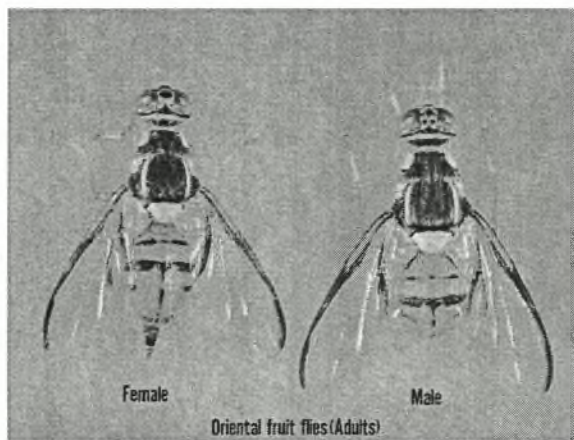




**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΗΣ**  
**ΑΚΕΤΥΛΟΧΟΛΙΝΕΣΤΕΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΔΑΚΟΥ ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ ΠΟΥ**  
**ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΑ**  
**ΟΡΓΑΝΟΦΩΣΦΟΡΙΚΑ ΕΝΤΟΜΟΚΤΟΝΑ ΣΤΗΝ ΚΥΠΡΟ.**



**ΠΑΝΑΓΗ ΠΑΥΛΟΣ**

ΛΑΡΙΣΑ 2007



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

Αριθ. Εισ.: 5432/1  
Ημερ. Εισ.: 11-03-2009  
Δωρεά: Π.Θ.  
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ  
2007  
ΠΑΝ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087350

Επόπτης Καθηγητής: Κωνσταντίνος Ματθιόπουλος

Μονάδα εκτέλεσης: Ινστιτούτο Γεωργικών Ερευνών, Κύπρος

Εκπαιδευτές Μονάδας: Ιωάννης Μ. Ιωαννίδης και Νίκος Α. Σεραφείδης

### **Ευχαριστίες:**

Η παρούσα πτυχιακή διεξάχθηκε στα πλαίσια του προγράμματος της Διακρατικής Συνεργασίας Ελλάδας - Κύπρου, στο Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας του Ινστιτούτου Γεωργικών Ερευνών (ΙΓΕ), σε συνεργασία με το Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Βιοχημείας – Βιοτεχνολογίας.

Αντικείμενο της εργασίας είναι ο έλεγχος ύπαρξης δύο συγκεκριμένων μεταλλάξεων της ακετυλοχολινεστεράσης σε κυπριακούς φυσικούς πληθυσμούς του δάκου της ελιάς από δύο διαφορετικές περιοχές.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υπεύθυνο καθηγητή μου Δρ. Κ. Ματθιόπουλο που μου έδωσε την ευκαιρία να ασχοληθώ με το θέμα και τις χρήσιμες πληροφορίες που μου παρείχε. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Ε. Κακάνη για την βοήθεια και προσαρμογή μου στο εργαστήριο.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ. Ι. Μ. Ιωαννίδη για την βοήθεια, την καθοδήγηση και τις συμβουλές που μου έδωσε, καθώς επίσης και τον κ. Ν. Α. Σεραφείδη για τη συμβολή του στη διεκπεραίωση της πτυχιακής μου εργασίας. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω θερμά τις κ. Χ. Μικελλίδου-Δημητρίου, κ. Μ. Γιωρκάτζη και Σταυριανή Λεωνίδου για όλη την καθοδήγηση και βοήθεια κατά την παραμονή μου στο Ινστιτούτο Γεωργικών Ερευνών .

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	2
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	4
SUMMARY.....	5
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	
1.1 Η ελιά και η σημασία της.....	7
1.2 Δάκος: Ο σοβαρότερος εχθρός της ελιάς.....	8
1.3 Έλεγχος πληθυσμού των εντόμων.....	9
1.4 Καταπολέμηση του δάκου.....	10
1.5 Ανθεκτικότητα.....	12
1.6 Μηχανισμός ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα.....	14
1.7 Το γονίδιο της ακετυλοχολινεστεράσης.....	17
1.8 Σκοπός της εργασίας.....	20
2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ – ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	
2.1 Συλλογή εντόμων και έλεγχος ανθεκτικότητας.....	22
2.2 Απομόνωση DNA.....	25
2.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	26
2.4 Πέψη DNA με ένζυμα περιορισμού.....	28
2.5 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης.....	30
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	
3.1 Έλεγχος φυσικών πληθυσμών του δάκου με βιοδοκιμές για ανθεκτικότητα σε εντομοκτόνο.....	33
3.2 Μοριακή ανάλυση για τον έλεγχο των μεταλλάξεων Ile214Val και Gly488Ser στο γονίδιο της ακετυλοχολινεστεράσης.....	36
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	44
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	46
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι.....	49
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ.....	51

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο δάκος της ελιάς, *Bactrocera oleae* (Diptera Tephritidae), είναι μονοφάγο είδος και προσβάλλει το ζωντανό μεσοκάρπιο της ελιάς. Ο δάκος προκαλεί τις σοβαρότερες ζημιές στην ελαιοπαραγωγή, όχι μόνο σε Ελλάδα και Κύπρο αλλά και στις άλλες μεσογειακές χώρες. Αν δεν καταπολεμηθεί αποτελεσματικά, η παραγωγή είναι δυνατόν να μειωθεί έως και 80%.

Καταπολέμηση του δάκου εφαρμόζεται με χημικές και βιολογικές μεθόδους. Για τις χημικές μεθόδους αναφέρονται πολλά εντομοκτόνα που χρησιμοποιήθηκαν ή χρησιμοποιούνται όπως τα οργανοφωσφορούχα dimethoate, fenthion, formothion, malathion, phosphamidon. Εφαρμόστηκαν επίσης βιολογικές μέθοδοι όπως η εισαγωγή και εξαπόλυση φυσικών εχθρών του δάκου, μαζικές εξαπολύσεις στερημένων δάκων με ακτινοβολία, μαζική παγίδευση και συνδυασμός ορισμένων από τις μεθόδους αυτές.

Η υπερβολική και μακροχρόνια χρήση των εντομοκτόνων μπορεί να οδηγήσει σε ανθεκτικότητα των εντόμων. Η μελέτη της ανθεκτικότητας αποτελεί ένα σημαντικό στοιχείο για την αντιμετώπιση του δάκου και την μείωση των καταστροφικών επιπτώσεων που επιφέρουν στις καλλιέργειες.

Η παρούσα εργασία έχει ως στόχο την ανίχνευση δύο μεταλλάξεων στο εξόνιο 3 και εξόνιο 6 του γονιδίου της ακετυλοχολινεστεράσης των κυπριακών φυσικών πληθυσμών του δάκου. Συγκεκριμένα συλλέχθηκαν 257 άτομα από δύο περιοχές της Κύπρου, Ευρύχου και Μαζωτός. Στη συνέχεια ακολούθησε απομόνωση DNA και αντιδράσεις PCR/RFLP με χρήση των περιοριστικών ένζυμων AccI και BssH II.

## SUMMARY

The olive fruit fly *Bactrocera oleae* is the most important pest of olives in the Mediterranean basin. Reports indicate that if it is not managed effectively, production may decrease up to 80%.

For more than 30 years, its control has been based mostly on bait sprays with organophosphate insecticides. Other management techniques include the use of natural enemies and the mass production and release of sterilized male insects.

The extensive and long use of insecticides, apart of the adverse side effects on beneficial organisms, might lead to the development of insecticide resistance, especially when only one group of insecticides with a particular mode of action is used. The development of resistance to insecticides is a very important issue in pest management since resistant populations have been reported in almost all economically important insect pests.

The present study aimed to examine the resistance of *Bactrocera oleae* to dimethoate and reveal the resistance mutations frequencies in two populations from Cyprus. The populations came from orchards that were heavily treated with the organophosphate insecticide dimethoate.

Specifically were collected 257 insects from two regions of Cyprus with different morphologically and environmental characteristics so that can be comparison from each other. Afterwards it followed isolation of DNA and reactions PCR/RFLP with the use of restrictive enzymes AccI and BssH II respectively.

# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1 Η ελιά και η σημασία της

Η ελιά έχει μεγάλη οικονομική και οικολογική σημασία για τις χώρες της Μεσογείου. Καλύπτει σημαντικό μέρος της γεωργικής έκτασης και χρησιμοποιείται για παραγωγή λαδιού και βρώσιμης ελιάς. Τα προϊόντα αυτά αποτελούν σημαντικό κομμάτι της Μεσογειακής διαίτας.

Η καλλιέργεια της ελιάς καταλαμβάνει μια έκταση 100 εκατομμύριων στρεμμάτων, από την οποία τα 2/3 είναι αμιγείς ελαιώνες, ενώ το 1/3 είναι εκτάσεις καλλιέργειας ελιάς με δημητριακά, άμπελο, ψυχανθή.

Σήμερα σε όλο τον κόσμο υπάρχουν περίπου 800 εκατομμύρια ελαιόδενδρα. Το 95% περίπου των καλλιεργειών βρίσκονται στη Μεσόγειο η οποία διαθέτει ιδανικές εδαφοκλιματικές συνθήκες για την ανάπτυξη της ελιάς (Εικόνα 1).



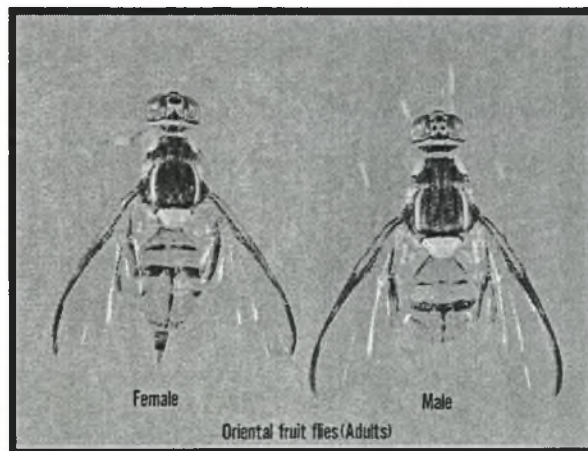
Εικόνα 1: Καλλιέργεια της ελιάς παγκοσμίως



## 1.2 Δάκος: Ο σοβαρότερος εχθρός της ελιάς

Ο δάκος, γνωστός ως *Bactrocera oleae* (Gmelin) ανήκει στην οικογένεια Tephritidae των Διπτέρων. Είναι ο πιο σοβαρός εχθρός της ελιάς στην Κύπρο και τις χώρες της Μεσογείου (1), (2), (3).

Στην φύση, το θηλυκό ωοτοκεί και εναποθέτει το αυγό του στον ελαιόκαρπο δημιουργώντας πληγές. Η προνύμφη αναπτύσσεται στο ζωντανό μεσοκάρπιο της ελιάς και όταν εκκολάπτεται τρέφεται με το σαρκώδες μέρος του ελαιοκάρπου (Εικόνα 2). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα ο ελαιόκαρπος να γίνεται ακατάλληλος για βρώση και το λάδι που θα παραχθεί από προσβεβλημένους καρπούς να έχει υψηλή οξύτητα ένεκα των μυκήτων που αναπτύσσονται (4), (5).



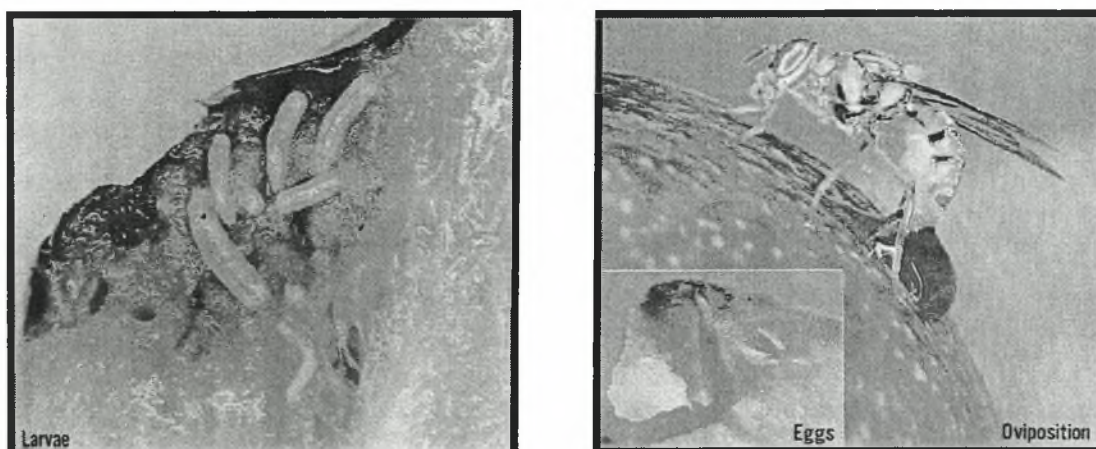
Εικόνα 2: Πάνω: Αρσενικός και θηλυκός δάκος. Κάτω: Προσβολή ελιάς από δάκο (προνύμφη)

### 1.3 Έλεγχος πληθυσμού των εντόμων

Κατά τη χειμερινή περίοδο το μεγαλύτερο ποσοστό του Δάκου βρίσκεται στο στάδιο της νύμφης. Τέλος Απριλίου με αρχές Μαΐου αρχίζει μια σταδιακή εκκόλαψη των ακμαίων εντόμων του Δάκου (Εικόνα 3). Οι επικρατούσες καιρικές συνθήκες επηρεάζουν σημαντικά την ανάπτυξη του Δάκου.

