

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**  
**ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ**  
**ΣΠΟΥΔΩΝ**  
**ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ 2<sup>Η</sup>: ΣΥΓΧΡΟΝΗ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΣΙΑ**  
**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΕΝΤΟΜΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΓΕΩΡΓΙΚΗΣ ΖΩΟΛΟΓΙΑΣ**

**«Ανθεκτικότητα του δάκου της ελιάς στο εντομοκτόνο  
alpha-cypermethrin»**



**Μεταπτυχιακή Διατριβή**  
**ΚΑΛΟΓΙΑΝΝΗΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ**

**ΝΕΑ ΙΩΝΙΑ ΜΑΓΝΗΣΙΑΣ**

**ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2007**



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ & ΚΕΝΤΡΟ ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ  
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»**

Αριθ. Εισ.: 5106/1  
Ημερ. Εισ.: 23-01-2008  
Δωρεά: Συγγραφέα  
Ταξιθετικός Κωδικός: Δ  
634.639  
ΚΑΛ

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Οφείλω να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον υπεύθυνο επιβλέποντα Καθηγητή κ. Ιωάννη Τσιτσιπή για την καθοδήγηση και τις συμβουλές του κατά τη διάρκεια εκπόνησης της μεταπτυχιακής μου διατριβής. Επίσης, ευχαριστίες εκφράζονται στον Καθηγητή κ. Δημήτριο Σταμόπουλο, καθηγητή του Τμήματος Γεωπονίας Ζωικής Παραγωγής και Υδάτινου Περιβάλλοντος της Σχολής Γεωπονικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, στον Επίκουρο Καθηγητή κ. Νικόλαο Παπαδόπουλο, επίκουρο καθηγητή του Τμήματος Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος της Σχολής Γεωπονικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για τις συμβουλές, επισημάνσεις και διορθώσεις τους στη διατριβή και ευχαριστίες ακόμη εκφράζονται προς τους διδάκτορες κ.κ. Γιάννη Μαργαριτόπουλο και Κώστα Ζάρπα, προσωπικό του Εργαστηρίου Εντομολογίας, για τις συμβουλές και την καθοδήγηση κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων. Ευχαριστώ επίσης τους υποψήφιους διδάκτορες του Εργαστηρίου κ.κ. Σκούρα Παναγιώτη, Βουδούρη Κωνσταντίνο, Διαμαντίδη Αλέξανδρο, τη μεταπτυχιακή φοιτήτρια κ. Χαριλάου Αναστασία, όλο το προσωπικό του Εργαστηρίου για τη βοήθειά τους κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων και στις συναδέλφους μεταπτυχιακές φοιτήτριες του Εργαστηρίου για τη συμπαράστασή τους κατά την εκπόνηση της διατριβής.

Ευχαριστίες εκφράζονται επίσης στον υποψήφιο διδάκτορα κ. Μαλανδράκη Μανόλη για τη βοήθειά του στη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων και στη φωτογράφο κ. Παρασκευοπούλου Μαρία για τη βοήθειά της στην επεξεργασία των φωτογραφιών.

Ευχαριστίες τέλος εκφράζονται στους υπεύθυνους επόπτες και τομεάρχες δακοκτονίας των Νομαρχιακών Αυτοδιοικήσεων Λευκάδας, Χίου, Σάμου, Εύβοιας, Φωκίδας, τη Δρα. κ. Κυριακή Βαρίκου του Ινστιτούτου Υποτροπικών Φυτών και Ελαιάς Χανίων και όσους ακόμη βοήθησαν στην ολοκλήρωση της διατριβής στέλνοντας δείγματα ελαιόκαρπου.

<u>ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ</u>	<u>Σελίδα</u>
Περίληψη	4
Abstract	5
<b><u>A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</u></b>	
Εισαγωγή	7
Η καλλιέργεια της ελιάς	7
Εχθροί της ελιάς	8
1) ΔΑΚΟΣ ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ	9
1.1) Ταξινόμηση	9
1.2) Μορφολογία	10
1.3) Βιολογία και ζημιές	11
1.4) Ζημιές- όρια ανεκτής προσβολής	13
2) ΚΑΤΑΠΟΛΕΜΗΣΗ ΤΟΥ ΔΑΚΟΥ	14
2.1) Εισαγωγικά στοιχεία	14
2.2) Παρακολούθηση του πληθυσμού	14
2.3) Δειγματοληψίες δάκου	16
2.4) Χημική καταπολέμηση	16
2.4.1) Προληπτική μέθοδος	17
2.4.2) Θεραπευτική ή κατασταλτική μέθοδος	18
2.5) Πυρεθροειδή εντομοκτόνα	19
2.6) Alpha-cypermethrin	21
2.7) Αρνητικές συνέπειες της χημικής καταπολέμησης	22
3) ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΑ ΕΝΤΟΜΟΚΤΟΝΑ	23
3.1) Εισαγωγή	23
3.2) Μηχανισμοί ανθεκτικότητας	24
3.3) Τύποι μεταβολικής ανθεκτικότητας	25
3.4) Μονοοξυγενάσες του κυτοχρώματος P450	25
3.4.1) Έκφραση των P450	25
3.4.2) Ρόλος των κυτοχρωμάτων στην ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα	26
3.4.3) Η μοριακή βάση της ανθεκτικότητας με μεσολάβηση μονοοξυγενασών	27
3.4.4) Γενετική της ανθεκτικότητας στα πυρεθροειδή μέσω των P450	28
3.5) Καρβοξυλεστεράσες	30
3.5.1) Μηχανισμός μεταβολισμού πυρεθροειδών μέσω καρβοξυλεστερασών	31
3.6) Τρανσφεράσες της γλουταθειόνης	32
3.6.1) Μηχανισμός δράσης των GSTs	33
3.6.2) Οι GSTs στα έντομα	34
3.7) Τροποποίηση του στόχου των πυρεθροειδών	36
3.7.1) Μεταλλάξεις τύπου <i>kdr</i>	36
4) ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	40
<b><u>B) ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</u></b>	
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	42
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	43

<b>2.1) ΕΚΤΡΟΦΗ ΤΩΝ ENTOMΩΝ</b>	<b>43</b>
2.1.1) Συλλογή των εντόμων	43
2.1.2) Εκτροφή του δάκου	44
2.1.3) Συλλογή αυγών και εκτροφή προνυμφών του δάκου	45
<b>2.2) ΒΙΟΔΟΚΙΜΕΣ</b>	<b>45</b>
2.2.1) Μέθοδος βιοδοκιμών	45
<b>2.3) ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΕΣ</b>	<b>45</b>
2.3.1) Μεθοδολογία βιοχημικών δοκιμών	45
<b>3) ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ</b>	<b>47</b>
<b>4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b>	<b>49</b>
4.1) Αποτελέσματα βιοδοκιμών	49
4.2) Αποτελέσματα βιοχημικών δοκιμών	51
<b>5) ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</b>	<b>57</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	<b>63</b>
<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ</b>	
<b>1) ΣΥΛΛΟΓΗ ΤΩΝ ENTOMΩΝ</b>	<b>71</b>
1.1) Συλλογή δειγμάτων από φυσικούς πληθυσμούς του <i>Bactrocera oleae</i>	71
<b>2) ΕΚΤΡΟΦΗ ΤΩΝ ENTOMΩΝ</b>	<b>71</b>
2.1) Εκτροφή των ενηλίκων του εργαστηριακού στελέχους δάκου	71
2.2) Συλλογή των αυγών του δάκου	73
2.3) Εκτροφή των προνυμφών του δάκου	73
<b>3) ΒΙΟΔΟΚΙΜΕΣ</b>	<b>74</b>
3.1) Υλικά βιοδοκιμών	74
3.2) Μέθοδος βιοδοκιμών	75
<b>4) ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΕΣ</b>	<b>76</b>
4.1) Μέθοδος ομογενοποίησης εντόμων των Vontas et al. (2001)	76
4.2) Μέθοδος εκτίμησης ολικής πρωτεΐνης των Vontas et al. (2001)	76
4.3) Μέθοδος εκτίμησης της δραστηριότητας των γενικών εστερασών (General Esterases, Naphthyl acetate tests) των Vontas et al. (2001)	78
4.4) Μέθοδος εκτίμησης της δραστηριότητας της τρoσφεράσης της γλουταθειόνης των Vontas et al. (2001).	78
4.5) Μέθοδος εκτίμησης της δραστηριότητας των μονοοξυγενασών μικτής λειτουργίας (MFOs) των Sousa et al. (1995), όπως τροποποιήθηκε από τους Nauen & Stumpf (2002).	79

## Περίληψη

Η καλλιέργεια της ελιάς είναι εξαιρετικά σημαντική για πολλές χώρες μεταξύ των οποίων και η Ελλάδα, εξαιτίας του ρόλου του ελαιόκαρπου και του ελαιόλαδου στη διατροφή και την οικονομία πολλών λαών της Μεσογείου. Ο κυριότερος εχθρός του ελαιόδεντρου είναι ο δάκος της ελιάς, *Bactrocera oleae* (Gmelin) (Diptera: Tephritidae). Η σοβαρότητα των ποσοτικών και ποιοτικών ζημιών, που προκαλούνται κάθε χρόνο από το έντομο, καθιστούν αναγκαία τη χρήση εντομοκτόνων, για τον έλεγχο των πληθυσμών του. Κατά τη διάρκεια των τελευταίων 4 δεκαετιών, η χημική καταπολέμηση του *B. oleae* έχει βασιστεί στην εντατική χρήση οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων (ειδικά του dimethoate), είτε με ψεκασμούς κάλυψης, είτε με δολωματικούς. Η επανειλημμένη χρήση εντομοκτόνων οδήγησε σε επιλογή ανθεκτικών ατόμων στους πληθυσμούς του εντόμου και βαθμιαία στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας. Αν και στην Ελλάδα η έγκριση του πυρεθροειδούς alpha-cypermethrin για καταπολέμηση του δάκου είναι σχετικά πρόσφατη (2001) και η χρησιμοποίησή του για δολωματικούς ψεκασμούς ακόμη πιο πρόσφατη (τα τελευταία 2 χρόνια), ορισμένα στοιχεία σχετικά με το δυναμικό ανάπτυξης ανθεκτικότητας κατέστησαν αναγκαία την καλύτερη μελέτη του φαινομένου. Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται σε αυτήν την εργασία δείχνουν ότι υπάρχει ένα δυναμικό ανάπτυξης ανθεκτικότητας, με αυξητική μάλιστα τάση, καθώς παρατηρήθηκε ανάπτυξη ισχυρής ανθεκτικότητας (σε ορισμένους πληθυσμούς μάλιστα από 19,5 ως και 54,7 φορές μεγαλύτερης συγκριτικά με τον ευαίσθητο πληθυσμό), ενώ σε περισσότερους πληθυσμούς ανιχνεύθηκε η ανάπτυξη μέτριας ανθεκτικότητας (μεταξύ 10,5 και 15,2 φορές μεγαλύτερη) και σε αρκετούς ανάπτυξη ανοχής (μεταξύ 2,3 και 9,7 μεγαλύτερης σε σχέση με τον ευαίσθητο πληθυσμό). Τα αποτελέσματα των βιοχημικών δοκιμών με δείγματα από φυσικούς πληθυσμούς έδειξαν ότι αν και γενικά δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των φυσικών πληθυσμών και του εργαστηριακού πληθυσμού, η δραστηριότητα των MFOs σε ορισμένους πληθυσμούς παρουσίασε κάποια συσχέτιση με τις τιμές RR (RR: Resistance Ratio, λόγος της τιμής LD50 ενός φυσικού πληθυσμού προς την αντίστοιχη τιμή του ευαίσθητου εργαστηριακού πληθυσμού) των πληθυσμών που εξετάστηκαν (Pearson's  $r = 0,750$ ,  $N=8$ ,  $P<0,032$ ). Συζητούνται επίσης οι προοπτικές και ορισμένοι πιθανοί μελλοντικοί ερευνητικοί στόχοι.

**Abstract**

The cultivation of olive is very important for many countries including Greece, due to the role that olive and olive oil play in the nourishment and the economy of many peoples around the Mediterranean. The major pest of olive tree is the olive fruit fly, *Bactrocera oleae* (Gmelin) (Diptera:Tephritidae). The severity of qualitative and quantitative losses, which are caused every year by the insect, necessitate the use of insecticides, in order to control the populations of the fly. During the past 4 decades, chemical control of *B.oleae* has been based on the intense use of organophosphate insecticides (especially dimethoate), either as cover or as bait sprays. The repetitive use of insecticides selected for resistant individuals within the pest populations and gradually led to the development of resistance to insecticides. Although in Greece the registration of the pyrethroid alpha-cypermethrin is quite recent (2001), and its utilization in bait sprays is even more recent (during the past two years), the existence of some evidence regarding the potential of resistance development made necessary the study of this phenomenon. The results presented in this work show that there is a potential of resistance development, with increasing trend. The level of resistance in several populations was high (between 19.5 and 54.7 times higher resistance compared to the laboratory reference strain), whereas in many populations resistance was moderate (between 10.5 and 15.2 times higher). Development of tolerance to alpha- cypermethrin has also been observed in many populations (between 2.3 and 9.7 times greater in comparison with the laboratory strain). The results from the biochemical studies with natural populations showed that even though no significant differences were noticed between natural populations and the laboratory susceptible strain, MFOs activity in some populations was correlated to a certain extend with RR values (Resistance Ratio, Ratio expressed as LD50 value of each natural population examined divided with the respective value of the laboratory susceptible strain (LS)) from the examined populations (Pearson's  $r = 0,750$ ,  $N=8$ ,  $P<0,032$ ). The perspectives and some possible research targets for future studies are discussed.

## **Α. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**



## Εισαγωγή

Η μελέτη κάποιου επιβλαβούς για τη γεωργία εντόμου μπορεί να γίνει περισσότερο ολοκληρωμένη αν παρουσιαστούν και κάποια στοιχεία που αφορούν κυρίως τη σχέση που έχει αναπτυχθεί μεταξύ εντόμου-ξενιστή (ή ξενιστών) ως αποτέλεσμα της συνεξέλιξης. Συγκεκριμένα, το είδος και η σοβαρότητα της ζημιάς που προκαλείται στον ξενιστή λόγω της προσβολής και οι επιδράσεις στη βιολογία και στις στρατηγικές επιβίωσης του εντόμου, που προκύπτουν ως αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης με τον ξενιστή, αποτελούν τις δύο κύριες συνιστώσες αυτής της αλληλεπίδρασης. Η αμφίδρομη σχέση που αναπτύσσεται γίνεται ισχυρότερος παράγοντας εξέλιξης για ένα είδος εντόμου αν αυτό είναι μονοφάγο, όπως για παράδειγμα ο δάκος της ελιάς. Πέρα από την οικολογική πλευρά αυτών των σχέσεων, ενδιαφέρον παρουσιάζει στην εφαρμοσμένη εντομολογία και η οικονομική επίπτωση που προκαλείται σε μια καλλιέργεια από τις προσβολές ενός είδους εντόμου. Η καλλιέργεια της ελιάς είναι μεγάλης σημασίας για πολλές χώρες, μεταξύ των οποίων και η Ελλάδα, καθώς αποτελεί σημαντική πηγή εσόδων για σημαντικό μέρος του πληθυσμού. Το σημαντικότερο έντομο-εχθρός της ελιάς είναι ο δάκος, οπότε στην παρούσα μελέτη θα επιχειρηθεί μια σύντομη παρουσίαση και των παραμέτρων που προαναφέρθηκαν.

## Η καλλιέργεια της ελιάς

Η ελιά, *Olea europaea* L., ταξινομείται στην οικογένεια Oleaceae. Στο γένος *Olea* εκτός από την ελιά κατατάσσονται περίπου 35 είδη, που εντοπίζονται σε περιοχές της Αφρικής (νότια, τροπική και βορειανατολική), της Ασίας (Κίνα, Ινδία, Μαλαισία), της Ωκεανίας (Αυστραλία) και της Ευρώπης (Μεσογειακές περιοχές). Ως πιθανότερος τόπος καταγωγής της ελιάς θεωρείται η ανατολική Μεσόγειος (Λίβανος, Συρία και ενδεχομένως το Ισραήλ) σύμφωνα με τον Walton (1995). Στη συνέχεια θεωρείται ότι εξαπλώθηκε δυτικά, με δεύτερο κέντρο εξέλιξης το Αιγαίο και τρίτο την περιοχή της Τυνησίας και της νότιας Ιταλίας. Στη σημερινή εποχή η ελιά είναι κυρίως διαδεδομένη στη λεκάνη της Μεσογείου, όπου καλλιεργείται το 96 % του συνολικού αριθμού ελαιόδεντρων. Το υπόλοιπο 4 % των ελαιόδεντρων εντοπίζεται σε περιοχές όπου μεταφέρθηκαν μεταγενέστερα ελιές, όπως η Καλιφόρνια, η Αυστραλία, η νότια Αφρική, το Ιράκ, το Ιράν, το Αφγανιστάν και η Κίνα (Walton, 1995). Οι μεγαλύτερες ποσότητες ελαιόκαρπου σε διεθνές επίπεδο παράγονται στην Ισπανία (1.199.090 στρέμματα με συνολική παραγωγή 3.919.800 τόνων το 2005)

FAO (2007). Ακολουθεί η Ιταλία, (1.167.980 στρέμματα και 3.181.300 τόνοι) και η Ελλάδα. (784.500 στρέμματα και συνολική παραγωγή 2.583.190 τόνοι καρπού). Ελαιόδεντρα καλλιεργούνται στη βόρεια Ελλάδα (Σαμοθράκη, Χαλκιδική, Καβάλα, Σέρρες), στην κεντρική Ελλάδα (Μαγνησία, Λάρισα), στη στερεά Ελλάδα (Αιτωλοακαρνανία, Φθιώτιδα, Φωκίδα, Εύβοια, Βοιωτία, Αττική), στα παράλια της Ηπείρου (Θεσπρωτία, Πρέβεζα, Άρτα), στα νησιά του Ιονίου, σε όλο το Αιγαίο (κυρίως σε Λήμνο, Μυτιλήνη, Χίο, Σάμο, Ικαρία, Ρόδο), στην Κρήτη και στην Πελοπόννησο. Στις θερμότερες και ξηρότερες περιοχές τα ελαιόδεντρα καλλιεργούνται κυρίως για παραγωγή ελαιολάδου, ενώ στις δροσερότερες για παραγωγή βρώσιμων ελιών. Οι σημαντικότερες με βάση τις παραγόμενες ποσότητες ελαιολάδου περιοχές είναι η Κρήτη, η Πελοπόννησος, η Λέσβος και τα νησιά του Ιονίου. Σημαντικές ποσότητες βρώσιμων ελιών παράγονται στη Χαλκιδική, τη Μαγνησία, τη Φθιώτιδα, την Αιτωλοακαρνανία και τη Φωκίδα.

Με βάση τα στοιχεία του Walton (1995), στην Ελλάδα καταναλώνονται μεγάλες ποσότητες ελαιολάδου (200.000 τόνοι/ έτος). Σημαντικές ποσότητες καταναλώνονται επίσης στην Ισπανία (374.000 τόνοι/ έτος), την Ιταλία (654.000 τόνοι/ έτος) και πολύ λιγότερες στις υπόλοιπες χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης (συνολική ετήσια κατανάλωση Ε.Ε. 1.301.000 τόνοι). Με βάση τα προηγούμενα στοιχεία αναδεικνύεται η τεράστια σημασία του ελαιολάδου και του ελαιόκαρπου γενικότερα για τη διατροφή των λαών της Μεσογείου κυρίως και για την οικονομία των χωρών όπου καλλιεργείται η ελιά.

### Εχθροί της ελιάς

Η ελιά προσβάλλεται από αρκετά έντομα, ορισμένα από τα οποία μπορούν να προκαλέσουν σημαντικές ζημιές. Το Λεπιδόπτερο *Prays oleae* (Bernard) της οικογένειας Yropomeutidae (κν. πυρηνοτρήτης) προκαλεί ζημιές σε φύλλα, άνθη και καρπούς με διαδοχικές γενιές. Τα κοκκοειδή *Saissetia oleae* (Bernard) (κν.λεκάνιο) της οικογένειας Coccidae και *Pollinia pollini* (Costa) της οικογένειας Asterolecaniidae απομυζούν φυτικούς χυμούς από το φύλλωμα και τους τρυφερούς βλαστούς και επιπλέον εκκρίνουν μελιτώματα που ευνοούν την ανάπτυξη δευτερογενών προσβολών από μύκητες (καπνιά). Τα Ημίπτερα *Euphyllura olivina* (Costa) και *E. phillyrae* (Foerster) (κν. ψύλλες) προσβάλλουν νεαρούς βλαστούς και ανθοταξίες. Άλλα είδη, όπως τα Δίπτερα *Thomasiniana oleisuga* (Targioni), *Dasyneura oleae* (Loew) και *Prolasioptera berlesiana* (Paoli) (κν. κηκιδόμυγες) της

οικογένειας Cecidomyiidae, προσβάλλουν τους καρπούς και συνήθως είναι φορείς του μύκητα *Camarosporium dalmaticum*. Το Θυσανόπτερο *Liothrips oleae* (Costa) της οικογένειας Aelothripidae (κν.θρίπας) προσβάλλει βλαστούς και φύλλα και προκαλεί ανθόρροια, παραμόρφωση και πτώση καρπών. Καρπόπτωση προκαλεί και το Κολεόπτερο *Rhynchites cribripennis* (Desbrochers) της οικογένειας Attelabidae (κν. ρυγχίτης), που προσβάλλει καρπούς. Άλλα είδη, όπως το Κολεόπτερο *Phloeotribus scarabaeoides* (Bernard) της οικογένειας Scolytidae που ανοίγει στοές στη βάση ταξιανθιών και καρποφόρων βλαστών και το Λεπιδόπτερο *Zeuzera pyrina* L. της οικογένειας Cossidae (κν. ζευζέρα), που ανοίγει στοές στον κορμό, προσβάλλουν τα δέντρα ελιάς. Το ημίπτερο *Calocoris tribialis* (Costa) της οικογένειας Miridae (κν. καλόκορις) νύσσει και απομυζά τρυφερή βλάστηση, κυρίως βλαστούς, ανθοφόρους οφθαλμούς και λιγότερο νεαρά φύλλα, προκαλώντας οφθαλμότητα, ανθόπτωση και παραμόρφωση βλαστών και φύλλων. Το Λεπιδόπτερο *Palpita unionalis* (Hübner) της οικογένειας Pyralidae (κν. μαργαρόνια) προσβάλλει την τρυφερή βλάστηση (κορυφές, φύλλα), κλειστά άνθη, ακόμη και πράσινους αναπτυγμένους καρπούς. Ωστόσο, οι σημαντικότερες εντομολογικές προσβολές της ελιάς στην Ελλάδα προκαλούνται από το δάκο (*Bactrocera oleae*), για τον οποίο θα γίνει εκτενής αναφορά.

## 1) ΔΑΚΟΣ ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ

### 1.1) Ταξινόμηση-Προέλευση

Ο δάκος της ελιάς, *Bactrocera oleae* (Gmelin) ταξινομείται στην οικογένεια Tephritidae της τάξης Diptera. Ο δάκος θεωρείται με βάση μελέτες αλληλουχίων μιτοχονδριακού DNA και μικροδορυφορικών δεικτών ότι προέρχεται εξελικτικά από 4 κέντρα. Οι πληθυσμοί από το Πακιστάν φαίνονται γενετικά διαφοροποιημένοι σε σημαντικό βαθμό, ενώ με βάση τη γενετική ομοιομορφία οι υπόλοιποι πληθυσμοί ταξινομούνται σε 2 γενετικές ομάδες, μια από την Βόρεια Αφρική και μια, που περιλαμβάνει τη λεκάνη της Μεσογείου και την Αμερική. Από αυτές, η Β. Αφρική θεωρείται ως η προέλευση του *B. oleae*, λόγω της σημαντικά μεγαλύτερης γενετικής ποικιλομορφίας των μικροδορυφορικών γονιδιακών τόπων σε πληθυσμούς από την Αφρική συγκριτικά με αυτούς της Μεσογείου. Είναι πιθανό επίσης οι πληθυσμοί της Αμερικής να προήλθαν από εισβολή, λόγω μεταφοράς ατόμων από Μεσογειακούς πληθυσμούς (Nardi et al. 2005).



