. 1997. *The mode of action of spinosad and other insect control products.* Down to Earth. 52(1), 35-44.

Salgado, V. L. , J.J. Sheets, G. B. Watson, A. L. Schmidt. 1998. *Studies on the mode of action of spinosad: The internal effective concentration and the concentration dependence of neural excitation.* Pesticide Biochemistry and Physiology. 60(2):103-110.

Sayyed AH, Omar D., Wright DJ., 2004. *Genetics of spinosad resistance in a multi-resistant field-selected population of Plutella xylostella.* Pest Manag Sci 60:827–832.

Schulz, R., E. Sawruk, C. Mülhardt, S. Bertrand, A. Baumann et al., 1998. *Da3, a new functional subunit of nicotinic acetylcholine receptors from Drosophila.* J. Neurochem. 71: 853–862.

Shono T., Scott JG., 2003. *Spinosad resistance in the house fly, Musca domestica, is due to a recessive factor on autosome 1.* PesticBiochem Physiol. 75:1–7.

Simon W. Baxter et.al. 2010. *Mis-Spliced Transcripts of Nicotinic Acetylcholine Receptor a6 Are Associated with Field Evolved Spinosad Resistance in Plutella xylostella (L.).* PLoS Genetics

Stuart J.Lansdell, Neil S.Millar. 2004. *Molecular characterization of Da6 and Da7 nicotinic acetylcholine receptor subunits from Drosophila: formation of a high-affinity a-bungarotoxin binding site*

revealed by expression of subunit chimeras. International Society for Neurochemistry, J. Neurochem. 90, 479–489

Thomas C Sparks, Gary D Crouse and Gregory Durst. 2001. *Natural products as insecticides: the biology, biochemistry and quantitative structure–activity relationships of spinosyns and spinosoids*. Pest Manag Sci 57: 896-905

Toshio Shono, Jeffrey G. Scott. 2003. *Spinosad resistance in the housefly, Musca domestica, is due to a recessive factor on autosome 1*. Pesticide Biochemistry and Physiology 75, 1–7

Vincent L. Salgado. 1998. *Studies on the Mode of Action of Spinosad: Insect Symptoms and Physiological Correlates*. Pesticide Biochemistry And Physiology 60, 91-102.

V. Raymond-Delpech et. al. 2005. *Ion channels: molecular targets of neuroactive insecticides*. Invert Neurosci. 5: 119–133.

Wang W, Mo J., Cheng J., Zhuang P., Tang Z. 2006: *Selection and characterization of spinosad resistance in Spodoptera exigua (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae)*. Pestic Biochem Physiol, 84:180–187.

Wang D, Qiu X, Ren X, Niu F, Wang K. 2009: *Resistance selection and biochemical characterization of spinosad resistance in Helicoverpa armigera (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae)*. Pestic Biochem Physiol. 95:90–94.

Watson GB, Chouinard SW, Cook KR, Geng C, Gifford JM, Gustafson GD, Hasler JM, Larrinua IM, Letherer TJ, Mitchell JC, Pak WL, Salgado VL, Sparks TC, Stilwell GE. 2010: *A spinosyn-sensitive Drosophila melanogaster nicotinic acetylcholine receptor identified through chemically induced target site resistance, resistance gene identification, and heterologous expression*. Insect Biochem Mol Biol . 40:376–384.

Wynetta S. Kollman, 2005 *Environmental Fate Of Spinosad*. Ph.D

Wyss CF, Young HP., Shukla J., Roe RM., 2003. *Biology and genetics of laboratory strain of the tobacco budworm, Heliothis virescens (Lepidoptera: Noctuidae), highly resistant to spinosad*. Crop Prot 22:307–314 .

Young HP, Bailey WD, Roe RM. 2003: *Spinosad selection of a laboratory strain of the tobacco budworm, Heliothis virescens (Lepidoptera: Noctuidae), and characterization of resistance*. Crop Prot . 22:265–273.

Zhao JZ, Li YX, Collins HL, Gusukuma-Minuto L, Mau RFL, Thompson GD, et al., 2002. *Monitoring and characterization of diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) resistance to spinosad*. J Econ Entomol 95:430–436.

Zouros, E.,M. Loukas, A. Economopoulos, B. Mazomenos.1982. *Selection at the alcohol dehydrogenase locus of the olive fruit fly Dacus oleae under artificial rearing.* Heredity 48: 169-183.

Ε.Γ. ΚΑΚΑΝΗ, Κ.Δ. ΜΑΤΘΙΟΠΟΥΛΟΣ. Ένας νέος μηχανισμός ανθεκτικότητας στα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα στο δάκο της ελιάς, *Bactrocera oleae*(Diptera: Tephritidae)

Ε.Γ. ΚΑΚΑΝΗ, Ν.Ε. ΖΥΓΟΥΡΙΔΗΣ, Κ.Τ. ΤΣΟΥΜΑΝΗ, Ν. ΣΕΡΑΦΕΙΔΗΣ, F.G. ZALOM, Κ.Δ.ΜΑΤΘΙΟΠΟΥΛΟΣ. Χαμηλά επίπεδα ανθεκτικότητας του δάκου της ελιάς, *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae) στο spinosad

Μπρούμας Θ. 2000. Οι ελκυστικές φερομόνες των εντόμων και η χρησιμοποίησή τους για καταπολέμηση επιβλαβών ειδών. Σημειώσεις Μαθημάτων Μετεκπαίδευσης Γεωπόνων, Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο

Πελεκάσης, Κ.Δ. 1980. *Μαθήματα Γεωργικής Εντομολογίας Β' Τόμος, Ειδική Εντομολογία.*