Η θερμοκρασία αποτελεί σημαντικό παράγοντα στην ανάπτυξη των διαφορετικών σταδίων του εντόμου. Η ανάπτυξη σταματά όταν η θερμοκρασία είναι μικρότερη από 6°C ή μεγαλύτερη από 35°C λόγω μεγάλης θνησιμότητας. Επίσης παρατηρείται σημαντική βιολογική αδρανοποίηση του εντόμου (μεγάλο ποσοστό στειρότητας). Η ιδανική θερμοκρασία κυμαίνεται μεταξύ 20-25°C.

Η υγρασία έχει επίσης σημαντικό ρόλο, καθώς ο δάκος προκαλεί μεγαλύτερες προσβολές στις παραθαλάσσιες περιοχές. Εάν υπάρχει χαμηλή υγρασία και υψηλές θερμοκρασίες για μεγάλο χρονικό διάστημα, οι ελιές συρρικνώνονται και η προνύμφη δεν μπορεί να επιβιώσει. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την μείωση του πληθυσμού των εντόμων το καλοκαίρι σε παραθαλάσσιες περιοχές με υψηλές θερμοκρασίες.



Εικόνα 3: Διαφορετικά στάδια του κύκλου ζωής του δάκου. Αριστερά: Δάκος στο στάδιο της χρυσαλίδας. Δεξιά: Θηλυκό που εναποθέτει αυγά σε ελαιόκαρπο

## 1.4 Καταπολέμηση του δάκου

Η μέθοδος καταπολέμησης του δάκου που εφαρμόζεται με επιτυχία τόσο από το κράτος όσο και από τους ελαιοπαραγωγούς είναι η χημική μέθοδος. Έχουν δοκιμαστεί και βιολογικές μέθοδοι οι οποίες μερικές από αυτές είναι δυνατό να εφαρμόζονται σε συνδυασμό (4).

### A) Χημική καταπολέμηση

Η χημική μέθοδος που εφαρμόζεται είναι οι ψεκασμοί με εντομοκτόνα. Μερικά από τα εντομοκτόνα που χρησιμοποιούνται είναι τα οργανοφωσφορούχα dimethoate, fention, formothion. Για να είναι αποτελεσματικοί οι ψεκασμοί πρέπει να γίνονται στον κατάλληλο χρόνο και σε ομαδική βάση. Η χημική καταπολέμηση επιτυγχάνεται με δύο τρόπους:

#### 1) Προληπτική μέθοδος

Οι ψεκασμοί γίνονται με ένα υδατικό διάλυμα ελκυστικού τροφής και ένα οργανοφωσφορικό εντομοκτόνο. Αυτή η μέθοδος προσελκύει το δάκο στο δέντρο όπου θανατώνεται λόγω του εντομοκτόνου. Ο στόχος του δολωματικού ψεκασμού είναι η θανάτωση του τέλειου εντόμου πριν αρχίσει την ωοτοκία του στον καρπό. Οι ψεκασμοί διενεργούνται από το έδαφος με ψεκαστήρες και έχει ελάχιστες επιπτώσεις στο περιβάλλον.

#### 2) Θεραπευτική μέθοδος

Ο καθολικός ψεκασμός χρησιμοποιείται σε περίπτωση μεγάλου πληθυσμού ή εφόσον παρατηρηθεί προσβολή στον καρπό. Το οργανοφωσφορούχο εντομοκτόνο που χρησιμοποιείται φθάνει μέσα στους καρπούς όπου ζει η προνύμφη (4).

## B) Βιολογική καταπολέμηση

Η πιο πρακτική και αποτελεσματική βιολογική μέθοδος που εφαρμόζεται είναι η μαζική παγίδευση των ενήλικων με δακοπαγίδες. Περιέχουν τροφικό ελκυστικό (π.χ. μελάσα), φερομόνη και κολλητικές ουσίες (Εικόνα 4). Με την μέθοδο αυτή επιτυγχάνεται η προσέλκυση του δάκου προς την δακοπαγίδα και η θανάτωση του σε αυτήν. Χρησιμοποιείται κυρίως στην βιολογική καλλιέργεια όπου απαγορεύεται ο ψεκασμός του δένδρου γιατί υπάρχει κίνδυνος συγκέντρωσης υπολειμμάτων εντομοκτόνων στον καρπό και το λάδι.



**Εικόνα 4:** Διάφοροι τύποι δακοπαγίδων. Α. Κίτρινη δακοπαγίδα που περιέχει κολλητικές ουσίες.

Β. Δακοπαγίδα με φερομόνη και εντομοκτόνο μεγάλης υπολειμματικής διάρκειας.

Γ. Δακοπαγίδα τύπου Mc Phail, η οποία φέρει σαν ελκυστικό υγρό, διάλυση υδρολυμένης πρωτεΐνης 3% ή Θεϊκής αμμωνίας στην ίδια αναλογία.

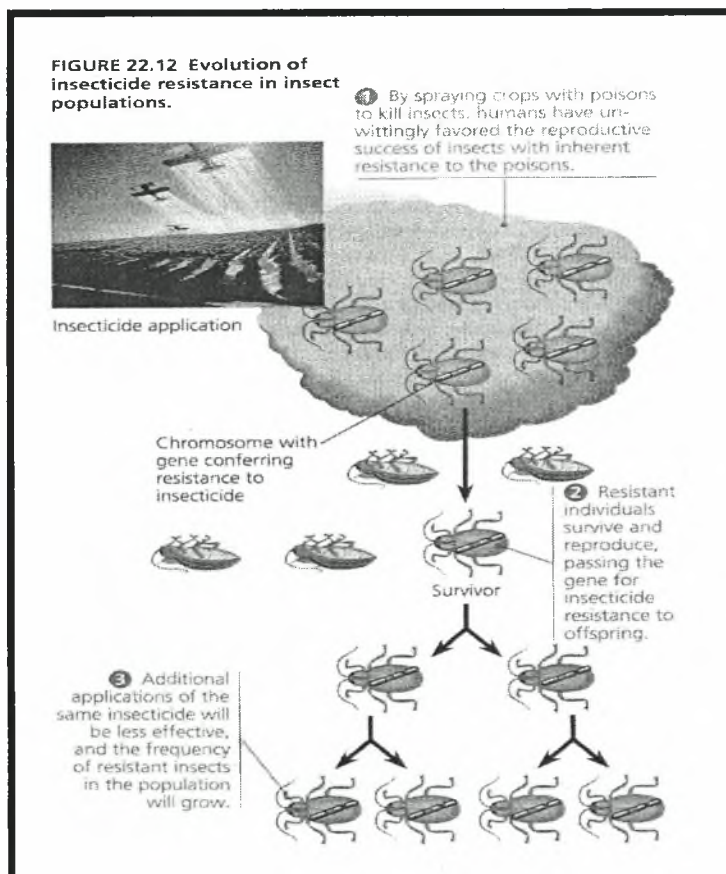
Προτεραιότητα πρέπει να δίνεται στους φυσικούς τρόπους αντιμετώπισης με την τοποθέτηση δακοπαγίδων και σε περίπτωση μόνο που το φαινόμενο είναι σε έξαρση τότε να χρησιμοποιείται η μέθοδος του ψεκασμού.

Οι ψεκασμοί αυτοί στις περισσότερες περιπτώσεις συμβάλλουν στη μείωση των ωφέλιμων εντόμων. Τα χημικά που περιέχονται στα εντομοκτόνα επιβαρύνουν ή μολύνουν το περιβάλλον. Επίσης υπάρχει κίνδυνος συγκέντρωσης υπολειμμάτων εντομοκτόνων στον καρπό και το λάδι. Τέλος και πιο σημαντικό είναι οι βλαβερές συνέπειες που μπορεί να προκαλέσει στην υγεία του ανθρώπου.

## 1.5 Ανθεκτικότητα στα φυτοφάρμακα

Η ευρεία και μη ορθολογική χρήση των εντομοκτόνων έχει οδηγήσει σε ένα έντονο πρόβλημα ανθεκτικότητας προς αυτά. Τα ανθεκτικά άτομα σε έναν πληθυσμό μπορούν να επιβιώσουν από την εφαρμογή των εντομοκτόνων. Αυτό οφείλεται λόγω ύπαρξης γονιδίου που προσδίδει ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα. Τα άτομα που επιβιώνουν αναπαράγονται και μεταβιβάζουν το χαρακτηριστικό της ανθεκτικότητας στους απογόνους τους. Σε κάθε επόμενη γενεά, η καταπολέμηση του πληθυσμού με τα ίδια φυτοφάρμακα γίνεται πιο δύσκολη συγκριτικά με τις προηγούμενες γενεές (Εικόνα 5).

Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται φυσική επιλογή στο οποίο επιζούν μόνο τα άτομα εκείνα που έχουν μια ειδική κατάσταση για ορισμένους χαρακτήρες. Σε αυτή την περίπτωση είναι η ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα. Ο ρυθμός εξέλιξης της ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα είναι ταχύς γιατί η επιλογή είναι ισχυρή, ο πληθυσμός είναι μεγάλος και ο χρόνος αναπαραγωγής είναι μικρός.

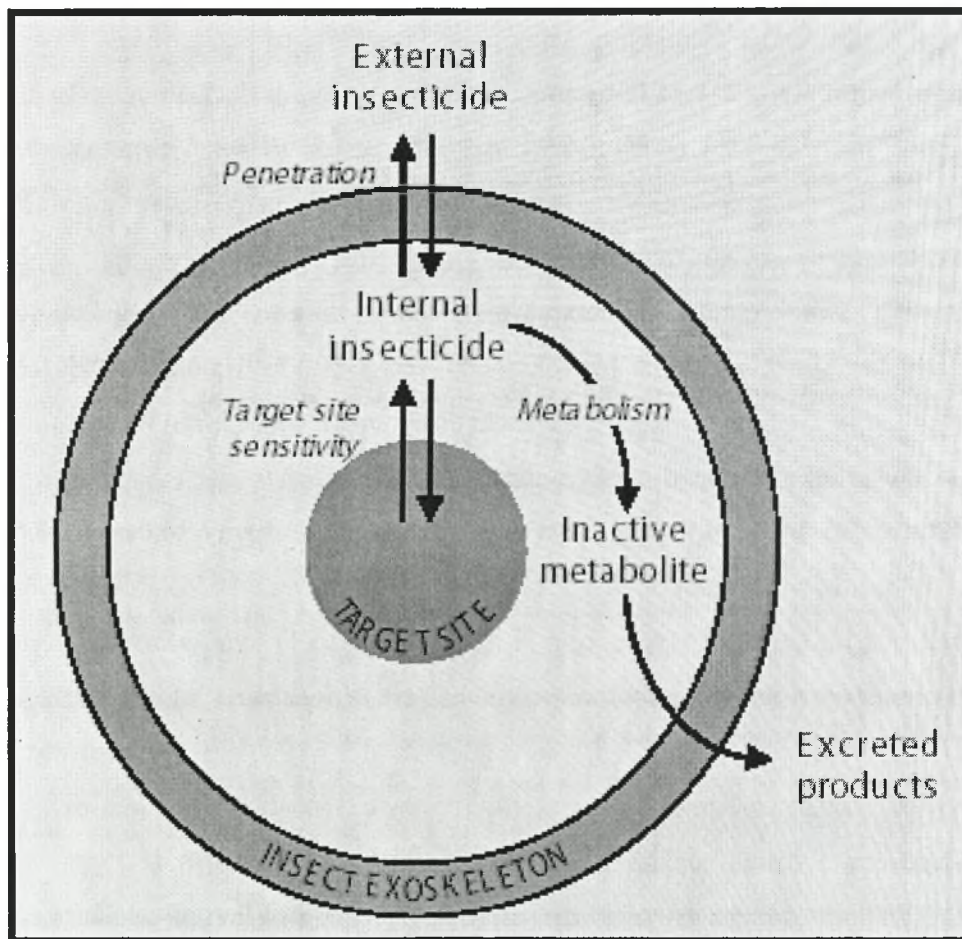


Εικόνα 5: Εξέλιξη της ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα στους πληθυσμούς των εντόμων.

Η μείωση της χρήσης εντομοκτόνων και η εναλλαγή σκευασμάτων με διαφορετικούς τρόπους δράσης μπορούν να βοηθήσουν στην μείωση της πιθανότητας ανάπτυξης ανθεκτικότητας. Η διαχείριση της ανθεκτικότητας των εντόμων είναι πολύ σημαντική στη βοήθεια να παραταθεί η αποτελεσματική ζωή των αναγκαίων φυτοφαρμάκων (1), (6), (7), (8).

Η ανθεκτικότητα μπορεί να οφείλεται:

- α) στη μειωμένη διείσδυση του εντομοκτόνου
- β) στην μείωση της ευαισθησίας της θέσης-στόχου
- γ) στην ενίσχυση μεταβολισμού του εντομοκτόνου
- δ) στην αποφυγή του εντόμου.



Εικόνα 6: Μηχανισμοί που προσδίδουν ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα

Γενικά τα έντομα εμφανίζουν ανθεκτικότητα, είτε μέσω αυξημένης ικανότητας αποικοδόμησης των εντομοκτόνων, είτε μέσω δομικής μεταβολής των στόχων των εντομοκτόνων στους οργανισμούς τους (1).

Η παρούσα εργασία επικεντρώθηκε στο δεύτερο μηχανισμό ανθεκτικότητας και συγκεκριμένα με τις χημικές ουσίες που παρεμποδίζουν την ενζυμική δραστηριότητα της ακετυλοχολινεστεράσης.