Εικόνα 1. Ενήλικα του *Bactrocera oleae*. Αριστερά αρσενικό, δεξιά θηλυκό (Φωτο: Ν.Καλογιάννης).

## 1.2) Μορφολογία

**Ενήλικα:** Τα ενήλικα του *B. oleae* έχουν μήκος περίπου 5mm και χρωματισμό ανοιχτό ως σκοτεινό καστανό (Εικόνα 1). Το νωτιαίο τμήμα του θώρακα είναι σκοτεινότερο από το κοιλιακό και συνήθως φέρει 3 επιμήκεις σκοτεινές γραμμές. Το scutellum είναι υπόλευκο ή υποκίτρινο και παρατηρούνται επίσης υπόλευκες ή υποκίτρινες κηλίδες στα πλάγια. Οι πτέρυγες είναι διαφανείς, ιριδίζουσιν και φέρουν ένα σκοτεινό στίγμα στο άκρο τους. Στα θηλυκά ο ωοθέτης είναι ευδιάκριτος και έχει μαύρο συνήθως χρώμα.

**Αυγά:** Τα αυγά είναι στενόμακρα, με οξύ τον ένα πόλο τους και έχουν λευκό χρώμα. Η τοποθέτησή τους γίνεται στο μεσοκάρπιο της ελιάς, μέσω οπής που διανοίγει με τον ωοθέτη του το θηλυκό.

**Προνύμφες:** Η προνύμφη έχει λευκό ή ανοιχτό κίτρινο χρώμα και τελικό μήκος 7- 8 mm. Το πρόσθιο μέρος του σώματός της είναι στενότερο από το οπίσθιο. Απουσιάζει η κεφαλική κάψα (χαρακτηριστικό των προνυμφών των Tephritidae) και στο πρόσθιο μέρος της προνύμφης τα στοματικά άγκιστρα και το υπόλοιπο του κεφαλοφαρυγγικού σκελετού έχουν μαύρο χρώμα.

**Νύμφες:** Η νύμφη έχει ελλειψοειδές σχήμα, ανοιχτό καστανό χρώμα και το περίβλημά της προκύπτει από σκληρωτισμό του δερματίου της αναπτυγμένης προνύμφης (Εικόνα 2) (Τζανακάκης και Κατσόγιαννος 2003).



Εικόνα 2. Νύμφες του *Bactrocera oleae* (Φωτο: Ν.Καλογιάννης).

### 1.3) Βιολογία και ζημιές

Το *B. oleae* είναι μονοφάγο και πολυκυκλικό είδος. Ωτοκοί στον καρπό της ελιάς και της αγριελιάς (*Olea oleaster*). Η προνύμφη στον αγρό αναπτύσσεται μόνο στο ζωντανό μεσοκάρπιο. Στις περισσότερες περιοχές της Ελλάδας παρατηρούνται 3-4 γενιές ανά έτος, ενώ αν οι συνθήκες ευνοούν την αναπαραγωγή είναι δυνατή η παράταση της ωτοκίας ως το Νοέμβριο και η εμφάνιση περισσότερων γενιών. Η διαχείμαση πραγματοποιείται στο ενήλικο στάδιο σε προφυλαγμένες θέσεις ή στο νυμφικό στάδιο στο έδαφος, ανάλογα με τις συνθήκες κάθε περιοχής. Είναι δυνατό να συνυπάρχουν όλα τα στάδια του είδους, αλλά σπάνια και αυτό του αυγού, σε περιοχές της Ελλάδας όπου ο χειμώνας είναι ήπιος, όπως για παράδειγμα σε παραλιακές, νότιες και νησιωτικές περιοχές (Τζανακάκης και Κατσόγιαννος 2003). Τα ενήλικα των 2 πρώτων γενιών κάθε έτος εξέρχονται πιθανώς από ασυγκόμιστους καρπούς πάνω στα δέντρα ή στο έδαφος κάτω από αυτά. Όταν υπάρχουν διαθέσιμοι καρποί, η διασπορά των ενηλίκων είναι μικρή, ενώ αν δεν υπάρχουν, τα ενήλικα μπορούν να διανύσουν ορισμένα χιλιόμετρα, αναζητώντας νέους ξενιστές. Αυτό μπορεί να παρατηρηθεί όταν τα ενήλικα έχουν μόλις εξέλθει ή ωριμάζουν (Fletcher 1989).

Οι καρποί της ελιάς ωριμάζουν για μια εκτεταμένη περίοδο, που μπορεί να διαρκέσει από τον Ιούλιο ως τον επόμενο Μάιο ή τις αρχές Ιουνίου. Κατά την έναρξη της περιόδου επομένως, οι καρποί είναι σε αφθονία, αλλά οι συνδυασμένες επιδράσεις της φυσικής καρπόπτωσης και της προσβολής από το δάκο μειώνουν σταδιακά τη διαθεσιμότητα του καρπού. Η κατάσταση αυτή επιταχύνεται στις περισσότερες περιοχές από τη συγκομιδή του καρπού, που αρχίζει συνήθως το Νοέμβριο (Fletcher 1989). Η έναρξη της ωτοκίας στους καρπούς παρατηρείται όταν αυτοί βρίσκονται στο κατάλληλο στάδιο αύξησης (με μέγεθος κοντά στο τελικό) και ανάπτυξης (όταν αρχίζουν να μαλακώνουν). Συνήθως η ωτοκία ξεκινά κατά τον Ιούλιο. Η διάρκεια ζωής των ενηλίκων είναι σχετικά μακρά και τα θηλυκά της ίδιας ή διαφορετικών γενιών ωτοκοούν επί εβδομάδες ή και μήνες, μέχρι τα τέλη φθινοπώρου (ή το αργότερο ως τις αρχές χειμώνα), οπότε οι χαμηλές τιμές θερμοκρασίας θα αποτελέσουν παρεμποδιστικό παράγοντα για την ωτοκία (Fletcher 1989).

Λίγα αυγά μπορούν να ωριμάσουν στις ωοθήκες θηλυκών χωρίς πρωτεϊνούχο γεύμα, αλλά ο χυμός της ελιάς και πιθανώς και μικροοργανισμοί της φυλλικής επιφάνειας είναι σημαντικές πρωτεϊνούχες τροφές (Fletcher & Karatos 1983; Tsiropoulos 1983). Τα αυγά εισάγονται μεμονωμένα στον ελαιόκαρπο που ωριμάζει

(στο μεσοκάρπιο), μέσω της οπής ωοτοκίας που διανοίγεται από τον ωοθέτη του θηλυκού. Στο χυμό της ελιάς που εξέρχεται από το νύγμα υπάρχουν ουσίες αποτρεπτικές για νέα ωοτοκία σε ήδη προσβεβλημένους καρπούς. Είναι πιθανό ότι τέτοιες ουσίες είναι η ακετοφαινόνη, η βενζαλδεϋδη, ορισμένες λιποδιαλυτές, πτητικές ενώσεις με τη μορφή ατμών και από τις υδατοδιαλυτές οι ορθοδιφαινόλες και η πυροκατεχόλη (Girolami et al. 1981). Αν ο πληθυσμός του εντόμου είναι μεγάλος ή οι καρποί λίγοι, είναι δυνατό να εισαχθούν και περισσότερα από ένα αυγά σε ένα καρπό. Ακόμη και αν αποτεθούν περισσότερα από 1 αυγά, κατά κανόνα μόνο μια προνύμφη επιβιώνει, λόγω ανταγωνισμού μεταξύ προνυμφών στο μεσοκάρπιο (Fletcher 1989).

Οι προνύμφες ορύσσουν στοές στο μεσοκάρπιο, τρέφονται και όταν συμπληρώσουν την ανάπτυξή τους εισέρχονται στο νυμφικό στάδιο. Η θέση νύμφωσης είναι μέσα στον καρπό κατά τα τέλη καλοκαιριού ως τις αρχές φθινοπώρου ή στο έδαφος, κατά το χειμώνα και την άνοιξη, σε χαμηλό βάθος (Karatos & Fletcher 1984). Στην περιοχή της Μεσογείου, η πλειοψηφία του πληθυσμού διαχειμάζει στο νυμφικό στάδιο στο έδαφος, αν και παρατηρούνται κανονικά ρυθμοί θνησιμότητας 70-80 % (Karatos & Fletcher 1984). Το επίπεδο ωριμότητας του καρπού είναι ο καθοριστικός παράγοντας για την επιλογή της θέσης νύμφωσης, καθώς όταν ο καρπός έχει φτάσει στην ωρίμανσή του, η αναπτυγμένη προνύμφη τον εγκαταλείπει για να νυμφωθεί στο έδαφος.

Οι νύμφες δεν εισέρχονται σε διάπαυση και ο χρόνος ανάπτυξης καθορίζεται από τη θερμοκρασία εδάφους. Τα ενήλικα εισέρχονται σε προαιρετική αναπαραγωγική διάπαυση τους χειμερινούς και τους θερμούς καλοκαιρινούς μήνες, όταν δεν υπάρχουν διαθέσιμοι καρποί και/ ή οι υψηλές θερμοκρασίες δεν ευνοούν την αναπαραγωγή (Fletcher et al. 1978).

Η ολοκλήρωση του βιολογικού κύκλου του *B. oleae* συνήθως απαιτεί χρονικό διάστημα ενός περίπου μήνα, όταν οι κλιματικές συνθήκες είναι ευνοϊκές. Το φθινόπωρο οι πληθυσμοί του δάκου αυξάνονται, ιδιαίτερα όταν παρατηρούνται ευνοϊκές συνθήκες υγρασίας και θερμοκρασίας για την αναπαραγωγή. Αντίθετα, η αναπαραγωγή του εντόμου δεν ευνοείται κατά τη θερινή περίοδο, όταν οι τιμές θερμοκρασίας είναι υψηλές και υγρασίας χαμηλές (Fletcher 1989).

Τον περισσότερο καιρό τα ενήλικα παραμένουν σε στενή σχέση με τα ελαιόδεντρα, αν και έχει παρατηρηθεί ότι τρέφονται σε ώριμα σύκα και άλλους καρπούς που δεν αποτελούν ξενιστές των προνυμφών τους (Katsoyannos 1983). Η

διάρκεια ζωής των ενηλίκων κυμαίνεται με βάση την περίοδο του έτους, αλλά κατά τα τέλη καλοκαιριού με αρχές φθινοπώρου, όταν οι καρποί είναι άφθονοι και τα επίπεδα δραστηριότητας υψηλά, είναι πιθανό ότι είναι 6-8 εβδομάδες. Η δυνητική γονιμότητα φαίνεται ότι είναι 300 αυγά ανά θηλυκό (Fletcher 1989).

#### **1.4) Ζημιές- όρια ανεκτής προσβολής**

Η προνύμφη του δάκου χρησιμοποιεί τις πρωτεΐνες του μεσοκαρπίου της ελιάς για τη θρέψη της όταν ο καρπός είναι ακόμη πράσινος, με τη βοήθεια συμβιοτικών βακτηρίων που ζουν στον πεπτικό της σωλήνα. Τα βακτήρια βρίσκονται στον ωοθήτη του θηλυκού. Κατά την ωοτοκία, επαλείφονται στο αυγό και στη συνέχεια εισέρχονται κατά την εκκόλαψη του και στον πεπτικό σωλήνα της προνύμφης.

Οι ζημιές του δάκου οφείλονται στην καρπόπτωση πριν τη συγκομιδή που προκαλείται από την προσβολή, στην κατανάλωση ενός μέρους του μεσοκαρπίου από την προνύμφη και στην ποιοτική υποβάθμιση του προϊόντος (βρώσιμη ελιά και ελαιόλαδο).

Η καρπόπτωση οφείλεται στη δράση του τελευταίου προνυμφικού σταδίου, κυρίως όμως στην ύπαρξη οπής εξόδου της προνύμφης στον καρπό. Στην Κρήτη έχει βρεθεί ότι η συνολική μάζα καρπού που καταναλώνεται από μια προνύμφη για την ανάπτυξή της κυμαίνεται μεταξύ 50 και 150 mg. Η απώλεια αυτή αντιστοιχεί σε απώλεια ελαιόλαδου κυμαινόμενη μεταξύ 3 και 20 % της παραγωγής, για μικρόκαρπες ποικιλίες (Μιχελάκης κ.α. 2001). Για να υπολογιστεί με ακρίβεια όμως η προκαλούμενη ζημιά, σε αυτήν θα πρέπει να συνυπολογιστούν και τα ποσοστά της που αναπληρώνονται από το δέντρο και μπορούν να φτάνουν το 10 % για προσβολές που γίνονται τον Αύγουστο και το 5 % για προσβολές του Σεπτεμβρίου. Η αναπλήρωση της ζημιάς γίνεται από το δέντρο τόσο με αύξηση της μάζας των υπόλοιπων καρπών, όσο και του βαθμού της ελαιοπεριεκτικότητάς τους (Neuenschwander et al. 1980).

Η προσβολή από το δάκο και ιδιαίτερα η αποθήκευση των καρπών πριν την έκθλιψή τους στο ελαιοτριβείο επιδρούν αρνητικά και αθροιστικά στην ποιότητα του ελαιόλαδου. Έχει βρεθεί ότι ο λογάριθμος της οξύτητας αυξάνεται ανάλογα με την αύξηση του ποσοστού καρπών που φέρουν οπές εξόδου των ενηλίκων και προορίζονται για παραγωγή ελαιόλαδου. Συγκεκριμένα, έχει βρεθεί ότι η οξύτητα του λαδιού που προέρχεται από ελιές που στο σύνολό τους έχουν οπές εξόδου δάκου (100 % ποσοστό προσβολής ελαιόκαρπου) είναι τετραπλάσια και διπλάσια της τιμής

οξύτητας λαδιού από απρόσβλητους καρπούς των ποικιλιών Τσουνάτη και Κορωνέικη αντίστοιχα (Μιχελάκης κ.α. 2001).

Η αύξηση της οξύτητας είναι σημαντικότερη όμως εξαιτίας της αποθήκευσης του ελαιόκαρπου πριν την επεξεργασία του. Συγκεκριμένα, έχει βρεθεί ότι η οξύτητα τριπλασιάζεται για διάρκεια αποθήκευσης 2 εβδομάδων και εξαπλασιάζεται ή και δωδεκαπλασιάζεται ακόμη, για διάρκεια αποθήκευσης 4 εβδομάδων, ανάλογα με το ποσοστό προσβολής του καρπού από το δάκο (Μιχελάκης κ.α. 2001).

Από την οπή ωοτοκίας του δάκου εισέρχεται και εγκαθίσταται στον καρπό ο μύκητας *Camarosporium dalmaticum* (Zachos & Tzavella-Klonari), το παθογόνο αίτιο της ασθένειας με το κοινό όνομα «βούλα». Ανάλογα με το ποσοστό σχετικής υγρασίας της ατμόσφαιρας, παρατηρείται η ξηρή ή η υγρή σήψη, που είναι γνωστές με τα κοινά ονόματα «ξεροβούλα» και «σαπιοβούλα». Η ασθένεια προκαλεί ποιοτική υποβάθμιση στον καρπό και ιδιαίτερα όταν προκαλεί την υγρή σήψη οι ζημιές είναι σημαντικές στην παραγωγή. Ο μύκητας μπορεί να εισέλθει στον καρπό και από άλλους τραυματισμούς, αλλά το νύγμα του δάκου είναι η συνηθέστερη αιτία προσβολής από το μύκητα. Στη θέση ωοτοκίας του δάκου συχνά παρατηρείται και ωοτοκία του εντόμου *Prolasioptera berlesiana* (Paoli) (Diptera:Cecidomyidae), το οποίο συντελεί στην εξάπλωση και πιθανότατα μεταφέρει το παθογόνο στον καρπό (Τζανακάκης και Κατσόγιαννος 2003).

## 2) ΚΑΤΑΠΟΛΕΜΗΣΗ ΤΟΥ ΔΑΚΟΥ

### 2.1) Εισαγωγικά στοιχεία

Η σοβαρότητα της ζημιάς που προκαλείται από το δάκο στην ελαιοκαλλιέργεια απαιτεί τη διάθεση σε ετήσια βάση μεγάλων χρηματικών ποσών για την καταπολέμησή του, καθώς και για έρευνες σχετικά με ανάπτυξη νέων και τη βελτίωση υπαρχουσών μεθόδων καταπολέμησης του εντόμου. Έχουν δοκιμαστεί διάφορες μέθοδοι, όπως η βιολογική και η χημική καταπολέμηση. Για το σχεδιασμό των μεθόδων αντιμετώπισης είναι απαραίτητη η παρακολούθηση των πληθυσμών του δάκου και η εκτίμηση των ποσοστών προσβολής του καρπού.

### 2.2) Παρακολούθηση του πληθυσμού

Για την παρακολούθηση του πληθυσμού των ενηλίκων του δάκου χρησιμοποιούνται κυρίως οι γυάλινες παγίδες τύπου McPhail, οι φερομονικές και οι χρωματικές παγίδες. Οι παγίδες τύπου McPhail αναρτώνται στο εσωτερικό της κόμης



του δέντρου και ελέγχονται ανά 5-7 ημέρες. Περιέχουν υδρολυμένη πρωτεΐνη, είναι αποτελεσματικές σε ακτίνα δράσης 20 μέτρων περίπου, ενώ σε ακτίνα 40 μέτρων η αποτελεσματικότητά τους μειώνεται πολύ (Μιχελάκης κ.α. 2001). Οι παγίδες περιέχουν ως ελκυστικό υδατικό διάλυμα φωσφορικού ή θειϊκού αμμωνίου 2 %. Πειραματικά έχει χρησιμοποιηθεί και διάλυμα 4 % υδρολυμένης πρωτεΐνης και 1,5 % βόρακα (Τζανακάκης και Κατσόγιαννος 2003). Η ελκυστικότητα της παγίδας αυξάνεται με τη μείωση της υγρασίας και την αύξηση της θερμοκρασίας. Μεταξύ Μαΐου και Αυγούστου η ελκυστικότητα της παγίδας αυξάνεται κατά 30-40 φορές και ελαττώνεται από το Σεπτέμβριο και αργότερα (Μιχελάκης κ.α. 2001). Καθ' όλη τη διάρκεια του έτους, οι συγκεκριμένες παγίδες προσελκύουν σε μικρότερο βαθμό νεαρά θηλυκά άτομα, αν και κατά τη διάρκεια του Μαΐου προσελκύουν τα θηλυκά σε μεγαλύτερη αναλογία. Η αναλογία θηλυκών προς αρσενικά είναι περίπου 1:1 (με υπεροχή των αρσενικών) και στη Θάσο βρέθηκε ότι κυμαίνεται μεταξύ 0,65-0,80 (Μιχελάκης κ.α. 2001).

Η φερομονική παγίδα χρησιμοποιείται για την προσέλκυση των αρσενικών του είδους. Στη σημερινή της μορφή χρησιμοποιείται σε συσκευασία φιαλιδίου πολυαιθυλενίου βραδείας απελευθέρωσης του κύριου συνθετικού της φερομόνης του δάκου, 1,7-διοξασπιρο-(5,5)-ενδεκάνιου. Χρησιμοποιείται συνήθως ποσότητα 25 mg φερομόνης ανά φιαλίδιο και ανά παγίδα. Η ακτίνα δράσης αγγίζει τα 80 m και η αποτελεσματικότητά της είναι ικανοποιητική για χρονικό διάστημα μεγαλύτερο των 4 μηνών (Μιχελάκης κ.α. 2001). Προσέλκυση των σεξουαλικά ώριμων αρσενικών παρατηρείται μόνο κατά την περίοδο της σεξουαλικής τους δραστηριότητας, επομένως οι παγίδες είναι αποτελεσματικότερες νωρίς την άνοιξη, αργά το καλοκαίρι και το φθινόπωρο (Haniotakis et al. 1981).

Οι χρωματικές παγίδες προσελκύουν τα ενήλικα του δάκου από κοντινές αποστάσεις (πρακτικά από το εσωτερικό του δέντρου). Οι χρωματικές παγίδες δεν παρουσιάζουν μεγάλη ελκυστικότητα και δε θεωρούνται κατάλληλες για παρακολούθηση πληθυσμών ή μαζική παγίδευση του δάκου, καθώς εκτός από τη μικρή ακτίνα δράσης που τις χαρακτηρίζει, προσελκύουν εκτός από το δάκο και ωφέλιμα έντομα. Οι αριθμοί συλληφθέντων ατόμων στις παγίδες McPhail είναι 17 φορές μεγαλύτεροι από αυτούς στις κίτρινες παγίδες. Οι κίτρινες παγίδες σε συνδυασμό με αμμωνιακό ελκυστικό ή ελκυστικό φερομόνης φύλου συλλαμβάνουν αντίστοιχο με τις παγίδες McPhail αριθμό ατόμων. Ως προς τις συλλήψεις με βάση το φύλο, έχει βρεθεί ότι οι φερομονικές παγίδες προσελκύουν σχεδόν διπλάσιο αριθμό

αρσενικών από τις McPhail, ενώ αντίθετα οι McPhail ελκύουν σχεδόν πενταπλάσιο αριθμό θηλυκών από τις φερομονικές (Μιχελάκης κ.α. 2001).

### 2.3) Δειγματοληψίες δάκου

Για να υπολογιστεί το ποσοστό προσβολής από δάκο, διεξάγονται δειγματοληψίες καρπών από τα δέντρα, στο τέλος κάθε μήνα (Ιούλιος, Αύγουστος, Σεπτέμβριος, Οκτώβριος) και μια τελευταία δειγματοληψία στα μέσα Νοεμβρίου. Οι καρποί με νύγματα δάκου εξετάζονται στο στερεομικροσκόπιο και γίνεται καταγραφή σταδίων του εντόμου (μη εκκολαφθέντα αυγά, προνύμφες 1<sup>ου</sup>, 2<sup>ου</sup> και 3<sup>ου</sup> σταδίου, νεκρές ή ζωντανές), νύμφες και οπές εξόδου τελείων. Με βάση αυτά τα στοιχεία, εκτιμάται η «γόνιμη ή ζωντανή προσβολή» (το σύνολο των ζωντανών σταδίων του εντόμου, δηλαδή αυγά, ζωντανές προνύμφες και νύμφες) και η «συνολική προσβολή», δηλαδή το σύνολο σταδίων του εντόμου (αυγά, ζωντανές και νεκρές προνύμφες ή προνυμφικές στοές, νύμφες και/ ή οπές εξόδου). Οι δειγματοληψίες καρπών χρησιμεύουν για τον προσδιορισμό του σταδίου των προνυμφικών προσβολών, του επιπέδου ζημιάς στον καρπό, καθώς και για την παρακολούθηση των πληθυσμών του δάκου (Μιχελάκης κ.α. 2001).

### 2.4) Χημική καταπολέμηση

Η χημική μέθοδος καταπολέμησης είναι η κυριότερη και εφαρμόζεται υπό την εποπτεία του κράτους ή και από τους παραγωγούς. Έχουν χρησιμοποιηθεί κατά καιρούς αρκετά εντομοκτόνα, ωστόσο η καταπολέμηση βασίστηκε επί πολλές δεκαετίες στα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα, κυρίως στα dimethoate και fenthion και λιγότερο στα formothion, malathion και phosphamidon. Τα περισσότερα από αυτά είναι διασυστηματικά, επομένως μπορούν να εισέρχονται στον καρπό και να θανατώνουν την προνύμφη, όταν χρησιμοποιούνται από ορισμένες δόσεις και πάνω. Είναι δυνατό να παρουσιαστεί φυτοτοξικότητα σε ορισμένες ποικιλίες ελιάς όταν γίνεται ψεκασμός πλήρους κάλυψης των δέντρων. Η φυτοτοξικότητα μπορεί να οφείλεται είτε στη δραστική ουσία ή στο διαλύτη του γαλακτωματοποιήσιμου σκευάσματος (συνήθης μορφή τυποποίησης των προαναφερθέντων εντομοκτόνων). Η χημική μέθοδος καταπολέμησης εφαρμόζεται είτε με προληπτικό ή με κατασταλτικό (ή θεραπευτικό) χαρακτήρα (Τζανακάκης και Κατσόγιαννος, 2003).

Τελευταία, εκτός από τα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα σε δολωματικούς ψεκασμούς χρησιμοποιείται και το πυρεθροειδές alpha-cypermethrin, μόνο όμως ως

τα τέλη Ιουλίου, με βάση τις οδηγίες του Υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων. Σε πειραματικό επίπεδο επίσης βρίσκεται η χρησιμοποίηση και του σπινουσινειδούς spinosad στην Κρήτη (Βαρίκου, προσωπική επικοινωνία).

