



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**Μελέτη των πολυμορφισμών του γονιδίου της  
ακετυλοχολινεστεράσης σε κυπριακούς φυσικούς πληθυσμούς του  
δάκου (*Bactrocera oleae*) της ελιάς**

**ΧΡΙΣΤΙΝΑ ΜΑΣΙΑ**



Επόπτης Καθηγητής: Κωνσταντίνος Μαθιόπουλος  
Μονάδα εκτέλεσης: Ινστιτούτο Γεωργικών Ερευνών, Κύπρος  
Εκπαιδευτές Μονάδας: Ιωάννης Μ. Ιωαννίδης και Νίκος Α. Σεραφείδης

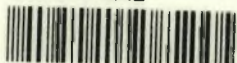
**ΛΑΡΙΣΑ 2007**



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

Αριθ. Εισ.: 5200/1  
Ημερ. Εισ.: 08-03-2007  
Δωρεά: Π.Θ.  
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ  
2007  
ΜΑΣ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087655

Αφιερωμένη σε αυτούς που έδωσαν τη ζωή τους για την ελευθερία της πατρίδας μας  
και σε αυτούς των οποίων αγνοείται η τύχη μέχρι σήμερα.

Στους γονείς μου Χρίστο και Μυροφόρα, στους οποίους οφείλω ότι έχω καταφέρει  
μέχρι σήμερα.

**Τριμελής επιτροπή:**

**Ματθιόπουλος Κωνσταντίνος**

Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

**Μαμούρης Ζήσης**

Αναπληρωτής Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών του Τμήματος Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

**Ιωαννίδης Ιωάννης**

Υπεύθυνος Εργαστηρίου Μοριακής Βιολογίας του Ινστιτούτου Γεωργικών Ερευνών στη Λευκωσία

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

|  |    |
|--|----|
| ΠΕΡΙΛΗΨΗ   | 06 |
| SUMMARY  | 07 |
| ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ   | 08 |
| ΠΡΟΛΟΓΟΣ   | 09 |
| <br>   |    |
| 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ  | 10 |
| <br>   |    |
| 1.1. Γενική ανασκόπηση   | 10 |
| 1.2. Η σημασία της ελιάς   | 10 |
| 1.3. Δάκος: Ο σοβαρότερος εχθρός της ελιάς                       | 12 |
| 1.4. Μορφολογία του δάκου  | 13 |
| 1.5. Βιολογικός κύκλος του δάκου                                 | 14 |
| 1.6. Καταπολέμηση του δάκου                                      | 15 |
| 1.7. Νευροτοξική δράση των οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων (OPs)   | 18 |
| 1.8. Ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα                               | 18 |
| 1.9. Μηχανισμοί ανθεκτικότητας                                   | 19 |
| 1.10. Μεταλλάξεις  | 21 |
| 1.11. Μεταλλάξεις στο γονίδιο της ακετυλοχολινεστεράσης στο δάκο | 22 |
| 1.12. Σκοπός της εργασίας  | 25 |
| <br>   |    |
| 2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ   | 26 |
| <br>   |    |
| 2.1. Συλλογή εντόμων από φυσικούς πληθυσμούς                     | 26 |
| 2.2. Έλεγχος της ανθεκτικότητας των πληθυσμών του δάκου          | 27 |
| 2.3. Απομόνωση DNA   | 28 |
| 2.4. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)                       | 29 |
| 2.5. Πέψη DNA με ένζυμα περιορισμού                              | 30 |
| 2.6. Καθαρισμός DNA  | 31 |
| 2.7. Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης                       | 33 |

|      |  |    |
|------|--|----|
| 3.   | ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ                                       | 35 |
| 3.1. | Έλεγχος της ανθεκτικότητας των πληθυσμών του δάκου | 35 |
| 3.2. | Μοριακή ανάλυση για την ύπαρξη της μετάλλαξης      | 38 |
| 4.   | ΣΥΖΗΤΗΣΗ   | 43 |
|      | ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ                                       | 45 |
|      | ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι  | 48 |

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο σημαντικότερος εντομολογικός εχθρός της ελιάς στις Μεσογειακές χώρες είναι ο δάκος, *Bactrocera oleae* (Gmelin) (Diptera: Tephritidae). Το έντομο μπορεί να προκαλέσει ζημιά στην παραγωγή του ελαιοκάρπου που υπερβαίνει το 50-60 %. Ο έλεγχος του εντόμου γίνεται ως επί το πλείστον με χρήση οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων, κυρίως του dimethoate. Διάφορες ερευνητικές μελέτες έχουν δείξει ότι ο δάκος εμφανίζει ανθεκτικότητα στα οργανοφωσφορικά, η οποία εκδηλώνεται μέσω μεταλλάξεων στο νευρικό του σύστημα. Στην παρούσα ερευνητική εργασία εξετάστηκε η ύπαρξη μετάλλαξης στο εξόνιο 10 του γονιδίου της ακετυλοχολινεστεράσης. Αναλύσεις PCR/RFLP έγιναν στα 45 πιο ανθεκτικά έντομα τα οποία συλλέχθηκαν από τρεις διαφορετικές περιοχές της Κύπρου. Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι δεν υπάρχει μετάλλαξη στο εξόνιο 10.

## SUMMARY

The olive fruit fly, *Bactrocera oleae* (Gmelin) (Diptera: Tephritidae) is the most important pest of olives in Mediterranean countries. The damages caused by the insect can exceed the 50-60 % of the olive production. Its control has been based mostly on bait sprays with organophosphate insecticides, usually dimethoate. Different research studies demonstrated that the insect developed insecticide resistance, which is expressed via mutations in its neurological system. In the present study the existence of a mutant at exon 10 of the acetylcholinesterase gene was examined. PCR/RFLP assays were performed on the most resistant 45 insects collected from three different regions of Cyprus. The data reveal no mutations on exon 10.



## ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

ACh = Ακετυλοχολίνη

AChE = Ακετυλοχολινεστεράση

Buffer AE = Elution Buffer

Buffer AL = Lysis Buffer

Buffer AW1 = Wash Buffer 1

Buffer AW2 = Wash Buffer 2

Buffer PB = Binding Buffer

Buffer PE = Wash Buffer

dNTPs = Deoxyribonucleotides (δεοξυριβοζονουκλεοτίδια)

EB Buffer = Elution Buffer

IRM = Insecticide Resistance Management

ΙΓΕ = Ινστιτούτο Γεωργικών Ερευνών

OPs = Οργανοφωσφορικά

PBS = Phosphate Buffered Saline

PCR = Polymerase Chain Reaction (Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης)

RFLP = Restriction Fragment Length Polymorphism

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η εργασία αυτή διεξήχθη στα πλαίσια του προγράμματος της Διακρατικής Συνεργασίας Ελλάδας - Κύπρου, στο Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας του Ινστιτούτου Γεωργικών Ερευνών (ΙΓΕ), με υπεύθυνο τον Δρ. Ι. Μ. Ιωαννίδη. Αντικείμενο της παρούσας ερευνητικής εργασίας είναι η μελέτη της ύπαρξης μιας συγκεκριμένης μετάλλαξης στο εξόνιο 10 της ακετυλοχολινεστεράσης σε κυπριακούς φυσικούς πληθυσμούς του δάκου της ελιάς.

Οι εμπειρίες που απόκτησα στα πλαίσια της εκπόνησης της πτυχιακής μου εργασίας είναι πάρα πολλές και πολύ σημαντικές για την μετέπειτα επιστημονική μου κατάρτιση. Ευχαριστώ ιδιαίτερα τον υπεύθυνο καθηγητή μου Δρ. Κ. Μαθιόπουλο για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με ένα τόσο ενδιαφέρον θέμα και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, καθώς επίσης για τη βοήθεια και τις χρήσιμες πληροφορίες που μου έδωσε. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω την κ. Ε. Κακάνη για τη βοήθεια και τις πολύτιμες συμβουλές της.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τη διεύθυνση του Ινστιτούτου που με δέκτηκε. Ευχαριστώ θερμά το Δρ. Ι. Μ. Ιωαννίδη για την βοήθεια, την καθοδήγηση και τις πολύτιμες συμβουλές που μου έδωσε, καθώς επίσης και τον κ. Ν. Α. Σεραφείδη για τη σημαντική συμβολή του στη διεκπεραίωση της πτυχιακής μου εργασίας. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τις κ. Χ. Μικελλίδου-Δημητρίου και κ. Μ. Γιωρκάτζη για όλη την υποστήριξη, συμπαράσταση και καθοδήγηση κατά την παραμονή μου στο Ινστιτούτο. Επιθυμώ επίσης να ευχαριστήσω όλη την ομάδα του εργαστηρίου για την πολύ καλή συνεργασία, καθώς και όλους όσους βοήθησαν με άμεσο ή έμμεσο τρόπο στη διεκπεραίωση της εργασίας αυτής.

Τέλος, ευχαριστώ ιδιαίτερα την οικογένεια μου για την αμέριστη συμπαράσταση τους χωρίς την οποία δεν θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί η παρούσα εργασία.

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1. Γενική ανασκόπηση

Αναμφισβήτητα η ελιά αποτελεί το σημαντικότερο καρποφόρο δέντρο για τους μεσογειακούς λαούς. Από τα πανάρχαια χρόνια εμφανίζεται στους μύθους, τις παραστάσεις και στην ιστορία των Μεσογειακών λαών. Η καλλιέργεια της έχει μεγάλη κοινωνική, οικονομική, πολιτιστική, πολιτική και οικολογική σημασία για τις χώρες της Μεσογείου, διότι καλύπτει σημαντικό μέρος της γεωργικής έκτασης και χρησιμοποιείται για παραγωγή λαδιού και βρώσιμης ελιάς, προϊόντα που αποτελούν αναπόσπαστο κομμάτι της Μεσογειακής διαίτας.

### 1.2. Η σημασία της ελιάς

Σήμερα σε όλο τον κόσμο καλλιεργούνται περίπου 800 εκατομμύρια ελαιόδεντρα. Περίπου το 95 % της παγκόσμιας ελαιοκαλλιέργειας καλλιεργείται στη λεκάνη της Μεσογείου, η οποία διαθέτει άριστες εδαφοκλιματικές συνθήκες για την ανάπτυξη της ελιάς (Πίνακες 1 και 2).

**Πίνακας 1:** Κατανομή και αριθμοί καλλιεργούμενων ελαιόδεντρων

| Περιοχή           | Αριθμός ελαιόδεντρων |
|-------------------|----------------------|
| Μεσόγειος         | 754.200.000          |
| ΗΠΑ               | 8.500.000            |
| Ασία              | 21.000.000           |
| Αφρική +Αυστραλία | 500.000              |
| <b>Σύνολο</b>     | <b>784.200.000</b>   |

**Πίνακας 2:** Γεωγραφική κατανομή των ελαιοκαλλιεργούμενων ελαιόδεντρων στην Ευρώπη

| Περιοχή       | Αριθμός ελαιόδεντρων σε εκατομμύρια | Έκταση σε στρέμματα |
|---------------|-------------------------------------|---------------------|
| Ισπανία       | 167                                 | 20.870.00           |
| Γαλλία        | 5                                   | 446.000             |
| Ελλάδα        | 120                                 | 7.581.000           |
| Ιταλία        | 165                                 | 11.765.560          |
| Πορτογαλλία   | 49,5                                | 11.140.000          |
| <b>Σύνολο</b> | <b>506,5</b>                        | <b>51.802.560</b>   |

Η οικονομική σημασία της ελιάς είναι τεράστια, κυρίως για τις Μεσογειακές χώρες, αφού εκτός από τους βρώσιμους καρπούς της, η ελιά προσφέρει και το λάδι της το οποίο κατέχει μια πολύ σημαντική θέση στη Μεσογειακή διαίτα. Η Ευρωπαϊκή Ένωση είναι ο μεγαλύτερος καταναλωτής ελαιόλαδου με 1.3 εκατομμύρια τόνους. Η παγκόσμια παραγωγή ελαιόλαδου χαρακτηρίζεται από μεγάλη διακύμανση από έτος σε έτος ανάλογα με την τεχνική υποστήριξη που δέχεται η ελαιοκαλλιέργεια στις ελαιοπαραγωγικές χώρες. Το ελαιόλαδο καταναλώνεται κατά ένα μεγάλο ποσοστό (85 %) στις χώρες παραγωγής και μόνο μια μικρή ποσότητα (16 %) αποτελεί αντικείμενο εμπορίας (Πίνακας 3).

**Πίνακας 3:** Παραγωγή και κατανάλωση ελαιόλαδου

| Χώρα          | Παραγωγή         | Κατανάλωση σε τόνους |
|---------------|------------------|----------------------|
| Ισπανία       | 494.000          | 374.000              |
| Γαλλία        | 2.000            | 27.000               |
| Ελλάδα        | 262.000          | 200.000              |
| Ιταλία        | 530.000          | 654.000              |
| Πορτογαλλία   | 31.000           | 35.000               |
| Άλλες         |                  | 11.000               |
| <b>Σύνολο</b> | <b>1.319.000</b> | <b>1.301.000</b>     |

Ο κοινωνικοοικονομικός ρόλος της ελιάς είναι μεγάλος, αφού έχει αναπτυχθεί κυρίως σε λιγότερο ευνοημένες ορεινές και ημιορεινές περιοχές στις οποίες τα εδάφη είναι φτωχά και ξηρά. Οι περιοχές αυτές συνήθως χαρακτηρίζονται από το χαμηλότερο γεωργικό εισόδημα. Επομένως, η ελαιοκαλλιέργεια σε αυτές τις περιοχές θεωρείται ως η μόνη λύση για τη διατήρηση των γεωργικών πληθυσμών στις περιοχές αυτές και προσφέρει απασχόληση σε ένα μεγάλο μέρος του πληθυσμού.

### 1.3. Δάκος: Ο σοβαρότερος εχθρός της ελιάς

Ο δάκος της ελιάς, *Bactrocera (Dacus) oleae* (Rossi), είναι αποκλειστικά μονοφάγο, καρποφάγο έντομο (1), (4), (8). Προσβάλλει τον καρπό της ελιάς και αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους εντομολογικούς εχθρούς στις περιοχές καλλιέργειας του φυτού. Τα όρια εξάπλωσης του είδους εκτείνονται στα όρια κατανομής της ελιάς. Η αντιμετώπιση του δάκου της ελιάς και η προστασία της ελαιοπαραγωγής από τις ζημιές του καταστροφικού αυτού διπτέρου δεν έπαψε, παρά την πρόοδο που έχει σημειωθεί την τελευταία 30ετία, να συγκεντρώνει το ιδιαίτερο ενδιαφέρον των επιστημόνων, ερευνητικών ιδρυμάτων και των αρμοδίων κρατικών υπηρεσιών και να αποτελεί ένα από τα σοβαρότερα θέματα φυτοπροστασίας.



Εικόνα 1: Προσβολή ελιάς από Δάκο σε ελαιόδεντρο (αριστερά), προσβεβλημένος καρπός (κέντρο) και δείγμα καρπών με μεγάλο ποσοστό προσβολής (δεξιά) (17).