## 1.6 Μηχανισμός ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα

Το 1961 ο Smissaert περιέγραψε την πρώτη περίπτωση ακετυλοχολινεστεράσης με μειωμένη ευαισθησία στα μικροβιοκτόνα (9). Από τότε έχουν περιγραφεί αρκετές τροποποιημένες στην ανθεκτικότητα ακετυλοχολινεστεράσες σε διάφορα είδη (10), (11).

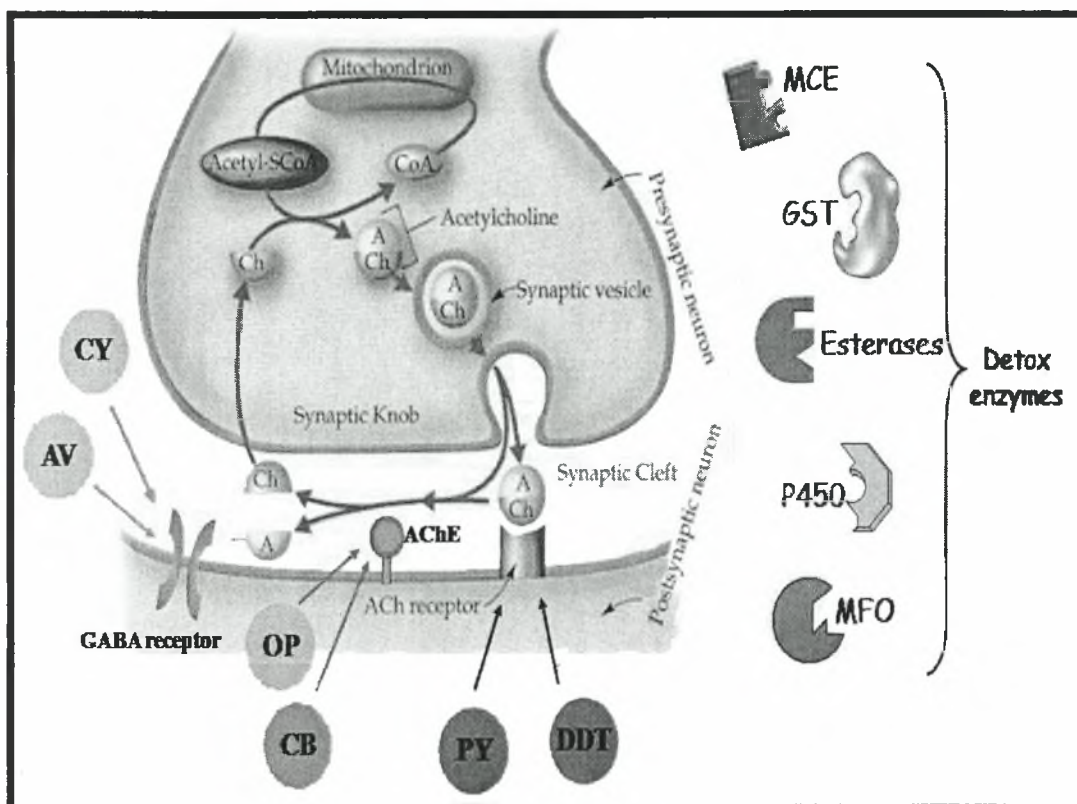
Μετά από μελέτες παρατηρήθηκε ότι αρκετές σημειακές μεταλλάξεις στην ίδια πρωτεΐνη έχουν βρεθεί σε ξεχωριστά αλληλόμορφα (12), (13). Όλα αυτά οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι η ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα έχει γενετική ποικιλότητα (14). Ο όρος γενετική ποικιλότητα αναφέρεται στη διαφοροποίηση του γενετικού υλικού μεταξύ των ατόμων του ίδιου είδους και καλύπτει τη γονιδιακή ποικιλία (διαφοροποίηση στα ποσοστά των γονιδιακών αλληλομόρφων) μεταξύ των πληθυσμών του ίδιου είδους ή/και τη γονιδιακή ποικιλία (ποικιλία γονιδιακών αλληλομόρφων) μεταξύ των ατόμων του ίδιου πληθυσμού.

Έχουν βρεθεί στη *Drosophila melanogaster* σημειακές μεταλλάξεις που προσδίδουν ανθεκτικότητα στην ακετυλοχολινεστεράση η οποία κωδικοποιείται από ένα μόνο γονίδιο. Δυο από αυτές τις μεταλλάξεις βρέθηκαν στην *Musca domestica* ενώ μόνο μια στον δάκο (1), (6), (7), (15). Η παρουσία των μεταλλάξεων αυτών σε διαφορετικά έντομα υποστηρίζει τη μεγάλη σημασία που έχουν στην εμφάνιση της ανθεκτικότητας.

Στο δάκο έχουν βρεθεί μέχρι στιγμής ποικίλες μεταλλάξεις που αφορούν το γονίδιο της ακετυλοχολινεστεράσης. Οι μεταλλάξεις αυτές περιλαμβάνουν υποκαταστάσεις αμινοξέων που βρίσκονται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου και εμποδίζουν την πρόσβαση των εντομοκτόνων στη βάση του οποίου βρίσκονται τα καταλυτικά κατάλοιπα.

Η ακετυλοχολινεστεράση είναι το ένζυμο κλειδί στο χολινεργικό σύστημα. Ρυθμίζει τα επίπεδα της ακετυλοχολίνης και τερματίζει τις νευρικές ωθήσεις καταλύοντας την υδρόλυση της ακετυλοχολίνης (Εικόνα 7).

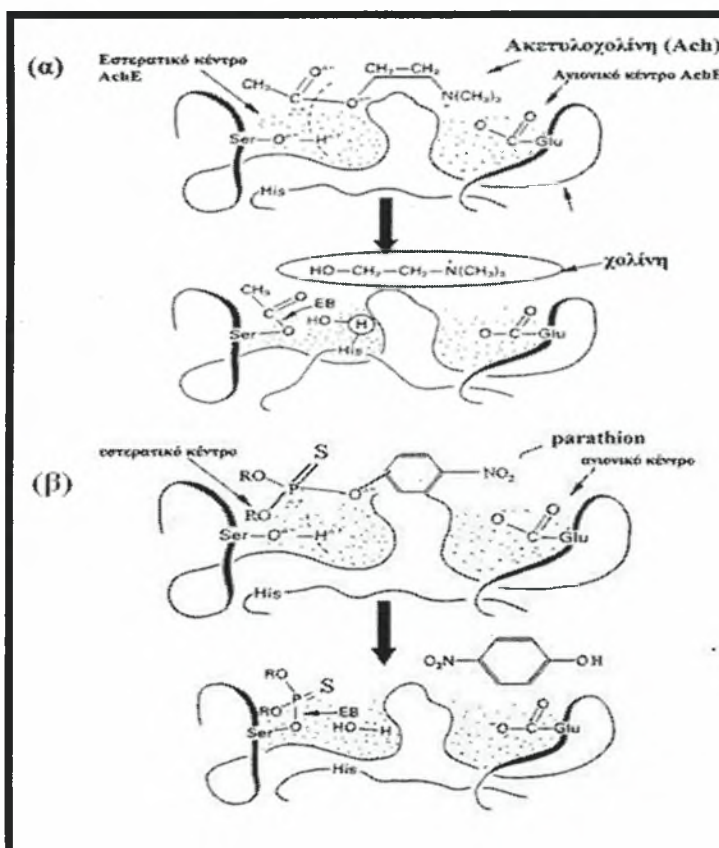
Στα έντομα είναι γλυκοσυλιωμένη διμερής που δεσμεύεται στη μεμβράνη με γλυκοπεπτιδική άγκυρα (6), (16), (17). Τα νευρικά μηνύματα είναι ηλεκτρικά σήματα. Η μεταφορά του σήματος γίνεται με ένα νευροδιαβιβαστή την ακετυλοχολίνη. Όταν το σήμα μεταφερθεί από το ένα κύτταρο στο άλλο, το ένζυμο ακετυλοχολινεστεράση, διασπά την ακετυλοχολίνη και ελευθερώνει τον υποδοχέα ώστε το σήμα να μεταφερθεί πιο πέρα. Αν αυτό δεν γίνει τότε οι νευρικές ίνες θα παραμένουν συνέχεια φορτισμένες (18), (19).



Εικόνα 7: Η θέση και η δράση της ακετυλοχολινεστεράσης στο χολινεργικό σύστημα



Τα οργανοφωσφορικά δεσμεύονται από την ακετυλοχολινεστεράση, εμποδίζοντας έτσι την δράση της. Τα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα έχουν παρόμοια δομή με την ακετυλοχολίνη με αποτέλεσμα να έχουν την δυνατότητα να εισέρχονται και αυτά στο ενεργό κέντρο της ακετυλοχολινεστεράσης. Το ενεργό κέντρο περιέχει μια σερίνη στη βάση του που παίζει σημαντικό ρόλο στην υδρόλυση της ακετυλοχολίνης. Η χολίνη που παράγεται από την υδρόλυση ελευθερώνεται στην συναπτική σχισμή και επαναπροσλαμβάνεται από τον προσυναπτικό νευρώνα. Η ακετυλομάδα παραμένει συνδεδεμένη με το κατάλοιπο σερίνης και στην συνέχεια απομακρύνεται από το ένζυμο. Η σύνδεση του οργανοφωσφορικού στην θέση της ακετυλοχολίνης φωσφορυλιώνει το κατάλοιπο σερίνης του ενεργού της κέντρου με την διαφορά ότι η αποσφωσφορυλίωση είναι μη αντιστρεπτή παρατείνοντας την παραμονή και την δράση του ενζύμου (Εικόνα 8). Αυτό προκαλεί διατάραξη της ισορροπίας του νευρικού συστήματος του εντόμου. Τα ορατά συμπτώματα είναι νευρικός υπερεθισμός του εντόμου, αναπηρία και τελικά επέρχεται ο θάνατος.

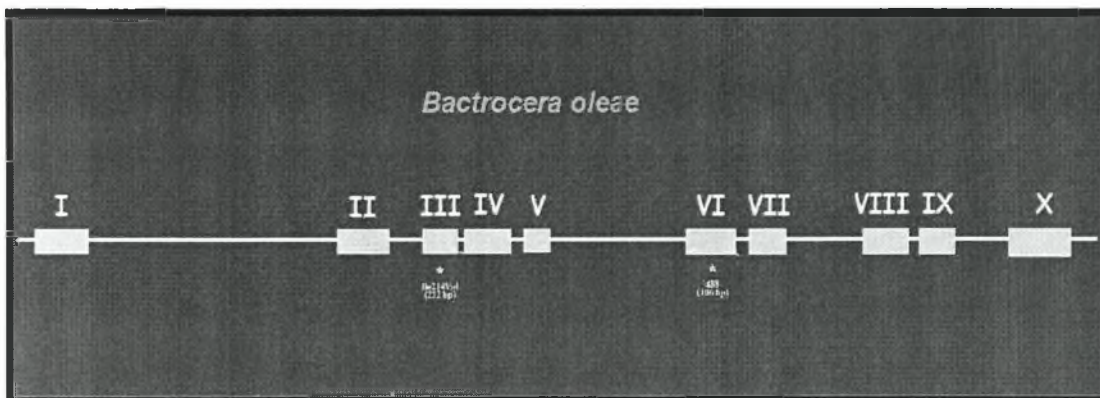


Εικόνα 8: Δομή της ακετυλοχολινεστεράσης: Α. (Πάνω) Πρόσδεση της ακετυλοχολίνης στο ενεργό κέντρο και (κάτω) ακετυλίωση του ενζύμου μετά την διάσπαση της ακετυλοχολίνης. Β. (Πάνω) Πρόσδεση του οργανοφωσφορικού στην θέση της ακετυλοχολίνης στο ενεργό κέντρο και (κάτω) φωσφορυλίωση του ενζύμου μετά την διάσπαση του εντομοκτόνου.

## 1.7 Το γονίδιο της ακετυλοχολινεστεράσης

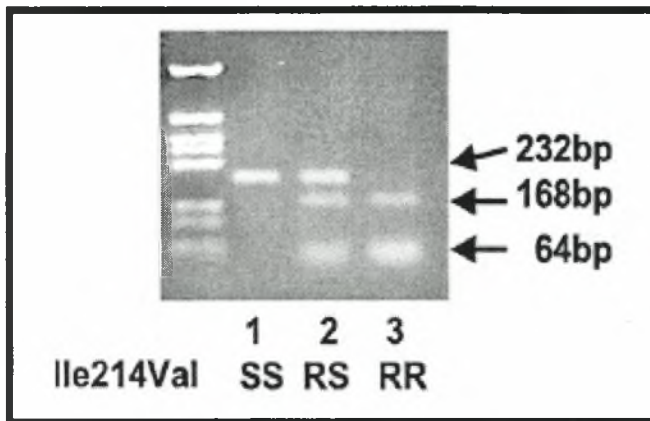
Το γονίδιο της ακετυλοχολινεστεράσης αποτελείται από δέκα εξόνια. Στο δάκο έχουν περιγραφεί μόνο δύο μεταλλάξεις μέχρι τώρα. Στο εξόνιο 3 έχει βρεθεί η μετάλλαξη Ile214Val και στο εξόνιο 6 η μετάλλαξη Gly488Ser (6).

Οι μεταλλάξεις αυτές που συσχετίζονται με την ανθεκτικότητα περιλαμβάνουν υποκαταστάσεις αμινοξέων που βρίσκονται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου (1), (20), (6). Η κάθε μετάλλαξη προσδίδει χαμηλά επίπεδα ανθεκτικότητας χωρίς να επηρεάζουν σημαντικά την υδρόλυση του νευροδιαβιβαστή. Συνδυασμοί, όμως, μεταλλάξεων προσδίδουν υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητα.