#### **2.4.1) Προληπτική μέθοδος**

Η προληπτική μέθοδος βασίζεται στην εκτέλεση δολωματικών εντομοκτόνων ψεκασμών, υπό την εποπτεία των Διευθύνσεων Αγροτικής Ανάπτυξης των Νομαρχιακών Αυτοδιοικήσεων σε ελαιοπαραγωγικούς νομούς. Χρησιμοποιείται για τον ψεκασμό διάλυμα, που περιέχει εντομοκτόνο σε συνδυασμό με ελκυστική για το έντομο ουσία, η οποία λειτουργεί ως φαγοδιεγερτικός παράγοντας. Η βρώση σταγονιδίων του ψεκαστικού μίγματος προκαλεί θανάτωση στα ενήλικα, πριν αυτά προλάβουν να ωοτοκήσουν στους καρπούς της ελιάς.

Ψεκασμοί σε κάποια περιοχή διεξάγονται μόνο εφόσον το ποσοστό καρποφορίας κατά την έναρξη της ελαιοκομικής περιόδου είναι μεγαλύτερο από 25 % και 20 % της πλήρους σοδειάς, για ποικιλίες ελαιοποιήσιμων ή βρώσιμων ελιών αντίστοιχα. Οι δολωματικοί ψεκασμοί διεξάγονται με επινώτιους ψεκαστήρες από το έδαφος. Για την παρασκευή του ψεκαστικού υγρού χρησιμοποιείται κατάλληλο οργανοφωσφορικό (dimethoate, fenthion) σε συγκέντρωση 0,3 % ή πυρεθροειδές εντομοκτόνο (alpha-cypermethrin) σε συγκέντρωση 0,3 ‰, μαζί με κατάλληλο ελκυστικό προϊόν, που προστίθεται στο διάλυμα σε αναλογία 2 % ή εφόσον ο πληθυσμός δάκου είναι μεγάλος 3 %. Σε ελαιώνες με κανονική πυκνότητα δέντρων, ο ψεκασμός καλύπτει ένα μέρος της κόμης ενός από τρία γειτονικά δέντρα. Το ψεκαστικό διάλυμα εφαρμόζεται με μορφή χοντρών σταγονιδίων και σε ποσότητα 300 cm<sup>3</sup> περίπου ανά δέντρο (Τζανακάκης και Κατσόγιαννος 2003).

Η διεξαγωγή του πρώτου δολωματικού ψεκασμού καθορίζεται με βάση ορισμένα κριτήρια, όπως η πυκνότητα ενήλικων ατόμων δάκου, η αναλογία φύλου μεταξύ των ατόμων που συλλέγονται, η παρουσία ώριμων ωαρίων στα θηλυκά, η καταλληλότητα των καρπών για ωοτοκία και οι καιρικές συνθήκες. Με αναλογία αρσενικών προς θηλυκά περίπου 1:1, ώριμα ωάρια σε ποσοστό 5 % των θηλυκών που συλλαμβάνονται με παγίδες, σημαντική πυκνότητα πληθυσμού (ψεκασμός διεξάγεται αν συλλαμβάνονται 5-20 άτομα ανά παγίδα και ανά πενήνήμερο, ανάλογα με την ποικιλία της ελιάς και το ποσοστό καρποφορίας των δέντρων) και ύπαρξη καρπού με ξυλοποιημένο μεσοκάρπιο, αποφασίζεται ο 1<sup>ος</sup> δολωματικός ψεκασμός. Αυτός συνήθως πραγματοποιείται από τα μέσα Ιουνίου ως τις αρχές Ιουλίου, είναι γενικός,

καθώς εφαρμόζεται σε ολόκληρη την περιοχή και ολοκληρώνεται σε χρονικό διάστημα 7-10 ημερών (Τζανακάκης και Κατσόγιαννος 2003).

Για την παρακολούθηση της πορείας των πληθυσμών του δάκου χρησιμοποιούνται παγίδες τύπου McPhail, για σύλληψη ατόμων και των δύο φύλων. Η πυκνότητα ανάρτησης είναι συνήθως 1 παγίδα ανά 1000 δέντρα περίπου. Οι παγίδες ελέγχονται και το ελκυστικό υγρό αντικαθίσταται με νέο ανά 5 ημέρες. Η καταμέτρηση των αρσενικών και θηλυκών ατόμων που συνελήφθησαν από την παγίδα και ο έλεγχος των ωοθηκών των θηλυκών, για να διαπιστωθεί η κατάσταση ωριμότητας των ωαρίων τους με εξέτασή τους στο στερεοσκόπιο, γίνονται από τον τομέαρχη γεωπόνου. Κατά τη διάρκεια της περιόδου κατά την οποία είναι δυνατή η προσβολή των καρπών από το δάκο, είναι δυνατό να γίνουν και άλλοι γενικοί ή τοπικοί ψεκασμοί, πέρα από τον πρώτο, γενικό ψεκασμό. Για τη λήψη απόφασης για την εφαρμογή τους, λαμβάνονται υπόψη ο αριθμός συλλήψεων ενηλίκων στις παγίδες και το ποσοστό προσβολής των καρπών, το οποίο προσδιορίζεται με τακτικές δειγματοληψίες καρπών ελιάς. Είναι απαραίτητη η τήρηση των χρονικών διαστημάτων μεταξύ τελευταίας επέμβασης και συγκομιδής, για την αποφυγή ύπαρξης ανεπιθύμητων υπολειμμάτων εντομοκτόνων στον καρπό και το ελαιόλαδο. Για το σκοπό αυτό, ο τελευταίος ψεκασμός με fenthion έπρεπε να διεξάγεται τουλάχιστο 20 ημέρες πριν (το fenthion αποσύρθηκε) και με dimethoate τουλάχιστο 15 ημέρες πριν την έναρξη συγκομιδής του καρπού (Τζανακάκης και Κατσόγιαννος 2003). Συνήθως όμως ο τελευταίος ψεκασμός διεξάγεται περίπου 30 ημέρες πριν την έναρξη συλλογής του καρπού (Ζιώγας 1996). Για την αποφυγή παρουσίας υπολειμμάτων στις ελιές και το ελαιόλαδο, επιλέγεται για τον τελευταίο ψεκασμό το dimethoate. Το dimethoate είναι και υδατοδιαλυτό, επομένως απομακρύνεται σε σημαντικό μέρος της εφαρμοζόμενης ποσότητας με την υδάτινη φάση κατά την επεξεργασία των ελιών στα ελαιοτριβεία και αποδομείται γρηγορότερα από το fenthion, που είναι μόνο λιποδιαλυτό (Τζανακάκης και Κατσόγιαννος 2003).

#### **2.4.2) Θεραπευτική ή κατασταλτική μέθοδος**

Η θεραπευτική μέθοδος εφαρμόζεται σε επίπεδο μεμονωμένων παραγωγών. Η κάλυψη της κόμης των δέντρων σε αυτήν την περίπτωση είναι πλήρης, με ψεκαστήρες μεγάλου όγκου από το έδαφος, σχεδόν μέχρι απορροής του ψεκαστικού υγρού. Η ποσότητα του ψεκαστικού υγρού που χρησιμοποιείται κυμαίνεται μεταξύ 10-25 λίτρων ανά δέντρο μέσης ανάπτυξης (Τζανακάκης και Κατσόγιαννος 2003).

Εναλλακτικά, μπορούν να χρησιμοποιηθούν και επινώτιοι ψεκαστήρες μικρού όγκου, οπότε η εφαρμοζόμενη ποσότητα ψεκαστικού υγρού κυμαίνεται μεταξύ 1 και 1,5 λίτρου ανά δέντρο. Στην πρώτη περίπτωση στο ψεκαστικό υγρό περιέχεται οργανοφωσφορικό εντομοκτόνο σε συγκέντρωση 0,03 % και στη δεύτερη 0,3 %. Απόφαση ψεκασμού λαμβάνεται όταν το ποσοστό της λεγόμενης «γόνιμης προσβολής» (που εκφράζει τα αυγά, τις ζωντανές προνύμφες, τις νύμφες και τις προνυμφικές στοές) είναι 5 % για ελαιοποιήσιμες ή το 2 % για βρώσιμες ελιές, σύμφωνα με το Ζιώγα (1996). Έχουν προταθεί και άλλα ποσοστά γόνιμης δακοπροσβολής ως πυκνότητες επέμβασης, όπως για παράδειγμα 2-4 % σε ελαιοποιήσιμες ποικιλίες ή ακόμη χαμηλότερα για βρώσιμες (Μπρούμας 1994). Σε πολλές περιοχές είναι αναγκαίοι 2-4 θεραπευτικοί ψεκασμοί για την προστασία της παραγωγής (Τζανακάκης και Κατσόγιαννος 2003). Είναι αναγκαία η τήρηση των καθορισμένων ελάχιστων χρονικών ορίων μεταξύ τελευταίας επέμβασης και συγκομιδής για την αποφυγή παρουσίας ανεπιθύμητων υπολειμμάτων εντομοκτόνων στο ελαιόλαδο.

Με τη θεραπευτική μέθοδο όμως προκαλείται θανάτωση πολλών ωφέλιμων εντόμων, σε βαθμό μεγαλύτερο από αυτόν που προκαλεί η προληπτική μέθοδος, με επακόλουθο την έξαρση πληθυσμών κοκκοειδών και άλλων επιζήμιων για την ελιά εντόμων (Τζανακάκης και Κατσόγιαννος 2003) (π.χ. *Saissetia oleae*, *Aspidiotus nerii*, *Prays oleae*).

## 2.5) Πυρεθροειδή εντομοκτόνα

Τα πυρεθροειδή εντομοκτόνα αναπτύχθηκαν με σκοπό να είναι αποτελεσματικότερα και περισσότερο εξειδικευμένα από το φυσικό πύρεθρο έναντι των εντόμων (Sogorb & Vilanova 2002). Τα μόριά τους είναι εστέρες, αποτελούμενοι από μια χαρακτηριστική ομάδα αλκοόλης και μια οξέος και διασπώνται μέσω βιοαποικοδόμησης από εστεράσες. Η μονάδα οξέος συνήθως περιέχει ένα δακτύλιο διμεθυλ-κυκλοπροπανίου με μια μεταβλητή ρίζα, που αντιστοιχεί στο χρυσανθεμικό οξύ, που παρατηρείται στις πυρεθρίνες τύπου I και το πυρεθρικό οξύ, που παρατηρείται στις πυρεθρίνες τύπου II. Μέσα στη χαρακτηριστική ομάδα αλκοόλης, τα περισσότερα συνθετικά πυρεθροειδή περιέχουν αρωματικούς δακτυλίους και ορισμένες φορές μια κυανομάδα. Υπάρχουν περίπου 10000 διαφορετικές δομές πυρεθροειδών και ορισμένες από αυτές διαφέρουν από τη δομή των πυρεθρινών, καθώς στερούνται το δακτύλιο διμεθυλ-κυκλοπροπανίου (Sogorb & Vilanova 2002).

Οι δίοδοι νατρίου είναι μικρές οπές, από τις οποίες ιόντα  $\text{Na}^+$  μπαίνουν στο νευρικό άξονα, προκαλώντας τη διέγερσή του. Το δυναμικό των διόδων  $\text{Na}^+$  σε κατάσταση ηρεμίας έχει αρνητικές τιμές (της τάξης μερικών mV). Η είσοδος ιόντων  $\text{Na}^+$  προκαλεί αύξηση της τιμής δυναμικού (σε θετικές τιμές) και αποπόλωση της μεμβράνης του νευρώνα. Αφού η τιμή δυναμικού πάρει τη μέγιστη τιμή της, ακολουθεί έξοδος ιόντων  $\text{K}^+$  και πτώση δυναμικού. Ακολουθεί ενεργή μεταφορά ιόντων, για αποκατάσταση ισορροπίας και τελικά το μετα-δυναμικό λαμβάνει αρνητικές τιμές. Το ερέθισμα μεταδίδεται με αυτόν τον τρόπο κατά μήκος του νευρικού άξονα.

Η δράση του φυσικού πύρεθρου (ακατέργαστες πυρεθρίνες) και του allethrin (το πρώτο πυρεθροειδές) ήταν παρόμοιες με αυτήν του DDT, καθώς προκαλούσαν αύξηση του αποπολωτικού μετα-δυναμικού, με συνέπεια επαναλαμβανόμενες αποφορτίσεις, ακολουθούμενες από παρεμπόδιση της αγωγιμότητας του νευράξονα. Αυτό διαπιστώθηκε σε γιγάντιους νευρικούς άξονες κατσαρίδων (Scott & Dong 1994).

Ο μηχανισμός δράσης των πυρεθροειδών είναι η παρεμπόδιση της φυσιολογικής λειτουργίας των διόδων  $\text{Na}^+$  σε νευρώνες εντόμων. Παρουσιάζουν μεγάλη συνάφεια προς τις διόδους  $\text{Na}^+$ , στις οποίες δρουν σε μια μοναδική θέση δέσμευσης, καθώς δεν παρεμποδίζουν τη δέσμευση άλλων νευροτοξινών ([3H] τετροδοτοξίνη, [125I] τοξίνη 2 της *Anemonia sulcata*, [125I] τοξίνη γ του *Tityus serrulatus*, στις θέσεις δέσμευσης νευροτοξινών 1,3 και 4 αντίστοιχα) (Scott & Dong 1994). Η υπερδιέγερση είναι η βασική τοξική επίδραση των πυρεθροειδών, καθώς αρκεί να τροποποιηθεί μόνο το 1 % του συνολικού αριθμού διόδων  $\text{Na}^+$  για να προκληθεί (Sogorb & Vilanova 2002).

Τα πυρεθροειδή τύπου I (cismethrin, permethrin) φαίνεται ότι δεσμεύονται σε απενεργοποιημένες ή βρισκόμενες σε κατάσταση ηρεμίας διόδους  $\text{Na}^+$ , μετατοπίζοντας την εξάρτηση του δυναμικού ενεργοποίησης του νευρώνα σε περισσότερο αρνητικές τιμές και προκαλώντας ρεύμα  $\text{Na}^+$  που ενεργοποιεί αργά τις διόδους. Αυτά τα ρεύματα προκαλούνται μετά τον παλμό αποπόλωσης του νευρώνα και φθίνουν με χρονικές σταθερές πρώτης τάξης (γραμμικά). Αντίθετα, τα πυρεθροειδή τύπου II ([1R, cis, αS]-cypermethrin, deltamethrin) φαίνεται ότι δεσμεύονται εκλεκτικά σε ενεργοποιημένες διόδους  $\text{Na}^+$ . Τα ρεύματα  $\text{Na}^+$  που προκαλούνται από αυτές τις ενώσεις είναι πιο έμμονα από αυτά που προκαλούνται από το permethrin και το cismethrin. Το ρεύμα που προκαλεί το deltamethrin είναι

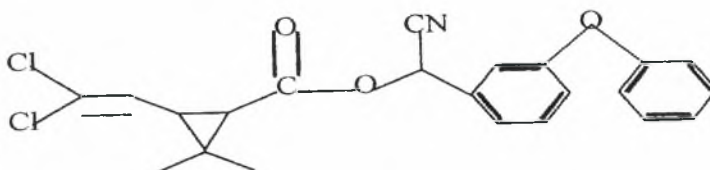
μάλλον διφασικό παρά μονοφασικό, κάτι που δείχνει ότι υπάρχουν 2 θέσεις δέσμευσης, με διαφορετικές συνάψεις για τη συγκεκριμένη ένωση, σε διόδους  $\text{Na}^+$  εντόμων (Soderlund & Knipple 2003).

Έχουν υποτεθεί επιδράσεις των πυρεθροειδών και σε άλλες θέσεις. Για παράδειγμα, επιδράσεις έχουν αναφερθεί στους υποδοχείς GABA/ ιονοφόρο σύμπλεγμα, στην ΑΤΡάση  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ , στην ΑΤΡάση  $\text{Ca}^{2+}$ , στην ανταλλαγή  $\text{Na}/ \text{Ca}$ , στην καλμοδουλίνη, στη φωσφορυλίωση της πρωτεϊνικής κινάσης σερίνης/θρεονίνης, στην πρωτεϊνική φωσφορυλίωση της συναψίνης I, στην εξαρτώμενη από την καλμοδουλίνη πρωτεϊνική κινάση και στη φωσφορυλίωση της ευαίσθητης στο δυναμικό πρωτεΐνης της διόδου  $\text{Na}^+$ . Όλες όμως δεν θεωρούνται ως κύριος μηχανισμός δράσης, καθώς στερούνται σαφή φυσιολογική συνάφεια (Scott & Dong 1994).

Οι κυριότεροι μεταβολικοί δρόμοι για την αποτοξίκωση των πυρεθροειδών είναι η οξείδωση και η υδρόλυση. Από αυτές, η υδρόλυση των εστερικών δεσμών από τις καρβοξυλεστεράσες αποτελεί την αποτελεσματικότερη αντίδραση αποτοξίκωσης (Sogorb & Vilanova 2002), ενώ και η οξείδωση μέσω της μονοοξυγενάσης P450 μπορεί να είναι ο σημαντικότερος μηχανισμός αποτοξίκωσης (Scott 1999, Scott et al. 1997).

## 2.6 Alpha-cypermethrin

Το πυρεθροειδές alpha-cypermethrin ( $\text{C}_{22}\text{H}_{19}\text{Cl}_2\text{NO}_3$ , Συντακτικός τύπος Σχήμα 1) είναι μη διασυστηματικό εντομοκτόνο επαφής και στομάχου, με αντιτροφική δράση και σημαντική υπολειμματική δράση στις καλλιέργειες εφαρμογής του. Χρησιμοποιείται για καταπολέμηση Λεπιδοπτέρων, Κολεοπτέρων, Διπτέρων, Ημιπτέρων σε οπωροφόρα, αμπέλι, λαχανικά, πατάτες, σιτηρά και καλλωπιστικά. Επίσης, χρησιμοποιείται και στη δημόσια υγεία και κατά εκτοπαρασίτων σε ζώα. Δεν προκαλεί φυτοτοξικότητα.



Σχήμα 1. Συντακτικός τύπος του μορίου του cypermethrin

Κατατάσσεται στην κατηγορία τοξικότητας II, με βάση το WHO και το EPA. Η οξεία τοξικότητα από δέρματος είναι >4920 (επίμυες) και >2460 mg/ kg (κουνέλια). Ερεθίζει το δέρμα και τα μάτια και προκαλεί ευαισθητοποίηση στο δέρμα. Το NOEL (2χρ.) βρέθηκε ίσο με 5 και 7,5 mg/ kg τροφής για σκύλους και επίμυες αντίστοιχα και το ADI (JMPR) 0,05 mg/ kg b.w./ ημέρα (Λέντζα-Ρίζου 2000). Σε εργαστηριακά πειράματα βρέθηκε πολύ τοξικό για τις μέλισσες, αλλά στον αγρό στη συνιστώμενη δοσολογία δεν προκαλεί προβλήματα.. Σε συνθήκες αγρού, η κανονική χρήση του alpha cypermethrin δεν προκαλεί προβλήματα σε ψάρια. Στο έδαφος μεταβολίζεται μέσω υδρολυτικής διάσπασης του εστερικού δεσμού μέσα σε 16 εβδομάδες και μέσω υδρολύσεων και οξειδώσεων. Σε ποτάμια αποδομείται γρηγορότερα, με χρόνο ημιζωής περίπου 5 ημέρες (Λέντζα-Ρίζου 2000).

## **2.7) Αρνητικές συνέπειες της χημικής καταπολέμησης**

Η χημική καταπολέμηση που εφαρμόζεται τις τελευταίες δεκαετίες εντατικά μεταξύ άλλων καλλιεργειών και στην ελαιοκαλλιέργεια, έχει οδηγήσει σε δυσμενείς επιπτώσεις για την υγεία των καταναλωτών και των αγροτών, τις φυσικές ισορροπίες και την ποιότητα των παραγόμενων προϊόντων. Η ύπαρξη υπολειμμάτων από φυτοπροστατευτικές ουσίες στα προϊόντα (ορισμένες φορές σε επίπεδα ανώτερα από τα MRLs που έχουν θεσπιστεί), τα καθιστά επιζήμια βραχυπρόθεσμα ή μακροπρόθεσμα για την υγεία των καταναλωτών. Από την άλλη μεριά, η αυξημένη συχνότητα και ποσότητα εφαρμοζόμενων φυτοπροστατευτικών από τους αγρότες, θέτει σε κίνδυνο την υγεία του χρήστη. Στο περιβάλλον, η εντατικοποίηση της χημικής καταπολέμησης έχει προκαλέσει διατάραξη των φυσικών ισορροπιών, καθώς εκτός από τα έντομα-στόχους, τις περισσότερες φορές θανατώνονται και σημαντικοί αριθμοί ωφέλιμων εντόμων. Αυτό οδηγεί, σε συνδυασμό με την ανάπτυξη ανθεκτικότητας στα καταπολεμούμενα είδη, σε πληθυσμιακές εξάρσεις επιζήμιων για τη γεωργία ειδών ή ακόμα και στην ανάδυση ορισμένων θεωρούμενων ως δευτερευόντων επιζήμιων ειδών. Οι αποτυχίες της χημικής καταπολέμησης μπορούν να θέσουν σε κίνδυνο την προστασία της αγροτικής παραγωγής και τη δημόσια υγεία, αν πρόκειται για έντομα υγειονομικής σημασίας.



### 3) ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΑ ΕΝΤΟΜΟΚΤΟΝΑ

#### 3.1) Εισαγωγή

Η ανθεκτικότητα έχει οριστεί από το WHO (1957) ως «η κληρονομούμενη ικανότητα ενός στελέχους κάποιου οργανισμού να επιβιώνει όταν εκτίθεται σε δόσεις μιας τοξικής ουσίας που θα θανάτωνε την πλειονότητα των ατόμων σε ένα κανονικό πληθυσμό του ίδιου είδους». Η ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα είναι ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα στον έλεγχο επιζήμιων αρthropόδων υγειονομικής και γεωργικής σημασίας. Το φαινόμενο χαρακτηρίζεται από ευρεία γεωγραφική εξάπλωση και έχει παρατηρηθεί σε τουλάχιστο 504 είδη εντόμων και ακάρεων (Georghiou 1994). Από αυτά, περίπου το 40 % είναι είδη υγειονομικής και κτηνοτροφικής και το υπόλοιπο 60 % γεωργικής σημασίας. Μεταξύ των αρthropόδων που έχουν αναπτύξει ανθεκτικότητα το 88 % ήταν έντομα και το 12 % ακάρεα και άλλα αρthropoda της κλάσης Arachnida. Από τα έντομα, το 92 % των ειδών ταξινομούνται στις τάξεις Κολεόπτερα, Δίπτερα, Ημίπτερα και Λεπιδόπτερα., ενώ τα υπόλοιπα είδη ήταν Θυσανόπτερα (θρίπες), Δερμάπτερα (κατσαρίδες), Ανόπλουρα (ψείρες) και ψύλλοι (Denholm & Jespersen 1998). Στην ουσία, πρόκειται για σημαντικό παράδειγμα προκληθείσας από τον άνθρωπο διαδικασίας φυσικής επιλογής (French-Constant et al. 2004).

Το πρόβλημα της ανθεκτικότητας προκύπτει από την κλιμάκωση στις δοσολογίες και τις συχνότητες εφαρμογής των εντομοκτόνων, που οδηγεί σε αυξημένη περιβαλλοντική ζημιά και κινδύνους για την ανθρώπινη υγεία (Scott 1999). Επιπλέον, μπορεί να οδηγήσει σε πληθυσμιακές εξάρσεις φορέων ασθενειών του ανθρώπου και ζώων. Επιπρόσθετα, όταν η ανθεκτικότητα καθίσταται σοβαρή, η αποτελεσματικότητα ολόκληρων κλάσεων εντομοκτόνων μπορεί να χαθεί. Επειδή σταδιακά μειώνεται ο αριθμός νέων εντομοκτόνων που αποκτούν έγκριση κυκλοφορίας, λόγω του τεράστιων οικονομικών, τεχνολογικών και υγειονομικών απαιτήσεων που πρέπει να καλυφθούν, είναι πολύ σημαντικό να επιβραδυνθεί η ανάπτυξη ανθεκτικότητας στις ήδη υπάρχουσες κλάσεις.