Το έντομο αυτό προκαλεί κάθε χρόνο σημαντική ποιοτική και ποσοτική υποβάθμιση στην ελαιοπαραγωγή (Εικόνα 1). Η ζημιά που προκαλείται είναι ποσοτική, διότι η παραγωγή μειώνεται αφού το έντομο καταστρέφει αρκετό

σαρκώδες μέρος του καρπού και ποιοτική, γιατί η ποιότητα του παραγόμενου ελαιόλαδου υποβαθμίζεται με την αύξηση της οξύτητας του (17), (14). Αν δεν ληφθούν έγκαιρα τα κατάλληλα μέτρα, είναι δυνατόν η ζημιά που προκαλείται από το έντομο στον καρπό να υπερβεί το 50-60 % (8).



**Εικόνα 2:** Προνύμφες δάκου σε ώριμο καρπό ελιάς

Ο δάκος της ελιάς ανήκει ταξινομικά στην οικογένεια Tephritidae των Διπτέρων και είναι μονοφάγος, τρέφεται δηλαδή αποκλειστικά με τον καρπό της ελιάς (4). Στην οικογένεια αυτή ανήκουν οι λεγόμενες «μύγες των φρούτων» (fruit flies), όπως η Μεσογειακή μύγα, η μύγα των κερασιών και η μύγα των μήλων. Οι «μύγες των φρούτων» εναποθέτουν τα αυγά τους στα ώριμα ή ανώριμα φρούτα έτσι ώστε οι προνύμφες τους να αναπτύσσονται μέσα σε αυτά με αποτέλεσμα την αποσύνθεση του φρούτου (Εικόνα 2).

#### **1.4. Μορφολογία του δάκου**

Ο δάκος αποτελεί το μικρότερο σε μέγεθος έντομο μεταξύ των ειδών του γένους Tephritidae των Διπτέρων. Τα μορφολογικά χαρακτηριστικά του εντόμου διαφοροποιούνται κατά τα διαδοχικά στάδια της ανάπτυξης του (Εικόνα 3). Το ενήλικο άτομο έχει μήκος 5 mm περίπου και χρώμα ανοικτό έως σκοτεινό καστανό. Οι σύνθετοι οφθαλμοί του έχουν πρασινοπορφυρές μεταλλικές ανταύγειες. Τα φτερά του είναι διαφανή, ιριδίζουσα, με ένα σκοτεινό στίγμα στην άκρη. Τα πόδια της μύγας έχουν κίτρινο χρώμα. Ο ωοθέτης του θηλυκού είναι ευδιάκριτος. Το αυγό έχει ελλειψοειδές σχήμα, χρώμα λευκό και μήκος περίπου 0.7 mm και ο πόλος στον οποίο βρίσκεται η μικροπύλη είναι μυτερός. Η προνύμφη έχει χρώμα υπόλευκο ή υποκίτρινο, με μέγιστο μήκος 7-8 mm. Όπως και τα άλλα Tephritidae, δεν έχει



κεφαλική κάψα. Το πρόσθιο μέρος του σώματος της είναι στενότερο από το οπίσθιο και σε αυτό διακρίνονται τα στοματικά άγκιστρα και ο υπόλοιπος κεφαλοφαρυγγικός σκελετός. Το σχήμα της νύμφης είναι ελλειψοειδές, έχει χρώμα ανοικτό καφέ και μήκος περίπου 2.5-4 mm, βάρους 7-8 mg περίπου (6), (18). Ο δάκος μπορεί να διακριθεί από τις άλλες μύγες των φρούτων από την έλλειψη ζωνώσεων κατά μήκος των φτερών, οι οποίες παρουσιάζονται στα περισσότερα συγγενικά είδη (9).

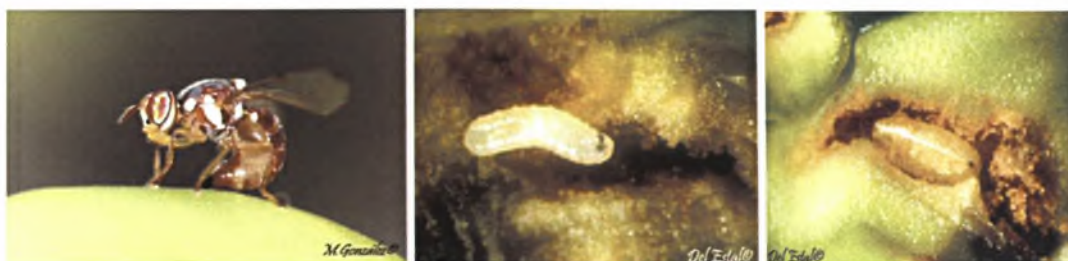


Εικόνα 3: Αναπτυξιακά στάδια του δάκου της ελιάς : ενήλικο θηλυκό, νύμφη, προνύμφη. Στο κάτω μέρος διακρίνεται αριθμός αυγών (18).

### 1.5. Βιολογικός κύκλος του δάκου

Ο βιολογικός κύκλος του δάκου είναι στενά συνδεδεμένος με την εποχιακή ανάπτυξη της ελιάς και με το τοπικό κλίμα. Συμπληρώνει 2 έως 5 γενεές το χρόνο ανάλογα με την περιοχή. Κατά τη χειμερινή περίοδο το μεγαλύτερο ποσοστό του δάκου βρίσκεται στο στάδιο της χρυσαλίδας, χωρίς όμως να αποκλείεται και η ύπαρξη τέλειων εντόμων. Την άνοιξη και συγκεκριμένα από το τέλος Απριλίου μέχρι τις αρχές Μαΐου αρχίζει μια σταδιακή εκκόλαψη των τέλειων εντόμων. Στις αρχές Ιουνίου τα θηλυκά ωοτοκούν σε νέους πράσινους καρπούς. Δεν εναποθέτουν περισσότερα από ένα αυγό σε κάθε νύγμα, ενώ παρατηρούνται επίσης πολλά άγονα νύγματα. Οι εκκολαπτόμενες προνύμφες τρέφονται από την ανώριμη σάρκα, ανοίγοντας ακανόνιστες επιμήκεις στοές σε βάθος, προκαλώντας τη πτώση του καρπού στο έδαφος. Η πρώτη γενιά ενήλικων εμφανίζεται την άνοιξη. Τα στάδια

του αυγού, της προνύμφης και του βομβυκίου διαρκούν 2 με 4, 10 με 14 και περίπου 10 μέρες, αντίστοιχα. Η διάρκεια ζωής του εντόμου ποικίλει από 1 έως 6-7 μήνες. Όταν υπάρχει διαθέσιμη τροφή κατά τη διάρκεια του Φθινοπώρου μέχρι και το Δεκέμβριο είναι δυνατόν να εμφανιστούν και επιπλέον γενεές του εντόμου. Τα περισσότερα άτομα της τελευταίας γενιάς του κάθε έτους εγκαταλείπουν τον καρπό και βομβυκιάζονται στο έδαφος, έτσι ώστε να συνεχίσουν τον βιολογικό κύκλο του εντόμου, δίνοντας την πρώτη γενιά του έτους (18).



**Εικόνα 4:** Διαφορετικά στάδια του κύκλου ζωής του δάκου. Αριστερά: θηλυκό που εναποθέτει αυγά σε καρπό ελιάς. Κέντρο: Προνύμφη. Δεξιά : Νύμφη μέσα στον καρπό.-Φωτογραφίες των Dr. M. Gonzalez Nunez (Dpto. De Proteccion Vegetal, INIA, αριστερά) and Dr. P. del Estal Padillo (κέντρο και δεξιά, Unidad de Proteccion de Cultivos, E.T.S.I Agronomos, Universidad Politecnica de Madrid) (15).

## 1.6. Καταπολέμηση του δάκου

Η καταπολέμηση του δάκου γίνεται κυρίως με δολωματικούς και καθολικούς ψεκασμούς (14). Για να είναι αποτελεσματικοί οι ψεκασμοί θα πρέπει να γίνονται στον κατάλληλο χρόνο και, όπου είναι δυνατόν, πάνω σε ομαδική βάση. Για να καθοριστεί ο χρόνος ψεκασμού χρησιμοποιούνται τα ακόλουθα κριτήρια:

1. Η πήξη του πυρήνα της ελιάς: Έχει παρατηρηθεί ότι για να γίνει ο καρπός της ελιάς επιδεκτικός προσβολής από το δάκο θα πρέπει πρώτα να πήξει ο πυρήνας. Αυτό είναι συνδεδεμένο στενά με την ποικιλία, τις μετεωρολογικές συνθήκες που επικρατούν στην περιοχή, την έκθεση του ελαιώνα κτλ.
2. Εκτίμηση του δακοπληθυσμού: Για τον υπολογισμό του δακοπληθυσμού γίνεται χρήση δυο τύπων παγίδας, της Μακφείλ και της κίτρινης κολλητικής παγίδας που φέρει τη φερομόνη του δάκου σαν ελκυστικό (Εικόνα 5). Οι παγίδες Μακφείλ



φέρουν σαν δόλωμα διάλυση υδρολελυμένης πρωτεΐνης 3 % ή Θεϊκής Αμμωνίας στην ίδια περίπτωση αναλογία, ή και τα δυο. Κάθε παγίδα περιέχει περίπου 250 cm<sup>3</sup> δολωματικού υγρού. Η παγίδα Μακφέιλ έχει βρεθεί να ελκύει το δάκο περισσότερο τους θερμούς καλοκαιρινούς μήνες, ενώ η κίτρινη κολλητική παγίδα το Φθινόπωρο ή νωρίς το Καλοκαίρι.

Οι παγίδες αναρτώνται από τις αρχές Ιουνίου, πριν την έναρξη των ψεκασμών σε δέντρα που φέρουν καρπό. Τοποθετείται μια παγίδα για κάθε 400-800 δέντρα, ανάλογα με τη διάταξη των δέντρων και την περιοχή. Οι παγίδες επιθεωρούνται κάθε 7 ημέρες και γίνεται καταγραφή των δάκων.

Η επιλογή των εντομοκτόνων γίνεται ανάλογα με το αν αποσκοπούν στην αντιμετώπιση ενήλικων ατόμων ή προνυμφών που έχουν ήδη προσβάλει τον καρπό. Η χημική καταπολέμηση του δάκου γίνεται κυρίως με τη χρήση οργανοφωσφορικών (OPs) εντομοκτόνων και κυρίως του dimethoate.

Οι δολωματικοί ψεκασμοί αποτελούν τον κυριότερο και οικονομικότερο τρόπο καταπολέμησης του δάκου. Στους ψεκασμούς αυτούς χρησιμοποιούνται μαζί με τα εντομοκτόνα και ουσίες που δρουν προσελκυστικά, όπως προϊόντα υδρόλυσης πρωτεϊνών. Οι καθολικοί ψεκασμοί χρησιμοποιούνται σε περίπτωση μεγάλου πληθυσμού ή εφόσον έχει παρατηρηθεί προσβολή στον καρπό (14).

Ωστόσο, η χημική καταπολέμηση πρέπει να αποφεύγεται, λόγω των αρνητικών της επιπτώσεων προς το περιβάλλον. Οι ψεκασμοί αυτοί στις περισσότερες περιπτώσεις θανατώνουν και οφέλιμα έντομα διαταράσσοντας την τροφική αλυσίδα. Τα χημικά αυτά εμπλέκονται στην ευρεία περιβαλλοντική μόλυνση. Σε αρκετές περιπτώσεις παρατηρούνται χημικά κατάλοιπα στα προϊόντα και το περιβάλλον της ελιάς.

Οι επανηληθμένοι ψεκασμοί οδήγησαν στην εμφάνιση στελεχών που ανέπτυξαν μηχανισμούς ανθεκτικότητας στα χρησιμοποιούμενα εντομοκτόνα. Στα ανθεκτικά αυτά άτομα αλλά και στους απογόνους τους εντοπίστηκαν μεταλλάξεις στο νευρικό τους σύστημα, οι οποίες προσδίδουν αντοχή στα χρησιμοποιούμενα εντομοκτόνα, με αποτέλεσμα να επιβιώνουν μετά τους ψεκασμούς με τα φάρμακα αυτά (5), (7), (10).

Όλα αυτά οδηγούν στην ανάγκη εξεύρεσης νέων μεθόδων καταπολέμησης του δάκου που να είναι φιλικότερες προς το περιβάλλον. Χαρακτηριστικότερο παράδειγμα αυτών των μεθόδων αποτελούν οι προαναφερθείσες δακοπαγίδες, οι οποίες έχουν ως στόχο την προσέλκυση των εντόμων με διάφορα ερεθίσματα και

τελικά τον εγκλωβισμό των εντόμων στην παγίδα (Εικόνα 5). Τα ερεθίσματα που δίνονται μπορεί να είναι είτε οπτικά, είτε κάποιες ουσίες που επηρεάζουν τη συμπεριφορά του εντόμου, είτε συνδυασμός αυτών. Οι δακοπαγίδες περιέχουν ουσίες οι οποίες προσελκύουν τα έντομα, όπως μελάσα, με αποτέλεσμα τον εγκλωβισμό των εντόμων σε αυτές. Χρησιμοποιούνται κυρίως στη βιολογική γεωργία, όπου απαγορεύεται ο ψεκασμός των δέντρων με φάρμακα.



**Εικόνα 5:** Δυο τύποι δακοπαγίδων. Α. Κίτρινες φερομονικές δακοπαγίδες, οι οποίες φέρουν τη φερομόνη του δάκου σαν ελκυστικό, Β. Δακοπαγίδα τύπου Mc Phail, η οποία φέρει σαν δόλωμα διάλυση υδρολελυμένης πρωτεΐνης 3 % ή Θεϊκής Αμμωνίας στην ίδια περίπτωση αναλογία, ή και τα δυο (14).

Η ανάγκη για την εξεύρεση φιλικότερων μεθόδων αντιμετώπισης του δάκου οδήγησε στην ανάπτυξη βιολογικών μεθόδων αντιμετώπισης του εντόμου. Ο βιολογικός έλεγχος των εντόμων στηρίζεται στους φυσικούς τους εχθρούς και στην τεχνική της στείρωσης ατόμων του πληθυσμού τους. Η τεχνική στείρωσης των εντόμων με χρήση ακτινοβολίας γ, έχει σκοπό τη μαζική παραγωγή στείρων ατόμων. Τα άτομα αυτά απελευθερώνονται ελεγχόμενα στο περιβάλλον, τα οποία ανταγωνίζονται τα άγρια έντομα, με αποτέλεσμα τη μείωση του πληθυσμού λόγω των μειωμένων γόνιμων διασταυρώσεων. Ωστόσο, η μέθοδος αυτή μειονεκτεί λόγω της μειωμένης διάρκειας ζωής των στείρων εντόμων (20).

### **1.7. Νευροτοξική δράση των οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων (OPs)**

Η χρήση δακοπαγίδων κατάφερε να περιορίσει τους πληθυσμούς του δάκου. Ωστόσο, η κύρια και πιο αποτελεσματική μέθοδος καταπολέμησης του εντόμου είναι η χημική καταπολέμηση, η οποία όπως έχω αναφέρει πιο πάνω γίνεται κυρίως με τη χρήση οργανοφωσφορικών (OPs) εντομοκτόνων. Τα οργανοφωσφορικά είναι χημικές ουσίες οι οποίες έχουν στο μόριο τους, τόσα άτομα φωσφόρου, όσο και άτομα άνθρακα, τα οποία συνδέονται μεταξύ τους απευθείας ή μέσω άλλων ατόμων, όπως είναι το οξυγόνο.