**Εικόνα 9:** Το γονίδιο της ακετυλοχολινεστεράσης. Διακρίνονται επίσης τα εξόνια καθώς και οι δύο σημειακές μεταλλάξεις. Η Ile214Val στο εξόνιο 3 και η Gly488Ser στο εξόνιο 6 αντίστοιχα. Στη παρένθεση αναφέρεται το μήκος του κομματιού κάθε εξονίου που ενισχύεται αντίστοιχα μετά από αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης ( PCR ) .

Οι μεταλλάξεις αυτές είναι δυνατόν να διαγνωσθούν στα πλαίσια ενός PCR-RFLP τεστ. Για το τεστ αυτό συγκεκριμένα, με επιλεγμένους εκκινητές για το εξόνιο 3, Boace 3F και Boace 3R, ενισχύεται μια συγκεκριμένη αλληλουχία μήκους 232 bp. Κατά την μετάλλαξη (Ile214Val) μετατρέπεται ένα κωδικόνιο ATA σε GTA δημιουργώντας μια θέση στην οποία μπορεί να δράσει το περιοριστικό ένζυμο AccI. Τα περιοριστικά ένζυμα είναι ενδονουκλεάσες τα οποία αναγνωρίζουν και κόβουν το DNA σε συγκεκριμένες αλληλουχίες. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να δώσει δύο κομμάτια DNA των 168 και 64 βάσεων αντιστοίχως.

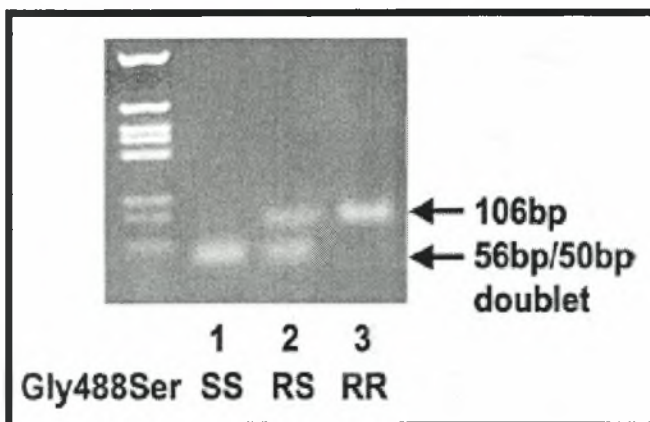


**Εικόνα 10:** Μετάλλαξη Ile214Val.

SS: Ομοζυγώτης ως προς την μη ύπαρξη της μετάλλαξης που προσδίδει ανθεκτικότητα.

RS/RR: Ετεροζυγώτης ή ομοζυγώτης ως προς την ύπαρξη της μετάλλαξης που προσδίδει ανθεκτικότητα

Με επιλεγμένους εκκινητές για το εξόνιο 6, Boace 6F και Boace 6R, ενισχύεται μια αλληλουχία μήκους 106 bp. Κατά την μετάλλαξη (Gly488Ser) μετατρέπεται ένα κωδικόνιο GGG σε GGA διαγράφοντας μια θέση στην οποία μπορεί να δράσει το περιοριστικό ένζυμο BssH II. Απουσία της μετάλλαξης δίνει δύο κομμάτια DNA των 50 και 56 βάσεων αντιστοίχως κατά την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης.



**Εικόνα 11:** Μετάλλαξη Gly488Ser.

SS: Ομοζυγώτης ως προς την μη ύπαρξη της μετάλλαξης που προσδίδει ανθεκτικότητα. RS/RR:

Ετεροζυγώτης ή ομοζυγώτης ως προς την ύπαρξη της μετάλλαξης που προσδίδει ανθεκτικότητα

Πρόσφατη έρευνα που διεξήχθη από το Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας της Ελλάδας σε συνεργασία με το Ινστιτούτο Γεωργικών Ερευνών της Κύπρου είχε ως στόχο τη διερεύνηση του βαθμού ανθεκτικότητας του δάκου της ελιάς σε Ελλάδα και Κύπρο (20).

Μελετήθηκε η ανθεκτικότητα στο dimethoate σε 31 πληθυσμούς του Δάκου από διάφορες περιοχές της Ελλάδας και 9 πληθυσμούς από την Κύπρο. Τα αποτελέσματα της έρευνας αποκάλυψαν μια ανάπτυξη αξιοσημείωτου βαθμού ανθεκτικότητας στο dimethoate στην ανατολική Μεσόγειο και σημαντική απόκλιση ως προς τα επίπεδα ανθεκτικότητας των φυσικών πληθυσμών του Δάκου στο dimethoate. Οι τιμές ήταν 6,3 έως 64,4 φορές μεγαλύτερες εκείνων των εργαστηριακών πληθυσμών. Οι υψηλότερες τιμές βρέθηκαν στην Κρήτη και οι χαμηλότερες στην Κύπρο (1), (20). Αυτό ίσως να οφείλεται:

α) Σε διαφορετική πίεση επιλογής που είναι αποτέλεσμα διαφορετικής εφαρμογής οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων. Στην Κύπρο η δακοπροστασία είναι κυρίως ατομική ενώ στην Ελλάδα η εκτέλεση των εργασιών δακοκτονίας διαχειρίζεται από κράτος.

β) Μετανάστευση εντόμων με ανθεκτικών γενοτύπων, είτε αυτόνομη είτε μέσω εμπορίου.

Η έρευνα βασίστηκε στον έλεγχο για παρουσία των δύο μεταλλάξεων στο γονίδιο της ακετυλοχολινεστεράσης. Έχει δείχτει ότι το συγκεκριμένο ένζυμο σχετίζεται με την αύξηση της ανθεκτικότητας του δάκου στα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα. Εντοπίζονται σε ομοζυγωτία στο 85% του πληθυσμού ανεξάρτητα από την εμφάνιση της ανθεκτικότητας.

## 1.8 Σκοπός της εργασίας

Όπως έχει αναφερθεί, η πιο πάνω έρευνα είχε ως στόχο τη διερεύνηση του βαθμού ανθεκτικότητας του δάκου της ελιάς στο οργανοφωσφορικό εντομοκτόνο dimethoate σε Ελλάδα και Κύπρο. Τα αποτελέσματα εντόπισαν μια ταυτόχρονη έκφραση των δύο μεταλλάξεων στο 99% των δειγμάτων της Κύπρου.

Η παρούσα εργασία έχει ως στόχο τον έλεγχο των δύο μεταλλάξεων στο εξόνιο 3 και εξόνιο 6 του γονιδίου της ακετυλοχολινεστεράσης του δάκου από δύο περιοχές της Κύπρου. Σημαντική διαφορά είναι το γεγονός ότι στην προηγούμενη έρευνα η διερεύνηση του βαθμού ανθεκτικότητας του δάκου μελετήθηκε μόνο στα ζωντανά δείγματα, δηλαδή επιλέχθηκαν τα δείγματα που επέζησαν μετά από τοπική εφαρμογή οργανοφωσφορικού. Η παρούσα εργασία επικεντρώνεται στην συχνότητα εμφάνισης αυτών των μεταλλάξεων στο σύνολο του πληθυσμού.

Συγκεκριμένα μελετήθηκαν 143 έντομα από την περιοχή του Μαζωτού, η οποία βρίσκεται σε παραθαλάσσια τοποθεσία, και 114 έντομα από τη περιοχή της Ευρύχου μια ορεινή περιοχή. Στην αρχή ελέγχθηκε η ανθεκτικότητα ζωντανών και νεκρών εντόμων με τοπική εφαρμογή του οργανοφωσφορικού εντομοκτόνου dimethoate. Στην συνέχεια για τον έλεγχο της ύπαρξης των δύο μεταλλάξεων χρησιμοποιήθηκαν τα περιοριστικά ένζυμα AccI και BssH II αντίστοιχα.

# **2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ**

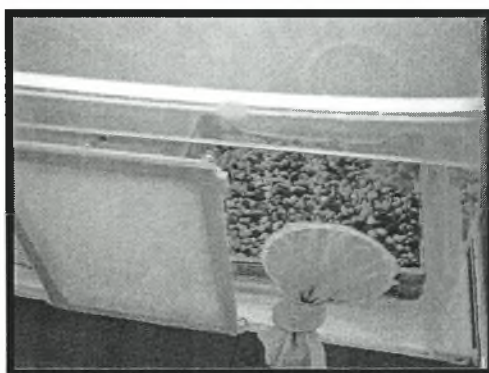
## **ΜΕΡΟΣ**

## **ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ**

## **ΜΕΘΟΔΟΙ**

## 2.1 Συλλογή εντόμων και έλεγχος ανθεκτικότητας

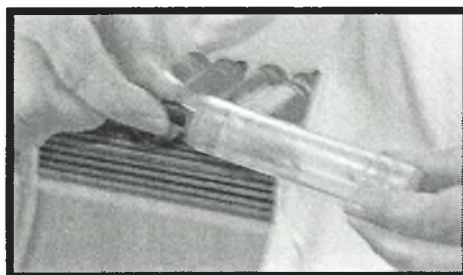
Η δειγματοληψία των εντόμων έγινε με συλλογή ελαιόκαρπων από καλλιέργειες που είχαν ψεκάσει. Η συλλογή των ελαιοκάρπων έγιναν από τη περιοχή της Ευρύχου και τη περιοχή του Μαζωτού. Οι προσβεβλημένοι ελαιόκαρποι τοποθετήθηκαν σε κλωβούς. Μετά την έξοδο των προνυμφών του δάκου από τους προσβεβλημένους ελαιόκαρπους, οι νύμφες μεταφέρονταν σε ειδικούς κλωβούς εκτροφής μέχρι να μετατραπούν σε τέλεια έντομα.



Εικόνα 12: Κλωβός τοποθέτησης προσβεβλημένου ελαιοκάρπου

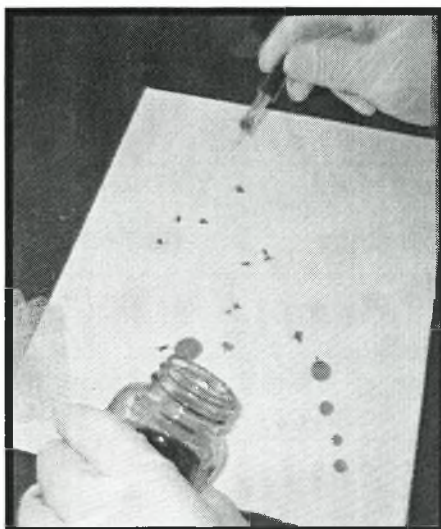
Στη συνέχεια μεταφέρθηκε μια ποσότητα εντόμων σε ειδικούς πλαστικούς σωλήνες (αναλογία περίπου 20 ανά σωλήνα) όπου έγινε η αναισθητοποίησή τους.

Η αναισθητοποίησή τους μπορεί να επιτευχθεί με το κρύο όπου τα έντομα τοποθετούνται στο ψυγείο για ένα μικρό χρονικό διάστημα αλλά αυτό δεν είναι πάντα αποτελεσματικό γιατί επανέρχονται σε σύντομο χρονικό διάστημα. Ο άλλος τρόπος, ο οποίος και χρησιμοποιήθηκε, είναι η νάρκωση με CO<sub>2</sub>.



Εικόνα 13: Αναισθητοποίηση των τέλειων εντόμων με CO<sub>2</sub>

Ο έλεγχος ανθεκτικότητας πραγματοποιήθηκε με τοπική εφαρμογή του οργανοφωσφορικού εντομοκτόνου dimethoate στα τέλεια έντομα (6). Συγκεκριμένα, εφαρμόστηκε 1 μl διαλύματος εντομοκτόνου στο κοιλιακό στέρνο κάθε εντόμου με ειδική σύριγγα που περιείχε χρωστική.



Εικόνα 14: Τοπική εφαρμογή εντομοκτόνου

Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν πάλι στους ειδικούς κλωβούς εκτροφής, ανάλογα με την δοσολογία που τους χορηγήθηκε, στους 23 - 25 °C. Μετά από 24 ώρες έγινε καταμέτρηση των νεκρών και ζωντανών εντόμων. Σε κάθε πληθυσμό ελέγχθηκε η θνησιμότητα των εντόμων σε 5 - 6 διαφορετικές συγκεντρώσεις (τουλάχιστο 20 άτομα σε κάθε συγκέντρωση) του εντομοκτόνου.



Εικόνα 15: Κλωβός βιοδοκιμών



Συνολικά χρησιμοποιήθηκαν 257 έντομα από τις δύο περιοχές και ελέγχθηκε η θνησιμότητα τους στο οργανοφωσφορικό εντομοκτόνο dimethoate σε έξι διαφορετικές συγκεντρώσεις (Πίνακας 1).

<b>Dose</b>	<b>Dimethoate (μl) /Aceton (ml)</b>	<b>Dimethoate applied %</b>	<b>ng/insect</b>
x/2	7,5/20	37,5	150
x/4	3,75/20	18,75	75
x/8	3,75/40	9,37	37,5
x/16	2,8/60	4,66	18,75
x/20	2,25/60	3,75	15
x/28	1,6/60	2,66	10,714

**Πίνακας 1:** Δόσεις φαρμάκου των τοξικολογικών εξετάσεων.

## 2.2 Απομόνωση DNA

Η απομόνωση DNA από τα έντομα έγινε με το Dneasy Tissue Kit της εταιρείας Qiagen (Cat. No. 69506). Αφού πρώτα έγινε ομογενοποίηση στα δείγματα ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο της εταιρείας.