Η κατανόηση της μοριακής βάσης της ανθεκτικότητας και της κατανομής των αλληλομόρφων ανθεκτικότητας στους πληθυσμούς εντόμων χρησιμεύει στην παρακολούθηση της εξέλιξης του φαινομένου στο χώρο και το χρόνο. Η τελευταία είναι αναγκαία για το σχεδιασμό ευαίσθητων προγραμμάτων παρακολούθησης της ανθεκτικότητας και τελικά για το σχεδιασμό αποτελεσματικών μέτρων διαχείρισής της στον αγρό.

Θεωρητικά ο αριθμός των γονιδίων που υπόκεινται στη διαδικασία επιλογής και εμπλέκονται στην ανθεκτικότητα εξαρτάται από το κατά πόσο η επιλογή δρα εντός ή εκτός της φαινοτυπικής κατανομής του ευαίσθητου πληθυσμού (French-Constant et al. 2004). Η επιλογή εντός της κανονικής κατανομής των αλληλομόρφων ανθεκτικότητας, που ασκείται μέσω μιας χαμηλής δόσης εντομοκτόνου, έχει ως συνέπεια την επιβίωση μεγάλου αριθμού ατόμων. Τα άτομα αυτά επιδεικνύουν μια οριακά αυξημένη ανοχή στο εντομοκτόνο, ύστερα από επιλογή. Με επαναλαμβανόμενη εφαρμογή αυτών των δόσεων στον ίδιο πληθυσμό, ασκείται επιλογή, προς ορισμένα διαφορετικά χαρακτηριστικά ανθεκτικότητας, ελάχιστος επίδρασης που δρουν αθροιστικά, όπως το σωματικό μέγεθος και ο αναπτυξιακός ρυθμός (πολυγονική ανθεκτικότητα). Η επιλογή εκτός της κανονικής κατανομής ανθεκτικότητας, που ασκείται μέσω της εφαρμογής μεγαλύτερης δόσης, οδηγεί στην επιλογή σπάνιων μεταλλάξεων, με μείζονα επίδραση εντός μεμονωμένων γονιδίων (μονογονική ανθεκτικότητα). Η κατανομή ανθεκτικότητας τέτοιων ατόμων βρίσκεται εκτός της αρχικής κατανομής. Η συχνότητα εμφάνισης τέτοιων σπάνιων μεταλλαγμένων ατόμων σε εργαστηριακά στελέχη μπορεί να αυξηθεί με μεταλλαξιγένεση. Επομένως, η συνεχής διαδικασία επιλογής χωρίς μεταλλαξιγένεση στο εργαστήριο, σε στελέχη που προέρχονται από μικρούς, γενετικά ομοιόμορφους πληθυσμούς, έχει ως αποτέλεσμα εκδήλωση πολυγονικής ανθεκτικότητας. Αντίθετα, τα περισσότερα ανθεκτικά στελέχη στον αγρό εκδηλώνουν μονογονική ανθεκτικότητα, αν δεν έχει ασκηθεί επιπρόσθετη επιλογή στο εργαστήριο. Οι δόσεις εντομοκτόνου που εφαρμόζονται στον αγρό είναι μεγαλύτερες από αυτές στο εργαστήριο, καθώς στην πρώτη περίπτωση είναι σχεδιασμένες να θανατώνουν όλα τα έντομα, ενώ στη δεύτερη έτσι ώστε να επιτρέπουν την ύπαρξη επιζώντων ατόμων (French-Constant et al. 2004).

### **3.2) Μηχανισμοί ανθεκτικότητας**

Οι σημαντικότεροι μηχανισμοί ανθεκτικότητας που παρατηρούνται στα έντομα είναι η αυξημένη ενζυμική αποτοξίκωση και η μειωμένη ευαισθησία του στόχου των εντομοκτόνων (Scott 1999, Scott & Dong 1994). Μεταξύ αυτών, ο πιο προβληματικός είναι συχνά αυτός της μειωμένης ευαισθησίας στόχου, καθώς μπορεί να προκαλέσει διασταυρωτή ανθεκτικότητα σε ολόκληρη κλάση εντομοκτόνων (Scott & Dong 1994). Είναι πιθανή η ύπαρξη και άλλων μηχανισμών ανθεκτικότητας στα έντομα, όπως η μειωμένη διείσδυση των εντομοκτόνων μέσω της επιδερμίδας (Scott

& Dong 1994) (φυσιολογικός μηχανισμός ανθεκτικότητας) ή η ιδιαιτερότητα συμπεριφοράς εντόμου (ηθολογικός μηχανισμός ανθεκτικότητας). Με τέτοιους μηχανισμούς τα έντομα μπορούν να μειώνουν ή να αποφεύγουν την έκθεσή τους στα εντομοκτόνα.

### **3.3) Τύποι μεταβολικής ανθεκτικότητας**

Οι κυριότεροι τύποι ανθεκτικότητας οφειλόμενης σε μεταβολισμό των εντομοκτόνων είναι τρεις. Η ανθεκτικότητα μπορεί να οφείλεται σε μεσολάβηση μονοοξυγενασών, στη δράση των εστερασών και στη δράση των τρανσφερασών της γλουταθειόνης (Scott 1999).

### **3.4) Μονοοξυγενάσες του κυτοχρώματος P450**

Οι μονοοξυγενάσες του κυτοχρώματος P450 είναι ένζυμα, που εμπλέκονται στη ρύθμιση των συγκεντρώσεων ενδογενών ουσιών όπως οι ορμόνες, τα στεροειδή και τα λιπαρά οξέα και στον καταβολισμό και αναβολισμό εξωγενών ουσιών, όπως τα φάρμακα, τα φυτοπροστατευτικά και οι φυτικές τοξίνες (Scott 1999). Παρατηρούνται σε όλους τους αερόβιους οργανισμούς, όπως τα έντομα, τα φυτά, τα θηλαστικά, τα πτηνά και τα βακτήρια. Το κυτόχρωμα P450 είναι μια αιμοπρωτεΐνη, που λειτουργεί ως τερματική οξειδάση στα συστήματα μονοοξυγενασών. Σε ευκαρυωτικά κύτταρα, τα κυτοχρώματα P450 εντοπίζονται στο ενδοπλασματικό δίκτυο και τα μιτοχόνδρια. Απαραίτητα για την οξείδωση μέσω μονοοξυγενασών είναι το κυτόχρωμα P450, η οξειδοαναγωγή του κυτοχρώματος P450 (αναγωγή του P450), το NADPH και φωσφολιπίδια. Η αναγωγή του P450 χρησιμεύει στη μεταφορά των αναγωγικών ισοδυνάμων από το NADPH στο P450. Το κυτόχρωμα *b<sub>5</sub>* εμπλέκεται σε ορισμένες αντιδράσεις μονοοξυγενασών, ανάλογα με το κυτόχρωμα P450 και/ ή το υπόστρωμα που εμπλέκεται στη διαδικασία (Scott 1999).

#### **3.4.1) Έκφραση των P450**

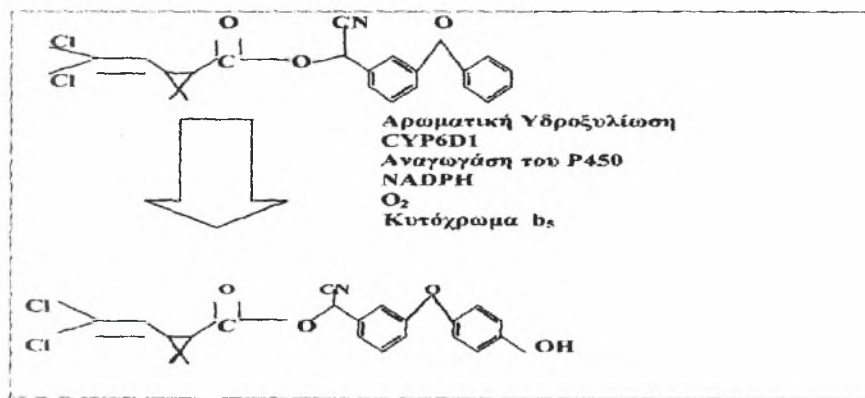
Ορισμένες μορφές των κυτοχρωμάτων P450 (CYP4D1 και CYP6A1) εκφράζονται σε όλα τα στάδια ανάπτυξης των εντόμων, ενώ άλλες μόνο στα ενήλικα (CYP6D1) ή τα προνυμφικά στάδια των εντόμων (CYP6B2) (Scott et al. 1998). Ορισμένα κυτοχρώματα μπορεί να εντοπίζονται σε ορισμένους μόνο ιστούς, ενώ άλλα (CYP6D1) παρατηρούνται σε όλο το σώμα του εντόμου. Δεν έχει αναφερθεί εξειδικευμένη με βάση το φύλο έκφραση κάποιου κυτοχρώματος σε έντομο. Η

απόκριση των κυτοχρωμάτων στους επαγωγείς μπορεί να διαφέρει. Η σύνθεση ορισμένων P450 επάγεται από ορισμένους επαγωγείς ενδογενούς προέλευσης (π.χ. υπερτρεχαλοσεμική ορμόνη για το CYP4C1, εκδυσόνη για το CYP18) ή εξωγενούς προέλευσης, όπως οι φυτοτοξίνες (ξανθοτοξίνη για τα CYP6B1, CYP6B3, CYP6B4, CYP6B5, CYP6D1) ή ξеноβιοτικές ουσίες (φαινοβαρβιτάλη για ορισμένα P450). Αντίθετα, υπάρχουν και P450 που δεν αποκρίνονται στη δράση κανενός επαγωγέα. Η έκφραση ορισμένων P450 (CYP6A2) μπορεί να εξαρτάται από τη θερμοκρασία σε ορισμένα στελέχη (Scott et al. 1998).

### 3.4.2) Ρόλος των κυτοχρωμάτων στην ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα

Η ανθεκτικότητα που προκαλείται μέσω της δράσης μονοοξυγενασών οφείλεται σε αυξημένη αποτοξίκωση ή αλλιώς σε μειωμένη ενεργοποίηση του εντομοκτόνου. Η ανθεκτικότητα μπορεί να προκύψει από μια αλλαγή στην καταλυτική δραστηριότητα του P450 που εμπλέκεται και/ ή σε αλλαγή του επιπέδου έκφρασης της πρωτεΐνης (Orpenoorth 1984).

Ο μηχανισμός δράσης του κυτοχρώματος CYP6D1 της *Musca domestica* L. (Diptera:Muscidae), που εμπλέκεται στην ανθεκτικότητα στα πυρεθροειδή, έχει ως εξής. Το CYP6D1 πραγματοποιεί μια αρωματική υδροξυλίωση, στο μόριο των πυρεθροειδών που έχουν μια φαινοξυβενζυλομάδα. Το αποτέλεσμα είναι ο σχηματισμός μεταβολιτών, που έχουν στο 4' άκρο τους μια υδροξυλομάδα (-OH) (Zhang & Scott 1996). Για παράδειγμα, ο μεταβολισμός του cypermethrin φαίνεται στο σχήμα 2.



Σχήμα 2. Μεταβολισμός του cypermethrin από το κυτόχρωμα CYP6D1.

### 3.4.3) Η μοριακή βάση της ανθεκτικότητας με μεσολάβηση μονοοξυγενασών

Η ανθεκτικότητα μπορεί να προκύψει μέσω αυξημένης μεταγραφής ενός κυτοχρώματος P450, που οδηγεί σε αυξημένη έκφραση της πρωτεΐνης και αυξημένη αποτοξίκωση του εντομοκτόνου (Liu & Scott 1998). Είναι πιθανό ότι η ανθεκτικότητα ως χαρακτηριστικό εντοπίζεται σε διαφορετική θέση στο γένωμα, από αυτήν του γονιδίου του κυτοχρώματος P450 που εμπλέκεται στην αποτοξίκωση. Η ανθεκτικότητα μπορεί να προκύψει εξαιτίας αποτοξίκωσης μέσω ενός μόνο κυτοχρώματος P450 (π.χ. του CYP6D1) και η δέσμευση του κυτοχρώματος μπορεί να περιοριστεί μόνο σε μία θέση στο μόριο του εντομοκτόνου. Το κυτόχρωμα *b5* είναι αναγκαίο για την αποτοξίκωση ορισμένων φυτοπροστατευτικών μέσω των κυτοχρωμάτων P450 και η εμπλοκή του στη δραστηριότητα των μονοοξυγενασών του P450 εξαρτάται από το ισόμορφο του P450 που εμπλέκεται (Zhang & Scott 1994).

Το αίτιο της υπερ-έκφρασης των κυτοχρωμάτων P450 σε ανθεκτικά στελέχη δε φαίνεται να είναι φαινόμενο αύξησης του αριθμού ενεργών αντιγράφων του γονιδίου (gene amplification). Αυτό έρχεται σε αντίθεση με ότι είναι γνωστό για τις εστεράσες, στην περίπτωση των οποίων η αύξηση του αριθμού ενεργών αντιγράφων των γονιδίων τους είναι ο κύριος μηχανισμός υπερέκφρασης αυτών των πρωτεϊνών (Scott 1999).

Είναι πιθανό ότι μια αλλαγή στην αλληλουχία αμινοξέων ενός κυτοχρώματος P450 μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας, μέσω της τροποποίησης της εξειδίκευσης ενός κυτοχρώματος P450 προς ένα υπόστρωμα (Lindberg & Negishi 1989). Είναι πιθανό ότι τα ίδια ρυθμιστικά γονίδια εμπλέκονται τόσο στην επαγωγή της, όσο και στη βιοχημική ανθεκτικότητα καθαυτή. Για παράδειγμα, ένα κυρίαρχο γονίδιο στο χρωμόσωμα 2 της *M. domestica* ίσως εμπλέκεται στην ανθεκτικότητα σε εντομοκτόνα λόγω μεταβολισμού (Plapp 1984). Σε στελέχη της *M. domestica* με ανθεκτικότητα στα πυρεθροειδή λόγω δράσης μονοοξυγενασών, η αυξημένη μεταγραφή του *CYP6D1* ελέγχεται από γενετικούς παράγοντες που εντοπίζονται στα αυτοσωμικά χρωμοσώματα 1 και 2. Επειδή βρέθηκε ότι η έκφραση του *CYP6D1* επάγεται από το PB (piperonyl butoxide, συνεργιστική ουσία για πυρεθροειδή) μόνο σε ευαίσθητα στελέχη, είναι πιθανό ότι ένας παράγοντας στο αυτοσωμικό χρωμόσωμα 2 ευαίσθητων ατόμων της *M. domestica*, παρατηρούμενος σε αυξημένα επίπεδα ως απόκριση στο χειρισμό των ατόμων με PB, οδηγεί σε αυξημένη μεταγραφή άλλων γονιδίων. Για αυτό το λόγο, ο Scott (1999) θεώρησε ότι αν ένας

παράγοντας υπόκειται στον έλεγχο ενός ρυθμιστικού στοιχείου (όπως ένας καταστολέας) και το συγκεκριμένο ρυθμιστικό στοιχείο υποστεί μετάλλαξη, θα μπορούσε να προκύψει αυξημένη επαγόμενη έκφραση ορισμένων κυτοχρωμάτων P450. Αν τουλάχιστο ένα από αυτά τα κυτοχρώματα μπορούσε να πραγματοποιήσει την αποτοξίκωση του εντομοκτόνου, το στέλεχος του εντόμου θα γινόταν ανθεκτικό στο συγκεκριμένο εντομοκτόνο (Scott 1999).

#### 3.4.4) Γενετική της ανθεκτικότητας στα πυρεθροειδή μέσω των P450

Στη *M. domestica* το γονίδιο *CYP6D1* είναι συνδεδεμένο με το αυτοσωμικό χρωμόσωμα 1 (Liu et al. 1995). Η αυξημένη μεταγραφή του *CYP6D1* οφείλεται σε ένα συνδυασμό παραγόντων που εντοπίζονται στα αυτοσωμικά χρωμοσώματα 1 και 2 (Liu & Scott 1998). Κληρονομείται ως σχεδόν ενδιάμεσο χαρακτηριστικό, λόγω αλληλεπίδρασης του σχεδόν πλήρως κυρίαρχου μηχανισμού στο αυτοσωμικό χρωμόσωμα 1 και του ατελώς υποτελούς μηχανισμού στο αυτοσωμικό χρωμόσωμα 2 (Liu & Scott 1997). Παρατηρήθηκαν 5 αλλαγές αμινοξέων σε ανθεκτικό στέλεχος της μύγας: ασπαραγίνη αντί αλανίνης στη θέση 150, ισολευκίνη αντί λευκίνης στη θέση 153, θρεονίνη αντί σερίνης στη θέση 165, γλουταμικό οξύ αντί γλυκίνης στη θέση 218 και μεθειονίνη αντί ισολευκίνης στη θέση 227 (Tomita et al. 1995). Οι παρατηρούμενες αλλαγές αμινοξέων εντοπίζονται σε 2 έντονα μεταβλητές περιοχές, μεταξύ των P450 της οικογένειας 6 και οι αλλαγές στις υπολειμματικές θέσεις 218, 220, 225 και 227 είναι κοντά σε μια θεωρούμενη ως περιοχή δέσμωσης του υποστρώματος. Δεν είναι σαφές όμως ακόμη αν οι αλλαγές αμινοξέων συσχετίζονται με ανάπτυξη ανθεκτικότητας (Scott 1999). Σε άλλο στέλεχος μύγας, έχει εντοπιστεί άλλο γονίδιο (*CYP6A1*) που μεταφράζεται σε υψηλό βαθμό και εντοπίζεται στο αυτοσωμικό χρωμόσωμα 5. Ο παράγοντας που ευθύνεται για την αυξημένη έκφραση συνδέεται με το αυτόσωμα 2. Το *CYP6A1* εντοπίζεται σε δέσμη με 4 άλλα γονίδια (*CYP6A3*, *A4*, *A5*, *CYP6C1*) και 2 κλάσματα (*CYP6A6*, *CYP6C2*) (Cohen & Feyereisen 1995). Αν και υπάρχουν κάποιες ενδείξεις, δεν είναι σαφές αν το *CYP6A1* εμπλέκεται στην ανθεκτικότητα (Scott 1999).

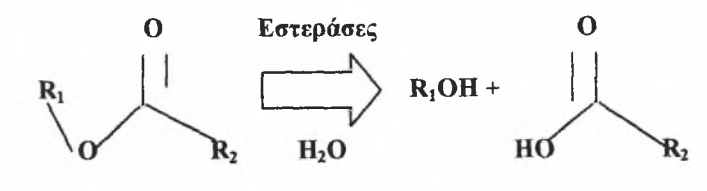
Στη *Drosophila melanogaster* (Meigen) (Diptera:Drosophilidae) απομονώθηκε ένα γονίδιο (*CYP6A2*) που κωδικοποιεί τη σύνθεση του *Cyp6a2*, σε μεγαλύτερο βαθμό σε ανθεκτικό στέλεχος από ότι σε ευαίσθητα (Waters et al. 1992b). Το *Cyp6a2* μπορεί όπως και το *CYP6D1* να μεσολαβεί στη βιοενεργοποίηση (δηλαδή την ενζυμική ενεργοποίηση ενός μορίου προ-εντομοκτόνου μέσα στο έντομο) και την

αποτοξίκωση οργανοφωσφορικών. Από το ίδιο στέλεχος απομονώθηκαν και τα *CYP6A8*, *CYP6A9*, που βρίσκονται σε δέσμη με το *CYP6A2* στο χρωμόσωμα 2R και παρατηρήθηκε αυξημένη έκφραση του *CYP6A8* σε ανθεκτικό στέλεχος (Maitra et al. 1996). Η εισαγωγή ενός στοιχείου τύπου *Accord* (αλληλουχία αμινοξέων που σχετίζεται με ανθεκτικότητα) στο 5'-άκρο του γονιδίου του κυτοχρώματος P450 της *D. melanogaster* (*Cyp6g1*) συσχετίζεται με την ανθεκτικότητα. Το γονίδιο της ανθεκτικότητας εντοπίζεται στο χρωμόσωμα II. Νεότερη μελέτη (Catania et al. 2004) έδειξε απόλυτη (100%) συσχέτιση μεταξύ εμφάνισης του *Accord* και ανθεκτικότητας, παράλληλα με σημαντική μείωση της παραλλακτικότητας, τουλάχιστο σε έκταση 20 kb στο γονίδιο *Cyp6g1*. Η συχνότητα εμφάνισης του *Accord* είναι σημαντικά μειωμένη στην περιοχή της ανατολικής Αφρικής (32-55 %), ενώ αντίθετα είναι αυξημένη σε πληθυσμούς εκτός Αφρικής (85-100 %), κάτι που αποδίδεται στη σταθερότητα των συχνοτήτων εμφάνισης του *Accord* σε μη Αφρικανικούς πληθυσμούς. Αυτή προκύπτει ως αποτέλεσμα της αυξημένης συχνότητας επιβίωσης του ανθεκτικού στα εντομοκτόνα φαινοτύπου που προκαλεί, σε περιοχές όπου ασκείται αυξημένη πίεση επιλογής με εντομοκτόνα (Catania et al. 2004).

Σε άλλα είδη δεν έχει δειχθεί σαφώς αν ο συγκεκριμένος μηχανισμός ευθύνεται για ανάπτυξη ανθεκτικότητας. Για παράδειγμα, στη *Blatella germanica* L. (Blattodea: Blattidae) απομονώθηκε ένα κυτόχρωμα (P450MA), που είναι πιθανό να εμπλέκεται στο μεταβολισμό πυρεθροειδών (Scharf et al. 1998b). Στο *Heliothis virescens* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae) αλληλουχήθηκε ένα γονίδιο (*CYP9A1*), που εκφράζεται σε υψηλό βαθμό και συσχετίζεται με την ανθεκτικότητα σε πυρεθροειδή (Ranasinghe et al. 1997). Στο *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) απομονώθηκαν 3 γονίδια, το *Cyp6B2* από τους Ranasinghe et al. (1997) και τα *CYP6B6*, *B7* από τους Ranasinghe & Hobbs (1998), χωρίς όμως να γίνει σαφές αν ευθύνονται για την ανθεκτικότητα σε πυρεθροειδή. Δεν είναι σαφές επίσης αν άλλα οκτώ γονίδια που ανιχνεύθηκαν (Pittendrigh et al. 1997) ευθύνονται για ανάπτυξη ανθεκτικότητας. Στο *Culex quinquefasciatus* (Say) (Diptera: Culicidae) αλληλουχήθηκε ένα γονίδιο (*CYP6E1*) (Kasai et al. 1998b) που δε φαίνεται να προκαλεί αυξημένο μεταβολισμό πυρεθροειδών μέσω υπερέκφρασης (Kasai et al. 1998a).

### 3.5) Καρβοξυλεστεράσες

Οι καρβοξυλεστεράσες είναι ένζυμα που υδρολύουν τους καρβοξυλεστέρες, μέσω αντιστρεπτής ακυλίωσης μιας υπολειμματικής σερίνης, μέσα στο ενεργό κέντρο της πρωτεΐνης. Η ακυλίωση προκαλεί απελευθέρωση της χαρακτηριστικής ομάδας αλκοόλης του καρβοξυλεστέρα και του αντίστοιχου ακυλιωμένου ένζυμου (Σχήμα 3). Η ακυλιωμένη ενδιάμεση ένωση υδρολύεται με πυρηνόφιλη επίθεση  $H_2O$ , που απελευθερώνει την αντίστοιχη χαρακτηριστική καρβοξυλομάδα και επιπλέον το ελεύθερο ενεργό ένζυμο, έτοιμο να αρχίσει ένα νέο κύκλο κατάλυσης (Sogorb & Vilanova 2002).



**Σχήμα 3.** Μηχανισμός υδρόλυσης μέσω εστερασών. Η υδρόλυση του εστέρα που περιέχει δύο υποκαταστάτες στο μόριό του ( $R_1$ ,  $R_2$ ) πραγματοποιείται από τις εστεράσες, μέσω της προσθήκης  $H_2O$ , που οδηγεί στο σχηματισμό ενός μορίου αλκοόλης που φέρει τον ένα υποκαταστάτη ( $R_1$ ) και ενός μορίου οξέος, που φέρει το δεύτερο υποκαταστάτη ( $R_2$ ).