Τα OPs, όπως και τα περισσότερα εντομοκτόνα δρουν στις νευρομυϊκές συνάψεις παρεμποδίζοντας τη νευρομυϊκή διαβίβαση, προκαλούν δηλαδή διατάραξη της ισορροπίας του νευρικού συστήματος του εντόμου. Τα ορατά συμπτώματα που παρατηρούνται είναι νευρικός υπερεθισμός του εντόμου, αναπηρία και τελικά επέρχεται ο θάνατος. Τα OPs εξασκούν ποικίλες νευροτοξικές δράσεις αλλά η πιο συχνή από αυτές συνδέεται με τη συσσώρευση της ακετυλοχολίνης (ACh) στις απολήξεις των μεταγαγγλιακών ιών του παρασυμπαθητικού συστήματος (μουςκαρινικά συμπτώματα), στα γάγγλια του αυτόνομου νευρικού συστήματος, καθώς και στις νευρομυϊκές συνάψεις (νικοτινικά συμπτώματα) (23), (24). Η ακετυλοχολίνη είναι ο πρώτος νευροδιαβιβαστής που ανακαλύφθηκε. Βιοχημικά, η συσσώρευση της ακετυλοχολίνης οφείλεται στην αναστολή του ενζύμου ακετυλοχολινεστεράση (AChE). Η AChE αναστέλλεται λόγω της φωσφορυλίωσης του υδροξυλίου ενός υπολείμματος σερίνης στο ενεργό κέντρο του ενζύμου, που προκαλείται από τα OPs.

### **1.8. Ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα**

Η χρήση των εντομοκτόνων και γενικά των γεωργικών φαρμάκων αποτελεί αναπόσπαστο κομμάτι της γεωργικής πρακτικής που εξασφαλίζει ικανοποιητικές αποδόσεις των αγροτικών εκμεταλλεύσεων. Ωστόσο, η χρήση τους εμφανίζει και κάποια μειονεκτήματα, το κυριότερο από τα οποία είναι η ανάπτυξη ανθεκτικότητας των οργανισμών στόχων στα γεωργικά φάρμακα. Η ανθεκτικότητα στα χημικά φάρμακα οδηγεί σε ένα φαύλο κύκλο, αναγκάζοντας τους ανθρώπους να ψεκάζουν πιο συχνά, να αυξάνουν τη δόση των φαρμάκων, να χρησιμοποιούν μίγματα

φαρμάκων, ενώ ταυτόχρονα παρατηρείται ραγδαία αύξηση της ανθεκτικότητας, με πολλά είδη να εμφανίζονται ανθεκτικά σε διάφορες ομάδες φαρμάκων.

Όλοι οι οργανισμοί στην προσπάθειά τους να επιβιώσουν από τους διάφορους κινδύνους που μπορεί να αντιμετωπίσουν, τις δυσμενείς περιβαλλοντικές συνθήκες και τους διάφορους εχθρούς, έχουν αναπτύξει διάφορους αμυντικούς μηχανισμούς. Η ανθεκτικότητα αποτελεί ένα είδος αμυντικού μηχανισμού, που εξασφαλίζει την επιβίωση των οργανισμών μετά από έκθεση στις διάφορες χημικές ουσίες. Έτσι λοιπόν τα έντομα έχουν αναπτύξει μηχανισμούς άμυνας, ώστε να εξασφαλίζεται η επιβίωση τους μετά από έκθεση στα εντομοκτόνα.

Η κληρονόμηση ενός συγκεκριμένου χαρακτηριστικού, το οποίο προσδίδει ανθεκτικότητα σε κάποια τοξική ουσία, στους απογόνους ενός πληθυσμού, προτού εκτεθούν στην ουσία αυτή, ονομάζεται ανθεκτικότητα. Ανάλογα με τον μηχανισμό δράσης των χημικών μέσων η ανθεκτικότητα χωρίζεται σε δυο κατηγορίες. Η «διασταυρωτή ανθεκτικότητα» (cross-resistance) είναι η ανθεκτικότητα που εμφανίζεται σε δυο ή περισσότερες κατηγορίες εντομοκτόνων και οφείλεται στον κοινό μηχανισμό δράσης των εντομοκτόνων. «Διασταυρωτή ανθεκτικότητα» παρατηρείται για παράδειγμα στην περίπτωση των οργανοφωσφορικών και των καρβαμιδικών, τα οποία δρουν με τον ίδιο τρόπο και τα άτομα που εμφανίζουν ανθεκτικότητα στα πρώτα, εμφανίζουν και στα δεύτερα και το αντίστροφο. Ο όρος «πολλαπλή ανθεκτικότητα» (multi-resistance) αναφέρεται στην ανθεκτικότητα σε δυο ή περισσότερες κατηγορίες εντομοκτόνων που εμφανίζεται εξαιτίας της συνύπαρξης δυο ή περισσότερων μηχανισμών ανθεκτικότητας.

Διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι και ο δάκος εμφανίζει ανθεκτικότητα σε εντομοκτόνα, όπως τα οργανοφωσφορικά, η οποία εκδηλώνεται μέσω μεταλλάξεων στο νευρικό τους σύστημα (1), (2), (5).

## **1.9. Μηχανισμοί ανθεκτικότητας**

Η ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα είναι ένα συνεχώς αυξανόμενο πρόβλημα σε όλο τον κόσμο. Μέχρι το 1990 υπήρχαν πάνω από 500 είδη αρθροπόδων, υγειονομικού, κτηνιατρικού και γεωργικού ενδιαφέροντος, στα οποία είχε αναφερθεί ανθεκτικότητα σε τουλάχιστον μια χημική ομάδα. Το πρόβλημα μάλιστα είναι πολύ πολύπλοκο στο βαθμό που περισσότερα από τα μισά ανθεκτικά είδη εντόμων παρουσιάζουν

πολλαπλή ανθεκτικότητα σε εντομοκτόνα που ανήκουν σε διαφορετικές χημικές ομάδες (1).

Τα έντομα εμφανίζουν ανθεκτικότητα, είτε μέσω αυξημένης ικανότητας αποικοδόμησης των εντομοκτόνων, είτε μέσω δομικής μεταβολής των στόχων των εντομοκτόνων στους οργανισμούς τους.

Από τη μέχρι τώρα βιβλιογραφία εντοπίστηκαν τρεις κύριοι τύποι αποικοδόμησης εντομοκτόνων που εμπλέκονται στην ανθεκτικότητα (1). Πρώτον, αυξημένος οξειδωτικός μεταβολισμός των εντομοκτόνων από την P450 κυτοχρωμική μονοοξυγενάση. Οι P450 κυτοχρωμικές μονοοξυγενάσες αποτελούν μια σημαντική οικογένεια υδρόφοβων ενζύμων που περιέχουν μια ομάδα αίμης στο μόριό τους και συμμετέχουν στο μεταβολισμό πολυάριθμων ενδογενών και εξωγενών συστατικών. Δεύτερον, αυξημένη δραστηριότητα του ενζύμου γλουταθειόνη-S-τρανσφεράση (GST). Οι S-τρανσφεράσες της γλουταθειόνης (GSTs) αποτελούν μια ομάδα πολυλειτουργικών ενζύμων των αερόβιων οργανισμών τα οποία παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην κυτταρική αποτοξίνωση. Τα ένζυμα αυτά προστατεύουν τα κύτταρα από τοξικές ουσίες. Τρίτον, η υδρόλυση ή η δέσμευση εντομοκτόνων από εστεράσες μετά από ποιοτική αλλαγή του ενζύμου ή αυξημένη παραγωγή του. Οι εστεράσες συνιστούν μια μεγάλη ομάδα ενζύμων που μεταβολίζουν μια ποικιλία υποστρωμάτων. Όλες οι εστεράσες είναι ικανές να υδρολύουν εστερικούς δεσμούς παρουσία νερού (11).

Από τους μηχανισμούς ανθεκτικότητας που αφορούν τη δομική μεταβολή των στόχων που δρουν τα εντομοκτόνα μέσα στο έντομο δυο είναι οι πιο κατανοητοί. Ο ένας προσδίδει ανθεκτικότητα στα οργανοφωσφορικά και τα καρβαμιδικά και ο άλλος στις πυρεθρίνες. Όσον αφορά την ανθεκτικότητα στα οργανοφωσφορικά και τα καρβαμιδικά, αυτές οι χημικές ουσίες παρεμποδίζουν την ενζυμική δραστηριότητα της ακετυλοχολινεστεράσης. Αυτό συνεπάγεται τη συσσώρευση ακετυλοχολίνης στις συνάψεις των νευρικών απολήξεων και δυσλειτουργία κατά τη μεταφορά των νευρικών παλμών με αποτέλεσμα το θάνατο των εντόμων. Οι πυρεθρίνες δρουν κυρίως μέσω της δέσμευσης και παρεμπόδισης των διοδών νατρίου στο νευρικό άξονα. Ο μηχανισμός ανθεκτικότητας είναι αποτέλεσμα μιας αλλαγής στην πρωτεΐνη διαύλου του νατρίου. Αποτέλεσμα της δράσης των πυρεθρινών είναι η παράλυση και ο θάνατος του εντόμου.



### 1.10. Μεταλλάξεις

Ως μετάλλαξη ορίζεται κάθε αιφνίδια κληρονομήσιμη αλλαγή του γενετικού υλικού, η οποία δεν δημιουργείται από τους γνωστούς μηχανισμούς που ανασυνδυάζουν τα γονίδια (δηλαδή τον εγγενή τρόπο αναπαραγωγής, τον τυχαίο ανασυνδυασμό των ασύνδετων γονιδίων και το διασκελισμό) ή την ενσωμάτωση ξένου γενετικού υλικού (16).

Οι μεταλλάξεις είναι δυνατόν να δημιουργηθούν είτε φυσικά είτε τεχνητά. Οι φυσικές μεταλλάξεις συμβαίνουν σε όλα τα κύτταρα και πιστεύεται ότι δημιουργούνται από τις κοσμικές ακτινοβολίες, από λάθη κατά την αντιγραφή του DNA, από μεταθετά γενετικά στοιχεία κ.α. Οι τεχνητές μεταλλάξεις δημιουργούνται με την επίδραση μεταλλαξιγόνων παραγόντων, όπως ακτίνες  $\chi$ , χημικές ενώσεις, υπεριώδης ακτινβολία κ.α. (16).

Ανάλογα με τη μονάδα του γενετικού υλικού που αλλάζει, οι μεταλλάξεις διακρίνονται σε γονιδιακές, χρωμοσωματικές και γενωματικές μεταλλάξεις. Οι γονιδιακές μεταλλάξεις έχουν σχέση με την αλλαγή ενός μόνο γονιδίου. Οι χρωμοσωματικές μεταλλάξεις έχουν σχέση με αλλαγές στη δομή των χρωμοσωμάτων και οι γενωματικές μεταλλάξεις αφορούν αλλαγές στον αριθμό των χρωμοσωμάτων.

Οι γονιδιακές μεταλλάξεις, σε επίπεδο DNA ταξινομούνται σε «μεταλλάξεις αντικατάστασης ενός ζευγαριού βάσεων από άλλο» και σε «μεταλλάξεις μετατόπισης του αναγνωστικού πλαισίου». Στην πρώτη περίπτωση μπορεί να παρατηρηθούν μεταπτώσεις, δηλαδή αντικατάσταση μιας βάσης πουρίνης με μια άλλη βάση πουρίνης ή μιας βάσης πυριμιδίνης με μια άλλη βάση πυριμιδίνης, ή μεταστροφές, δηλαδή αντικατάσταση μιας βάσης πουρίνης με μια βάση πυριμιδίνης και αντίστροφα (16). Οι μεταλλάξεις μετατόπισης αναγνωστικού πλαισίου προκύπτουν από προσθήκη ή έλλειμμα μιας βάσης ή βάσεων. Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν οι περισσότερες φυσικές μεταλλάξεις, ενώ οι αντικαταστάσεις βάσεων αντιπροσωπεύουν μόνο το 20 %. Μεταλλάξεις μπορεί να δημιουργηθούν επίσης από αυτόματες φυσικές βλάβες βάσεων του DNA, όπως είναι η αποπουρίνωση και η απαμίνωση, καθώς και από ιούς και μεταθετά γενετικά στοιχεία (16).

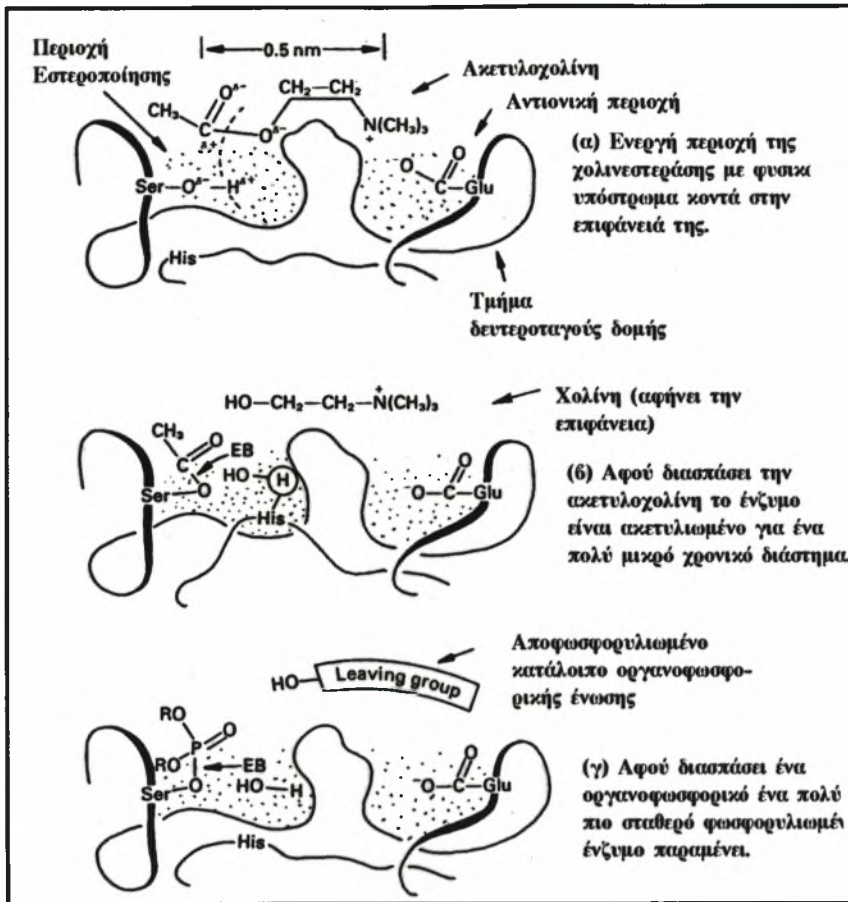
### 1.11. Μεταλλάξεις του γονιδίου της ακετυλοχολινεστεράσης στο δάκο

Η ακετυλοχολινεστεράση (AChE) είναι ένα ένζυμο κλειδί του νευρικού συστήματος, το οποίο ρυθμίζει τα επίπεδα της ακετυλοχολίνης, ενός νευροδιαβιβαστή, και τερματίζει τις νευρικές ώσεις με την υδρόλυση της ακετυλοχολίνης. Στα έντομα είναι ένα γλυκοσυλιωμένο διμερές, το οποίο είναι προσκολλημένο στη μεμβράνη μέσω μιας γλυκολιπιδιακής άγκυρας (5), (21), (22). Η αναστολή του ενζύμου οδηγεί σε συσσώρευση της ακετυλοχολίνης στις συνάψεις με αποτέλεσμα οι υποδοχείς της να είναι συνεχώς ανοικτοί, γεγονός που τελικά οδηγεί στο θάνατο του εντόμου.