### Πρωτόκολλο:

1. Τοποθετείται το έντομο σε σωληνάκι erpendorf.
2. Προστίθεται 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 αφαιρείται η μεταλλική σφαίρα από κάθε δείγμα.
4. Προστίθεται 20 μl Proteinase K, 200 μl Buffer AL, και αναδεύεται καλά χρησιμοποιώντας τη συσκευή ανάδευσης. Επωάζεται για 10 λεπτά στους 56 °C.
5. Προστίθεται 200 μl αιθανόλη 100 %, αναδεύεται καλά χρησιμοποιώντας τη συσκευή ανάδευσης και μεταφέρεται το δείγμα σε ειδικές κολωνίτσες, οι οποίες αποτελούνται από ειδικό φίλτρο και σωληνάκι συλλογής.
6. Φυγοκέντρηση για 1.5 λεπτό στις 8.500 rpm.
7. Απομακρύνεται το σωληνάκι συλλογής και τοποθετείται καινούριο.
8. Προστίθεται 500 μl Buffer AW1 και γίνεται φυγοκέντρηση για 1.5 λεπτό στις 8.500 rpm.
9. Απομακρύνεται το σωληνάκι συλλογής και τοποθετείται καινούριο.
10. Προστίθεται 500 μl Buffer AW2 και γίνεται φυγοκέντρηση για 3.5 λεπτά στις 14.500 rpm.
11. Αποσύρεται το υγρό από το σωληνάκι συλλογής και γίνεται φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 3.500 rpm.
12. Απομακρύνεται το σωληνάκι συλλογής και μεταφέρεται το φίλτρο σε καινούριο σωληνάκι erpendorf.
13. Προστίθεται 100 μl Buffer AE, επωάζεται για 2-3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
14. Φυγοκέντρηση για 1.5 λεπτό στις 8.500 rpm. Στο σωληνάκι erpendorf έχει καθαρό DNA.

### 2.3 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 ενίσχυση ενός τμήματος DNA πετυχαίνεται με τη χρήση δύο πλευρικών ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών μετά από επαναλαμβανόμενους κύκλους επιμήκυνσης με τη βοήθεια μιας πολυμεράσης.

Η εκλεκτικότητα της μεθόδου βασίζεται στον προσχεδιασμό των εκκινητών, 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 διάλυμα ελεύθερων 5' τριφωσφορικών δεοξυριβοζονουκλεοτιδίων (dNTPs) για την επέκταση των νεοσχηματιζόμενων αλυσίδων και ρυθμιστικό διάλυμα για την Taq πολυμεράση (21), (22).

Η τεχνική πραγματοποιείται σε κύκλους. Κάθε κύκλος της PCR πραγματοποιείται σε στάδια και έχει ως αποτέλεσμα 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 εκκινητές 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 αρχική ποσότητα του DNA αυξάνεται εκθετικά, αφού διπλασιάζεται στο τέλος κάθε κύκλου.

Έτσι μετά την ολοκλήρωση (n) κύκλων, η αρχική αλληλουχία θα έχει πολλαπλασιαστεί  $2^n$  φορές. Η όλη διαδικασία πραγματοποιείται σε θερμικό κυκλοποιητή, ο οποίος προγραμματίζεται ώστε να προσαρμόζεται σταδιακά σε διάφορες θερμοκρασίες για συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα (21), (22).

Στο εργαστήριο χρησιμοποιήθηκε ο θερμικός κυκλοποιητής 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 3R και 6R εκκινητές (10 pmole/μl) αντίστοιχα, 0.7 μl 3F και 6F εκκινητές (10 pmole/μl) αντίστοιχα, 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: 60 °C για 30 δευτ.	
Επιμήκυνση αλυσίδων: 72 °C για 30 δευτ.	
Τελική επιμήκυνση: 72 °C για 7 λεπτά	1 κύκλος

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν σχεδιάστηκαν βάση της αλληλουχίας των εξονίων 3 και 6 του γονιδίου της ακετυλοχολινεστεράσης του *Bactrocera oleae*. Οι αλληλουχίες τους παρουσιάζονται παρακάτω:

#### **Primer 3F (Forward)**

5' GCT TAC CCG TGC TTA TTT GG '3

#### **Primer 3R (Reverse)**

5' AGC CAA CGT ATA GCC AAT GC '3

#### **Primer 6F (Forward)**

5' ACA CCA GCT GGG TTG GTA ATC '3

#### **Primer 6R (Reverse)**

5' AAC GCT TGG GCA TAC TCA TT '3

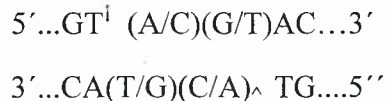
## 2.4 Πέψη DNA με ένζυμα περιορισμού

Τα ένζυμα περιορισμού είναι ενδονουκλεάσες που κόβουν, με καθορισμένο και επαναλαμβανόμενο τρόπο, 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 στη σύγχρονη τεχνολογία του DNA.

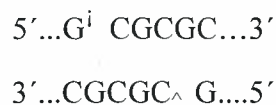
Τα περισσότερα περιοριστικά ένζυμα αναγνωρίζουν ειδικές παλίνδρομες αλληλουχίες τεσσάρων έως οκτώ βάσεων και υδρολύουν ένα φωσφοδιεστερικό δεσμό σε κάθε αλυσίδα της περιοχής αυτής, προς τη θέση 3' σε σχέση με τον άξονα συμμετρίας. Τελικά ανάλογα με τον τρόπο της πέψης δημιουργούνται τμήματα DNA με συμπληρωματικά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

Τα περιοριστικά ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν είναι το AccI για το εξόνιο 3 και το BssH II για το εξόνιο 6. Οι θέσεις αναγνώρισης των ενζύμων είναι:

### AccI



### BssH II



Για την αντίδραση τελικού όγκου 20 μl χρησιμοποιήθηκαν: 12 μl προϊόν αντίδρασης PCR, 2.0 μl ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμου (10X buffer), 0.5 μl AccI (10 U/μl) για το εξόνιο 3, 0.6 μl BssH II (8 U/μl) για το εξόνιο 6 και συμπλήρωση με διπλά απεσταγμένο αποστειρωμένο νερό.

Τελικό στάδιο είναι η επώαση για 2 ώρες, όπου τα δείγματα με το ένζυμο AccI επωάζονται στους 37 °C και τα δείγματα με το ένζυμο BssH II επωάζονται στους 50 °C.

## 2.5 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό, την αναγνώριση και τον καθορισμό του μοριακού βάρους κομματιών DNA. 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 μετά από εμφάνιση του πηκτώματος σε διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου.

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 χρησιμοποιήθηκε η Wide Range αγαρόζη λόγω πιο ευδιάκριτων αποτελεσμάτων.

### Πρωτόκολλο:

- Παρασκευή πηκτώματος Wide Range αγαρόζης 2 %
  1. Σε κωνική φιάλη των 250 ml προστίθεται 3 gr σκόνη Wide Range αγαρόζης. Σε ογκομετρικό κύλινδρο προστίθεται 15 ml 10X TBE και αφού συμπληρωθεί με διπλά απεσταγμένο αποστειρωμένο νερό μέχρι τον όγκο των 150 ml, προστίθεται στην κωνική φιάλη.
  2. Το διάλυμα θερμαίνεται με διαδοχικές ανακινήσεις, μέχρι να διαλυθεί η αγαρόζη και γίνει ένα διαυγές διάλυμα.
  3. Αφού κρυώσει το διάλυμα μεταφέρεται στη στεγανοποιημένη βάση της ηλεκτροφορητικής συσκευής, στην οποία έχει τοποθετηθεί το κατάλληλο χτενάκι. Αφήνεται περίπου 30 λεπτά ώστε να στερεοποιηθεί το πήκτωμα.
  4. Όταν η αγαρόζη στερεοποιηθεί εντελώς αφαιρείται το χτενάκι, το πήκτωμα τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης.

- Ηλεκτροφόρηση

1. 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 παρακολούθηση της πορείας της διαδικασίας.
2. Το στερεοποιημένο πήκτωμα βυθίζεται 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 110 V. Η διαδικασία ολοκληρώνεται μετά από 1,5 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 ορατές οι θέσεις των ζωνών του DNA που έχει προκύψει μετά το διαχωρισμό.
7. Λήψη φωτογραφίας και αποθήκευση αποτελεσμάτων σε ηλεκτρονικό υπολογιστή.

# **3 . ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**



### 3.1 Έλεγχος φυσικών πληθυσμών του δάκου με βιοδοκιμές για ανθεκτικότητα σε εντομοκτόνο.

Ο έλεγχος των δύο μεταλλάξεων στο εξόνιο 3 και εξόνιο 6 του γονιδίου της ακετυλοχολινεστεράσης από δύο περιοχές της Κύπρου έγινε στο Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας του Ινστιτούτο Γεωργικών Ερευνών Κύπρου. Η παραλαβή και μεταφορά προσβεβλημένου ελαιοκάρπου έγινε από την περιοχή του Μαζωτού και της Ευρύχου. Μετά την έξοδο των προνυμφών του δάκου και τη νύμφωση τους, οι νύμφες τοποθετήθηκαν σε κλωβούς εκτροφής, όπου διατηρήθηκαν μέχρι την έξοδο των τέλειων εντόμων. Στη συνέχεια έγινε αναισθητοποίηση των εντόμων και τοπική εφαρμογή μικροποσότητας dimethoate σε συγκεκριμένες δόσεις. Τα έντομα τοποθετήθηκαν σε κλωβούς βιοδοκιμών και μετά από 24 ώρες έγινε καταμέτρηση του ποσοστού θνησιμότητας.

Στις γραφικές παραστάσεις φαίνονται τα αποτελέσματα των τοξικολογικών εξετάσεων από τις δύο περιοχές.

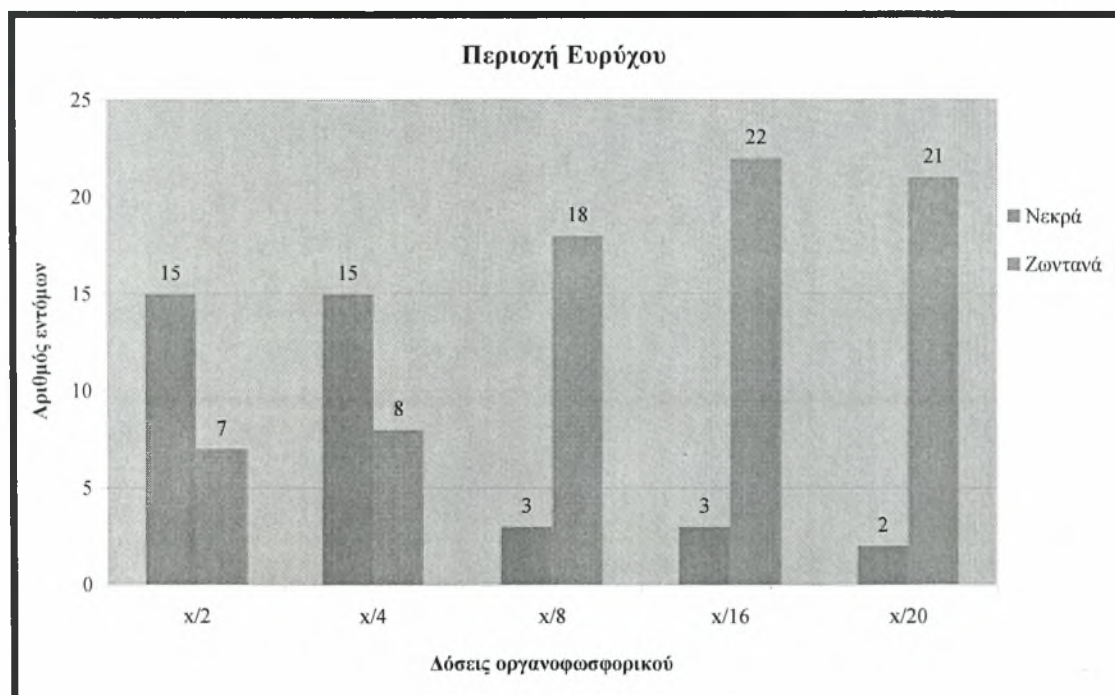
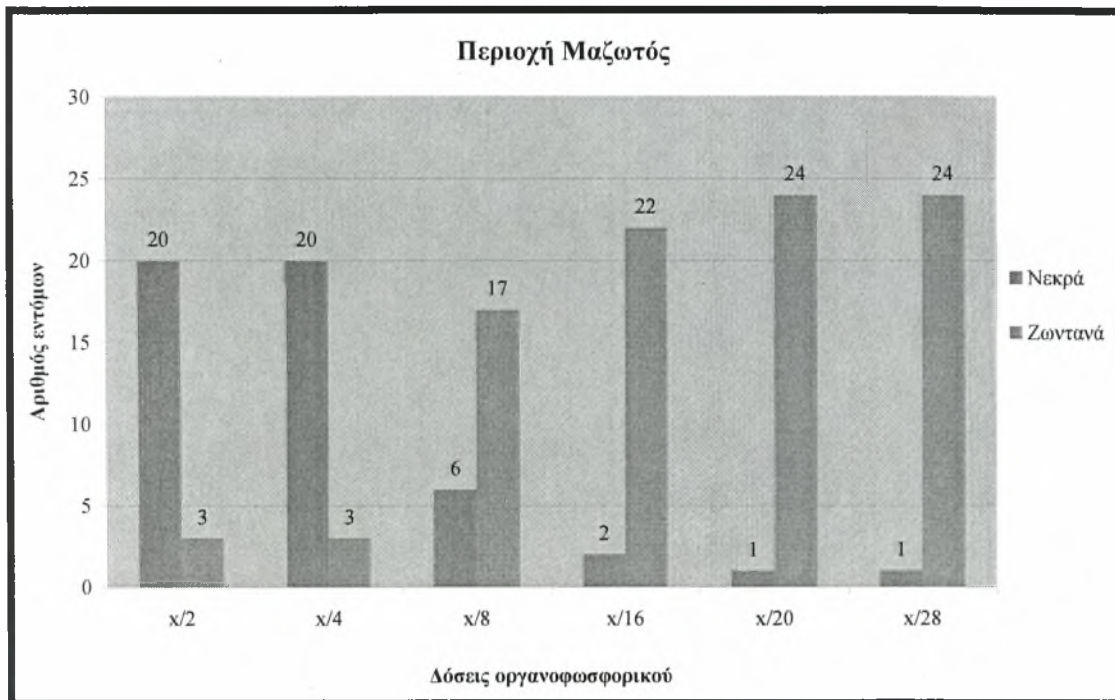
Πίνακας 2: Δοσολογία εντομοκτόνου και αποτελέσματα τοξικολογικών εξετάσεων