Υπάρχουν τρεις μηχανισμοί μέσω των οποίων οι καρβοξυλεστεράσες συνδέονται με την ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα. Στην πρώτη περίπτωση, η ανθεκτικότητα μπορεί να προκύψει σε πληθυσμούς μέσω της επιλογής προς έντομα που κατέχουν και εκφράζουν πολλαπλά αντίγραφα ενός γονιδίου καρβοξυλεστεράσης (αύξηση αριθμού αντιγράφων γονιδίου, *gene amplification*) (French-Constant et al. 2004, Wheelock et al. 2005). Η υπερπαραγωγή τέτοιων ένζυμων έχει παρατηρηθεί στη *Myzus persicae* (Sulzer) (Homoptera:Aphididae) (Devonshire et al. 1998), σε κουνούπια (Culicidae) (Hemingway et al. 2004) και στον άλτη *Nilaparvata lugens* (Stål) (Hemiptera:Delphacidae) (Small & Hemingway 2000). Η ανθεκτικότητα οφείλεται σε υψηλή συγκέντρωση καρβοξυλεστερασών, που δεσμεύουν τα μόρια εντομοκτόνου, καθυστερώντας ή παρεμποδίζοντας την αλληλεπίδραση μεταξύ τοξίνης και στόχου. Η ανθεκτικότητα που οφείλεται σε αυτόν το μηχανισμό μπορεί να επαυξηθεί, όταν παρατηρούνται παράλληλα και μεταλλάξεις που μειώνουν την ευαισθησία των στόχων εντομοκτόνων (Wheelock et al. 2005, Martinez-Torres et al. 1999b).



Στη δεύτερη περίπτωση, η μεταβολική ανθεκτικότητα μπορεί να προκύψει μέσω της επιλογής και της έκφρασης μεταλλαγμένων καρβοξυλεστερασών. Οι σημειακές μεταλλάξεις μέσα σε δομικά γονίδια έχουν ως αποτέλεσμα ένζυμα με αυξημένη ικανότητα μεταβολισμού εντομοκτόνων. Τέτοιες περιπτώσεις παρατηρήθηκαν σε 2 είδη Διπτέρων (*M. domestica*, *Lucilia cuprina*). Η επικρατούσα υπόθεση για την εξήγηση του μηχανισμού είναι αυτή των μεταλλαγμένων αλιεστερασών (French-Constant et al. 2004, Wheelock et al. 2005). Σύμφωνα με αυτήν, τόσο η μειωμένη δραστηριότητα των καρβοξυλεστερασών όσο και η αυξημένη δραστηριότητα των φωσφοτριεστερασών οφείλονται και στις δύο περιπτώσεις σε μια μετάλλαξη στο γονίδιο εστεράσης. Την υπόθεση ενίσχυσε ο εντοπισμός ενός τέτοιου γονιδίου (*Lca-E7*), που κωδικοποιεί τη σύνθεση εστεράσης (E3) σε ανθεκτικά στο diazinon στελέχη της *L. cuprina* (Wiedemann)(Diptera:Calliphoridae). Μια σημειακή μετάλλαξη στο γονίδιο οδηγεί σε απώλεια δραστηριότητας των αλιεστερασών έναντι των οργανοφωσφορικών (French-Constant et al. 2004). Μια νεότερη εναλλακτική υπόθεση είναι ότι η σημειακή μετάλλαξη στο γονίδιο της αλιεστεράσης ίσως ανα-καταστέλλει τη μεταγραφή μη υδρολυτικών ένζυμων (P450 MOs), που καταλύουν τη διάσπαση εστερικών δεσμών, προκαλώντας ανθεκτικότητα (Wheelock et al. 2005).

Στην τρίτη περίπτωση, μεταβολική ανθεκτικότητα προκαλείται μέσω επαυξημένης μεταγραφής μη δομικών γονιδίων (που δεν παρατηρούνται σε αυξημένο αριθμό ενεργών αλληλομόρφων), που οδηγεί στη σύνθεση ένζυμων αποτοξίκωσης εντομοκτόνων. Οι μεταλλάξεις στα ρυθμιστικά γονίδια έχουν ως αποτέλεσμα την υπερ-έκφραση ένζυμων και την επαύξηση της ικανότητας μεταβολισμού εντομοκτόνων. Ο μηχανισμός έχει παρατηρηθεί για άλλες κλάσεις ένζυμων, όπως οι GSTs και οι P450MOs, όχι όμως και για τις καρβοξυλεστεράσες (Wheelock et al. 2005).

### **3.5.1) Μηχανισμός μεταβολισμού πυρεθροειδών μέσω καρβοξυλεστερασών**

Γενικά, στο μηχανισμό κατάλυσης μέσω καρβοξυλεστερασών εμπλέκεται μια καταλυτική τριάδα, αποτελούμενη από σερίνη, ιστιδίνη και μια υπολειμματική ομάδα, είτε γλουταμικού ή ασπαρτικού οξέος. Είναι δυνατή επίσης και η παρουσία μιας τέταρτης, καταλυτικής υπολειμματικής ομάδας σερίνης. Οι καρβοξυλεστεράσες διασπούν τους εστερικούς δεσμούς, μέσω μιας διαδικασίας 2 σταδίων, που περιλαμβάνει το σχηματισμό και την αποδόμηση ενός ενδιάμεσου ακυλ-ένζυμου.

Η διαδικασία υδρόλυσης των πυρεθροειδών είναι η ακόλουθη, όπως περιγράφηκε από τους Wheelock et al. (2005) για το permethrin. Με μεταφορά ενός πρωτονίου από τη σερίνη στην ιστιδίνη, αυξάνεται ο πυρηνόφιλος χαρακτήρας της υδροξυλομάδας στο άκρο της σερίνης. Η ιστιδίνη με τη σειρά της σταθεροποιείται μέσω σχηματισμού δεσμού υδρογόνου σε γλουταμικό (ή ασπαρτικό) οξύ. Η πυρηνόφιλη σερίνη επιτίθεται στην ομάδα καρβονυλίου, που έχει χάσει ένα ηλεκτρόνιο και βρίσκεται στο υπόστρωμα εστέρα. Σχηματίζεται μια ενδιάμεση τετραεδρική ένωση, που σταθεροποιείται από 2 υπολειμματικές ομάδες γλυκίνης, στην οπή του οξυανιόντος. Η ενδιάμεση ένωση καταρρέει και σχηματίζεται το ακυλ-ένζυμο, απελευθερώνοντας τη σερίνη και το τμήμα της αλκοόλης του υποστρώματος στη διαδικασία. Ένα ενεργοποιημένο από ιστιδίνη μόριο νερού τότε επιτίθεται στο σύμπλοκο του ακυλ-ένζυμου, επαναλαμβάνοντας τα προηγούμενα βήματα και απελευθερώνοντας το τμήμα οξέος του υποστρώματος. Η δεύτερη, διατηρούμενη υπολειμματική ομάδα σερίνης, χρησιμεύει στην παροχή δομικής υποστήριξης για το χωρικό προσανατολισμό του γλουταμικού οξέος, σταθεροποιώντας με αυτόν τον τρόπο την καταλυτική τριάδα.

Τα οξονικά παράγωγα των οργανοφωσφορικών μπορεί να είναι πολύ ισχυροί παρεμποδιστές της δράσης των καρβοξυλεστερασών και δυνητικά οδηγούν στη γήρανση του ένζυμου ύστερα από τη φωσφορυλίωση. Το φωσφορυλιωμένο ένζυμο μπορεί είτε να ελευθερώσει το οργανοφωσφορικό υπόστρωμα (που υφίσταται υδρόλυση παρόμοια με της ακυλομάδας, αλλά με πολύ βραδύτερο ρυθμό) ή να υποστεί γήρανση, οπότε το ένζυμο είναι στην ουσία καταλυτικά νεκρό (το οργανοφωσφορικό λειτουργεί ως υπόστρωμα αυτοκτονίας). Παρόμοια αντίδραση μπορεί να παρατηρηθεί και με τα καρβαμιδικά εντομοκτόνα. Ωστόσο, το μεθυλοκαρβαμουλωμένο ένζυμο είναι λιγότερο σταθερό από το φωσφορυλιωμένο ένζυμο, κάτι που εξηγεί τη μειωμένη τοξικότητα ορισμένων καρβαμιδικών σε σχέση με τα οργανοφωσφορικά (Wheelock et al. 2005).

### **3.6) Τρανσφεράσες της γλουταθειόνης**

Οι τρανφεράσες της γλουταθειόνης (glutathione transferases, GSTs) είναι διμερή κυρίως κυτοπλασματικά ένζυμα, με ευρεία ικανότητα δέσμευσης υποκαταστατών, επιπρόσθετα με το ρόλο που παίζουν στην αποτοξίκωση (Sheehan et al. 2001). Επιπλέον, υπάρχει μια μικρότερη κλάση μικροσωμικών GSTs σε έντομα, θηλαστικά και φυτά (Ranson & Hemingway 2000). Διεξάγουν πολλές λειτουργίες

στα κύτταρα, όπως η απομάκρυνση ενεργών ριζών οξυγόνου, η αναγέννηση των S-θειολομένων πρωτεϊνών (συνέπεια οξειδωτικής καταπόνησης), η κατάλυση συζεύξεων με ενδογενείς χαρακτηριστικές ομάδες και αντιδράσεων σε μεταβολικά μονοπάτια που δε συνδέονται με την αποτοξίκωση (Sheehan et al. 2001). Εκτός από τις προκύπτουσες τοξικές ενώσεις (φυτικές τοξίνες και μυκοτοξίνες, φαινόλες, αφλατοξίνες), οι οργανισμοί αντιμετωπίζουν αρνητικές επιπτώσεις ενεργών ριζών οξυγόνου, όπως η ελεύθερη ρίζα υπεροξειδίου και το υπεροξείδιο του υδρογόνου. Τα έντομα αντιμετωπίζουν επιπλέον και τα εντομοκτόνα (Sheehan et al. 2001). Γενικά, οι GSTs καταλύουν αντιδράσεις σύζευξης μορίων που έχουν μια ηλεκτρόφιλη θέση με την ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH) (Vontas et al. 2000).

Στα έντομα, τα αυξημένα επίπεδα των GSTs σχετίζονται κυρίως με την ανθεκτικότητα σε οργανοχλωριωμένα και οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα, καθώς αποδείχτηκε ότι εμπλέκονταν στο μεταβολισμό του DDT σε κουνούπια και στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας σε στελέχη της *M. domestica*, της *B. germanica*, της *H. armigera* και άλλων φυτοφάγων εντόμων (Vontas et al. 2001).

### 3.6.1) Μηχανισμός δράσης των GSTs

Οι GSTs μπορούν να καταλύσουν πυρηνόφιλες αρωματικές υποκαταστάσεις, αντιδράσεις προσθήκης σε  $\alpha,\beta$ -ακόρεστες κετόνες και αντιδράσεις διάρρηξης εποξειδικών δακτυλίων, με αποτέλεσμα σε όλες τις περιπτώσεις το σχηματισμό συζευγμένων με GSH ενώσεων και την αναγωγή των υπεροξειδίων, που οδηγεί στο σχηματισμό οξειδωμένης γλουταθειόνης (GSSG). Κάθε υπομονάδα GST έχει μια θέση G που δεσμεύει τη γλουταθειόνη και μια θέση H, όπου δεσμεύεται το υπόστρωμα (Ranson & Hemingway 2000). Για την απομάκρυνση των συμπλόκων της γλουταθειόνης υπάρχουν ορισμένοι μηχανισμοί μεταφοράς, όπως η εξαρτώμενη από την ATP αντλία GS-X, ένας πολλαπλά εξειδικευμένος μεταφορέας οργανικών ανιόντων (MOAT), ένας ανιονικός μεταφορέας των συμπλόκων της S-GSH με δινιτροφαινόλη ευρείας εξειδίκευσης (Dnp-SG ATPase), η P-γλυκοπρωτεΐνη και η σχετιζόμενη με πολλαπλή ανθεκτικότητα σε φάρμακα πρωτεΐνη MRP (Sheehan et al. 2001).

Η ενζυματική αποτοξίκωση των ξеноβιοτικών έχει ταξινομηθεί σε 3 διακριτές φάσεις, που δρουν ως ολοκληρωμένη αλληλουχία. Οι φάσεις I και II περιλαμβάνουν τη μετατροπή της λιπόφιλης, μη πολικής ξеноβιοτικής ουσίας σε ένα περισσότερο υδατοδιαλυτό και επομένως λιγότερο τοξικό μεταβολίτη, που μπορεί να



απομακρυνθεί ταχύτερα από το κύτταρο κατά τη φάση III (Vontas et al. 2001, Sheehan et al. 2001). Η φάση I καταλύεται κυρίως από το ενζυμικό σύστημα του κυτοχρώματος P450, που εμπλέκεται σε πολλές αντιδράσεις, με κυριότερες τις οξειδώσεις. Η πιο ενδιαφέρουσα λειτουργία των GSTs για τη φυτοπροστασία είναι η εμπλοκή τους στη φάση II της ενζυμικής αποτοξίκωσης στα έντομα. Κατά τη φάση II, τα ένζυμα καταλύουν τη σύζευξη των ενεργοποιημένων ξеноβιοτικών με ένα ενδογενές υδατοδιαλυτό υπόστρωμα, όπως η ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH), το UDP-γλουκουρονικό οξύ και η γλυκίνη. Ποσοτικά, η σύζευξη προς GSH που καταλύεται από τις GSTs είναι η κύρια αντίδραση της φάσης II σε πολλά είδη (Sheehan et al. 2001).

### 3.6.2) Οι GSTs στα έντομα

Τρανσφεράσες της γλουταθειόνης έχουν απομονωθεί από περισσότερα των 24 είδη εντόμων. Εκφράζονται σε μεγάλο βαθμό σε ισοζυμικές μορφές και με διαφορετικούς τρόπους κατά τα διάφορα αναπτυξιακά στάδια. Σε πολλά είδη, οι GSTs εμπλέκονται στην ανθεκτικότητα στο DDT, μέσω της απυδροχλωρίωσης που καταλύουν και δευτερευόντως στην ανθεκτικότητα στα οργανοφωσφορικά. Στα έντομα οι GSTs ταξινομούνται σε δύο διακριτές ανοσολογικά κλάσεις (I και II) (Sheehan et al. 2001). Στη *M. domestica* έχουν ανιχνευθεί και απομονωθεί 2 κλάσεις τρανσφερασών της γλουταθειόνης. Οι 2 κλάσεις (GST1, GST2) διαφέρουν μεταξύ τους στο μοριακό βάρος (28 kDa, 32 kDa αντίστοιχα) και κάθε κλάση συντίθεται από ορισμένα ισόμορφα (Fournier et al. 1992). Παρόμοια μοριακά βάρη έχουν παρατηρηθεί στις GSTs του *Aedes aegypti* L. (Diptera:Culicidae) (26,8 kDa, 28 kDa για τις GST-1, GST-2 αντίστοιχα) (Grant & Matsumura 1989) και του *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera:Noctuidae) (27 kDa) (Lagadic et al. 1993). Οι GST1 αποτελούνται από μορφές με ισοηλεκτρικά σημεία μεταξύ 4 και 9, ενώ όλες οι μορφές της κλάσης GST2 έχουν ισοηλεκτρικά σημεία στην όξινη περιοχή (Fournier et al. 1992). Στη *M. domestica* βρέθηκε ότι η αυξημένη μεταγραφή των GST1 συσχετίζεται με την ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα (Fournier et al. 1992). GSTs της κλάσης I βρέθηκαν εκτός από τη *M. domestica* στη *D. melanogaster*, τα *Anopheles gambiae* (Patton) και *A. dirus* (Peyton & Harrison) (Diptera: Culicidae) και τη *L. cuprina*. Οι GSTs της κλάσης II έχουν αναγνωριστεί στη *Manduca sexta* L. (Lepidoptera:Sphingidae) και τη *D. melanogaster* (Sheehan et al. 2001).

Στη βιβλιογραφία υπάρχουν δεδομένα που δείχνουν ότι οι GSTs μπορούν να είναι δραστικές και έναντι των πυρεθροειδών, προκαλώντας όμως μικρού βαθμού ανθεκτικότητα. Για παράδειγμα, στο *A. aegypti* παρατηρήθηκε μεταβαλλόμενη δραστηριότητα των ενζύμων GST-1 κατά τη διάρκεια της προνυμφικής ανάπτυξης τόσο σε ανθεκτικά στο permethrin, όσο και σε ευαίσθητα στελέχη. Σε όλη τη διάρκεια της ανάπτυξης όμως, η δραστηριότητα ήταν σχεδόν 1,7 φορές μεγαλύτερη στις ανθεκτικές προνύμφες και νύμφες. Επίσης, η δραστηριότητα των GST-2 ήταν μεγαλύτερη, σχεδόν κατά 8 φορές στα ανθεκτικά στελέχη σε όλη τη διάρκεια ανάπτυξης (Grant & Matsumura 1989). Στο *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera:Tenebrionidae) βρέθηκε αυξημένη ανοχή λόγω της δράσης GSTs στο πυρεθροειδές decamethrin και θεωρήθηκε ότι το εντομοκτόνο είναι πιθανό να δεσμεύεται στην ενεργή θέση του ενζύμου, παρεμποδίζοντας τη δραστηριότητα του τελευταίου προς το CDNB (chloro-dinitro-benzene, υπόστρωμα δέσμευσης) με ανταγωνιστικό τρόπο. Το εντομοκτόνο όμως δε συζευγνύεται με τη γλουταθειόνη (GSH), κάτι που οδηγεί στην υπόθεση ότι οι GSTs παρέχουν παθητική προστασία έναντι των πυρεθροειδών, μέσω της δέσμευσης των μορίων τους με μηχανισμό διάσπασης (Kostaropoulos et al. 2001). Η ανθεκτικότητα του *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera:Tenebrionidae) στο cyfluthrin συνδέθηκε με αύξηση τόσο της συγκέντρωσης γλουταθειόνης (GSH) (κατά 2 φορές), όσο και της δραστηριότητας τρανσφεράσης της γλουταθειόνης (GST) (κατά 4-6 φορές, με βάση την ικανότητα σύζευξης του CDNB και του DCNB), στο κυτόπλασμα ανθεκτικών ατόμων (Reidy et al. 1990). Εκτός από τα πυρεθροειδή, ανθεκτικότητα λόγω δράσης των GSTs έχει παρατηρηθεί και έναντι του οργανοχλωριωμένου lindane στο λεπιδόπτερο *S. littoralis*. Η δραστηριότητα των GSTs έναντι του CDNB ήταν διπλάσια στο ανθεκτικό στέλεχος σε σχέση με το ευαίσθητο (Lagadic et al. 1993).

Τα γονίδια των GSTs της κλάσης I δεν έχουν γενικά ιντρόνια στην περιοχή κωδικοποίησης, αν και ίσως διακόπτονται από ιντρόνια στο 5'-άκρο τους που δεν μεταφράζεται (Lougarre et al. 1999). Τα γονίδια υπάρχουν σε σύνθετους προσανατολισμούς στις χρωματοσωμικές δέσμες και τα πολλαπλά ένζυμα ίσως παράγονται ως αποτέλεσμα του εναλλακτικού διαχωρισμού του mRNA. Στα κουνούπια έχουν αναγνωριστεί περισσότερα από 30 γονίδια GST και επιπρόσθετη ποικιλομορφία προκύπτει από τον εναλλακτικό διαχωρισμό, που οδηγεί σε παραγωγή GSTs με διαφορετικές εξειδικεύσεις ως προς το υπόστρωμα (Ranson & Hemingway 2000).

### 3.7) Τροποποίηση του στόχου των πυρεθροειδών

Εκτός από τους μηχανισμούς ενζυμικής αποτοξίκωσης που προαναφέρθηκαν, σημαντικό ρόλο στην ανθεκτικότητα στα πυρεθροειδή παίζει και η τροποποίηση του στόχου δράσης τους, των διόδων  $\text{Na}^+$ . Οι ελεγχόμενες από το δυναμικό δίοδοι όπως η δίοδος  $\text{Na}^+$ , ενεργοποιούνται από μεταβολές δυναμικού της μεμβράνης των νευρικών κυττάρων. Οι δίοδοι  $\text{Na}^+$  των εντόμων αποτελούν θέση δράσης ορισμένων κλάσεων εντομοκτόνων, όπως τα οργανοχλωριωμένα (DDT) και τα πυρεθροειδή (Scott & Dong 1994, Soderlund & Knipple 2003, ffrench-Constant et al. 2004). Η ανθεκτικότητα στα πυρεθροειδή χαρακτηρίστηκε ως ανθεκτικότητα τύπου κατάρριψης (*knockdown resistance, kdr*) και παρατηρήθηκε για πρώτη φορά στη *M. domestica* (Busvine 1951), σε στέλεχος που επίβησε χωρίς πρώτα να καταρριφθεί από το DDT και επιπλέον παρουσίασε διασταυρωτή ανθεκτικότητα στις πυρεθρίνες (Scott & Dong 1994).

Η κλωνοποίηση της κύριας υπομονάδας της διόδου βασίστηκε στην ταυτοποίηση ενός γονιδίου, σε άτομα της *D. melanogaster* με μετάλλαξη που προκαλεί ευαισθησία στη θερμοκρασία και παράλυση (*para<sup>ls</sup>*). Μετά την κλωνοποίηση του γονιδιακού τόπου *para* στη *D. melanogaster*, η γενετική ανάλυση έδειξε τη σύνδεση μεταξύ του φαινοτύπου της *kdr* και του ομόλογού του *para* στη *M. domestica*. Στη συνέχεια, βρέθηκε ότι μια αντικατάσταση αμινοξέος συνδέεται με την *kdr* και η προσθήκη μιας δεύτερης αντικατάστασης αμινοξέος με το αλληλόμορφο *super-kdr*. Οι ακόλουθες αναλύσεις, σε ευρύ φάσμα επιζήμιων για τη γεωργία εντόμων, αποκάλυψαν αντίστοιχες μεταλλάξεις σε παρόμοιες θέσεις των γονιδιακών τόπων διόδων  $\text{Na}^+$ , οι οποίες ευθύνονταν για την ανάπτυξη ανθεκτικότητας στα πυρεθροειδή (ffrench-Constant et al. 2004).

Ο υπεύθυνος γενετικός παράγοντας ήταν υποτελής, εντοπισμένος στο χρωμόσωμα 3 της *M. domestica*. Αργότερα, βρέθηκαν και άλλα αλληλόμορφα, που είναι όμοια με το αλληλόμορφο που εντοπίστηκε αρχικά (Scott & Dong 1994).

#### 3.7.1) Μεταλλάξεις τύπου *kdr*

Στις αλληλουχίες αμινοξέων παρατηρούνται υποκαταστάσεις, που συνδέονται με την ανθεκτικότητα τύπου *kdr* και κατανέμονται κατά μήκος της μεγάλης υπομονάδας  $\alpha$  της πρωτεΐνης του διαύλου  $\text{Na}$ . Οι περισσότερες από τις 20 μεταλλάξεις που συνδέονται με την ανθεκτικότητα παρατηρούνται σε 1 από 3 τμήματα της πρωτεΐνης του διαύλου  $\text{Na}$ . Τρεις από αυτές έχουν αναγνωριστεί ως

μεμονωμένες μεταλλάξεις σε ανθεκτικούς πληθυσμούς (T929I, L1014F, L1014H) (Soderlund & Knipple 2003).

Μεταξύ των μεταλλάξεων, οι υποκαταστάσεις λευκίνης από φαινυλαλανίνη ή ιστιδίνη ή σερίνη στην υπολειμματική θέση 1014 (L1014F ή L1014H ή L1014S) διαδραματίζουν τον κύριο ρόλο και έχουν παρατηρηθεί σε πολλά είδη εντόμων με ανθεκτικότητα στα πυρεθροειδή τύπου *kdr*. Οι μεταλλάξεις L1014F, L1014S, L1014H έχουν εντοπιστεί στα διαμεμβρανικά τμήματα S6 των υπομονάδων I, II, III, που θεωρείται ότι συνδέονται στενά μεταξύ τους, περιβάλλοντας τον πόρο του διαύλου (Soderlund & Knipple 2003). Οι υποκαταστάσεις μεθειονίνης από θυμίνη ή βαλίνη στην υπολειμματική θέση 918 (M918T, M918V) εντοπίζονται στους κοντούς ενδοκυτταρικούς βρόχους, που συνδέουν τις διαμεμβρανικές έλικες των ομόλογων τμημάτων I, II και III. Αυτές οι μεταλλάξεις περιλαμβάνουν τις M918T (Guerrero et al. 1997, Miyazaki et al. 1996) και M918V (Morin et al. 2002) στο ομόλογο τμήμα II.