Η δομή των οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων και των καρβαμιδίων είναι ανάλογη με το φυσικό υπόστρωμα της ακετυλοχολινεστεράσης, την ακετυλοχολίνη. Τα εντομοκτόνα, όπως και το φυσικό υπόστρωμα του ενζύμου εισέρχονται στο ενεργό κέντρο, το οποίο φέρει μια σερίνη στη βάση του. Το εντομοκτόνο διασπάται και το ένζυμο φωσφορυλιώνεται ή καρβαμιώνεται. Το φωσφορυλιωμένο ένζυμο δεν μπορεί πλέον να υδρολύσει το νευροδιαβιβαστή, η μετασυναπτική μεμβράνη παραμένει εκπολωμένη, η συναπτική διαβίβαση δεν δουλεύει και τα οργανοφωσφορικά συχνά λαμβάνονται ως μη αντιστρεπτοί αναστολείς.

Τα εντομοκτόνα αυτά οδηγούν στο θάνατο του εντόμου. Όμως, λόγω της εντατικής τους χρήσης τα τελευταία 30 χρόνια συνεχώς αυξάνεται η εμφάνιση ειδών που φέρουν ακετυλοχολινεστεράσες, λιγότερο ευαίσθητες στα εντομοκτόνα αυτά, προσδίδοντας ανθεκτικότητα στα είδη αυτά. Η ανάπτυξη ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα έχει μελετηθεί σε διάφορα έντομα του γένους *Tephritidae* των Διπτέρων. Στην *Drosophila melanogaster* η ακετυλοχολινεστεράση κωδικοποιείται από ένα μόνο γονίδιο, για το οποίο έχουν περιγραφεί ποικίλες μεταλλάξεις που προσδίδουν ανθεκτικότητα (G265A, F330Y, G368A, I161V) (19), (22), (26). Δυο από αυτές τις μεταλλάξεις (G262A και F327Y) βρέθηκαν και στην ανθεκτική *Musca domestica*, για την οποία έχουν αναφερθεί μέχρι τώρα πέντε μεταλλάξεις που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα (G262A, F327Y, G365A, G262V και V180L) (25). Στο ανθεκτικό *Bactrocera dorsalis* βρέθηκαν τρεις μεταλλάξεις (I214V, G488S και Q643R), μια από τις οποίες είναι η μετάλλαξη I161V, που βρέθηκε στη *Drosophila melanogaster* (27). Στον δάκο, *Bactrocera oleae*, έχουν περιγραφεί μέχρι τώρα δύο μεταλλάξεις η I214V, η οποία έχει βρεθεί και στη *Drosophila melanogaster* και η G488S, η οποία έχει βρεθεί μόνο στον ανθεκτικό δάκο (1), (5), (7), (28). Η παρουσία

των μεταλλάξεων αυτών σε διαφορετικά έντομα υποστηρίζει τη μεγάλη σημασία που έχουν στην εμφάνιση της ανθεκτικότητας.



Εικόνα 6: Δευτεροταγής δομή της ακετυλοχολινεστεράσης, στην οποία φαίνεται: Α. Η πρόσδεση της ακετυλοχολίνης στο ενεργό κέντρο του ενζύμου, Β. Η ακετυλίωση του ενζύμου μετά τη διάσπαση της ακετυλοχολίνης, Γ. Η φωσφορυλίωση του ενζύμου μετά τη διάσπαση οργανοφωσφορικών συμπλόκων. (Ser = Σερίνη, His = Ιστιδίνη, Glu = Γλουταμικό, EB = εστερικός δεσμός).

Οι μεταλλάξεις που βρέθηκαν στο δάκο αφορούν διαφορετικά εξόνια του γονιδίου της ακετυλοχολινεστεράσης. Στο εξόνιο 6 έχει βρεθεί η μετάλλαξη Gly488Ser και στο εξόνιο 3 η μετάλλαξη Ile214Val, (5) Η κάθε μετάλλαξη προσδίδει χαμηλά επίπεδα ανθεκτικότητας χωρίς να επηρεάζουν σημαντικά την υδρόλυση του νευροδιαβιβαστή. Συνδυασμοί, όμως, των 2 αυτών μεταλλάξεων προσδίδουν έντονη ανθεκτικότητα. Οι μεταλλάξεις αυτές εμποδίζουν την πρόσβαση των εντομοκτόνων στο ενεργό κέντρο του ενζύμου, στη βάση του οποίου βρίσκονται τα καταλυτικά κατάλοιπα (Εικόνα 6), (5).





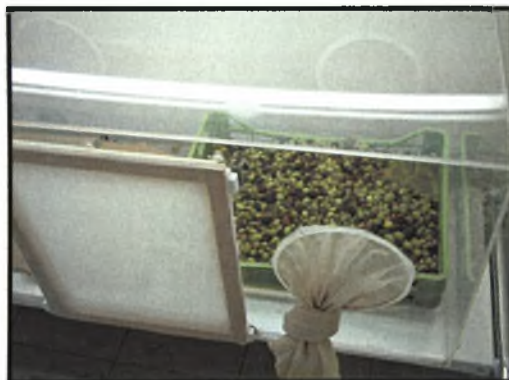
### 1.12. Σκοπός της εργασίας

Η εμφάνιση ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα αποτελεί ένα συνεχώς αυξανόμενο πρόβλημα για την ελαιοκαλλιέργεια σε όλο τον κόσμο. Η ανάγκη εξεύρεσης αποτελεσματικών τρόπων καταπολέμησης του δάκου οδήγησε στην μοριακή μελέτη των μεταλλάξεων που προσδίδουν ανθεκτικότητα. Η μελέτη αυτή βασίζεται στη χρήση ειδικού μοριακού τεστ, το οποίο βασίζεται σε συνδυασμό PCR/RFLP, σχεδιασμένο για τον εντοπισμό της μετάλλαξης του εξονίου 10. Η μετάλλαξη του εξονίου 10 της ακετυλοχολινεστεράσης έχει βρεθεί σε φυσικούς πληθυσμούς του δάκου με υψηλή ανθεκτικότητα από διάφορες τοποθεσίες της Ελλάδας. Η παρούσα εργασία είχε ως στόχο τη μελέτη της ύπαρξης της μετάλλαξης του εξονίου 10 σε κυπριακούς φυσικούς πληθυσμούς του δάκου της ελιάς.

## 2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### 2.1. Συλλογή εντόμων από φυσικούς πληθυσμούς

Η δειγματοληψία των εντόμων του δάκου έγινε με συλλογή προσβεβλημένων ελαιοκαρπών, μεταφορά τους στο εργαστήριο και συλλογή των ενηλίκων ατόμων που προήλθαν. Η συλλογή του ελαιοκαρπού έγινε από την περιοχή της Ευρύχου, την περιοχή του Μαζωτού και από την περιοχή της Δρομολαξιάς. Ο προσβεβλημένος ελαιοκαρπός τοποθετήθηκε σε κλωβούς στο εντομοτροφείο του ΙΓΕ (Εικόνα 6), όπου μετά την έξοδο των προνυμφών του δάκου και τη νύμφωση τους, οι νύμφες μεταφέρονταν σε ειδικούς κλωβούς εκτροφής. Μετά την έξοδο των τέλειων εντόμων γινόταν μεταφορά αριθμού ενηλίκων σε ειδικά διαμορφωμένους πλαστικούς σωλήνες (τουλάχιστο 20/σωλήνα) όπου γινόταν αναισθητοποίηση τους με CO<sub>2</sub> (Εικόνα 7).



Εικόνα 6: Κλωβός τοποθέτησης προσβεβλημένου ελαιοκαρπού

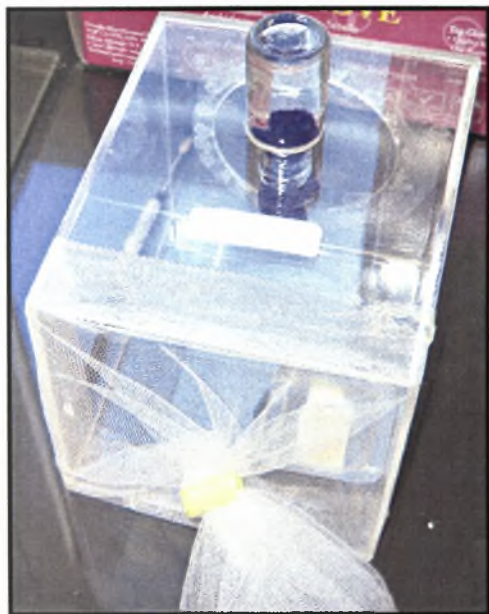


Εικόνα 7: Αναισθητοποίηση των τέλειων εντόμων με CO<sub>2</sub>

## 2.2. Έλεγχος ανθεκτικότητας των πληθυσμών του δάκου

Εξετάστηκε η ανθεκτικότητα σε πληθυσμούς εντόμων από τις ανωτέρω περιοχές στο οργανοφωσφορικό εντομοκτόνο dimethoate. Ο έλεγχος πραγματοποιήθηκε με τοπική εφαρμογή των εντομοκτόνων σε ενήλικα (5). Συγκεκριμένα, εφαρμόστηκε μικροποσότητα εντομοκτόνου σε κάθε ενήλικο με ειδική σύριγγα, αφού προηγουμένως έγινε αναισθητοποίηση τους με CO<sub>2</sub> (Εικόνα 9).

Σε κάθε πληθυσμό ελέγχθηκε η θνησιμότητα 100-200 ενηλίκων σε 5-6 διαφορετικές συγκεντρώσεις (τουλάχιστο 20 άτομα σε κάθε συγκέντρωση) του εντομοκτόνου, συμπεριλαμβανομένου και του μάρτυρα και υπολογίστηκαν στοιχεία που χαρακτηρίζουν το επίπεδο ανθεκτικότητας, όπως είναι η μέση θανατηφόρος δόση (LD<sub>50</sub>).



Εικόνα 8: Κλωβός βιοδοκιμών



Εικόνα 9: Τοπική εφαρμογή εντομοκτόνου

Μετά την ανάλυση αυτή, τα έντομα διατηρήθηκαν στους -20 °C για περαιτέρω ανάλυση σε μοριακό επίπεδο.

### 2.3. Απομόνωση DNA

Η απομόνωση του DNA από τα έντομα έγινε με τη βοήθεια του Dneasy Tissue Kit της εταιρείας Qiagen (Cat. No. 69506). Αφού πρώτα έγινε ομογενοποίηση στα δείγματα ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο της εταιρείας και χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα αντιδραστήρια, τα οποία υπήρχαν στο kit: PBS, Proteinase K, Αιθανόλη 100 %, Buffer AL, Buffer AW1, Buffer AW2, Buffer AE.

#### Μεθοδολογία:

1. Τοποθετούμε το έντομο σε σωληνάκι erpendorf.
2. Προσθέτουμε 180 μl PBS (1X) και μια μεταλλική σφαίρα (3 mm). Τα erpendorf τοποθετούνται στις ειδικές θέσεις της συσκευής ομογενοποίησης (Tissue Lyser), όπου ομογενοποιούνται τα δείγματα στις 20 rpm για 30 δευτερόλεπτα.
3. Με τη βοήθεια μαγνήτη αφαιρούμε τη μεταλλική σφαίρα από κάθε δείγμα.
4. Προσθέτουμε 20 μl Proteinase K και 200 μl Buffer AL, ανακατεύουμε καλά χρησιμοποιώντας τη συσκευή ανάμειξης και επωάζουμε για 10 λεπτά στους 56 °C.
5. Προσθέτουμε 200 μl αιθανόλη 100 %, ανακατεύουμε καλά χρησιμοποιώντας τη συσκευή ανάμειξης και μεταφέρουμε το δείγμα στις ειδικές κολωνίτσες, οι οποίες αποτελούνται από ειδικό φίλτρο και σωληνάκι συλλογής.
6. Φυγοκεντρούμε για 1.5 λεπτό στις 8.500 rpm.
7. Πετάμε το σωληνάκι συλλογής και τοποθετούμε καινούριο.
8. Προσθέτουμε 500 μl Buffer AW1 και φυγοκεντρούμε για 1.5 λεπτό στις 8.500 rpm.
9. Πετάμε το σωληνάκι συλλογής και τοποθετούμε καινούριο.
10. Προσθέτουμε 500 μl Buffer AW2 και φυγοκεντρούμε για 3.5 λεπτά στις 14.500 rpm.
11. Πετάμε το υγρό από το σωληνάκι συλλογής και φυγοκεντρούμε για 1 λεπτό στις 3.500 rpm.
12. Πετάμε το σωληνάκι συλλογής και μεταφέρουμε το φίλτρο σε καινούριο σωληνάκι erpendorf.
13. Προσθέτουμε 100 μl Buffer AE, επωάζουμε για 2-3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.



14. Φυγοκεντρούμε για 1.5 λεπτό στις 8.500 rpm. Στο σωληνάκι eppendorf έχουμε καθαρό DNA.

#### 2.4. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η τεχνική της Αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, Polymerase Chain Reaction (PCR), επιτρέπει τον ενζυμικό πολλαπλασιασμό *in vitro* επιλεγμένων αλληλουχιών DNA από ελάχιστες αρχικές ποσότητες δείγματος. Η εκλεκτική ενίσχυση ενός τμήματος DNA πετυχαίνεται με τη χρήση δύο πλευρικών ολιγονουκλεοτιδικών εκκινήτων μετά από επαναλαμβανόμενους κύκλους επιμήκυνσης με τη βοήθεια μιας ειδικής DNA πολυμεράσης. Η εκλεκτικότητα της μεθόδου βασίζεται στον προσχεδιασμό των εκκινήτων, δηλαδή γνωστών αλληλουχιών εκατέρωθεν της περιοχής που πρόκειται να ενισχυθεί ώστε να είναι ειδικοί προς αυτή. Η DNA πολυμεράση (Taq DNA polymerase) που χρησιμοποιείται έχει απομονωθεί από το βακτήριο *Thermus aquaticus* και είναι θερμοσταθερή διατηρώντας τη δραστηριότητα της σε θερμοκρασίες έως και 95 °C. Η αντίδραση απαιτεί επιπλέον διάλυμα ελεύθερων 5' τριφωσφορικών δεοξυριβοζονουκλεοτιδίων (dNTPs), για την επέκταση των νεοσχηματιζόμενων αλυσίδων και ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα για την Taq πολυμεράση, ενώ για την συμπλήρωση του τελικού όγκου προστίθεται διπλά απεσταγμένο αποστειρωμένο νερό (12), (13).