#### Μαζωτός (27/11/2006)

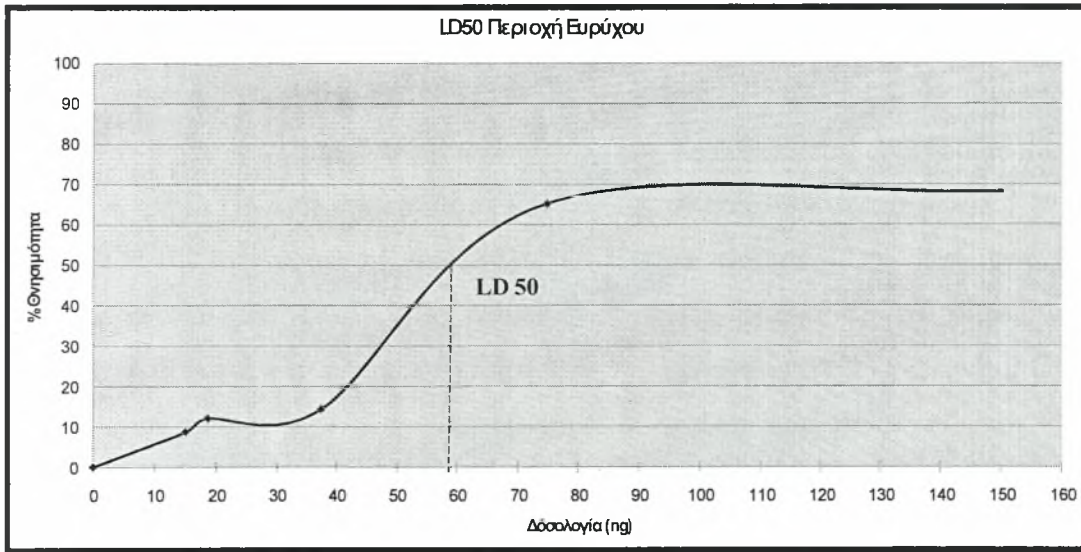
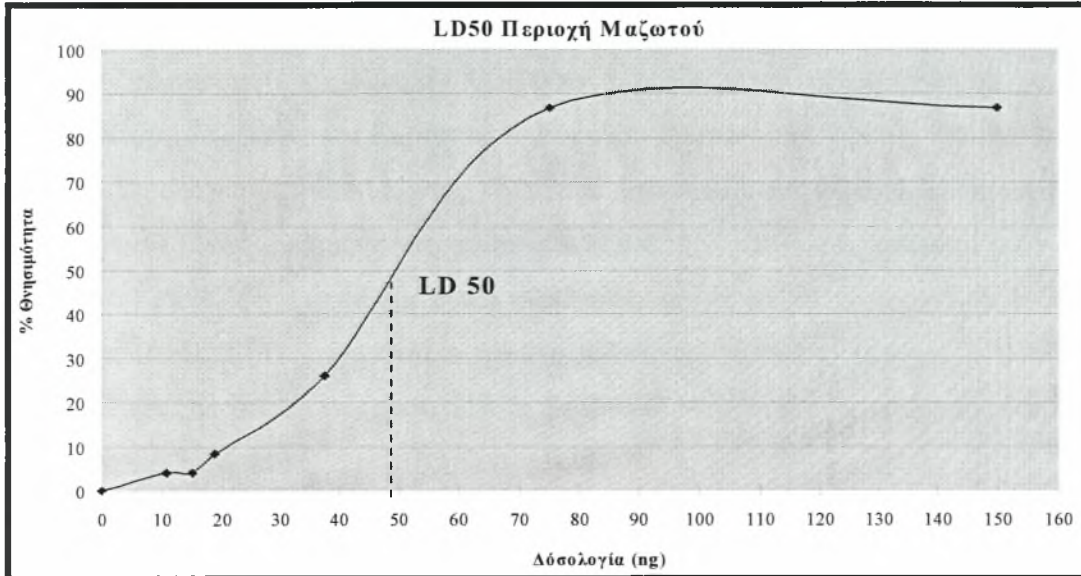
Δόση	Νεκρά	Ζωντανά
x/2	20	3
x/4	20	3
x/8	6	17
x/16	2	22
x/20	1	24
x/28	1	24
<b>Ολικά</b>	<b>50</b>	<b>93</b>

#### Ευρύχου (27/11/2006)

Δόση	Νεκρά	Ζωντανά
x/2	15	7
x/4	15	8
x/8	3	18
x/16	3	22
x/20	2	21
x/28	-	-
<b>Ολικά</b>	<b>38</b>	<b>76</b>



Βάση των αποτελεσμάτων των τοξικολογικών εξετάσεων υπολογίζεται η μέση θανατηφόρος δόση (LD50). Μέση θανατηφόρος δόση (LD50) είναι η συγκέντρωση της δραστικής ουσίας που προκαλεί το θάνατο του 50% των εντόμων.



Περιοχή	Αριθμός ατόμων	LD50 (ng/έντομο)
Μαζωτός	143	49
Ευρύχου	114	59

Πίνακας 3: Μέση θανατηφόρος δόση για το οργανοφωσφορικό εντομοκτόνο Dimethoate

### 3.2 Μοριακή ανάλυση για τον έλεγχο των μεταλλάξεων Ile214Val και Gly488Ser στο γονίδιο της ακετυλοχολινεστεράσης.

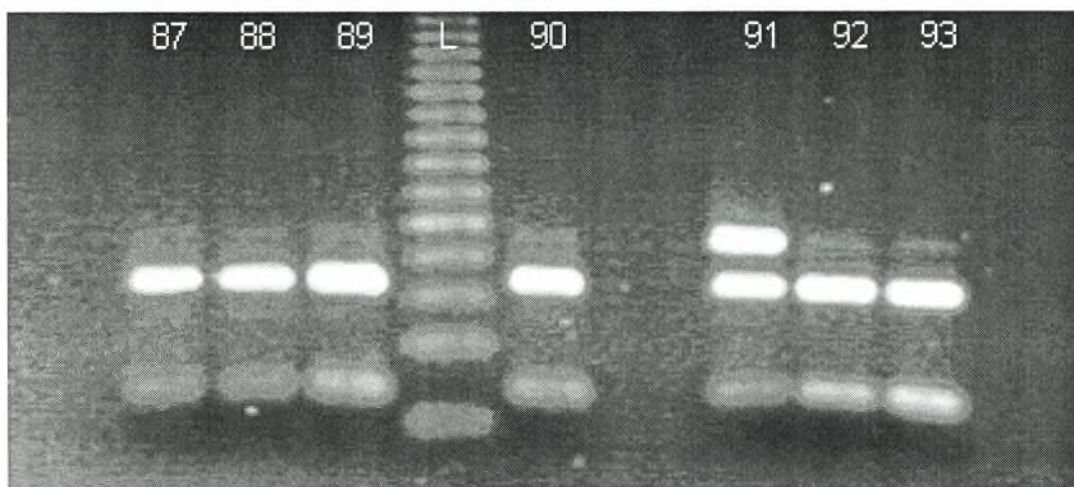
Σε αυτή την πειραματική εργασία χρησιμοποιήθηκαν έντομα από δύο φυσικούς πληθυσμούς της Κύπρου. Ο έλεγχος των δύο μεταλλάξεων έγινε και για τις δύο περιοχές, Μαζωτός και Ευρύχου. Η Ευρύχου βρίσκεται σε ορεινή τοποθεσία με υψηλές θερμοκρασίες. Ο Μαζωτός είναι μια παραθαλάσσια περιοχή με κανονικές θερμοκρασίες και αυξημένη υγρασία. Συνολικά 257 δείγματα υποβλήθηκαν σε αντίδραση PCR. Στην συνέχεια έγινε αντίδραση πέψης με τα περιοριστικά ένζυμα AccI και BssH II. Επόμενο στάδιο ήταν η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα 2 % Wide Range αγαρόζης για 1,5 ώρες στα 110 V. Το τελικό στάδιο ήταν η φωτογράφιση και αποθήκευση δεδομένων.

Για την ανίχνευση της μετάλλαξης Ile214Val αρχικά γενωμικό DNA απομονώθηκε από τα έντομα του δάκου. Ειδικοί εκκινητές, Boace 3F και Boace 3R, σχεδιάστηκαν με την δυνατότητα να δημιουργείται μετά από αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) ένα τμήμα DNA 232 βάσεων από το εξόνιο 3. Το προϊόν από την αντίδραση PCR επωάστηκε με το περιοριστικό ένζυμο AccI. Η μετάλλαξη Ile214Val δημιουργεί μια θέση αναγνώρισης του περιοριστικού ενζύμου το οποίο πέπτει το τμήμα DNA σε δύο τμήματα των 168 και 64 βάσεων αντίστοιχα.

Για την ανίχνευση της μετάλλαξης Gly488Ser, γενωμικό DNA απομονώθηκε από τα έντομα του δάκου. Με ειδικούς εκκινητές, Boace 6F και Boace 6R, δημιουργείται μετά από αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) ένα τμήμα DNA 106 βάσεων από το εξόνιο 6. Στη συνέχεια το προϊόν από την αντίδραση PCR επωάζεται με το περιοριστικό ένζυμο BssH II. Η παρουσία της μετάλλαξης Gly488Ser έχει σαν αποτέλεσμα την απώλεια της θέσης αναγνώρισης του περιοριστικού ενζύμου BssH II με αποτέλεσμα το προϊόν της PCR να παραμένει ανέπαφο. Απουσία της μετάλλαξης Gly488Ser το περιοριστικό ένζυμο πέπτει το προϊόν της PCR σε δύο τμήματα DNA των 50 και 56 βάσεων αντίστοιχα.

Στην εικόνα 16 φαίνονται τα αποτελέσματα των δειγμάτων 88 μέχρι 93 τα οποία προέρχονται από την περιοχή της Ευρύχου. Τα δείγματα αυτά επέζησαν στην x/16 δόση. Στα δείγματα αυτά πραγματοποιήθηκε αντίδραση PCR και στην συνέχεια τα προϊόντα από την αντίδραση PCR επωάστηκαν με το περιοριστικό ένζυμο AccI.

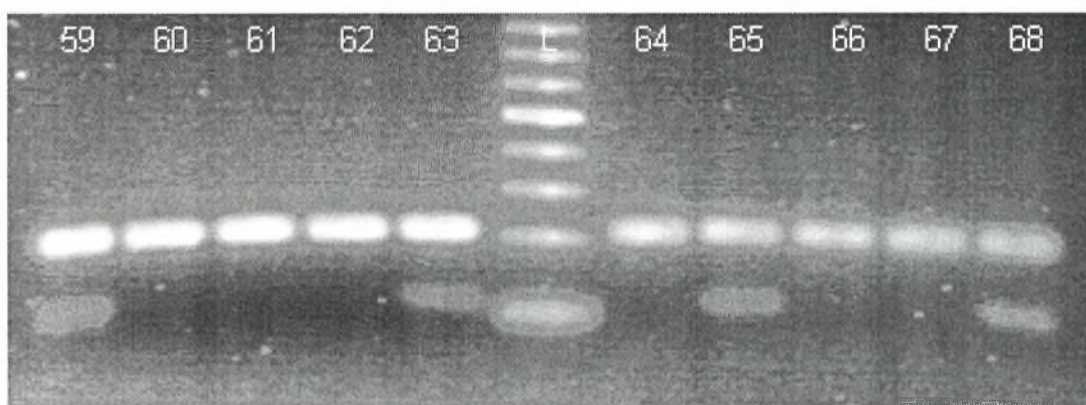
Σε όλα τα δείγματα εκτός από το 91 εντοπίστηκαν δύο τμήματα DNA, των 168 και των 64 βάσεων. Τα τμήματα αυτά δείχνουν ότι υπάρχει μια θέση την οποία αναγνωρίζει το περιοριστικό ένζυμο AccI και πέπτει το αρχικό PCR προϊόν μεγέθους 232 βάσεων. Η παρουσία μόνο αυτών των δύο τμημάτων δείχνει ότι και στα δύο αλληλόμορφα υπάρχει η συγκεκριμένη θέση η οποία δημιουργήθηκε από την μετάλλαξη. Στο δείγμα 91 εντοπίστηκε ένα επιπλέον κομμάτι, των 232 βάσεων, ίδια με το προϊόν PCR. Το αποτέλεσμα αυτό μας δείχνει ότι στο ένα αλληλόμορφο υπάρχει η θέση η οποία αναγνωρίζει το περιοριστικό ένζυμο AccI και στο άλλο αλληλόμορφο δεν υπάρχει άρα το δείγμα αυτό είναι ετερόζυγο ως προς τη μετάλλαξη.