Στη *M. domestica* δύο σημειακές μεταλλάξεις σχετίζονται με τους ανθεκτικούς φαινοτύπους. Αυτές είναι η L1014F (Miyazaki et al. 1996) σε όλα τα στελέχη *kdr* και *super-kdr* και η επιπρόσθετη αντικατάσταση μεθειονίνης από θρεονίνη στην υπολειμματική θέση 918 (M918T), μόνο στα στελέχη *super-kdr*. Η δομή και η οργάνωση των γονιδίων δίδουν  $\text{Na}^+$  ήταν τυπική γονιδίων που κωδικοποιούν τη σύνθεση των υπομονάδων  $\alpha$  και κατά 90% όμοια με αυτήν του προϊόντος του γονιδιακού τόπου *para* της *D. melanogaster* (Ingles et al. 1996, Williamson et al. 1996). Η M918T δεν έχει εντοπιστεί σε κανένα από τους πληθυσμούς της *M. domestica* ως τώρα όταν απουσιάζει η μετάλλαξη L1014F (Soderlund & Knipple 2003). Στο *Culex pipiens* L. (Diptera: Culicidae) η ανθεκτικότητα *kdr* συνδέεται είτε με την L1014F σε ορισμένα στελέχη ανθεκτικά στα πυρεθροειδή ή με την L1014S, σε στελέχη ελαφρά ανθεκτικά σε πυρεθροειδή αλλά ισχυρά ανθεκτικά στο DDT. Δεν παρατηρήθηκε όμως παρουσία μετάλλαξης τύπου *super-kdr* (M918T) (Martinez-Torres et al. 1999a). Στο *A. gambiae*, πέρα από τη μετάλλαξη L1014F που συνδέεται με την ανθεκτικότητα στο permethrin και στο DDT, η L1014S οδηγεί σε ανθεκτικότητα στο permethrin (Ranson et al. 2000). Στην αφίδα *M. persicae*, βρέθηκε ότι η μετάλλαξη L1014F στο διαμεμβρανικό τμήμα IIS6 σε ορισμένους ανθεκτικούς κλώνους αποτελεί το κύριο μηχανισμό πρόκλησης ανθεκτικότητας στο deltamethrin και το DDT, ενώ ο μηχανισμός των εστερασών συνεισφέρει σημαντικά στην αύξηση του γενικού επιπέδου ανθεκτικότητας (Martinez-Torres et al. 1999b). Παρόμοια μετάλλαξη (L1014F) έχει εντοπιστεί περίπου στο κέντρο του τμήματος IIS6 και στην

περίπτωση της *B. germanica* (Liu et al. 2000), του *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Coleoptera: Coccinellidae), όπου προκαλεί ανθεκτικότητα στο permethrin (Lee et al. 2000) και της *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera:Plutellidae), όπου προκάλεσε ισχυρή ανθεκτικότητα στα πυρεθροειδή (Schuler et al. 1998). Στο *H. armigera*, η L1014H είναι υπεύθυνη για την ανάπτυξη ανθεκτικότητας στα πυρεθροειδή (Park & Taylor 1997).

Μεταλλάξεις αντίστοιχες με την M918T της *M. domestica* έχουν βρεθεί ως τώρα σε ισχυρά ανθεκτικούς στο permethrin και το cyhalothrin πληθυσμούς του *Haematobia irritans* L. (Diptera: Muscidae). Εκτός από τη μετάλλαξη L1014F, παρατηρήθηκε σε ισχυρά ανθεκτικό στέλεχος και αντικατάσταση θρεονίνης από μεθειονίνη (M918T). Βρέθηκε ότι η ανθεκτικότητα οφείλεται τόσο σε μετάλλαξη τύπου *super-kdr*, όσο και σε αυξημένο μεταβολισμό εντομοκτόνου (Guerrero et al. 1997). Σε μια άλλη περίπτωση, μια νέα μετάλλαξη στη θέση 918, η M918V ανιχνεύθηκε σε ορισμένους ανθεκτικούς πληθυσμούς του αλευρώδη *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Homoptera: Aleurodidae) (Morin et al. 2002). Η συγκεκριμένη μετάλλαξη εντοπίζεται μεταξύ των διαμεμβρανικών τμημάτων 4 και 5 του τμήματος II της πρωτεΐνης διόδου Na<sup>+</sup> (IIS4-5), στο τμήμα που τα συνδέει. Στην περίπτωση της *M. persicae*, η M918T έχει παρατηρηθεί σε πληθυσμούς διαφορετικών γεωγραφικών προελεύσεων ταυτόχρονα με την L1014F (Anstead et al. 2005) και είναι διαδεδομένη στην Ευρώπη (Anstead et al. 2007).

Θεωρείται ότι οι υπόλοιπες μεταλλάξεις λειτουργούν ως δευτερεύουσες, παράγοντας προσθετικές ή συνεργιστικές επιδράσεις στο επίπεδο ανθεκτικότητας που προκαλεί η L1014F μόνη της (Soderlund & Knipple 2003). Η υποκατάσταση ασπαραγίνης από βαλίνη στη θέση 1494 (A1494V) εντοπίστηκε στην περιοχή σχηματισμού του πόρου, μεταξύ των τμημάτων S5,S6 της υπομονάδας III *D. melanogaster*. Επιπλέον, σε παρόμοια με αυτήν της M918T θέση στην υπομονάδα III εντοπίστηκε στη *D. melanogaster* η A1410V. Στα στελέχη που είχαν τόσο τη μετάλλαξη A1410V όσο και την M1524I (ιστιδίνη αντί μεθειονίνης στη θέση 1524), παρουσιάστηκαν μεγαλύτερα επίπεδα ανθεκτικότητας στο deltamethrin από τα αναμενόμενα από τις προσθετικές επιδράσεις των δύο μεμονωμένων μεταλλάξεων. Οι δύο αυτές μεταλλάξεις παρατηρούνται σε θέσεις στο ομόλογο τμήμα III παρόμοιες με τις θέσεις των μεταλλάξεων M918T και L1014F, στο τμήμα II του γονιδίου *Vssc1* των στελεχών της *M. domestica* με τη μετάλλαξη *super-kdr*. Εκτός από αυτές, παρατηρήθηκε και η μετάλλαξη I1253N (Pittendrigh et al. 1997).



Επιπλέον, τέσσερις νέες μεταλλάξεις που προκύπτουν από αντικατάσταση ασπαρτικού οξέος από γλυκίνη (D58G), αντικατάσταση γλουταμικού οξέος από κυστεΐνη (E434K), αντικατάσταση κυστεΐνης από αργινίνη (C784R) και αντικατάσταση προλίνης από λευκίνη (P1888L), παρατηρούνται μαζί με την L993F, σε ένα ή περισσότερα στελέχη της *B. germanica* με ισχυρή ανθεκτικότητα στα πυρεθροειδή. Από αυτές, οι E434K και C784R εντοπίζονται στον πρώτο ενδοκυτταρικό σύνδεσμο, μεταξύ των τμημάτων I και II (Liu et al. 2000). Οι μεταλλάξεις D1549V και E1553G έχουν εντοπιστεί μόνο μαζί, επίσης στους ενδοκυτταρικούς συνδέσμους μεταξύ ομόλογων τμημάτων, σε ανθεκτικές στα πυρεθροειδή προνύμφες των ειδών *H. virescens* και *H. armigera* (Head et al. 1998).

Στο ίδιο τμήμα με την M918V, εντοπίστηκε και μια αντικατάσταση ισολευκίνης από λευκίνη (L925I). Η L925I συνδέεται με ανθεκτικότητα σε μίγμα πυρεθροειδούς και οργανοφωσφορικού (fenpropathrin + acephate). Πρόσφατα, διαγνώστηκε στην Κρήτη η παρουσία της μετάλλαξης L925I, σε πληθυσμούς του *B. tabaci*, συνοδευόμενη όμως από αντικατάσταση θρεονίνης από βαλίνη στη θέση 929 (T929V), μετάλλαξη που παρατηρήθηκε για πρώτη φορά στο *B. tabaci* και ευθύνεται μαζί με την L925I για την ανθεκτικότητα στο alpha-cypermethrin (Roidakis et al. 2006).

Σε λεπιδόπτερα έχουν βρεθεί και άλλες μεταλλάξεις, όπως η αντικατάσταση της λευκίνης από ιστιδίνη στη θέση 1029 (L1029H) στο *H. virescens*. Η μετάλλαξη προκαλεί ισχυρή ανθεκτικότητα και εντοπίζεται στο τμήμα II του διαμεμβρανικού τμήματος S6. Μια νέα μετάλλαξη (V421M) στο τμήμα IS6, ανιχνεύθηκε σε μοναδικό ανθεκτικό απλότυπο, όχι όμως σε ευαίσθητους ή ανθεκτικό απλότυπο που είχε τη μετάλλαξη L1029H (Park et al. 1997). Τέλος, σε ανθεκτικό στα πυρεθροειδή πληθυσμό του *P. xylostella*, ανιχνεύθηκε μαζί με την L1014F (στο τμήμα 6 της θέσης II διόδου Na<sup>+</sup>) μια αντικατάσταση ιστιδίνης από θυμίνη (T929I), σε ισχυρά ανθεκτικά στα πυρεθροειδή στελέχη (Schuler et al. 1998).

Συχνά, οι μεταλλάξεις τύπου *kdr* που ευθύνονται για την ανθεκτικότητα εντόμων στα πυρεθροειδή, συνοδεύονται και από κάποιο κόστος στην προσαρμοστικότητα του είδους. Το κόστος αυτό ίσως εκδηλώνεται με μειωμένη ικανότητα επιβίωσης, μειωμένο σωματικό βάρος, βραδύτερο αναπτυξιακό ρυθμό ή μειωμένη ικανότητα αποφυγής φυσικών εχθρών. Για παράδειγμα, έχει παρατηρηθεί ότι στο είδος *C. ripiens* ανθεκτικά άτομα παρουσίασαν μειωμένη ικανότητα διαχείμασης (Gazave et al. 2001). Σε άλλη περίπτωση, σε κλώνους της *M. persicae* με

διαφορετικές προελεύσεις και ανθεκτικότητα οφειλόμενη σε συνδυασμούς των μηχανισμών τύπου *kdr* και εστερασών, παρατηρήθηκε μειωμένη απόκριση σε συνθετικό ανάλογο της φερομόνης συναγερού. Αυτό ίσως έχει ως αποτέλεσμα μειωμένη ικανότητα αποφυγής παρασιτοειδών και αρπακτικών και τελικά μειωμένη ικανότητα επιβίωσης (Foster et al. 1999). Οι ανθεκτικοί στα εντομοκτόνα πληθυσμοί του *Choristoneura rosaceana* (Harris) (Lepidoptera: Tortricidae) χαρακτηρίζονταν από μειωμένο σωματικό βάρος, μικρότερο νυμφικό και μεγαλύτερο χρόνο ανάπτυξης (Carriere et al. 1994).

#### 4) ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Με βάση τα υπάρχοντα δεδομένα, φαίνεται ότι το πρόβλημα της ανθεκτικότητας είναι διαδεδομένο σε ευρεία κλίμακα. Επιπλέον, είναι γνωστές οι αρνητικές επιπτώσεις της χημικής καταπολέμησης για την υγεία και το περιβάλλον και τα προβλήματα από την εντατική χημική καταπολέμηση είναι σοβαρά. Από την άλλη μεριά, οι διατροφικές ανάγκες αυξάνονται συνεχώς και οι ανάγκες επιτυχημένης φυτοπροστασίας είναι δεδομένες. Η προσπάθεια συγκερασμού όλων των απαιτήσεων (προστασία υγείας, περιβάλλοντος, παραγωγής) έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη της ολοκληρωμένης διαχείρισης εχθρών και ασθενειών των φυτών. Στο πλαίσιο μιας τέτοιας στρατηγικής, είναι απαραίτητη η ορθολογική διαχείριση των διατιθέμενων φυτοπροστατευτικών, με σκοπό τη διατήρηση της αποτελεσματικότητάς τους. Για να επιτευχθεί κάτι τέτοιο, είναι αναγκαία η παρακολούθηση του επιπέδου ανθεκτικότητας στους πληθυσμούς εντόμων στον αγρό, μέσω προγραμμάτων παρακολούθησης του φαινομένου σε τακτικά χρονικά διαστήματα.

Επομένως, σκοπός της εργασίας είναι να γίνει μια πρώτη προσπάθεια μελέτης της δυνατότητας ανάπτυξης ανθεκτικότητας του *Bactrocera oleae* στο πυρεθροειδές alpha-cypermethrin. Η μελέτη αποσκοπεί στην καταγραφή της ανθεκτικότητας στο alpha-cypermethrin, μέσω βιοδοκιμών σε δείγματα από φυσικούς πληθυσμούς του εντόμου και επιπλέον, στη διερεύνηση της δραστηριότητας ενζυμικών συστημάτων (εστεράσες, τρανσφεράσες της γλουταθειόνης, μονοοξυγενάσες του κυτοχρώματος P450), που εμπλέκονται στην ενζυμική αποτοξίκωση εντομοκτόνων.

## **B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## 1) ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Είναι γνωστό ότι το επίπεδο της οικονομικής ζημιάς που προκαλεί ο δάκος στην καλλιέργεια της ελιάς είναι σημαντικό. Με βάση τον Chaniotakis (1994), η ζημιά ανέρχεται περίπου στο 30% της τελικής παραγωγής καρπού κάθε χρόνο, ενώ για τη μείωση των ζημιών δαπανήθηκαν το 1994 περίπου 20 εκατομμύρια δολάρια ΗΠΑ, για την καταπολέμηση του δάκου στο 75% των δέντρων.

Ως τώρα, έχει ήδη μελετηθεί εκτεταμένα η ανθεκτικότητα στα οργανοφωσφορικά στην Ελλάδα και την Κύπρο με βιοδοκιμές (Skouras et al. 2007) και διαπιστώθηκε η ανάπτυξη ισχυρής ανθεκτικότητας. Επιπλέον, σε βιοχημικό και μοριακό επίπεδο το φαινόμενο έχει διερευνηθεί σημαντικά από τους Vontas et al. (2001, 2002) και σε ευρύτερη γεωγραφική κλίμακα με μοριακές δοκιμές από τους Hawkes et al. (2005). Τα διαθέσιμα δεδομένα όμως σχετικά με τη δυνατότητα ανάπτυξης ανθεκτικότητας του *B. oleae* στα πυρεθροειδή είναι περιορισμένα (Σκούρας, 2005).

Σε άλλα συγγενή είδη όμως, όπως το *Bactrocera dorsalis* (Hendel)(Diptera: Tephritidae) (πολυφάγο είδος που παρατηρείται σε υποτροπικές-τροπικές περιοχές σε καλλιέργειες φρούτων), έχει διαπιστωθεί η ανάπτυξη ανθεκτικότητας σε αρκετές κλάσεις εντομοκτόνων, μεταξύ των οποίων και πυρεθροειδή, στην Ταιβάν (Hsu et al. 2004). Το *B. dorsalis* ανέπτυξε ανθεκτικότητα στα πυρεθροειδή, κάτω από συνεχή διαδικασία επιλογής σε εργαστηριακές συνθήκες, μετά την όγδοη γενιά επιλογής. Μεταξύ των τριών πυρεθροειδών που εξετάστηκαν, ο βραδύτερος ρυθμός ανάπτυξης ανθεκτικότητας παρατηρήθηκε στο cypermethrin και ο ταχύτερος στο fenvalerate. Η ανθεκτικότητα όμως ήταν σε κάθε περίπτωση σημαντικά μικρότερη από αυτήν στα οργανοφωσφορικά.

Αντίθετα, στο *Dacus ciliatus* (Loew) (Diptera:Tephritidae) παρατηρήθηκε ότι τα πυρεθροειδή ήταν πολύ αποτελεσματικά, σε μελέτες που έγιναν στο Ισραήλ (Maklakov et al. 2001). Ελαφρά ταχύτερη μεταξύ των πυρεθροειδών που εξετάστηκαν, ήταν η δράση του cypermethrin,

Δεδομένα σχετικά με το μεταβολισμό πυρεθροειδών σε συγγενή είδη της οικογένειας Tephritidae, έδειξαν ότι στο *D. ciliatus* αυτός οφείλεται κυρίως στη δράση του P450 (Maklakov et al. 2001). Το PB (piperonyl butoxide, ουσία που αυξάνει συνεργιστικά τη δράση πυρεθροειδών, παρεμποδίζοντας τη δράση των οξειδασών) παρουσίασε σημαντική συνεργιστική δράση για όλα τα πυρεθροειδή που εξετάστηκαν και στην περίπτωση του *B. dorsalis*, κάτι που έδειξε ότι ο μεταβολισμός

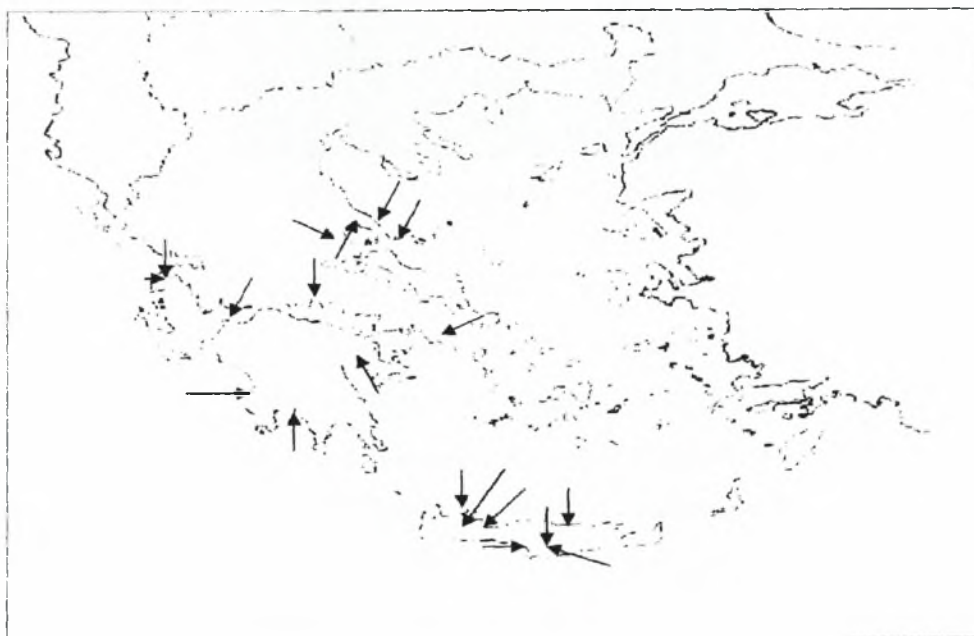
των πυρεθροειδών οφειλόταν στη δράση του P450. Επιπλέον, παρατηρήθηκε και δραστηριότητα του DEF (S,S,S,- tributyl phosphorotrithioate, παρεμποδιστής δράσης των οξειδασών, εστερασών) (Hsu et al. 2004). Επομένως, για να διερευνηθεί αν υπάρχει δυνατότητα ανάπτυξης ανθεκτικότητας του δάκου στο alpha-cypermethrin, πραγματοποιήθηκαν αντίστοιχες βιοδοκιμές και βιοχημικές δοκιμές.

## 2) ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1) ΕΚΤΡΟΦΗ ΤΩΝ ENTOMΩΝ

#### 2.1.1) Συλλογή των εντόμων

Κατά τη διάρκεια διεξαγωγής του πειράματος, πραγματοποιήθηκαν συνολικά 13 δειγματοληψίες φυσικών πληθυσμών δάκου (Εικόνα 3). Η συλλογή προσβεβλημένων από δάκο καρπών ελιάς από τους ελαιώνες έγινε από όσο το δυνατό μεγαλύτερη έκταση. Για τη συλλογή και μεταφορά στο εργαστήριο χρησιμοποιήθηκαν χάρτινες σακούλες, ενώ για τη νύμφωση των εξερχόμενων από τους καρπούς προνυμφών πλαστικές λεκάνες με αδρανές υλικό νύμφωσης (πριονίδι).



Εικόνα 3. Χάρτης δειγματοληψιών φυσικών πληθυσμών δάκου από την Ελλάδα

Οι προσβεβλημένοι καρποί διατηρούνταν στο εργαστήριο, σε σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας ( $23 \pm 0,5^\circ \text{C}$ ), σχετικής υγρασίας ( $65 \pm 5 \%$ ) και φωτοπεριόδου (L: D 16: 8). Καθημερινά γινόταν έλεγχος, για απομάκρυνση σάπιων

καρπών και συλλογή ενηλίκων που εξέρχονται από τη νύμφωση ή νυμφών από το προνίδι. Στη συνέχεια, τα ενήλικα τοποθετούνταν σε κλωβούς εκτροφής, όπου και παρέμεναν στις ίδιες συνθήκες, ως την πραγματοποίηση των βιοδοκιμών. Οι νύμφες τοποθετούνταν σε μικρά πλαστικά διαφανή κουτιά, όπου και παρέμεναν μέχρι την έξοδο από αυτές των ενηλίκων, στις ίδιες επίσης συνθήκες.

Η διαδικασία συλλογής των δειγμάτων περιγράφεται πιο αναλυτικά στο παράρτημα.

### 2.1.2) Εκτροφή του δάκου

Για την εκτροφή τόσο των προνυμφών του εργαστηριακού στελέχους του δάκου, όσο και των ενηλίκων που προέρχονται από τις δειγματοληψίες, χρησιμοποιήθηκαν κατάλληλες τροφές (Tsitsipis 1983b, Tsitsipis & Kontos 1983). Για την εκτροφή του εργαστηριακού στελέχους, χρησιμοποιήθηκαν μικροί κλωβοί από plexiglass (εικόνα 4).



Εικόνα 4. Κλωβός εκτροφής ενηλίκων του *Bactrocera oleae* (Φωτο:Ν.Καλογιάννης).

Το εργαστηριακό στέλεχος του δάκου, που χρησιμοποιήθηκε ως μέτρο σύγκρισης κατά τις βιοδοκιμές, προήλθε από το Ερευνητικό Κέντρο «Δημόκριτος» και δεν είχε δεχτεί την επίδραση επεμβάσεων από εντομοκτόνα για περισσότερο από 30 χρόνια. Οι νύμφες του εργαστηριακού στελέχους τοποθετήθηκαν στον κλωβό αναπαραγωγής, όπου και διατηρήθηκαν σε συνθήκες σταθερής θερμοκρασίας ( $23 \pm 0,5^\circ \text{C}$ ), σχετικής υγρασίας ( $65 \pm 5 \%$ ) και φωτοπεριόδου (L: D 16: 8). Μετά την έξοδο, τα ενήλικα διατηρούνταν στους κλωβούς, στις ίδιες συνθήκες. Για τη διατροφή των ενηλίκων χρησιμοποιούταν στερεά τροφή, αποτελούμενη από λειοτριβημένο μίγμα υδρολυμένης πρωτεΐνης και κρυσταλλικής ζάχαρης, σε αναλογία 1:3. Οι διαδικασίες παρασκευής των τροφών και εκτροφής παρατίθενται αναλυτικά στο παράρτημα.

### 2.1.3) Συλλογή αυγών και εκτροφή προνυμφών του δάκου

Μετά την πάροδο 3-4 ημερών στις συγκεκριμένες συνθήκες, άρχιζε η συλλογή των αυγών του εργαστηριακού στελέχους. Στη συνέχεια, γινόταν μεταφορά των αυγών με πιπέτα σε τρυβλία Petri. Μετά από 3-4 ημέρες διατήρησης των αυγών σε σταθερές συνθήκες (θερμοκρασία  $23 \pm 0,5^\circ \text{C}$ , σχετική υγρασία  $95 \pm 5 \%$  και φωτοπερίοδος L: D 16: 8), γινόταν έκπλυση των διηθητικών χαρτιών σε ποτήρι ζέσης, με σκοπό τη συλλογή των αυγών.

Οι νεαρές προνύμφες μετά την εκκόλαψη τρέφονταν μέσα σε πλαστικά διαφανή κουτιά και μετά 10-12 ημέρες νυμφώνονταν μέσα στα κουτιά. Τελικά γινόταν συλλογή των νυμφών του δάκου. Η σύσταση της τροφής, όπως και οι διαδικασίες συλλογής αυγών και εκτροφής προνυμφών παρατίθενται αναλυτικά στο παράρτημα.