Η τεχνική πραγματοποιείται σε κύκλους. Κάθε κύκλος της PCR πραγματοποιείται σε στάδια και αποφέρει τον εκθετικό πολλαπλασιασμό του DNA-στόχου. Το πρώτο στάδιο της αντίδρασης είναι η θερμική αποδιάταξη του DNA-στόχου, όπου το δίκλωνο DNA μετατρέπεται σε μονόκλωνο. Στο δεύτερο στάδιο συμβαίνει η θερμική επαναδιάταξη του DNA, όπου οι δυο εκκινήτες συνδέονται με τις δυο συμπληρωματικές αλληλουχίες του DNA-στόχου. Στο τρίτο στάδιο γίνεται η σύνθεση DNA με το διπλασιασμό του DNA-στόχου. Ως αποτέλεσμα της διαδικασίας, η ελάχιστη αρχική ποσότητα του DNA αυξάνεται εκθετικά, αφού διπλασιάζεται στο τέλος κάθε κύκλου. Έτσι μετά την ολοκλήρωση (n) κύκλων, η αρχική αλληλουχία θα έχει πολλαπλασιαστεί 2<sup>n</sup> φορές, δηλαδή θα έχουν συντεθεί περίπου 2<sup>n</sup> νέα δίκλινα μόρια DNA. Η όλη διαδικασία πραγματοποιείται σε θερμικό ανακυκλωτή, ο οποίος προγραμματίζεται ώστε να προσαρμόζεται κυκλικά στις επιθυμητές θερμοκρασίες για τα συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα (12), (13).

Στο Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας του ΙΓΕ, οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε θερμικό ανακυκλωτή Whatman Biometra Thermocycler. Για την αντίδραση τελικού όγκου 15 µl χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα αντιδραστήρια και συγκεντρώσεις: 1 µl DNA, 1.5 µl ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμου (10X buffer), 1.2 µl dNTPs (2.5 mM καθένα), 0.7 µl 10R εκκινητής (10 pmole/µl), 0.7 µl 10F εκκινητής (10 pmole/µl), 0.1 µl Taq πολυμεράση (5 U/µl), 9.7 µl διπλά απεσταγμένο αποστειρωμένο νερό.

#### Συνθήκες προγράμματος PCR

|  |             |
|--|-------------|
| Αρχική αποδιάταξη: 94 °C για 4 λεπτά     | 1 κύκλος    |
| Αποδιάταξη DNA: 94 °C για 15 δευτ.       | } 30 κύκλοι |
| Υβριδισμός εκκινητών: 51 °C για 30 δευτ. |             |
| Επιμήκυνση αλυσίδων: 72 °C για 45 δευτ.  |             |
| Τελική επιμήκυνση: 72 °C για 7 λεπτά     | 1 κύκλος    |

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν σχεδιάστηκαν βάση της αλληλουχίας του εξονίου 10 του γονιδίου της ακετυλοχολινεστεράσης του *Bactrocera oleae*. Οι αλληλουχίες τους παρουσιάζονται παρακάτω:

Primer 10F (Forward)

5' TGA AGT CAA ACC ATC ATC CG '3

Primer 10R (Reverse)

5' GAC AGC GCC AAC ATG AAC G '3

#### **2.5. Πέψη DNA με ένζυμα περιορισμού**

Τα ένζυμα περιορισμού είναι ενδονουκλεάσες που κόβουν, κατά τρόπο καθορισμένο και επαναλαμβανόμενο το δίκλωνο DNA. Τα ένζυμα αυτά τέμνουν το DNA όταν αναγνωρίσουν μια ειδική αλληλουχία. Χάρη στην ικανότητα τους να κόβουν το DNA σε ειδικές αλληλουχίες τα ένζυμα περιορισμού παίζουν σημαντικό ρόλο σε κάθε όψη της σύγχρονης τεχνολογίας του DNA. Φυσιολογικά τα ένζυμα περιορισμού απομονώνονται από βακτήρια, στα οποία παρέχουν προστατευτικούς μηχανισμούς, έναντι της εισβολής ξένου DNA στο εσωτερικό τους. Το DNA του βακτηρίου δεν καταστρέφεται από τα δικά του ένζυμα περιορισμού, είτε γιατί δε

διαθέτει αναγνωρίσιμα σημεία, είτε γιατί αυτά είναι μεθυλιωμένα. Τα ένζυμα περιορισμού μπορούν να θεωρηθούν ως ένα σύστημα άμυνας του βακτηρίου (3), (16).

Τα περισσότερα περιοριστικά ένζυμα αναγνωρίζουν ειδικές παλλίνδρομες αλληλουχίες τεσσάρων έως οκτώ βάσεων και υδρολύουν ένα φωσφοδιεστερικό δεσμό σε κάθε αλυσίδα της περιοχής αυτής, προς τη θέση 3' σε σχέση με τον άξονα συμμετρίας. Τελικά ανάλογα με τον τρόπο της πέψης δημιουργούνται τμήματα DNA με συμπληρωματικά ή τυφλά άκρα.

Το περιοριστικό ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη της ύπαρξης της μετάλλαξης του εξονίου 10 της ακετυλοχολινεστεράσης του δάκου είναι το Mwo I, το οποίο απομονώθηκε από το *Methanobacterium wolfeii*. Οι θέσεις αναγνώρισης του ενζύμου αυτού είναι:



Για την αντίδραση τελικού όγκου 20 μl χρησιμοποιήθηκαν: 15 μl προϊόν αντίδρασης PCR, 2.0 μl ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμου (10X buffer), 0.4 μl MwoI (5 U/μl) και 2.6 μl διπλά απεσταγμένο αποστειρωμένο νερό.

#### Μεθοδολογία:

1. Σε σωληνάκι erppendorf προστίθενται με την ακόλουθη σειρά 15 μl προϊόν αντίδρασης PCR, 2.6 μl διπλά απεσταγμένο αποστειρωμένο νερό, 2.0 μl ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμου συγκεντρώσεως 10X και 0.4 μl MwoI τελικής συγκέντρωσης 5 U/μl.
2. Το διάλυμα επωάζεται στους 60 °C για 75 λεπτά.

#### **2.6. Καθαρισμός DNA**

Η διαδικασία καθαρισμού του DNA έγινε με δυο διαφορετικούς τρόπους:

- A. Κατακρήμνιση με αιθανόλη. Για την κατακρήμνιση χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα αντιδραστήρια: Αιθανόλη 100 %, Αιθανόλη 70 %, CH<sub>3</sub>COONa 3 M, Γλυκογόνο, διπλά απεσταγμένο αποστειρωμένο νερό.



### Μεθοδολογία

1. Στο δείγμα DNA όγκου (V) προσθέτονται 2.5 V αιθανόλης 100 %, 1/10 V διαλύματος CH<sub>3</sub>COONa 3 M και 0.5 μl γλυκογόνο και το δείγμα διατηρείται για 15 λεπτά στους -80 °C.
  2. Το δείγμα φυγοκεντρείται για 10 λεπτά στις 13.200 rpm.
  3. Αφαιρούμε προσεκτικά το υπερκείμενο και προσθέτουμε αιθανόλη 70 % σε ποσότητα 0.5 V.
  4. Φυγοκεντρούμε για 5 λεπτά στις 13.200 rpm. Αφαιρούμε το υπερκείμενο.
  5. Αφήνουμε το ίζημα να στεγνώσει και επαναδιαλύουμε σε 20 μl διπλά απεσταγμένο αποστειρωμένο νερό.
- B. Με το ειδικό QiAquick Purification kit της εταιρείας Qiagen (Cat. No. 28106), χρησιμοποιώντας τα ακόλουθα αντιδραστήρια του kit: Buffer PB, Buffer PE, EB Buffer.

### Μεθοδολογία

1. Σε σωληνάκι erpendorf 1.5 μl προσθέτουμε 20 μl προϊόν PCR και πέψης και προσθέτουμε 100 μl Buffer PB. Ανακατεύουμε με την πιπέτα.
  2. Μεταφέρουμε το δείγμα στις ειδικές κολωνίτσες, οι οποίες αποτελούνται από ειδικό φίλτρο και σωληνάκι συλλογής.
  3. Φυγοκεντρούμε για 1 λεπτό στις 13.000 rpm.
  4. Αφαιρούμε το υγρό από το σωληνάκι συλλογής και προσθέτουμε 750 μl Buffer PE. Φυγοκεντρούμε για 1 λεπτό στις 13.000 rpm.
  5. Μεταφέρουμε το φίλτρο σε καθαρό σωληνάκι erpendorf.
  6. Προσθέτουμε 30 μl EB Buffer. Επωάζουμε σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 1 λεπτό και φυγοκεντρούμε για 3 λεπτά στις 13.000 rpm.
- Έχουμε καθαρό DNA, το οποίο αποθηκεύουμε στους 4 °C.

Συγκρίνοντας τις δυο μεθόδους η χρήση του ειδικού QiAquick Purification kit της εταιρείας Qiagen είναι ευκολότερη και γρηγορότερη σε σχέση με την κατακρήμνιση, η οποία απαιτεί μεγαλύτερους χρόνους επώασης. Όσον αφορά την ευκρίνεια των αποτελεσμάτων δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές.

## 2.7. Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης είναι μια μέθοδος που χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό, την αναγνώριση και τον καθορισμό του μοριακού βάρους κομματιών DNA. Η μέθοδος βασίζεται στην κινητικότητα γραμμικών δίκλωνων μορίων DNA σε ένα ηλεκτρικό πεδίο σύμφωνα με το φορτίο και το μοριακό τους βάρος. Η τεχνική είναι απλή, γρήγορη και ικανή να διαχωρίζει μίγματα κομματιών DNA που δεν μπορούν να διαχωριστούν με άλλες τεχνικές. Η θέση του DNA στο πήκτωμα μπορεί να προσδιοριστεί άμεσα μετά από εμβάπτιση του πηκτώματος σε διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου. Τα αποτελέσματα φαίνονται στο υπεριώδες φως.

Η ηλεκτροφορητική ικανότητα του DNA στα πηκτώματα αγαρόζης εξαρτάται από το μοριακό βάρος του DNA, τη συγκέντρωση της αγαρόζης, τη στερεοδιάταξη του DNA και την ένταση του ρεύματος. Η συγκέντρωση της αγαρόζης που χρησιμοποιείται καθορίζει το μέγεθος των πόρων της πηκτής και συνεπώς ποικίλει ανάλογα με το μέγεθος του DNA που θέλουμε να διαχωρίσουμε και να ανιχνεύσουμε.

Στην συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν δυο διαφορετικές ποιότητες αγαρόζης, η Regular και η Wide Range. Με τη χρήση της Regular αγαρόζης τα αποτελέσματα ήταν πιο ευδιάκριτα.

Για την παρασκευή του πηκτώματος αγαρόζης χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα αντιδραστήρια, στις ακόλουθες συγκεντρώσεις: Regular Αγαρόζη, Διάλυμα TBE 1X, Διάλυμα TBE 10X, Βρωμιούχο αιθίδιο, Χρωστική, διπλά απεσταγμένο αποστειρωμένο νερό, Δείγματα DNA.

### Μεθοδολογία

Παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης 2 %

1. Σε κωνική φιάλη των 250 ml προσθέτουμε 3 gr σκόνη αγαρόζης. Σε ογκομετρικό κύλινδρο προσθέτουμε 15 ml 10X TBE και συμπληρώνουμε με διπλά απεσταγμένο αποστειρωμένο νερό μέχρι τον όγκο των 150 ml και το προσθέτουμε στην κωνική φιάλη.
2. Το διάλυμα θερμαίνεται με διαδοχικές ανακινήσεις, μέχρι να διαλυθεί η αγαρόζη και να γίνει ένα διαυγές διάλυμα.
3. Αφού κρυώσει το διάλυμα το μεταφέρουμε στη στεγανοποιημένη βάση της ηλεκτροφορητικής συσκευής, στην οποία έχουμε τοποθετήσει το κατάλληλο χτενάκι. Αφήνουμε περίπου 30 λεπτά ώστε να στερεοποιηθεί το πήκτωμα.

4. Όταν η αγαρόζη πήξει εντελώς αφαιρούμε το χτενάκι και η διαδικασία μπορεί να αρχίσει.

#### Ηλεκτροφόρηση

1. Αρχικά προετοιμάζονται τα δείγματα προσθέτοντας στο καθένα περίπου 2 μl μπλε χρωστικής και αναμιγνύοντας καλά. Η χρωστική αυτή φέρει ηλεκτρικό φορτίο με αποτέλεσμα να κινείται προς το ηλεκτρόδιο της καθόδου, όμοια με το DNA, έτσι ώστε να είναι δυνατή η παρατήρηση της πορείας της διαδικασίας.
2. Το στερεοποιημένο πήκτωμα βυθίζεται με τη βάση στο εσωτερικό της ηλεκτροφορητικής συσκευής που έχει πληρωθεί με το ρυθμιστικό διάλυμα.
3. Τα δείγματα και ο μάρτυρας φορτώνονται στις θέσεις εκκίνησης, στην κάθοδο.
4. Στη συνέχεια συνδέονται τα ηλεκτρόδια της ηλεκτροφορητικής συσκευής με τη συσκευή τροφοδότησης, έτσι ώστε το θετικό ηλεκτρόδιο να βρίσκεται στην αντίθετη κατεύθυνση από τις θέσεις φόρτωσης και εφαρμόζεται τάση 100 V. Η διαδικασία ολοκληρώνεται μετά από 2 ώρες.
5. Το πήκτωμα μεταφέρεται σε διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (0.005 mg/ml), όπου παραμένει για 30 λεπτά και στη συνέχεια ξεπλένεται για 10 λεπτά σε διάλυμα διπλά απεσταγμένου αποστειρωμένου νερού.
6. Το πήκτωμα εκτίθεται σε υπεριώδη ακτινοβολία, όπου είναι ορατό το πρότυπο των ζωνών του DNA που έχει προκύψει μετά το διαχωρισμό.
7. Λήψη φωτογραφίας.