**Εικόνα 16:** Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης των δειγμάτων 87 – 93 από την περιοχή της Ευρύχου. Από την εικόνα παρατηρείται ότι όλα τα δείγματα εκτός από το 91 είναι ομοζυγωτικά ως προς την μετάλλαξη Ile214Val. Το δείγμα 91 λόγω του ότι έχει ένα τμήμα DNA 232 βάσεων, δηλαδή δεν κόπηκε το προϊόν PCR, είναι ετερόζυγο ως προς την μετάλλαξη.

Στην εικόνα 17 φαίνονται τα αποτελέσματα των δειγμάτων 59 μέχρι 68 τα οποία προέρχονται από την περιοχή του Μαζωτού. Τα δείγματα αυτά επέζησαν στην x/8 δόση. Στα δείγματα αυτά πραγματοποιήθηκε αντίδραση PCR και στην συνέχεια τα προϊόντα από την αντίδραση PCR επώαστηκαν με το περιοριστικό ένζυμο BssH II.

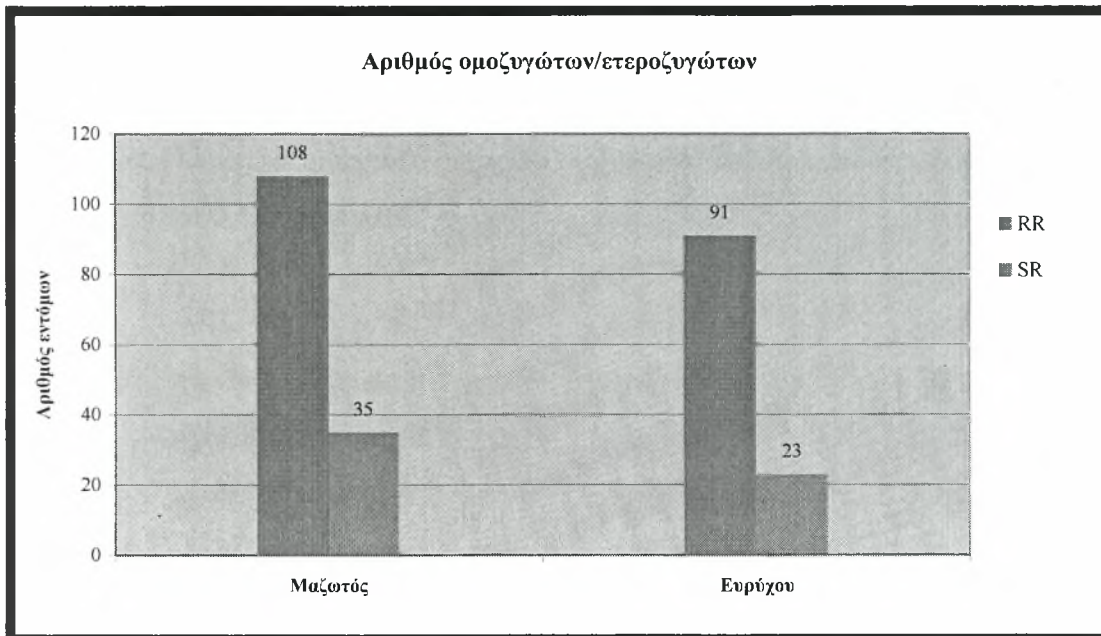
Στα δείγματα 60, 61, 62, 64, 66, 67 εντοπίστηκε ένα τμήμα DNA των 106 βάσεων. Το τμήμα αυτό, το οποίο είναι ίδιο με το προϊόν PCR, δείχνει ότι δεν υπάρχει θέση την οποία να αναγνωρίζει το περιοριστικό ένζυμο BssH II. Η παρουσία μόνο ενός τμήματος δείχνει ότι στα δύο αλληλόμορφα δεν υπάρχει η συγκεκριμένη θέση η οποία διαγράφηκε από την μετάλλαξη Gly488Ser. Στα δείγματα 59, 63, 65, 68 εντοπίστηκε ένα επιπλέον τμήμα, περίπου των 50 βάσεων. Συγκεκριμένα αυτό το τμήμα αποτελείται από άλλα δύο τμήματα, των 50 και των 56 βάσεων, αλλά λόγω παραπλήσιων μεγεθών αλληλεπικαλύπτονται. Αυτά τα τμήματα δείχνουν ότι μόνο στο ένα αλληλόμορφο υπάρχει η θέση η οποία αναγνωρίζει το περιοριστικό ένζυμο BssH II ενώ στο άλλο αλληλόμορφο δεν υπάρχει η συγκεκριμένη θέση.



**Εικόνα 17:** Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης των δειγμάτων 59 – 68 από την περιοχή του Μαζωτού. Από την εικόνα παρατηρείται ότι τα δείγματα 60, 61, 62, 64, 66, 67 είναι ομοζυωτικά ως προς την μετάλλαξη Gly488Ser. Τα δείγματα 59, 63, 65, 68 είναι ετερόζυγα ως προς την μετάλλαξη.

Στα έντομα από την περιοχή του Μαζωτού ελέγχθηκε η θνησιμότητα τους σε 6 δοσολογίες του οργανοφωσφορικού εντομοκτόνου ( x/2, x/4, x/8, x/16, x/20, x/28 ) ενώ στα έντομα από την περιοχή της Ευρύχου ελέγχθηκε σε 5 συγκεντρώσεις ( x/2, x/4, x/8, x/16, x/20 ).

Στη γραφική παράσταση παρατηρείται ο αριθμός των ομοζυγώτων και ετεροζυγώτων ως προς μετάλλαξη ανά περιοχή.



Γενοτυπικές συχνότητες που αφορούν το εξόνιο 3 και εξόνιο 6.

ΔΕΙΓΜΑ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΤΟΜΩΝ	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ RR	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ SR	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ SS
ΜΑΖΩΤΟΣ	143	75,5 %	24,5 %	-
ΕΥΡΥΧΟΥ	114	80 %	20 %	-

Η συχνότητα του R αλληλόμορφου υπολογίζεται από την ισορροπία Hardy-Weinberg. Η ισορροπία Hardy-Weinberg εκφράζεται από ένα τύπο που μας δίνει τις γενοτυπικές αναλογίες των απογόνων σε γαμετικές αλληλομορφικές συχνότητες του γονικού γονιδιακού αποθέματος.

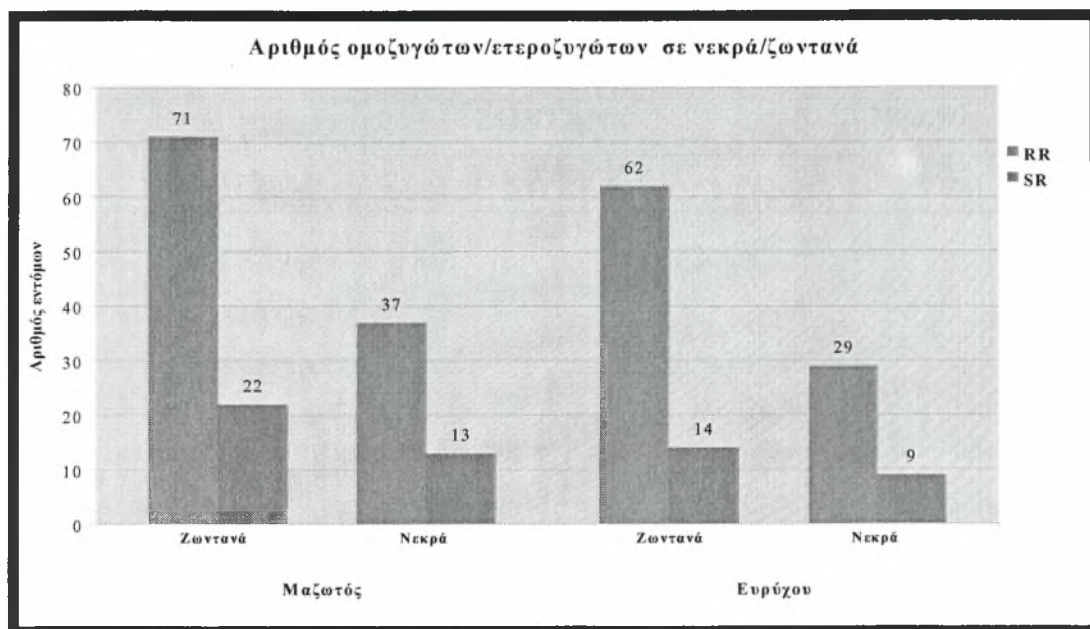
$$p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

όπου p είναι η εκατοστιαία αναλογία του αλληλόμορφου R και q είναι η εκατοστιαία αναλογία του αλληλόμορφου S.

Σε αυτή την περίπτωση η συχνότητα του αλληλόμορφου R στον Μαζωτό είναι  $p = 0.87$  και στην Ευρύχου  $p = 0,89$ .



Στη δεύτερη γραφική παράσταση φαίνεται πιο συγκεκριμένα ο αριθμός των ομοζυγώτων και ετεροζυγώτων ως προς μετάλλαξη σε ζωντανά και νεκρά σε κάθε περιοχή.



Γενοτυπικές συχνότητες που αφορούν το εξόνιο 3 και εξόνιο 6.

<b>ΖΩΝΤΑΝΑ</b>			
<b>ΔΕΙΓΜΑ</b>	<b>ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΤΟΜΩΝ</b>	<b>ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ RR</b>	<b>ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ SR</b>
ΜΑΖΩΤΟΣ	93	76,3 %	23,7 %
ΕΥΡΥΧΟΥ	76	80,7 %	19,3 %
<b>ΝΕΚΡΑ</b>			
<b>ΔΕΙΓΜΑ</b>	<b>ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΤΟΜΩΝ</b>	<b>ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ RR</b>	<b>ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ SR</b>
ΜΑΖΩΤΟΣ	50	74 %	26 %
ΕΥΡΥΧΟΥ	38	76,3 %	23,7 %

Η συχνότητα του αλληλόμορφου R στον Μαζωτό και στην Ευρύχου ανάμεσα στα νεκρά και ζωντανά φαίνεται παρακάτω.

<b>ΜΑΖΩΤΟΣ</b>	<b>ΖΩΝΤΑΝΑ</b>	<b>ΝΕΚΡΑ</b>
	0,87	0,86
<b>ΕΥΡΥΧΟΥ</b>	<b>ΖΩΝΤΑΝΑ</b>	<b>ΝΕΚΡΑ</b>
	0,89	0,87

Εδώ πρέπει να αναφερθεί ότι έχει εντοπιστεί ταυτόχρονη έκφραση των δύο μεταλλάξεων στο 99, % των δειγμάτων. Μόνο σε 2 από τα 257 δείγματα έχουμε έκφραση της μιας από τις δύο μεταλλάξεις. Για αυτό δεν υπολογίστηκαν οι γενοτυπικές συχνότητες κάθε εξονίου διαφορετικά.

## 4. Συζήτηση

Η παρούσα εργασία είχε ως στόχο τον έλεγχο των δύο μεταλλάξεων στο εξόνιο 3 και εξόνιο 6 του γονιδίου της ακετυλοχολινεστεράσης του δάκου από δύο περιοχές της Κύπρου, Μαζωτός και Ευρύχου. Συγκεκριμένα μελετήθηκαν 257 έντομα και από τις δύο περιοχές. Στην αρχή ελέγχθηκε η ανθεκτικότητα των εντόμων με τοπική εφαρμογή του οργανοφωσφορικού εντομοκτόνου dimethoate. Ακολούθησε καταμέτρηση ποσοστού θνησιμότητας. Στην συνέχεια έγινε απομόνωση DNA από κάθε έντομο. Συγκεκριμένα τμήματα DNA δημιουργήθηκαν μετά από αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR). Αυτό επιτεύχθηκε με ειδικούς εκκινητές για το εξόνιο 3 και εξόνιο 6. Για τον έλεγχο της ύπαρξης των μεταλλάξεων, στο εξόνιο 3 και εξόνιο 6, χρησιμοποιήθηκαν τα περιοριστικά ένζυμα AccI και BssH II αντίστοιχα.

Στο Μαζωτό, η οποία είναι παραθαλάσσια περιοχή, από τα 143 έντομα που εξετάστηκαν βρέθηκε ότι στο 76 % των εντόμων και οι δύο μεταλλάξεις αντίστοιχα έχουν συχνότητα RR. Από τα έντομα αυτά, τα 71 έντομα προέρχονται από τα 93 έντομα που επέζησαν και τα 37 έντομα προέρχονται από τα 48 έντομα που πέθαναν.

Στην Ευρύχου, η οποία είναι ορεινή περιοχή, από τα 114 έντομα που εξετάστηκαν βρέθηκε ότι στο 78 % των εντόμων και οι δύο μεταλλάξεις αντίστοιχα έχουν συχνότητα RR. Επίσης βρέθηκαν και δύο έντομα όπου εντοπίστηκε μόνο η μετάλλαξη Ile214Val στο 3 εξόνιο. Από τα 91 αυτά έντομα που περιέχουν τις μεταλλάξεις τα 62 έντομα προέρχονται από τα 76 έντομα που επέζησαν και τα 29 έντομα προέρχονται από τα 38 έντομα που πέθαναν.