## 2.2) ΒΙΟΔΟΚΙΜΕΣ

### 2.2.1) Μέθοδος βιοδοκιμών

Για την πραγματοποίηση βιοδοκιμών στο *B. oleae*, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της τοπικής εφαρμογής alpha-cypermethrin στα έντομα. Σε κάθε βιοδοκιμή, παρασκευάζονταν διαλύματα γνωστών συγκεντρώσεων alpha-cypermethrin, με διαλύτη ακετόνη (pro analysis, 98 %). Το εντομοκτόνο που χρησιμοποιήθηκε είναι εμπορικό σκεύασμα (FASTAC 10 SC, BASF). Επιλέχθηκε η μέθοδος με πλήρες εύρος δόσεων (full dose bioassay), με δόσεις εντομοκτόνου ίσες με το 1/128, το 1/64, το 1/32, το 1/16, το 1/8 ή και το 1/80 και 1/12 της προτεινόμενης δόσης (30 ng/ έντομο). Σε όλες τις βιοδοκιμές συμπεριλήφθηκε και μάρτυρας (ακετόνη).

Για κάθε δόση χρησιμοποιούνταν 20-30 ενήλικα άτομα του *B. oleae*, με προσπάθεια τήρησης αναλογίας αρσενικών/ θηλυκά 1/ 1 σε κάθε δόση. Μετά την εφαρμογή του εντομοκτόνου, τα έντομα διατηρούνταν σε κλωβούς από plexiglass (εικόνα 4). Στα έντομα χορηγούνταν τροφή και απεσταγμένο νερό (τοποθετημένα στο εσωτερικό των κλωβών), για διάστημα 48 ωρών μετά την πραγματοποίηση της βιοδοκιμής. Η μέθοδος παρατίθεται με περισσότερες λεπτομέρειες στο παράρτημα.

## 2.3) ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΕΣ

### 2.3.1) Μεθοδολογία βιοχημικών δοκιμών

Οι βιοχημικές δοκιμές που διεξήχθησαν είχαν στόχο τη διερεύνηση των επιπέδων δραστηριότητας των ένζυμων α- και β- εστεράση (α- και β- esterase),

τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST) και μονοοξυγενάση P450, σε δείγματα από φυσικούς πληθυσμούς του *B. oleae*.

Η ομογενοποίηση των εντόμων, η εκτίμηση της ολικής ποσότητας πρωτεΐνης και η διερεύνηση των επιπέδων δραστηριότητας των  $\alpha$ - και  $\beta$ -εστερασών διεξήχθησαν με βάση το πρωτόκολλο των Vontas et al. (2001). Για την εκτίμηση της ποσότητας ( $\mu\text{g}$ ) ολικών πρωτεϊνών και της δραστηριότητας γενικών εστερασών, χρησιμοποιούνταν έντομα από τα οποία είχαν προηγουμένως οι πτέρυγες (ένα ολόκληρο έντομο ανά βοθρίο της πλάκας ELISA). Η πλάκα παρέμενε σε σκοτεινό μέρος επί πέντε λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου ( $25^\circ \text{C}$ ) και γινόταν λήψη της ένδειξης του φασματοφωτόμετρου (OD: optical density), για το τελικό σημείο της αντίδρασης (end point) στα 630 nm. Πριν τη διαδικασία εκτίμησης της ολικής ποσότητας πρωτεϊνών του εντόμου, κατασκευάστηκε η πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης του οργάνου, με πρότυπα διαλύματα BSA (Bovine Serum Albumin), συγκεντρώσεων 0, 1, 2, 5, 7,5, 10 και 15  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

Για την εκτίμηση της δραστηριότητας γενικών εστερασών, γινόταν προσθήκη σε κάθε βοθρίο 20 (ή τροποποιημένα με τον τρόπο που αναφέρεται στο παράρτημα)  $\mu\text{l}$  ομογενοποιημάτος. Για κάθε έντομο γίνονταν δύο επαναλήψεις με  $\alpha$ -Naphthyl acetate και δύο με  $\beta$ -Naphthyl acetate.

Η πλάκα διατηρούταν σε σκοτεινό σημείο επί 30 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου ( $25^\circ \text{C}$ ). Ακολούθως, γινόταν προσθήκη διαλύματος χρωστικής fast blue στα βοθρία και διατήρηση της πλάκας επί πέντε λεπτά σε σκοτεινό σημείο, σε θερμοκρασία δωματίου ( $25^\circ \text{C}$ ). Μετά την παρέλευση του απαιτούμενου χρονικού διαστήματος, γινόταν λήψη της ένδειξης του φασματοφωτόμετρου (OD) στα 630 nm, για το τελικό σημείο της αντίδρασης (end point). Για την επεξεργασία των αποτελεσμάτων του οργάνου χρησιμοποιήθηκε το πακέτο KC Junior (Bio-Tek Instruments).

Η διερεύνηση των επιπέδων δραστηριότητας της τρανσφεράσης της γλουταθειόνης (GST) πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο που περιγράφηκε από τους Vontas et al. (2001). Για την εκτίμηση της δραστηριότητας της GST σε μεμονωμένα έντομα, χρησιμοποιούνταν εις διπλούν 10  $\mu\text{l}$  ομογενοποιημάτος κάθε εντόμου, που προστίθονταν στα βοθρία της πλάκας ELISA. Σε κάθε βοθρίο στο οποίο είχε προστεθεί προηγουμένως ομογενοποίημα εντόμου, προστίθονταν 200  $\mu\text{l}$  από το μίγμα CDNB (1-χλωρο-2,4-δινιτροβενζόλιο). Τελικά, το μίγμα που προέκυπτε διατηρούταν για ένα λεπτό και το επίπεδο δραστηριότητας της GST εκτιμιόταν με εξέταση της



οπτικής πυκνότητας του μίγματος αντίδρασης σε φασματοφωτόμετρο, κινητικά στα 340 nm, ανά 5 λεπτά. Οι μονάδες μέτρησης εκφράζονταν σε τιμές mOD/ min.

Η εκτίμηση της δραστηριότητας του P450 πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο που περιγράφηκε από τους de Sousa et al. (1995), όπως τροποποιήθηκε από τους Stumpf & Nauen (2002). Για τον προσδιορισμό χρησιμοποιούνταν περίπου 20 κοιλιακά τμήματα τέλειων εντόμων ανά πληθυσμό, σε δύο επαναλήψεις. Οι κοιλίες των εντόμων ομογενοποιούνταν σε ρυθμιστικό διάλυμα και τα ομογενοποιημένα φυγοκεντρώνταν στα 5000g, επί 10 λεπτά στους 4° C. Μετά τη φυγοκέντρηση, το υπερκείμενο στρώμα κάθε ομογενοποιημένου διαχωριζόταν και γινόταν νέα φυγοκέντρηση, στα 15000g επί 15 λεπτά και στη συνέχεια στα 100000g, επί μία ώρα στους 4° C. Η μέθοδος αποσκοπούσε στον προσδιορισμό της δραστηριότητας του ένζυμου απαιθυλάση της Ο-αιθοξικουμαρίνης (ECOD, ethoxycoumarin O-deethylase). Η ανίχνευση απελευθέρωσης φθορίζουσας 7-υδροξικουμαρίνης γινόταν στα 380 nm, κατά τη φάση της διέγερσης και στα 480 nm, κατά τη φάση της εκπομπής ακτινοβολίας. Για την ανίχνευση χρησιμοποιήθηκε μια συσκευή ανάγνωσης φθορισμού M2e (Molecular Devices, UK). Μια μονάδα στις ενδείξεις του οργάνου αντιστοιχούσε σε σχηματισμό 1 pmol 7-υδροξικουμαρίνης ανά λεπτό και ανά mg μικροσωμικής πρωτεΐνης. Οι μέθοδοι παρατίθενται αναλυτικά στο παράρτημα.

### **3) ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ**

Η θνησιμότητα του δάκου εξεταζόταν μετά την παρέλευση 24 και 48 ωρών από την εφαρμογή του εντομοκτόνου. Η επεξεργασία των δεδομένων θνησιμότητας πραγματοποιούνταν με probit analysis, στο στατιστικό πακέτο SPSS (SPSS 13). Η αύξηση της θνησιμότητας είναι ανάλογη με το λογάριθμο της δόσης τοξικής ουσίας. Επομένως, η κλίμακα των δόσεων μετατρέπεται σε λογαριθμική, οπότε η αρχικά ασύμμετρη καμπύλη δόσης-θνησιμότητας (στον άξονα X αναπαρίστανται οι δόσεις σε μονάδες μάζας και στον Y οι διορθωμένες με βάση τον τύπο του Abbot τιμές θνησιμότητας) μετατρέπεται σε συμμετρική. Η καμπύλη μπορεί να γίνει ευθεία (εκτός από τα άκρα της), αν η κλίμακα θνησιμότητας (τεταγμένη) μετατραπεί από αριθμητική σε κλίμακα μονάδων probits. Μια μονάδα probit αντιστοιχεί σε μια τυπική απόκλιση. Αν τα αποτελέσματα βιοδοκιμών αναπαρασταθούν σε κλίμακα ποσοστών (%) του πληθυσμού που αντιστοιχούν σε μονάδες probits, η καμπύλη θα

μετατραπεί σε ευθεία. Η κλίμακα των μονάδων probits ορίζεται έτσι ώστε η τιμή 5 να αντιστοιχεί σε ποσοστό θνησιμότητας 50 % (Τζανακάκης 1995).

Η επεξεργασία των δεδομένων από τις βιοχημικές δοκιμές πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του στατιστικού πακέτου JMP 6 (SAS Institute Inc, USA).

Η ανάλυση συσχέτισης μεταξύ τιμών δραστηριότητας των ένζυμων α- και β-εστεράση, τρανσφεράση της γλουταθειόνης και μονοοξυγενάση 450 και των τιμών RR (Resistance Ratios) κάθε πληθυσμού, πραγματοποιήθηκε με το στατιστικό πακέτο JMP 6 (SAS Institute Inc, USA). Χρησιμοποιήθηκε ο συντελεστής συσχέτισης ( $r$ ) του Pearson.

## 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 4.1) Αποτελέσματα βιοδοκιμών

Τα αποτελέσματα των βιοδοκιμών με το εντομοκτόνο alpha-cypermethrin παρουσιάζονται στον Πίνακα 4. Για λόγους συσχέτισης, αναδημοσιεύονται ύστερα από άδεια του Π. Σκούρα τα στοιχεία που αφορούν αποτελέσματα βιοδοκιμών με alpha-cypermethrin σε ορισμένους φυσικούς πληθυσμούς δάκου, καθώς οι πληθυσμοί που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό δραστηριότητας των ένζυμων (Est α, Est β, GSTs, MFOs) ήταν οι ίδιοι που είχαν χρησιμοποιηθεί και για τις βιοδοκιμές.

Από τα δεδομένα, φαίνεται ότι οι τιμές της μέσης θανατηφόρας συγκέντρωσης (LD<sub>50</sub>) κυμάνθηκαν μεταξύ 0,29 (Ηράκλειο) και 1,38 (Μοίρες Ηρακλείου) ng/ έντομο, για πληθυσμούς από την Κρήτη, μεταξύ 0,26 (Βραχναϊίκα Αχαΐας) και 3,28 (Προσύμνη Αργολίδας, συλλογή 11-11-2003) ng/ έντομο, για πληθυσμούς από την Πελοπόννησο και μεταξύ 0,14 (Καλά Νερά Μαγνησίας) και 0,63 ng/έντομο (Δράκεια Μαγνησίας), για πληθυσμούς από την κεντρική Ελλάδα.

Όλοι οι πληθυσμοί που εξετάστηκαν διέφεραν σημαντικά από τον ευαίσθητο εργαστηριακό πληθυσμό, που χρησίμευσε ως μέτρο σύγκρισης. Με βάση τις τιμές LD<sub>50</sub> και τα όρια εμπιστοσύνης υπολογισμού τους, φαίνεται ότι γενικά δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των περισσότερων πληθυσμών που εξετάστηκαν. Μια ομάδα αποτελούμενη από τρεις πληθυσμούς {Προσύμνη (συλλογή 11-11-2003), Καλαμάτα, Μοίρες} παρουσίασε τις υψηλότερες τιμές LD<sub>50</sub> και σημαντικές διαφορές με όλους τους υπόλοιπους πληθυσμούς, με εξαίρεση μια ομάδα τεσσάρων πληθυσμών (Απόλπαινα, Μικροθήβες, Σκιάθος, Δράκεια). Στον αντίποδα, ένας πληθυσμός από τα Καλά Νερά διέφερε σημαντικά από όλους τους υπολοίπους και παρουσίασε χαμηλή τιμή LD<sub>50</sub>. Μια ομάδα τεσσάρων πληθυσμών (Κάινα, Τυμπάκι, Αποκόρωνος, Πόμπια), διέφερε σημαντικά από την ομάδα των τριών ισχυρά ανθεκτικών πληθυσμών, από αυτόν των Βραχναϊϊκών και αυτόν των Καλών Νερών. Τέλος, όλοι οι υπόλοιποι πληθυσμοί δεν παρουσίασαν σημαντικές διαφορές μεταξύ τους ως προς τις τιμές LD<sub>50</sub>.

Αξιοσημείωτη είναι η στατιστικά σημαντική διαφορά που παρατηρήθηκε μεταξύ δύο δειγματοληψιών από την ίδια περιοχή (Προσύμνη Αργολίδας), που διέφεραν χρονικά κατά τρία χρόνια.

Οι τιμές του λόγου ανθεκτικότητας RR, που εκφράζεται ως λόγος της τιμής LD<sub>50</sub> κάθε πληθυσμού προς την αντίστοιχη τιμή του ευαίσθητου εργαστηριακού στέλεχους (LS), κυμάνθηκαν μεταξύ 4,8 (Ηράκλειο) και 23 (Μοίρες) για την Κρήτη,

**Πίνακας 4.** Θνησιμότητα φυσικών πληθυσμών του δάκου της ελιάς από Ελλάδα και σε ένα εργαστηριακό ευαίσθητο πληθυσμό (LS) στο alpha-cypermethrin. Τα δεδομένα που αφορούν βιοδοκιμές των ετών 2003 και 2004 αναδημοσιεύονται με άδεια του Π. Σκούρα.

Περιοχή	Ημ/νία συλλογής	N	n	LD50(ng/έντομο) (95%)	Κλίση	X <sup>2</sup>	P	df	RR
Προσύμνη									
Αργολίδας	11.xi.2003	6	120	3,28(1,49 – 78,86) <sup>a</sup>	1,17	0,89	0,83	3	54,7
Καλαμάτα	6.xi.2004	7	120	1,83 (1,38 – 3,30) <sup>a</sup>	3,37	1,36	0,72	4	30,5
Μοίρες	1.xii.2005	6	126	1,38(1,06-1,85) <sup>a</sup>	2,77	3,04	0,39	3	23
Ηρακλείου									
Απόλπεινα	7.xi.2006	6	115	1,17(0,60-2,89) <sup>ab</sup>	3,41	5,67	0,13	3	19,5
Λευκάδας									
Μικροθήβες	15.xi.2006	7	129	0,91(0,34-2,08) <sup>abc</sup>	2,53	10,78	0,03	4	15,2
Μαγνησίας									
Σκιάθος	15.x.2006	8	162	0,81(0,15-3,39) <sup>abcd</sup>	2,14	25,81	0,00	5	13,5
Μαγνησίας									
Κάινα	30.xi.2006	6	142	0,72(0,60-0,88) <sup>b</sup>	4,01	0,41	0,94	3	12
Χανίων									
Τυμπάκι	12.xii.2005	6	126	0,69(0,55-0,87) <sup>b</sup>	3,71	0,12	0,99	3	11,5
Ηρακλείου									
Τσουκαλάδες	4.xi.2006	6	116	0,66(0,44-0,92) <sup>bc</sup>	2,02	0,28	0,96	3	11
Λευκάδας									
Αποκόρωνος	29.xi.2006	6	150	0,66(0,53-0,80) <sup>b</sup>	3,52	0,58	0,90	3	11
Χανίων									
Πόμπια	6.xii.2005	6	154	0,64(0,51-0,85) <sup>b</sup>	2,52	0,34	0,95	3	10,7
Ηρακλείου									
Δράκεια									
Μαγνησίας	19.xii.2004	6	94	0,63 (0,2 – 5,22) <sup>abc</sup>	2,33	5,39	0,15	3	10,5
Χανιά	8.xii.2005	6	159	0,58(0,46-0,76) <sup>bc</sup>	2,41	1,76	0,62	3	9,7
Σπάτα	20.x.2006	6	100	0,55(0,44-0,70) <sup>bc</sup>	4,31	3,24	0,36	3	9,2
Αττικής									
Προσύμνη	5.xii.2006	8	170	0,51(0,35-0,67) <sup>bc</sup>	4,95	13,65	0,03	5	8,5
Αργολίδας									
Κυπαρισσία	6.xii.2003	6	123	0,46 (0,31 – 0,73) <sup>bc</sup>	3,00	8,09	0,04	3	7,7
Άμφισσα	19.xii.2004	6	124	0,43 (0,34 – 0,50) <sup>bc</sup>	3,24	1,79	0,62	3	7,2
Ηράκλειο	27.x.2003	7	222	0,29 (0,21 – 0,38) <sup>bc</sup>	1,74	2,01	0,73	4	4,8
Βραχναίικα									
Αχαΐας	8.xii.2004	6	120	0,26 (0,21 – 0,31) <sup>c</sup>	4,55	5,12	0,16	3	4,3
Καλά Νερά									
Μαγνησίας	27.x.2003	5	116	0,14 (0,09 – 0,16) <sup>d</sup>	4,08	1,13	0,57	2	2,3
Ευαίσθητος (LS)	7.x.2005	6	126	0,06(0,04-0,09) <sup>e</sup>	2,08	2,35	0,50	3	

N: αριθμός δόσεων που χρησιμοποιήθηκαν, n: συνολικός αριθμός ατόμων κάθε βιοδοκιμής, RR: λόγος ανθεκτικότητας, df: βαθμοί ελευθερίας. Τιμές που συνοδεύονται από διαφορετικούς εκθέτες διαφέρουν μεταξύ τους στατιστικά σημαντικά (P=0,05).

μεταξύ 4,3 (Βραχναίικα) και 54,7 (Προσύμνη, 11-11-2003) για την Πελοπόννησο και μεταξύ 2,3 (Καλά Νερά) και 15,2 (Μικροθήβες) για την κεντρική Ελλάδα.

Αν καταταγούν οι τιμές του συντελεστή ανθεκτικότητας σε μια κλίμακα, της οποίας τα επίπεδα μπορούν να ταξινομηθούν ως R1 (τιμές λόγου ανθεκτικότητας από 2,1 ως 9,7), R2 (τιμές λόγου ανθεκτικότητας από 10,5 ως 19,5), R3 (τιμές από 23 ως

30,5) και R4 (τιμές λόγου μεγαλύτερες από 30,5), τότε οι κατηγορίες R1, R2, R3, R4 μπορούν να χαρακτηριστούν ως χαμηλής, μέτριας, υψηλής και πολύ υψηλής αντίστοιχα ανθεκτικότητας. Με βάση αυτή την ταξινόμηση, φαίνεται ότι συνολικά οκτώ από τους 20 πληθυσμούς που εξετάστηκαν κατατάσσονται στην κατηγορία χαμηλής ανθεκτικότητας (κλάση R1), εννιά από τους 20 στην κατηγορία μέτριας ανθεκτικότητας (κλάση R2), δύο από τους 20 στην κατηγορία υψηλής ανθεκτικότητας (κλάση R3) και ένας στην κατηγορία πολύ υψηλής ανθεκτικότητας (κλάση R4). Στην κατηγορία R1 κατατάχθηκαν δύο πληθυσμοί από την Κρήτη, ένας από την κεντρική Ελλάδα, δύο από τη στερεά Ελλάδα και τρεις από την Πελοπόννησο. Στην κατηγορία R2 ανήκουν τέσσερις πληθυσμοί από την Κρήτη, δύο από τα Επτάνησα και τρεις από την κεντρική Ελλάδα στην κατηγορία R3 ένας από την Κρήτη και ένας πληθυσμός από την Πελοπόννησο και στην κλάση R4 μόνο ένας πληθυσμός από την Πελοπόννησο.

Ένας δείκτης της ομοιογένειας των πληθυσμών που εξετάστηκαν ως προς την ευπάθειά τους στο alpha-cypermethrin, είναι το κριτήριο  $X^2$ . Όσο περισσότερο ομοιογενής ως προς την ευπάθειά του στο εντομοκτόνο είναι ένας πληθυσμός, τόσο μικρότερη είναι η τιμή του κριτηρίου. Επομένως, η ομοιογένεια μεταξύ των πληθυσμών που εξετάστηκαν ήταν μέγιστη στον πληθυσμό από το Τυμπάκι ( $X^2=0,12$ ) και ελάχιστη σε αυτόν από τη Σκιάθο ( $X^2=25,81$ ). Σημαντική ετερογένεια παρατηρήθηκε επίσης στον πληθυσμό από την Προσύμνη ( $X^2=13,65$ , συλλογή 5-12-2006), τις Μικροθήβες ( $X^2=10,78$ ), την Κυπαρισσία ( $X^2=8,09$ ), τα Απόλπαινα ( $X^2=5,67$ ), τη Δράκεια ( $X^2=5,39$ ) και τα Βραχναϊίκα ( $X^2=5,12$ ).

#### 4.2) Αποτελέσματα βιοχημικών δοκιμών

Τα αποτελέσματα των βιοχημικών δοκιμών (εκτίμηση δραστηριότητας α- και β-εστερασών, τρανσφεράσης της γλουταθειόνης, μονοοξυγενασών του κυτοχρώματος P450) φαίνονται στον Πίνακα 5.

Από τα αποτελέσματα φάνηκε ότι η υψηλότερη τιμή δραστηριότητας α-εστερασών παρατηρήθηκε σε έναν πληθυσμό από την Κρήτη (Μοίρες, 0,08899 OD/μg πρωτεΐνης) και η χαμηλότερη σε έναν πληθυσμό από την κεντρική Ελλάδα (Δράκεια, 0,02029 OD/μg πρωτεΐνης). Ο συγκεκριμένος πληθυσμός προερχόταν από ελαιώνα βιολογικής καλλιέργειας. Ένας ακόμη πληθυσμός από την Πελοπόννησο (Καλαμάτα, 0,07416 OD/μg πρωτεΐνης) παρουσίασε σχετικά υψηλή δραστηριότητα α-εστερασών, με μέση τιμή μεγαλύτερη από αυτήν του εργαστηριακού πληθυσμού

(0,06024 OD/ μg πρωτεΐνης). Οι αντίστοιχες τιμές σε άλλους πληθυσμούς όμως, ήταν χαμηλότερες από αυτήν που παρατηρήθηκε στον ευαίσθητο εργαστηριακό πληθυσμό

**Πίνακας 5.** Μέσες δραστηριότητες των α- και β-εστερασών σε φυσικούς πληθυσμούς και σε ένα ευαίσθητο εργαστηριακό στέλεχος (LS) του *Bactrocera oleae* από την Ελλάδα.

Περιοχή	n	OD/μg πρωτεΐνης (α-naphthyl acetate)	95% Δ.Ε.	OD/μg πρωτεΐνης (β-naphthyl acetate)	95% Δ.Ε.
Κυπαρισσία	48	0,03315 <sup>bc</sup>	(0,02481-0,04149)	0,00633 <sup>abc</sup>	(0,00438-0,00828)
Καλαμάτα	28	0,07416 <sup>ab</sup>	(0,05367-0,09465)	0,01187 <sup>a</sup>	(0,00882-0,01492)
Αργολίδα	25	0,04290 <sup>abc</sup>	(0,03046-0,05534)	0,00584 <sup>abc</sup>	(0,00436-0,00733)
Μοίρες	23	0,08899 <sup>a</sup>	(0,01572-0,16228)	0,01163 <sup>ab</sup>	(0,00357-0,01969)
Τυμπάκι	20	0,03366 <sup>bc</sup>	(0,02516-0,04217)	0,00443 <sup>bc</sup>	(0,00354-0,00532)
Ηράκλειο	31	0,04563 <sup>abc</sup>	(0,03450-0,05676)	0,00767 <sup>abc</sup>	(0,00571-0,00964)
Χανιά	10	0,03204 <sup>abc</sup>	(0,02545-0,03864)	0,00399 <sup>abc</sup>	(0,00336-0,00464)
Πόμπια	11	0,04571 <sup>abc</sup>	(0,02950-0,06192)	0,00869 <sup>abc</sup>	(0,00608-0,01131)
Καλά Νερά	13	0,05130 <sup>abc</sup>	(0,03969-0,06291)	0,00868 <sup>abc</sup>	(0,00564-0,01173)
Δράκεια	24	0,02029 <sup>c</sup>	(0,01837-0,02222)	0,00411 <sup>c</sup>	(0,00313-0,00509)
Άμφισσα	24	0,02762 <sup>bc</sup>	(0,02047-0,03477)	0,00432 <sup>c</sup>	(0,00324-0,00540)
Εργαστηριακός	43	0,06024 <sup>abc</sup>	(0,04858-0,07191)	0,00893 <sup>abc</sup>	(0,00704-0,01083)

Οι μονάδες εκφράζονται ως μονάδες οπτικής πυκνότητας ανά μg πρωτεΐνης (OD/ μg πρωτεΐνης). n: αριθμός ατόμων που εξετάστηκαν, Δ.Ε.: διαστήματα εμπιστοσύνης. Τιμές που συνοδεύονται από διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ( $F_{12,303} = 3,7, P < 0,001, F_{12,303} = 4,0, P < 0,001$ , για τις α- και β-εστεράσες αντίστοιχα).