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

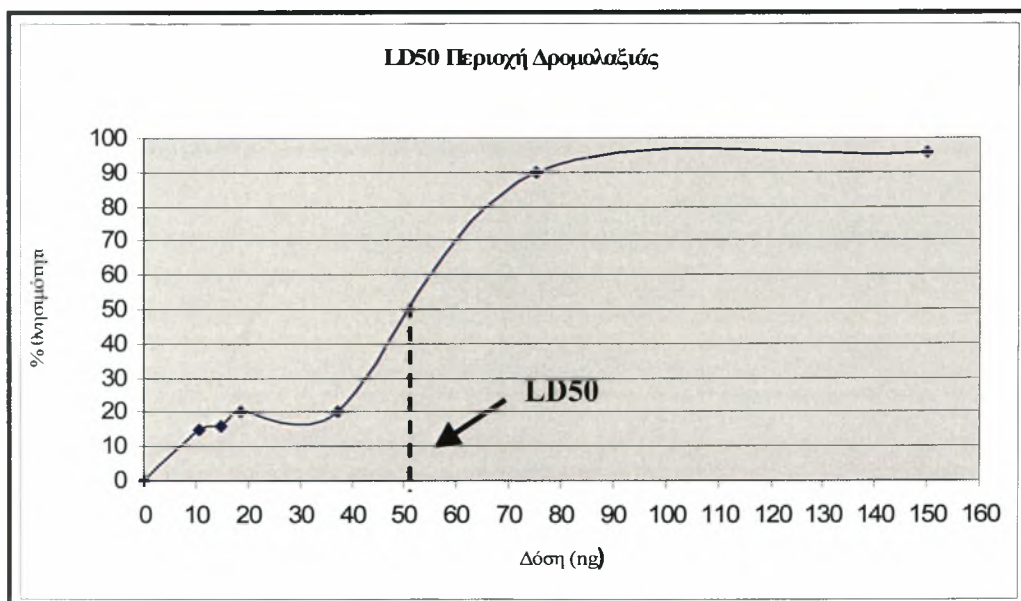
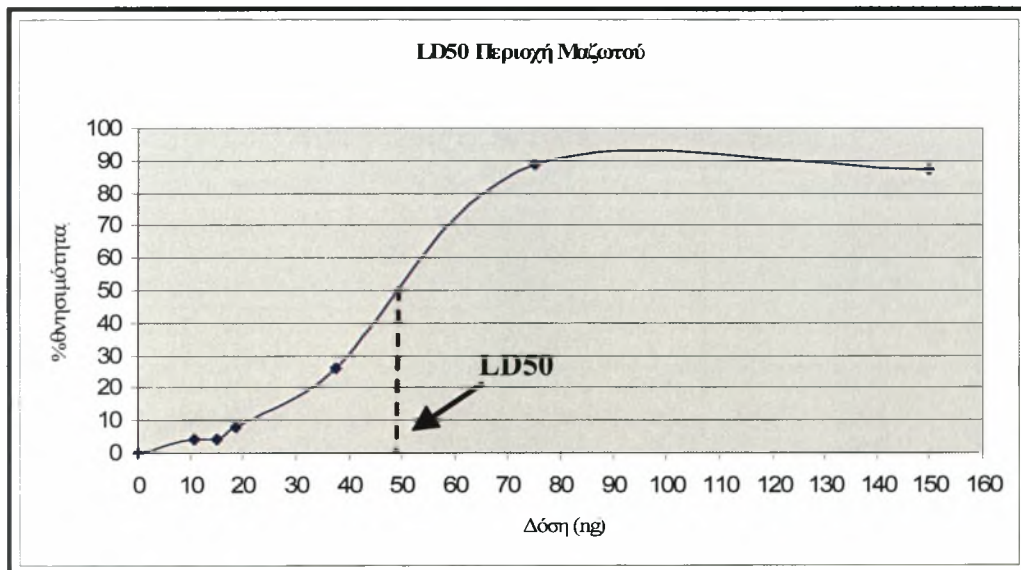
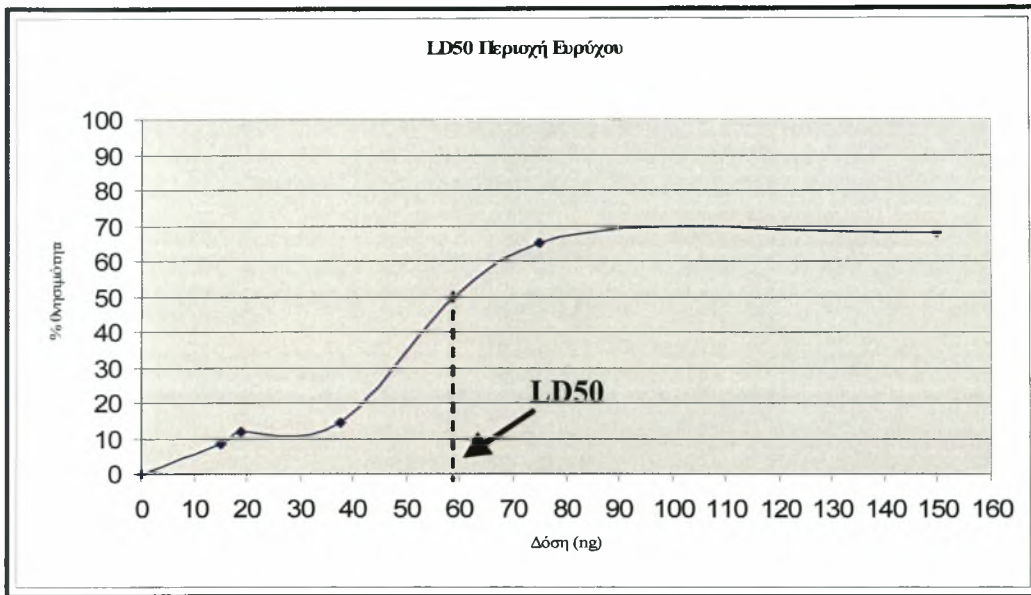
#### 3.1. Έλεγχος ανθεκτικότητας των πληθυσμών του δάκου

Ο έλεγχος ύπαρξης της μετάλλαξης στο εξόνιο 10 της ακετυλοχολινεστεράσης στο δάκο έγινε βάση του πρωτοκόλλου που καθορίστηκε στο Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Έγινε πειραματισμός του πρωτοκόλλου στο Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας του ΙΓΕ, για τις βέλτιστες συνθήκες λειτουργίας του. Αρχικά έγινε παραλαβή και μεταφορά προσβεβλημένου ελαιοκαρπού από την περιοχή της Ευρύχου, του Μαζωτού και τη Δρομολαξιά, στο εντομοτροφείο του ΙΓΕ. Μετά την έξοδο των προνύμφων του δάκου και τη νύμφωση τους, οι νύμφες μεταφέρθηκαν σε ειδικούς κλωβούς εκτροφής, όπου διατηρήθηκαν μέχρι την έξοδο των τέλειων εντόμων. Τα έντομα αναισθητοποιήθηκαν και εφαρμόστηκε τοπικά μικροποσότητα dimethoate, για τις δόσεις που φαίνονται στον Πίνακα 4. Τα έντομα τοποθετήθηκαν σε κλωβούς βιοδοκιμών και μετά από 24 ώρες μετρήθηκε το ποσοστό θνησιμότητας και υπολογίστηκε η μέση θανατηφόρος δόση (LD50) (Πίνακας 5). Μέση θανατηφόρος δόση (LD50) είναι η συγκέντρωση εκείνη της δραστικής ουσίας που προκαλεί το θάνατο στο 50 % των ατόμων που έχουν δηλητηριαστεί από την ουσία.

Πίνακας 4: Δόσεις φαρμάκου των τοξικολογικών εξετάσεων.

| # |          | Ακετόνη (ml) | Δόση (μl) |
|---|----------|--------------|-----------|
| 1 | Μάρτυρας | 20           | 0         |
| 2 | x/2      | 20           | 7.50      |
| 3 | x/4      | 20           | 3.75      |
| 4 | x/8      | 40           | 3.75      |
| 5 | x/16     | 60           | 2.80      |
| 6 | x/20     | 60           | 2.25      |
| 7 | x/28     | 60           | 1.60      |
| 8 | x/32     | 60           | 1.40      |

Στις γραφικές παραστάσεις που ακολουθούν φαίνεται ο προσδιορισμός της μέσης θανατηφόρας δόσης για τις τρεις περιοχές από όπου συλλέγηκαν τα έντομα.

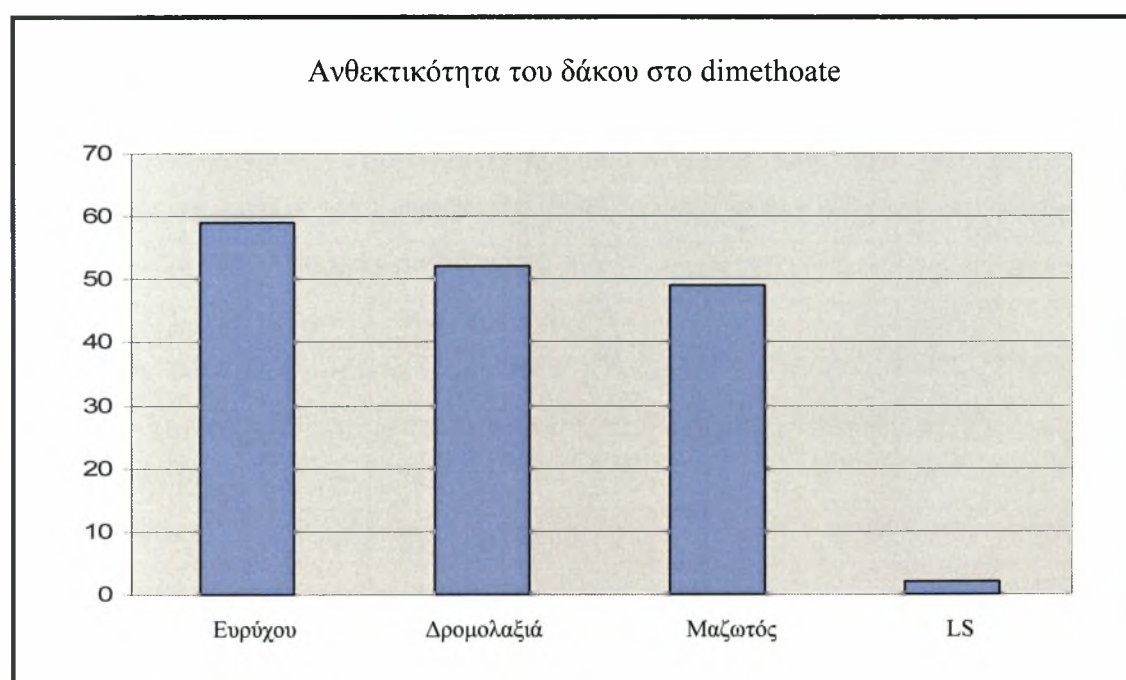




**Πίνακας 5:** Μέση θανατηφόρος δόση dimethoate

| Περιοχή    | Αριθμός ατόμων | LD50 (ng/έντομο) |
|------------|----------------|------------------|
| Ευρύχου    | 114            | 59               |
| Μαζωτός    | 143            | 49               |
| Δρομολαξιά | 128            | 51               |

Στο διάγραμμα που ακολουθεί φαίνεται η σύγκριση των επιπέδων ανθεκτικότητας στους τρεις πληθυσμούς που εξετάστηκαν και ενός εργαστηριακού ευαίσθητου πληθυσμού (LS).



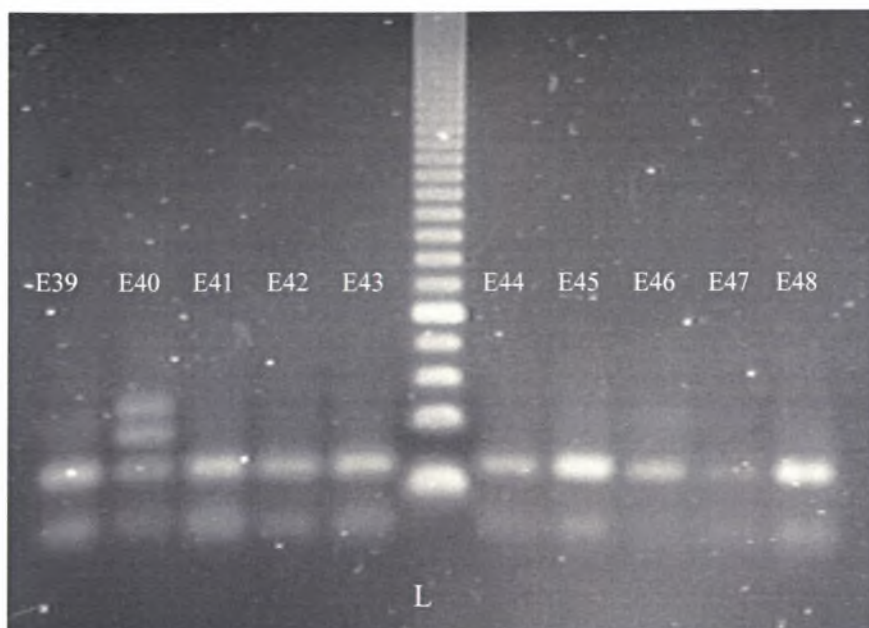
Όπως βλέπουμε στο διάγραμμα οι τιμές ανθεκτικότητας των φυσικών πληθυσμών του δάκου είναι από 49 έως 59 φορές μεγαλύτερες εκείνων του εργαστηριακού πληθυσμού.

### 3.2. Μοριακή ανάλυση για την ύπαρξη της μετάλλαξης

Σε αυτή την πειραματική εργασία, χρησιμοποιήθηκαν από κάθε περιοχή 15 από τα έντομα που επιβίωσαν των τοξικολογικών εξετάσεων στις πιο υψηλές δόσεις. Επιλέγηκαν τα συγκεκριμένα έντομα γιατί εμφάνισαν το μεγαλύτερο επίπεδο ανθεκτικότητας κατά τις βιοδοκιμές. Τα δείγματα αυτά αναλύθηκαν σε μοριακό επίπεδο.

Όσον αφορά τις μοριακές αναλύσεις των δειγμάτων, αρχικά εκχειρίστηκε το DNA από τα έντομα και υποβλήθηκε σε αντίδραση PCR με τους συγκεκριμένους εκκινητές για το εξόνιο 10, με αποτέλεσμα τη δημιουργία PCR προϊόντος 95 βάσεων. Τα προϊόντα από την αντίδραση PCR επωάζονταν για 75 λεπτά στους 60 °C με το περιοριστικό ένζυμο MwoI. Η μετάλλαξη στο εξόνιο 10 του γονιδίου της ακετυλοχολινεστεράσης, δηλαδή η έλλειψη εννέα νουκλεοτιδίων που οδηγούν στην έλλειψη τριών αμινοξέων γλουταμίνης, αφαιρεί από τα άτομα που φέρουν τη μετάλλαξη μια θέση αναγνώρισης του περιοριστικού ενζύμου. Έτσι στα άτομα αυτά εμφανίζεται το προϊόν της αντίδρασης PCR, ενώ στα άτομα που δεν φέρουν τη μετάλλαξη το ένζυμο αναγνωρίζει μια θέση για να δράσει δίνοντας δυο κομμάτια DNA των 58 και 37 βάσεων αντιστοίχως.

Τέλος τα δείγματα υποβλήθηκαν σε καθαρισμό είτε με κατακρήμνιση με αιθανόλη, είτε με τη χρήση του ειδικού QiAquick Purification kit της εταιρείας Qiagen. Όσον αφορά την ηλεκτροφόρηση, τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε 2 % Regular αгарόζη, για 2 ώρες στα 100 V.