Η εμφάνιση των μεταλλάξεων και στις δύο περιοχές κυμαίνεται στο 75% στη περιοχή του Μαζωτού και στο 79% στη περιοχή της Ευρύχου. Από τα πιο πάνω αποτελέσματα παρατηρείται ότι δεν επηρεάζεται η εμφάνιση των μεταλλάξεων από το περιβάλλον και τις κλιματολογικές συνθήκες κάθε περιοχής. Αυτό ίσως να οφείλεται στην μικρή έκταση της Κύπρου η οποία μπορεί να περιορίζει την εμφάνιση διαφορών σε σχέση με τις τοποθεσίες. Η παρούσα εργασία βασίστηκε στην μελέτη μόνο δύο περιοχών έτσι μια περαιτέρω έρευνα με μεγαλύτερους πληθυσμούς εντόμων από περισσότερες περιοχές είναι πιθανόν να εμφανίσει κάποιες διαφορές. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι δεν εντοπίστηκαν καθόλου SS άτομα δηλαδή έντομα που να μην έχουν τις μεταλλάξεις.

Προηγούμενη έρευνα που έγινε για την συχνότητα των μεταλλάξεων που προσδίδουν ανθεκτικότητα έδειξαν ένα ποσοστό 92% στους φυσικούς πληθυσμούς που εξετάστηκαν. Η παρούσα εργασία έδειξε την συχνότητα εμφάνισης των μεταλλάξεων περίπου στο 87% των εντόμων. Αυτή η διαφορά οφείλεται στο γεγονός ότι στην προηγούμενη έρευνα μελετήθηκε η συχνότητα των μεταλλάξεων που προσδίδουν ανθεκτικότητα μόνο στα πιο ανθεκτικά από τα ζωντανά δείγματα ενώ η παρούσα εργασία επικεντρώθηκε στο σύνολο του πληθυσμού.

## 5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Κ. Ματθιόπουλος, 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. H. V. Weems, J. L. Nation, T. R. Fasulo, Olive fruit fly, *Bactrocera oleae* (Gmelin) (Insecta: Diptera: Tephritidae), Entomology Circular No. 44, 1999.
3. 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.
4. Α. Πατσιάς, Η καταπολέμηση του δάκου της ελιάς, 2005, Γ.Τ.Π 26/2005-6.000.
5. Κέντρο Διάδοσης Τεχνολογίας για την ελιά (TDC), Υποβάθμιση της ποιότητας της επιτραπέζιας ελιάς και του ελαιόλαδου.
6. 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.
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). *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 81 (3): 154-163 MAR.
8. S. E. Michellakis, The olive fruit fly (*Dacus oleae* Gmel.) in Crete, *ISHS Acta Horticulturae* 286: International Symposium on Olive Growing.

9. Smissaert HR. Cholinesterase inhibition in spider mites susceptible and resistant to organophosphate. *Science*. 1964;143:129–131.
10. Fournier D, Mutero A. Modification of acetylcholinesterase as a mechanism of resistance to insecticides. *Comp Biochem Physiol*. 1994;108C:19–31.
11. Guedes RNC, Kambhampati S, Dover BA, Zhu KY. Biochemical mechanisms of organophosphate resistance in *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrichidae) populations from the United States and Brazil. *Bull Ent Res*. 1997;87:581–586.
12. Mutero A, Pralavorio M, Bride JM, Fournier D. Resistance-associated point mutations in insecticide insensitive acetylcholinesterase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994;91:5922–5926.
13. Devonshire, AL.;Byrne, FJ.;Moores, GD.; Williamson, MS. Biochemical and molecular characterization of insecticide-insensitive acetylcholinesterases. In: Doctor BP, Taylor P, Quinn DM, Rotundo RL, Gentry MK., editor. *In Structure and Function of Cholinesterases and Related Proteins*. Plenum Press, New York; 1998. pp. 491–496.
14. Villatte F, Ziliani P, Marcel V, Menozzi P, Fournier D. A high number of mutations in insect acetylcholinesterase may provide insecticide resistance. *Pest Biochem Physiol*. 2000;67:95–102.
15. 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, *BMC Evolutionary Biology* 4, (2004) 5.
16. P. Menozzi, M. An Shi, A. Lougarre, D. Fournier, Mutations of acetylcholinesterase which confer insecticide resistance in *Drosophila melanogaster* populations, *BCM Evolutionary Biology*, (2004).
17. L. G. Sultatos, Mammalian toxicology of organophosphorus pesticides, *J. Toxicol. Environ. Health* 43, p. 271-289, 1994.

18. T. C. Marrs. Organophosphate poison, *Pharmacology & Therapeutics* 58, p. 51-66, 1993.
19. 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* 63:42-48, 2007.
20. 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.
21. The history of PCR (<http://www.si.edu/archives/ihd/videocatalog/9577.htm>): Smithsonian Institution Archives, Institutional History Division, June 2006.



## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

### Διαλύματα

- Απομόνωση DNA

#### 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).

- Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμερισμού

#### 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.

- Ηλεκτροφόρηση

#### 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.

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ

Πίνακας που περιλαμβάνει τα δείγματα, περιοχή προέλευσης και γενότυποι για το εξόνιο 3 και εξόνιο 6.

<b>Μαζωτός (Νεκρά)</b>			
<b>Dose</b>	<b>Sample</b>	<b>Exon 3</b>	<b>Exon 6</b>
x/2	M1	RR	RR
x/2	M2	RR	RR
x/2	M3	RR	RR
x/2	M4	RR	RR
x/2	M5	RR	RR
x/2	M6	RR	RR
x/2	M7	SR	SR
x/2	M8	RR	RR
x/2	M9	RR	RR
x/2	M10	SR	SR
x/2	M11	RR	RR
x/2	M12	SR	SR
x/2	M13	RR	RR
x/2	M14	RR	RR
x/2	M15	RR	RR
x/2	M16	RR	RR
x/2	M17	RR	RR
x/2	M18	RR	RR
x/2	M19	RR	RR
x/2	M20	RR	RR
x/4	M21	SR	SR
x/4	M22	SR	SR
x/4	M23	RR	RR
x/4	M24	RR	RR
x/4	M25	RR	RR
x/4	M26	RR	RR
x/4	M27	RR	RR
x/4	M28	RR	RR
x/4	M29	RR	RR
x/4	M30	RR	RR
x/4	M31	RR	RR
x/4	M32	RR	RR
x/4	M33	RR	RR
x/4	M34	RR	RR
x/4	M35	RR	RR
x/4	M36	SR	SR
x/4	M37	RR	RR
x/4	M38	SR	SR
x/4	M39	RR	RR

x/4	M40	RR	RR
x/8	M41	SR	SR
x/8	M42	SR	SR
x/8	M43	SR	SR
x/8	M44	SR	SR
x/8	M45	RR	RR
x/8	M46	RR	RR
x/16	M47	RR	RR
x/16	M48	SR	SR
x/20	M49	SR	SR
x/28	M50	RR	RR

**Μαζωτός (Ζωντανά)**

x/2	M51	RR	RR
x/2	M52	RR	RR
x/2	M53	RR	RR
x/4	M54	RR	RR
x/4	M55	SR	SR
x/4	M56	RR	RR
x/8	M57	RR	RR
x/8	M58	SR	SR
x/8	M59	SR	SR
x/8	M60	RR	RR
x/8	M61	RR	RR
x/8	M62	RR	RR
x/8	M63	SR	SR
x/8	M64	RR	RR
x/8	M65	SR	SR
x/8	M66	RR	RR
x/8	M67	RR	RR
x/8	M68	SR	SR
x/8	M69	RR	RR
x/8	M70	RR	RR
x/8	M71	SR	SR
x/8	M72	RR	RR
x/8	M73	RR	RR
x/16	M74	RR	RR
x/16	M75	RR	RR
x/16	M76	SR	SR
x/16	M77	RR	RR
x/16	M78	RR	RR
x/16	M79	RR	RR
x/16	M80	RR	RR
x/16	M81	RR	RR
x/16	M82	RR	RR
x/16	M83	SR	SR
x/16	M84	SR	SR
x/16	M85	RR	RR

x/16	M86	RR	RR
x/16	M87	RR	RR
x/16	M88	SR	SR
x/16	M89	RR	RR
x/16	M90	RR	RR
x/16	M91	RR	RR
x/16	M92	RR	RR
x/16	M93	SR	SR
x/16	M94	RR	RR
x/16	M95	RR	RR
x/20	M96	RR	RR
x/20	M97	RR	RR
x/20	M98	RR	RR
x/20	M99	SR	SR
x/20	M100	RR	RR
x/20	M101	RR	RR
x/20	M102	SR	SR
x/20	M103	SR	SR
x/20	M104	RR	RR
x/20	M105	SR	SR
x/20	M106	RR	RR
x/20	M107	RR	RR
x/20	M108	RR	RR
x/20	M109	RR	RR
x/20	M110	RR	RR
x/20	M111	RR	RR
x/20	M112	RR	RR
x/20	M113	RR	RR
x/20	M114	RR	RR
x/20	M115	RR	RR
x/20	M116	RR	RR
x/20	M117	RR	RR
x/20	M118	SR	SR
x/20	M119	RR	RR
x/28	M120	SR	SR
x/28	M121	SR	SR
x/28	M122	RR	RR
x/28	M123	SR	SR
x/28	M124	RR	RR
x/28	M125	RR	RR
x/28	M126	RR	RR
x/28	M127	RR	RR
x/28	M128	RR	RR
x/28	M129	RR	RR
x/28	M130	RR	RR
x/28	M131	SR	SR
x/28	M132	RR	RR
x/28	M133	RR	RR
x/28	M134	RR	RR
x/28	M135	RR	RR
x/28	M136	RR	RR
x/28	M137	RR	RR
x/28	M138	RR	RR

x/28	M139	RR	RR
x/28	M140	SR	SR
x/28	M141	RR	RR
x/28	M142	RR	RR
x/28	M143	RR	RR
<b>Ευρύχου (Νεκρά)</b>			
x/2	E1	RR	RR
x/2	E2	RR	RR
x/2	E3	RR	RR
x/2	E4	SR	SR
x/2	E5	SR	SR
x/2	E6	RR	RR
x/2	E7	RR	RR
x/2	E8	RR	RR
x/2	E9	RR	RR
x/2	E10	RR	RR
x/2	E11	RR	RR
x/2	E12	RR	RR
x/2	E13	RR	RR
x/2	E14	RR	RR
x/2	E15	SR	SR
x/4	E16	RR	RR
x/4	E17	SR	SR
x/4	E18	RR	RR
x/4	E19	RR	RR
x/4	E20	RR	RR
x/4	E21	RR	RR
x/4	E22	RR	RR
x/4	E23	RR	RR
x/4	E24	RR	RR
x/4	E25	RR	RR
x/4	E26	RR	RR
x/4	E27	RR	RR
x/4	E28	RR	RR
x/4	E29	SR	SR
x/4	E30	SR	SR
x/8	E31	RR	RR
x/8	E32	RR	RR
x/8	E33	SR	SR
x/16	E34	RR	RR
x/16	E35	SR	SR
x/16	E36	RR	RR
x/20	E37	RR	RR
x/20	E38	SR	SR

## Ευρύχου (Ζωντανά)

x/2	E39	RR	RR
x/2	E40	RR	RR
x/2	E41	RR	RR
x/2	E42	RR	RR
x/2	E43	RR	RR
x/2	E44	RR	RR
x/2	E45	RR	RR
x/4	E46	SR	SR
x/4	E47	RR	RR
x/4	E48	RR	RR
x/4	E49	RR	RR
x/4	E50	RR	RR
x/4	E51	SR	SR
x/4	E52	RR	RR
x/4	E53	RR	RR
x/8	E54	RR	RR
x/8	E55	SR	SR
x/8	E56	RR	RR
x/8	E57	SR	SR
x/8	E58	RR	RR
x/8	E59	RR	RR
x/8	E60	RR	RR
x/8	E61	RR	RR
x/8	E62	SR	SR
x/8	E63	RR	RR
x/8	E64	RR	RR
x/8	E65	RR	RR
x/8	E66	RR	RR
x/8	E67	RR	RR
x/8	E68	RR	RR
x/8	E69	RR	RR
x/8	E70	RR	RR
x/8	E71	RR	RR
x/16	E72	RR	RR
x/16	E73	RR	RR
x/16	E74	SR	SR
x/16	E75	RR	RR
x/16	E76	RR	RR
x/16	E77	RR	RR
x/16	E78	RR	RR
x/16	E79	SR	SR
x/16	E80	RR	RR
x/16	E81	RR	RR
x/16	E82	RR	RR
x/16	E83	RR	RR
x/16	E84	RR	RR
x/16	E85	RR	RR
x/16	E86	RR	RR
x/16	E87	RR	RR

x/16	E88	RR	RR
x/16	E89	RR	RR
x/16	E90	RR	RR
x/16	E91	SR	SR
x/16	E92	RR	RR
x/16	E93	RR	RR
x/20	E94	RR	RR
x/20	E95	RR	RR
x/20	E96	RR	RR
x/20	E97	RR	RR
x/20	E98	RR	RR
x/20	E99	SR	SR
x/20	E100	SR	RR
x/20	E101	RR	RR
x/20	E102	RR	RR
x/20	E103	SR	SR
x/20	E104	RR	RR
x/20	E105	SR	RR
x/20	E106	RR	RR
x/20	E107	RR	RR
x/20	E108	RR	RR
x/20	E109	RR	RR
x/20	E110	SR	SR
x/20	E111	RR	RR
x/20	E112	RR	RR
x/20	E113	RR	RR
x/20	E114	SR	SR