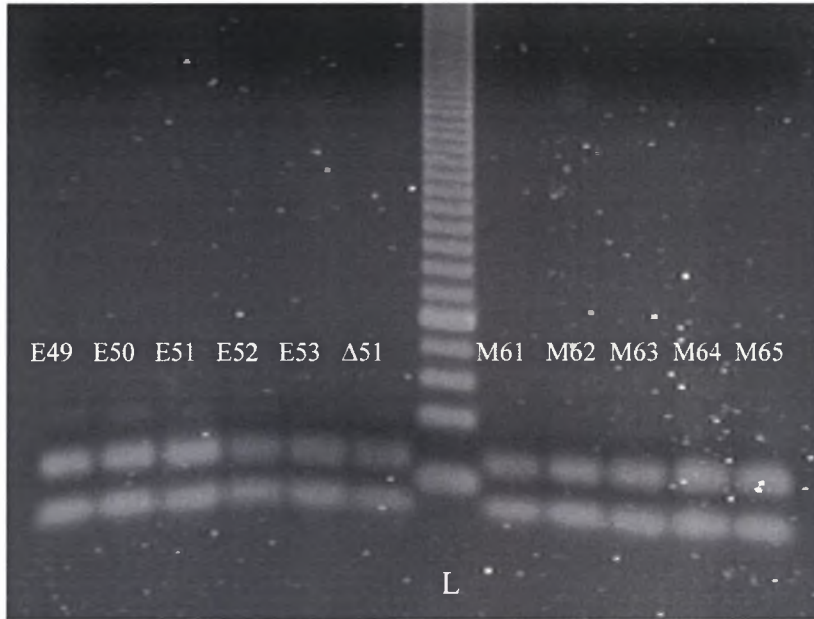


**Εικόνα 10:** Στην εικόνα φαίνονται τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης των δειγμάτων E39 μέχρι E48, τα οποία έχουν υποβληθεί σε αντίδραση PCR, αντίδραση πέψης και καθαρισμό με το QiAquick Purification kit της εταιρείας Qiagen. Μεταξύ των δειγμάτων E43 και E44 ηλεκτροφορήθηκε μάρτυρας γνωστών μοριακών βάρων, ο οποίος αρχίζει στις 50 βάσεις, ανεβαίνει στις 100 βάσεις και ανεβαίνει αναλογικά. Τα δείγματα E39-E45 επέζησαν στη δόση  $\times/2$ , ενώ τα δείγματα E46-E48 επέζησαν στη δόση  $\times/4$ . Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε πήκτωμα 2 % Regular αγαρόζης, στα 100 V, για δυο ώρες. (E=υποδηλώνει ότι τα δείγματα αυτά παραλήφθηκαν από την περιοχή της Ευρύχου) (L=50 bases Ladder).

Στην Εικόνα 10 φαίνονται τα αποτελέσματα των δειγμάτων E39 μέχρι E48 (E=υποδηλώνει ότι τα δείγματα αυτά παραλήφθηκαν από την περιοχή της Ευρύχου). Τα δείγματα E39-E45 επέζησαν στη δόση  $\times/2$ , ενώ τα δείγματα E46-E48 επέζησαν στη δόση  $\times/4$ . Τα δείγματα αυτά έχουν υποβληθεί σε αντίδραση PCR, στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε αντίδραση πέψης των δειγμάτων με το ένζυμο MwoI, καθαρισμός των δειγμάτων και τελικά ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα 2 % Regular αγαρόζης, για 2 ώρες στα 100V. Σε όλα τα δείγματα, εκτός στο δείγμα E40 βλέπουμε δυο κομμάτια DNA, των 58 και 37 βάσεων. Τα κομμάτια αυτά υποδηλώνουν ότι στα δείγματα αυτά το ένζυμο έχει αναγνωρίσει μια θέση. Άρα δεν υπάρχει η μετάλλαξη, διότι σε περίπτωση μετάλλαξης η θέση αναγνώρισης του ενζύμου δεν υπάρχει, οπότε αναμένουμε ένα κομμάτι DNA των 95 βάσεων. Στο δείγμα E40 εμφανίζονται αυτά τα δυο κομμάτια DNA, μαζί με ένα κομμάτι DNA των 95 βάσεων, το οποίο είναι

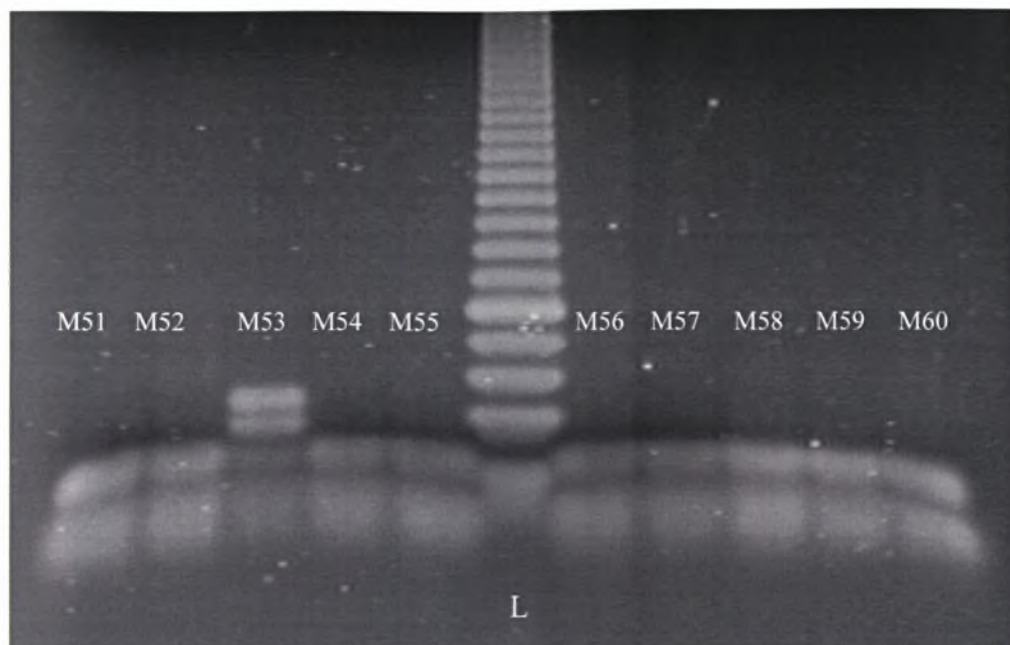


αναμενόμενο σε περίπτωση ετεροζυγωτίας του δείγματος. Στο δείγμα E40 όμως, εμφανίζεται και ένα κομμάτι DNA περίπου 120 βάσεων, το οποίο δεν είναι αναμενόμενο. Το κομμάτι αυτό πρέπει να διερευνηθεί περαιτέρω, ώστε να διαπιστωθεί αν πρόκειται για παραπροϊόν της αντίδρασης PCR ή για κάτι άλλο.



**Εικόνα 11:** Στην εικόνα φαίνονται τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης των δειγμάτων E49, E50, E51, E52, E53, Δ51, M61, M62, M63, M64 και M65. Τα δείγματα E49-E53 επέζησαν στη δόση  $\times/4$ , το δείγμα Δ51 επέζησε στη δόση  $\times/2$ , ενώ τα δειγματα M61-M65 επέζησαν στη δόση  $\times/8$ . Τα δείγματα αυτά υποβλήθηκαν σε αντίδραση PCR, αντίδραση πέψης και κατακρήμνιση με αιθανόλη. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε πήκτωμα 2 % Regular αγαρόζης, στα 100 V, για δυο ώρες. (E=υποδηλώνει ότι τα δείγματα αυτά παραλήφθηκαν από την περιοχή της Ευρύχου, Δ=περιοχή Δρομολαξιάς, M=περιοχή Μαζωτού) (L=50 bases Ladder).

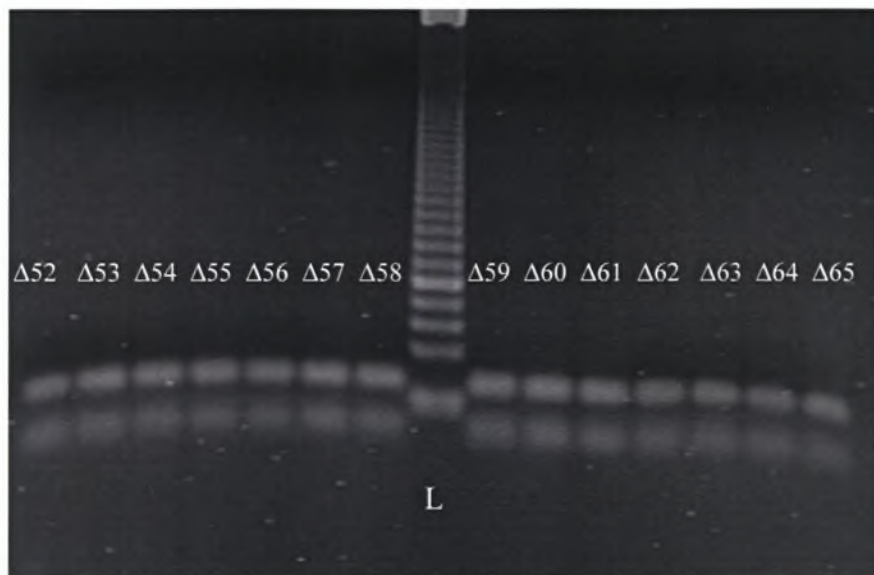
Τα δείγματα E49, E50, E51, E52, E53, Δ51, M61, M62, M63, M64 και M65 υποβλήθηκαν σε αντίδραση PCR, πέψης με το ένζυμο MwoI και κατακρήμνιση με αιθανόλη (E=υποδηλώνει ότι τα δείγματα αυτά παραλήφθηκαν από την περιοχή της Ευρύχου, Δ=περιοχή Δρομολαξιάς, M=περιοχή Μαζωτού). Τα δείγματα E49-E53 επέζησαν στη δόση  $\times/4$ , το δείγμα Δ51 επέζησε στη δόση  $\times/2$ , ενώ τα δειγματα M61-M65 επέζησαν στη δόση  $\times/8$ . Όπως φαίνεται στην Εικόνα 11, σε όλα τα δείγματα το περιοριστικό ένζυμο αναγνώρισε τη θέση κοπής και έδρασε δημιουργώντας δυο κομμάτια DNA των 58 και 37 βάσεων αντίστοιχα. Άρα στα δείγματα αυτά δεν υπάρχει μετάλλαξη.



**Εικόνα 12:** Στην εικόνα φαίνονται τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης των δειγμάτων M51 μέχρι M60, τα οποία έχουν υποβληθεί σε αντίδραση PCR και αντίδραση πέψης. Τα δείγματα αυτά δεν υποβλήθηκαν σε καθαρισμό. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε πήκτωμα 2 % Regular αραρόζης, στα 100 V, για δυο ώρες (M=υποδηλώνει ότι τα δείγματα αυτά παραλήφθηκαν από την περιοχή Μαζωτού) (L=50 bases Ladder). Τα δείγματα M51-M53 επέζησαν στη δόση  $\times/2$ , τα δειγματο M54-M56 επέζησαν στη δόση  $\times/4$  και τα δείγματα M57-M60 επέζησαν στη δόση  $\times/8$ .

Στην Εικόνα 12 βλέπουμε τα αποτελέσματα από την επεξεργασία των δειγμάτων M51 μέχρι M60 (M=υποδηλώνει ότι τα δείγματα αυτά παραλήφθηκαν από την περιοχή Μαζωτού). Τα δείγματα M51-M53 επέζησαν στη δόση  $\times/2$ , τα δειγματο M54-M56 επέζησαν στη δόση  $\times/4$  και τα δείγματα M57-M60 επέζησαν στη δόση  $\times/8$ . Τα δείγματα αυτά υποβλήθηκαν σε αντίδραση PCR. Τα προϊόντα της αντίδρασης PCR επώαστηκαν για 75 λεπτά στους 60 °C με το ένζυμο MwoI και στη συνέχεια ηλεκτροφορήθηκαν χωρίς να γίνει καθαρισμός. Όπως βλέπουμε τα αποτελέσματα δεν είναι τόσο ευδιάκριτα, τα κομμάτια εμφανίζονται πιο διάχυτα και η κίνηση της ηλεκτροφόρησης εμφανίζεται σαν χαμόγελο. Ωστόσο σε όλα τα δείγματα, εκτός το δείγμα M53 φαίνονται τα δυο κομμάτια DNA των 58 και 37 βάσεων αντίστοιχα, τα οποία δείχνουν ότι το ένζυμο αναγνώρισε και έκοψε, άρα δεν υπάρχει η μετάλλαξη. Στο δείγμα M53 όπως και στο δείγμα E40 που αναφέρθηκε προηγουμένως (Εικόνα 10) εμφανίζονται αυτά τα δυο κομμάτια DNA, μαζί με ένα κομμάτι DNA των 95

βάσεων και ένα κομμάτι των 120 βάσεων. Το κομμάτι των 95 βάσεων είναι αναμενόμενο σε περίπτωση ετεροζυγωτίας του δείγματος, ενώ το κομμάτι των 120 βάσεων δεν είναι αναμενόμενο, γι'αυτό απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση, ώστε να διαπιστωθεί αν πρόκειται για παραπροϊόν της αντίδρασης PCR ή για κάτι άλλο.



**Εικόνα 13:** Στην εικόνα φαίνονται τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης των δειγμάτων Δ52 μέχρι Δ65, τα οποία έχουν υποβληθεί σε αντίδραση PCR, αντίδραση πέψης και καθαρισμό με το QiAquick Purification kit. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε πήκτωμα 2 % Regular αгарόζης, στα 100 V, για δυο ώρες (E=υποδηλώνει ότι τα δείγματα αυτά παραλήφθηκαν από την περιοχή της Ευρύχου, Δ=περιοχή Δρομολαξιάς, M=περιοχή Μαζωτού) (L=50 bases Ladder). Τα δείγματα Δ52-Δ65 επέζησαν στη δόση x/8.

Τα δείγματα που παρουσιάζονται στην Εικόνα 13, δεν φέρουν τη μετάλλαξη, γιατί η θέση αναγνώρισης του ενζύμου υπάρχει και το ένζυμο έχει δράσει, δίνοντας τα δυο κομμάτια DNA, των 58 και 37 βάσεων αντίστοιχα.

#### 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο δάκος αποτελεί το σοβαρότερο εχθρό της ελιάς προκαλώντας κάθε χρόνο σημαντική ποιοτική και ποσοτική υποβάθμιση στην ελαιοπαραγωγή. Για πάνω από 30 χρόνια, ο έλεγχος του γίνεται κυρίως με τη χρήση οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων. Πέρα από τις καταστροφικές επιπτώσεις των εντομοκτόνων στο περιβάλλον και γενικά στο οικοσύστημα, η υπερβολική και μακροχρόνια χρήση τους οδήγησε στην εμφάνιση ανθεκτικότητας των εντόμων στα εντομοκτόνα. Η εμφάνιση ανθεκτικότητας αναγκάζει τους ανθρώπους να ψεκάζουν πιο συχνά, να αυξάνουν τη δόση των φαρμάκων, να χρησιμοποιούν μίγματα φαρμάκων κ.α. Η ανακάλυψη εντομοκτόνων με νέους τρόπους δράσης γίνεται ολοένα πιο δύσκολη και πιο δαπανηρή. Για τους λόγους αυτούς έχει ήδη αλλάξει η νοοτροπία περί νέων εντομοκτόνων και έχει ενισχυθεί η άποψη της ορθολογικής χρήσης των υπαρχόντων έτσι ώστε να διατηρηθεί η αποτελεσματικότητά τους, προσέγγιση που είναι γνωστή ως Insecticide Resistance Management (IRM) (1).

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της ύπαρξης της μετάλλαξης του εξονίου 10 σε κυπριακούς φυσικούς πληθυσμούς του δάκου. Στα πλαίσια του σκοπού αυτού παραλήφθηκε προσβεβλημένος ελαιοκαρπός από τρεις περιοχές της Κύπρου και μεταφέρθηκε στο εντομοτροφείο του ΙΓΕ, όπου διατηρήθηκε, μέχρι την έξοδο των τέλειων εντόμων. Στη συνέχεια εξετάστηκε η ανθεκτικότητα σε πληθυσμούς εντόμων από τις ανωτέρω περιοχές στο οργανοφωσφορικό εντομοκτόνο dimethoate. Για την μελέτη της ύπαρξης της μετάλλαξης του εξονίου 10 σε μοριακό επίπεδο, επιλέγηκαν από κάθε πληθυσμό 15 από τα έντομα που επιβίωσαν των τοξικολογικών εξετάσεων στις υψηλότερες δόσεις φαρμάκου. Αρχικά εκχειρίστηκε το DNA από τα έντομα και υποβλήθηκε σε αντίδραση PCR με ειδικούς εκκινητές για το εξόνιο 10 του γονιδίου της AChE. Τα προϊόντα της αντίδρασης PCR επωάζονταν για 75 λεπτά στους 60 °C με το περιοριστικό ένζυμο MwoI και υποβάλλονταν σε καθαρισμό. Η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων γινόταν σε 2 % Regular αγαρόζη, για 2 ώρες στα 100 V.

Η μετάλλαξη δεν βρέθηκε στα δείγματα. Σε δυο δείγματα, το E40 και το M53, εμφανίστηκε μια μη αναμενόμενη μπάντα περίπου στις 120 βάσεις. Η μπάντα αυτή θα μπορούσε να απομονωθεί και να κλωνοποιηθεί, ώστε να σταλεί για αλληλούχιση. Μετά από αλληλούχιση θα μπορούσαμε να ξέρουμε με ακρίβεια για τι πρόκειται. Τα δυο αυτά δείγματα θα μπορούσαν να είναι ετεροζυγώτες για τη

μετάλλαξη, ωστόσο η ύπαρξη της μη αναμενόμενης μπάντας οδηγεί στο μη χαρακτηρισμό των δειγμάτων.

Μελέτες που έγιναν με σκοπό τη μελέτη της ύπαρξης των μεταλλάξεων του γονιδίου της ακετυλοχολινεστεράσης του δάκου σε πληθυσμούς από διάφορες περιοχές της Ελλάδας και της Κύπρου, έδειξαν σημαντικές αποκλίσεις ως προς τα επίπεδα ανθεκτικότητας των φυσικών πληθυσμών του δάκου στο dimethoate. Συγκεκριμένα, οι υψηλότερες τιμές ανθεκτικότητας βρέθηκαν σε πληθυσμούς της Κρήτης και οι χαμηλότερες σε πληθυσμούς της Κύπρου (1), (2). Οι διαφορές αυτές θα μπορούσαν να αποδοθούν στη διαφορετική γενετική σύσταση του τοπικού πληθυσμού στην Ελλάδα και την Κύπρο. Οι παρατηρούμενες διαφορές αποδίδονται κυρίως στις διαφορετικές στρατηγικές ελέγχου των πληθυσμών του δάκου σε Ελλάδα και Κύπρο. Στην Ελλάδα οι ψεκασμοί γίνονται τόσο από το κράτος, όσο και από τους ίδιους τους ελαιοπαραγωγούς. Τα τελευταία 40 χρόνια οι ψεκασμοί γίνονται από το κράτος και ποικίλουν ανάλογα με την περιοχή και το έτος. Επιπλέον ψεκασμοί, γίνονται και από τους ίδιους τους αγρότες. Στην Κύπρο η κατάσταση είναι τελείως διαφορετική. Οι ψεκασμοί γίνονται από τους ίδιους τους αγρότες και δεν ξεπερνούν τους δύο το χρόνο. Έτσι, οι πληθυσμοί του δάκου στην Κύπρο έχουν εκτεθεί σε πολύ χαμηλότερη πίεση επιλογής από τους πληθυσμούς της Ελλάδας (2). Μετανάστευση ανθεκτικών γενότυπων, είτε αυτόνομη είτε μέσω εμπορίου, μπορεί επίσης να συνεισφέρει στις παρατηρούμενες διαφορές.



## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Κ. Μαθιόπουλος, Ν. Σεραφείδης, Διερεύνηση της ανθεκτικότητας του δάκου της ελιάς σε οργανοφωσφορικά και πυρεθροειδή εντομοκτόνα, Δελτίο Τελικής έκθεσης έργου Διακρατικής Ε&Τ συνεργασίας, Ινστιτούτο Γεωργικών Ερευνών, Κύπρος, 2004-2006.
2. P. J. Skouras, J. T. Margaritopoulos, N. A. Seraphides, I. M. Ioannides, E. G. Kakani, K. D. Mathiopoulos, J. A. Tsitsipis, Organophosphate resistance in olive fruit fly, *Bactrocera oleae*, populations in Greece and Cyprus, Pest Management Science, 2006.
3. B. Alberts, D. Bray, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, 1998, Essential Cell Biology: An Introduction to the Molecular Biology of the Cell, ISBN 0-8153-2045-0.
4. H. V. Weems, J. L. Nation, T. R. Fasulo, Olive fruit fly, *Bactrocera oleae* (Gmelin) (Insecta: Diptera: Tephritidae), Entomology Circular No. 44, 1999.
5. J. G. Vontas, M. J. Hejazi, N. J. Hawkes, N. Cosmidis, M. Loukas and J. Hemingway; Resistance-associated point mutations of organophosphate insensitive acetylcholinesterase in the olive fruit fly *Bactrocera oleae*, Insect Molecular Biology 11, Vol 4, p. 329-336, 2002.
6. D. G. Mouzaki, F. E. Zarani, L. H. Margaritis, Structure and morphogenesis of the eggshell and micropylar apparatus in the olive fruit fly, *Dacus oleae* (Diptera: Tephritidae), Athens University, Greece, 1991, PMID: 1920445.
7. N. J. Hawkes, R. W. Janes, J. Hemingway, J. Vontas, Detection of resistance-associated point mutations of organophosphate-insensitive acetylcholinesterase in the olive fruit fly, *Bactrocera oleae* (Gmelin).
8. R. A. Van Steenwyk, L. Ferguson, F.G. Zalom, G. S. Sibbett, How to Manage Pests: Olive: Olive fruit fly, UC ANR Publication 3452, Insects and Mites.
9. R. E. Rice, Bionomics of the olive fruit fly *Bactrocera* (*Dacus*) *oleae*, U.C. Kearney. Agricultural Center, UC Plant Protection Quarterly, vol.10, number 3, July 2000.
10. S. E. Michellakis, The olive fruit fly (*Dacus oleae* Gmel.) in Crete, ISHS Acta Horticulturae 286: International Symposium on Olive Growing.
11. S. Tsakas, C. B. Krimbas, How many genes are selected in populations of *Dacus oleae*, Greece, 1974.

12. D. W. Russell, Sambrook, Joseph, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3<sup>rd</sup> ed., Cold Spring Harbor, N.Y.: Gold Spring Harbor Laboratory Press. ISBN 0-87969-576-5, 2001.
13. The history of PCR (<http://www.si.edu/archives/ihd/videocatalog/9577.htm>): Smithsonian Institution Archives, Institutional History Division, June 2006.
14. Α. Πατσιάς, Η καταπολέμηση του δάκου της ελιάς, 2005, Γ.Τ.Π 26/2005-6.000.
15. Μ. Ε. Τζανακάκης, Μαθήματα Εφαρμοσμένης Εντομολογίας. Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, 1980.
16. Κ. Τριανταφυλλίδης, Κλασική και Μοριακή Γενετική, Εκδοτικός Οίκος Αδελφών Κυριακίδη Α.Ε., 2001, ISBN 960-343-192-3.
17. Κέντρο Διάδοσης Τεχνολογίας για την ελιά (TDC), Υποβάθμιση της ποιότητας της επιτραπέζιας ελιάς και του ελαιόλαδου.
18. Μ. Κονσολάκη, Τεχνητή εκτροφή προνύμφης δάκου ελιάς [*Bactrocera* (= *Dacus*) *oleae* (Rossi), Diptera-Tephritidae]: αντικατάσταση βασικού υλικού υφής μίγματος (κυτταρίνη χρωματογραφίας) από προσφορότερα και/ή φθηνότερα υλικά. Τροφές Εκκίνησης και Πετάτωσης προνυμφικού σταδίου, Επαναχρησιμοποίηση τροφών προνύμφης, Μεταπτυχιακή Διατριβή, 2005.
19. D. Fournier, F. Karch, J. M. Bride, L. M. C. Hall, J.-B. Berge and P. Spierer; *Drosophila melanogaster* acetylcholinesterase gene, structure evolution and mutations, J. Mol. Evol., Vol 210, p. 15-22, 1989.
20. Α. P. Economopoulos, Sexual competitiveness of g-ray sterilized males of *Dacus oleae*. Mating frequency of artificially reared and wild females, Environmental Entomology 1: 490-497, 1972.
21. M. An Shi, A. Lougarre, C. Alies, I. Fremaux, Z. H. Tang, J. Stojan, D. Fournier, Acetylcholinesterase alterations reveal the fitness cost of mutations conferring insecticide resistance, Evolutionary Biology, 2004.
22. P. Menozzi, M. An Shi, A. Lougarre, D. Fournier, Mutations of acetylcholinesterase which confer insecticide resistance in *Drosophila melanogaster* populations, Evolutionary Biology, 2004.
23. L. G. Sultatos, Mammalian toxicology of organophosphorus pesticides, J. Toxicol. Environ. Health 43, p. 271-289, 1994.
24. T. C. Marrs. Organophosphate poisoning, Pharmacology & Therapeutics 58, p. 51-66. 1993.

25. S. B. Walsh, T. A. Dolden, G. D. Moores, M. Kristensen, T. Lewis, A. L. Devonshire, M. S. Williamson, Identification and characterization of mutations in housefly (*Musca domestica*) acetylcholinesterase involved in insecticide resistance, *Biochem. J.* 359, p. 175-181, 2001.
26. D. Fournier, A. Mutero, M. Pralavorio, J. Bride, *Drosophila* acetylcholinesterase: Mechanisms of resistance to organophosphates, *Chemico-Biological Interactions* Vol. 87, Issues 1-3, Pages 233-238, 1993.
27. J. Hsu, D. S. Haymer, W. Wu, H. Feng, Mutations in the acetylcholinesterase gene of *Bactrocera dorsalis* associated with resistance to organophosphorus insecticides, *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 36, Issue 5, p. 396-402, 2006.
28. D. Fournier, Mutations of acetylcholinesterase which confer insecticide resistance in insect populations, *Chemico-Biological Interactions*, 2005.



## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

### Διαλύματα

#### PBS

Phosphate Buffered Saline. Το διάλυμα PBS αραιώθηκε από την αρχική συγκέντρωση 40X σε συγκέντρωση 1X και διατηρήθηκε στους 4 °C.

#### Buffer AL

Lysis buffer. Περιέχει guanidine hydrochloride. Το διάλυμα διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου (15-25 °C).

#### Buffer AW1

Wash buffer 1. Περιέχει guanidine hydrochloride. Στο buffer AW1 έγινε προσθήκη 125 ml 100 % αιθανόλης βάση των οδηγιών της εταιρείας. Το διάλυμα διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου (15-25 °C).

#### Buffer AW2

Wash buffer 2. Περιέχει guanidine hydrochloride. Στο buffer AW2 προστέθηκαν 160 ml 100 % αιθανόλης, βάση των οδηγιών της εταιρείας. Το διάλυμα διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου (15-25 °C).

#### Buffer AE

Elution buffer. Διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου (15-25 °C).

#### dNTPs

Από αρχική συγκέντρωση 100 mM, παίρνουμε 5 μl από κάθε dNTP και προσθέτουμε 180 μl διπλά απεσταγμένο αποστειρωμένο νερό, ώστε να έχουμε τελικό όγκο 200 μl και τελική συγκέντρωση 2.5 mM για κάθε dNTP.

#### 10R εκκινητής

Ο εκκινητής αρχικά βρίσκεται σε μορφή σκόνης και βάση τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας αραιώνεται στην επιθυμητή συγκέντρωση. Στην

περίπτωση του 10R εκκινητή προσθέσαμε 1288 µl διπλά απεσταγμένο αποστειρωμένο νερό, ώστε να έχουμε τελική συγκέντρωση 100 µM (100 pmol/µl).

#### 10F εκκινητής

Ο εκκινητής αρχικά βρίσκεται σε μορφή σκόνης και βάση τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας αραιώνεται στην επιθυμητή συγκέντρωση. Στην περίπτωση του 10R εκκινητή προσθέσαμε 1291 µl διπλά απεσταγμένο αποστειρωμένο νερό, ώστε να έχουμε τελική συγκέντρωση 100 µM (100 pmol/µl).

#### Buffer PB

Binding buffer. Περιέχει guanidine hydrochloride και ισοπροπανόλη. Το διάλυμα διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου (15-25 °C).

#### Buffer PE

Wash buffer. Στο buffer έγινε προσθήκη 220 ml 100 % αιθανόλης βάση των οδηγιών της εταιρείας. Διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου (15-25 °C).

#### EB Buffer

Elution buffer. Διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου (15-25 °C).

#### Διάλυμα TBE 10X, pH = 8.3

Tris 225 mM (MW=121.14) 27.26 gr

Boric Acid 225 mM (MW=61.83) 13.91 gr

EDTA 5mM (MW=372.2) 1.86 gr

Οι ενώσεις αυτές διαλύονται σε διπλά απιονισμένο νερό και ο όγκος συμπληρώνεται μέχρι το 1 λίτρο. Γίνεται προσδιορισμός του pH ώστε να διαπιστωθεί ότι είναι 8.3, ο οποίος συνήθως δε χρειάζεται. Το διάλυμα διατηρείται στους 4 °C.

#### Διάλυμα TBE 1X

Το διάλυμα αυτό γίνεται με αραιώση του διαλύματος TBE 10X ως εξής: Σε ογκομετρικό κύλινδρο των 1000 ml προσθέτουμε 100 ml TBE 10X και συμπληρώνουμε με διπλά απεσταγμένο αποστειρωμένο νερό μέχρι τον όγκο των 1000 ml.

### Βρωμιούχο αιθίδιο

Ένα δισκίο βρωμιούχου αιθιδίου διαλυμένο σε 1 ml διπλά απεσταγμένο, αποστειρωμένο νερό, με τελική συγκέντρωση 10 mg/ml. Φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου σε σκοτεινό χώρο, γιατί είναι φωτοευαίσθητο. Το διάλυμα αυτό αραιώνεται σε συγκέντρωση 0.005 mg/ml. Αυτό πετυχαίνεται με προσθήκη 100 µl βρωμιούχου αιθιδίου συγκεντρώσεως 10 mg/ml και 200 ml διπλά απεσταγμένο, αποστειρωμένο νερό.