Αντίστοιχα, οι υψηλότερες τιμές δραστηριότητας β-εστερασών παρατηρήθηκαν και πάλι στους ίδιους πληθυσμούς (Μοίρες, 0,01163 OD/ μg πρωτεΐνης και Καλαμάτα, 0,01187 OD/ μg πρωτεΐνης). Συγκρίσιμες με αυτήν του εργαστηριακού πληθυσμού (0,00893 OD/ μg πρωτεΐνης) τιμές, παρατηρήθηκαν σε έναν πληθυσμό από την Κρήτη (Πόμπια, 0,00869 OD/ μg πρωτεΐνης) και έναν από την κεντρική Ελλάδα (Καλά Νερά, 0,00868 OD/ μg πρωτεΐνης). Όλοι οι υπόλοιποι πληθυσμοί παρουσίασαν τιμές δραστηριότητας αρκετά χαμηλότερες, με τη χαμηλότερη τιμή να παρατηρείται επίσης στον ίδιο πληθυσμό από την κεντρική Ελλάδα όπου σημειώθηκε και η χαμηλότερη τιμή δραστηριότητας α-εστερασών (Δράκεια, 0,00411 OD/ μg πρωτεΐνης).

Δεν παρατηρήθηκαν ωστόσο στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ εργαστηριακού πληθυσμού και φυσικών πληθυσμών, ως προς τις τιμές δραστηριότητας α-εστερασών. Στατιστικά σημαντικές διαφορές όμως παρατηρήθηκαν μεταξύ Μοιρών και Δράκειας και μεταξύ καθενός από αυτούς τους δύο πληθυσμούς

και όλων των υπολοίπων. Παρόμοια εικόνα παρατηρήθηκε και στις τιμές δραστηριότητας β-εστερασών, με την ομάδα πληθυσμών από Δράκεια και Άμφισσα να διαφέρουν σημαντικά από τον πληθυσμό από την Καλαμάτα και όλους τους υπολοίπους, τον πληθυσμό της Καλαμάτας να διαφέρει σημαντικά από όλους τους υπολοίπους και τους υπόλοιπους πληθυσμούς να μη διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους.

**Πίνακας 6.** Μέσες δραστηριότητες της τρανσφεράσης της γλουταθειόνης σε φυσικούς πληθυσμούς και σε ένα ευαίσθητο εργαστηριακό στέλεχος (LS) του *Bactrocera oleae* από την Ελλάδα.

Περιοχή	n	mOD/μg πρωτεΐνης/min	95% Δ.Ε.
Μοίρες Ηρακλείου	9	0,222 <sup>b</sup>	(0,194-0,250)
Τυμπάκι Ηρακλείου	10	0,287 <sup>ab</sup>	(0,266-0,308)
Ηράκλειο	9	0,289 <sup>ab</sup>	(0,271-0,307)
Πόμπια Ηρακλείου	5	0,283 <sup>ab</sup>	(0,265-0,301)
Καλαμάτα	9	0,279 <sup>ab</sup>	(0,255-0,303)
Κυπαρισσία	10	0,275 <sup>ab</sup>	(0,246-0,304)
Προσύμνη Αργολίδας	10	0,219 <sup>b</sup>	(0,204-0,234)
Βραχνέικα Αχαΐας	9	0,316 <sup>ab</sup>	(0,289-0,343)
Καλά Νερά Μαγνησίας	8	0,226 <sup>b</sup>	(0,206-0,246)
LS	13	0,359 <sup>a</sup>	(0,340-0,378)

Οι μονάδες εκφράζονται ως μονάδες οπτικής πυκνότητας ανά μg πρωτεΐνης και ανά λεπτό (mOD/ μg πρωτεΐνης/ λεπτό). n: αριθμός ατόμων που εξετάστηκαν, Δ.Ε.: διαστήματα εμπιστοσύνης. Τιμές που συνοδεύονται από διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ( $F_{9,83} = 3,4$ ,  $P < 0,001$ ).

Οι δραστηριότητες της τρανσφεράσης της γλουταθειόνης ήταν χαμηλότερες σε όλους τους φυσικούς πληθυσμούς, σε σχέση με τον εργαστηριακό πληθυσμό. Τα αποτελέσματα εκτίμησης δραστηριότητας της τρανσφεράσης της γλουταθειόνης φαίνονται στον Πίνακα 6. Στατιστικά σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν μόνο μεταξύ του εργαστηριακού πληθυσμού και όλων των φυσικών που εξετάστηκαν, με τη μέση τιμή δραστηριότητας του ένζυμου στον εργαστηριακό να είναι αρκετά υψηλότερη (0,359 mOD/ μg πρωτεΐνης/ min) από τις αντίστοιχες τιμές όλων των φυσικών πληθυσμών που εξετάστηκαν. Μεταξύ των φυσικών πληθυσμών δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές, ενώ μπορούν να διακριθούν δύο ομάδες με παρόμοιες μέσες τιμές δραστηριότητας: αυτή των πληθυσμών από Προσύμνη, Καλά Νερά και Μοίρες και αυτή όλων των υπολοίπων.

**Πίνακας 7.** Μέσες δραστηρότητες μονοοξυγενασών του κυτοχρώματος P450 σε φυσικούς πληθυσμούς και σε ένα ευαίσθητο εργαστηριακό στέλεχος (LS) του *Bactrocera oleae* από την Ελλάδα.

Περιοχή	n	Δραστηριότητα των P450
Προσύμη Αργολίδας	20	1164,4
Καλαμάτα	20	808,6
Μικροθήβες Μαγνησίας	20	494,7
Μοίρες Ηρακλείου	20	n.a.
Τυμπάκι Ηρακλείου	20	245,2
Πόμπια Ηρακλείου	20	n.a.
Δράκεια Μαγνησίας	20	n.a.
Χανιά	20	n.a.
Κυπαρισσία	20	283,5
Άμφισσα	20	n.a.
Ηράκλειο	20	925,3
Βραχυνέα Αχαΐας	20	308,6
Καλά Νερά Μαγνησίας	20	293
LS	20	445

Οι μονάδες εκφράζονται ως pmol 7-υδροξυκουμαρίνης ανά λεπτό και ανά mg μικροσωμικής πρωτεΐνης. n: αριθμός κοιλιακών τμημάτων που εξετάστηκαν, n.a.: δεν εντοπίστηκε δραστηρότητα. Για κάθε πληθυσμό χρησιμοποιήθηκαν περίπου 20 κοιλιακά τμήματα, σε 2 επαναλήψεις.

Επομένως, δε διαπιστώθηκε ότι τα συγκεκριμένα μεταβολικά μονοπάτια (Est/GST) αποικοδόμησης εντομοκτόνων διαδραματίζουν κάποιο ρόλο στην ανθεκτικότητα στο alpha-cypermethrin.

Αντίθετα με τις τιμές δραστηρότητας εστερασών και τρανσφερασών της γλουταθειόνης, παρατηρήθηκε ότι σε ορισμένες περιοχές η δραστηρότητα των κυτοχρωμάτων P450 ήταν αυξημένη, συγκριτικά με τον εργαστηριακό πληθυσμό. Για παράδειγμα, στους πληθυσμούς από την Προσύμη Αργολίδας, το Ηράκλειο και την Καλαμάτα παρατηρήθηκαν τιμές 1164,4, 925,3 και 808,6 pmol 7-υδροξυκουμαρίνης/λεπτό/ mg μικροσωμικής πρωτεΐνης αντίστοιχα. Παρομοίως, ο πληθυσμός από τις Μικροθήβες παρουσίασε υψηλότερη τιμή (494,7) δραστηριότητας του P450 σε σχέση με τον εργαστηριακό πληθυσμό (445). Στους υπόλοιπους πληθυσμούς, οι τιμές δραστηρότητας του P450 ήταν χαμηλότερες από αυτήν του εργαστηριακού και χωρίς σημαντικές διαφορές μεταξύ τους. Τα αποτελέσματα εκτίμησης δραστηρότητας μονοοξυγενασών του κυτοχρώματος P450 φαίνονται στον Πίνακα 7.

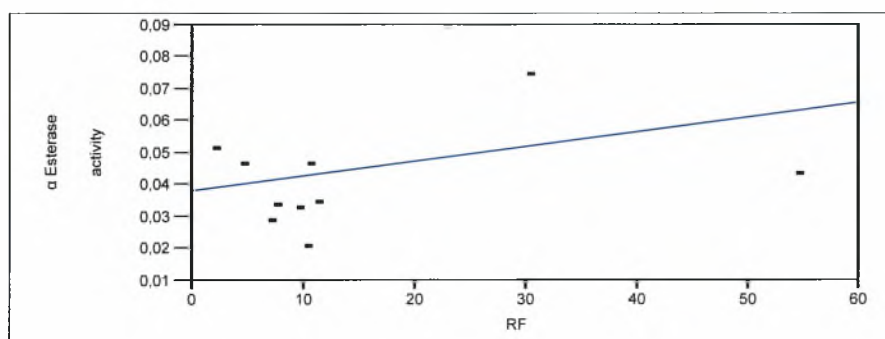
Στη συνέχεια, διερευνήθηκε αν τα ένζυμα που μελετήθηκαν σχετίζονται με την ανθεκτικότητα, χρησιμοποιώντας το συντελεστή συσχέτισης  $r$  του Pearson. Όσον αφορά τις εστεράσες, δεν παρατηρήθηκε ισχυρή συσχέτιση μεταξύ των τιμών RR και των τιμών δραστηρότητας ενζύμων που προσδιορίστηκαν για κάθε πληθυσμό {οι



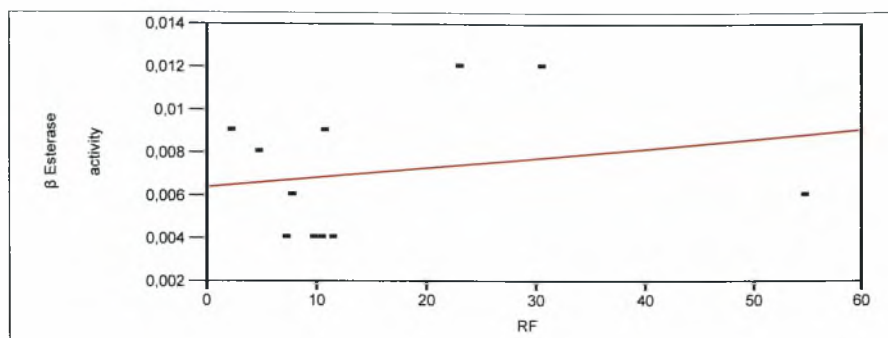
τιμές του συντελεστή συσχέτισης  $r$  του Pearson ήταν:  $r = 0,343$  ( $N=12$ ,  $P<0,301$ ) και  $r = 0,218$  ( $N=12$ ,  $P<0,520$ ) μεταξύ τιμών RR και δραστικότητας  $\alpha$ - και  $\beta$ - εστερασών αντίστοιχα. Οι τιμές δραστικότητας των GST παρουσίασαν αρνητική συσχέτιση ( $r = -0,524$ ,  $N=9$ ,  $P<0,147$ ) με τις τιμές  $LD_{50}$  κάθε πληθυσμού.

Τα δεδομένα δείχνουν ότι είτε οι δραστικότητες των  $\alpha$ -,  $\beta$ - εστερασών και της τρανσφεράσης της γλουταθειόνης δε συνδέονται με την ανθεκτικότητα στο alpha-cypermethrin ή ότι δεν κατέστη δυνατό να ανιχνευθεί η πιθανή σύνδεση μεταξύ τους, με τα πρότυπα υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν. Αντίθετα με τις εστεράσες, σημαντική συσχέτιση παρατηρήθηκε μεταξύ των τιμών RR και των τιμών δραστικότητας P450 ( $r = 0,750$ ,  $N=9$ ,  $P<0,032$ ). Συνεπώς, είναι πιθανό ότι τα συγκεκριμένα ένζυμα συνδέονται με την ανθεκτικότητα του *B. oleae* στο alpha-cypermethrin.

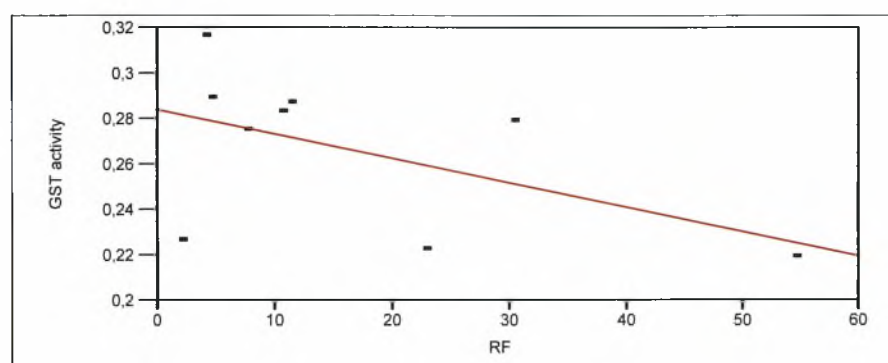
Οι καμπύλες συσχέτισης μεταξύ τιμών δραστικότητας  $\alpha$ - και  $\beta$ - εστερασών, τρανσφεράσης της γλουταθειόνης (GST) και μονοοξυγενασών του κυτοχρώματος P450 αναπαρίστανται γραφικά στα γραφήματα 1, 2, 3, και 4 αντίστοιχα.



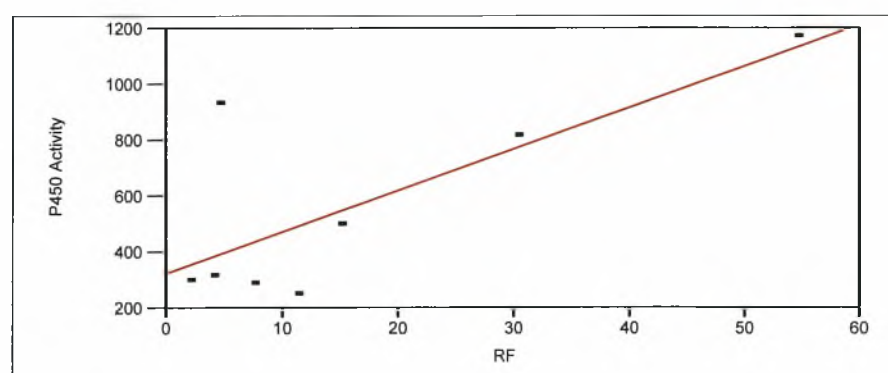
Γράφημα 1. Καμπύλη συσχέτισης μεταξύ των τιμών δραστικότητας  $\alpha$ -εστερασών και των τιμών συντελεστή ανθεκτικότητας (RR). Οι μονάδες εκφράζονται ως μονάδες οπτικής πυκνότητας ανά  $\mu\text{g}$  πρωτεΐνης (OD/ $\mu\text{g}$  πρωτεΐνης). Η σχέση μεταξύ δραστικότητας  $\alpha$ -εστερασών (Y) και των τιμών συντελεστή ανθεκτικότητας (RF) (X) είναι γραμμική:  $Y = 0,037891 + 0,0004589 * X$  ( $R^2 = 0,117917$ ,  $F = 1,2031$ ,  $P = 0,3012$ ).



**Γράφημα 2.** Καμπύλη συσχέτισης μεταξύ των τιμών δραστηριότητας β-εστερασών και των τιμών συντελεστή ανθεκτικότητας (RR). Οι μονάδες εκφράζονται ως μονάδες οπτικής πυκνότητας ανά μγ πρωτεΐνης (OD/ μγ πρωτεΐνης). Η σχέση μεταξύ δραστηριότητας β-εστερασών (Y) και των τιμών συντελεστή ανθεκτικότητας (RF) (X) είναι γραμμική :  $Y = 0,0063949 + 4,4355 \text{ E-}05 * X$  ( $R^2 = 0,047376$ ,  $F = 0,4476$ ,  $P = 0,5203$ ).



**Γράφημα 3.** Καμπύλη συσχέτισης μεταξύ των τιμών δραστηριότητας μεταφοράς της γλουταθειόνης (GST) και των τιμών συντελεστή ανθεκτικότητας (RR). Οι μονάδες εκφράζονται ως μονάδες οπτικής πυκνότητας ανά μγ πρωτεΐνης ανά λεπτό (OD/ μγ πρωτεΐνης/ λεπτό). Η σχέση μεταξύ δραστηριότητας μεταφοράς της γλουταθειόνης (Y) και των τιμών συντελεστή ανθεκτικότητας (RF) (X) είναι γραμμική :  $Y = 0,2840694 - 0,0010744 * X$  ( $R^2 = 0,274676$ ,  $F = 2,6509$ ,  $P = 0,1475$ ).



**Γράφημα 4.** Καμπύλη συσχέτισης μεταξύ των τιμών δραστηριότητας μονοοξυγενασών του κυτοχρώματος P450 και των τιμών συντελεστή ανθεκτικότητας (RR). Οι μονάδες εκφράζονται ως μονάδες οπτικής πυκνότητας ανά μγ πρωτεΐνης ανά λεπτό (OD/ μγ πρωτεΐνης/ λεπτό). Η σχέση μεταξύ δραστηριότητας μονοοξυγενασών του P450 (Y) και των τιμών συντελεστή ανθεκτικότητας (RF) (X) είναι γραμμική :  $Y = 323,05849 + 14,800245 * X$  ( $R^2 = 0,562663$ ,  $F = 7,7194$ ,  $P = 0,0321$ ).

## 5) ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Αν και τα αποτελέσματα της μελέτης είναι περιορισμένα, ως προς το χρονικό διάστημα που καλύπτουν και τη γεωγραφική εξάπλωση των πληθυσμών που μελετήθηκαν, μπορούν να διακριθούν κάποιες τάσεις. Καταρχήν, φαίνεται ότι αν και η έγκριση του alpha-cypermethrin για χρήση κατά του δάκου είναι αρκετά πρόσφατη (2001), εκδηλώνεται δυναμικό ανάπτυξης σημαντικής ανοχής (ως και ισχυρής ανθεκτικότητας σε ορισμένους πληθυσμούς) του *B. oleae* προς το συγκεκριμένο εντομοκτόνο. Σε όλες τις περιοχές που μελετήθηκαν, παρατηρήθηκαν ελαφρά αυξημένες τιμές συντελεστών ανθεκτικότητας (RR), συγκριτικά με παλιότερα δεδομένα (Σκούρας, 2005). Οι περισσότεροι φυσικοί πληθυσμοί παρουσίασαν σχετικά υψηλές τιμές συντελεστών ανθεκτικότητας (από 10,5 ως 15,2), δύο πληθυσμοί εμφάνισαν ακόμη υψηλότερες τιμές (19,5 και 23 αντίστοιχα) και δύο πολύ υψηλές (30,5 και 54,7). Οχτώ πληθυσμοί εμφάνισαν χαμηλές τιμές συντελεστή ανθεκτικότητας (μεταξύ 8,5 και 9,7). Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν πλέον μια ανοδική τάση του επιπέδου ανθεκτικότητας στα πυρεθροειδή. Ο Σκούρας (2005) είχε βρει τιμές RR χαμηλότερες από 9,7 στους περισσότερους φυσικούς πληθυσμούς, με εξαίρεση δύο μόνο πληθυσμούς, με τιμές RR 28,1 και 50,5 αντίστοιχα.

Στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας στο alpha-cypermethrin είναι πιθανό να έχουν συμβάλει διάφοροι παράγοντες, όπως η μετανάστευση των πληθυσμών του *B. oleae* από μια περιοχή σε άλλη, η ασκούμενη πίεση επιλογής από τις επεμβάσεις με το εντομοκτόνο, η ροή γονιδίων μεταξύ πληθυσμών και τέλος ιδιαίτεροι βιοτικοί και αβιοτικοί παράγοντες κάθε περιοχής, που επηρεάζουν την επιβίωση σε κάθε πληθυσμό.

Από το 2006, το alpha-cypermethrin χρησιμοποιείται σε όλες τις περιφέρειες όπου εφαρμόζεται πρόγραμμα καταπολέμησης του δάκου από τις Νομαρχιακές Αυτοδιοικήσεις, για δολωματικούς ψεκασμούς μεγάλης κλίμακας. Είναι πιθανό επίσης ότι τα τελευταία έξι χρόνια από την έγκριση κυκλοφορίας του alpha-cypermethrin για την καταπολέμηση του δάκου, αρκετοί παραγωγοί το έχουν εφαρμόσει με επιπρόσθετους ψεκασμούς. Η εκτεταμένη χρήση του επομένως είναι πιθανό να έχει λειτουργήσει ως παράγοντας επιλογής ανθεκτικών στα πυρεθροειδή ατόμων, μέσα σε κάθε τοπικό πληθυσμό.

Ένας παράγοντας που θα μπορούσε να έχει επιδράσει στο αυξημένο επίπεδο ανθεκτικότητας του *B. oleae* στο alpha-cypermethrin, που παρατηρήθηκε σε κάποιες περιοχές, είναι η γειτνίαση των ελαιώνων με άλλες καλλιέργειες. Ενδεχόμενοι

ψεκασμοί με πυρεθροειδή σε γειτονικούς οπωρώνες ή καλλιέργειες κηπευτικών μπορούσαν να συνοδευτούν από παράσυρση του ψεκαστικού νέφους προς τους γειτονικούς ελαιώνες. Κατά συνέπεια, θα μπορούσαν να έχουν εκθέσει συμπτωματικά ένα μέρος του πληθυσμού του *B. oleae* κάθε περιοχής στα πυρεθροειδή. Ένα τέτοιο ενδεχόμενο δεν μπορεί να αποκλειστεί σε περιοχές της Κρήτης, όπου καλλιεργούνται εσπεριδοειδή, ελιές και κηπευτικά σε κοντινές αποστάσεις μεταξύ τους, σε περιοχές της Πελοποννήσου με παρόμοιες καλλιέργειες και της Κεντρικής Ελλάδας (με καλλιέργειες οπωροφόρων και ελιάς σε κοντινές αποστάσεις).

Οι διαφορές που παρατηρήθηκαν μεταξύ των τιμών LD<sub>50</sub> διαφορετικών πληθυσμών ίσως είναι αποτέλεσμα γενετικών ή οικολογικών παραγόντων. Ένα πιθανό αίτιο θα μπορούσαν να είναι οι διαφορές μεταξύ των συχνοτήτων εμφάνισης αλληλομόρφων ανθεκτικότητας μεταξύ των πληθυσμών, αποτέλεσμα διαφορών γενετικής παραλλακτικότητας ή μικρού σχετικού μεγέθους πληθυσμού σε ορισμένους από αυτούς. Επίσης, η επίδραση οικολογικών παραγόντων (βιοτικοί, αβιοτικοί) σε πληθυσμούς διαφορετικών περιοχών, ίσως περιορίζει την έκθεση του *B. oleae* στο alpha-cypermethrin σε ορισμένες περιοχές.

Σε ορισμένες περιπτώσεις, εκτός από την παραλλακτικότητα μεταξύ των τιμών του συντελεστή ανθεκτικότητας διαφορετικών πληθυσμών, παρατηρήθηκε σημαντική παραλλακτικότητα και μεταξύ πληθυσμών της ίδιας περιοχής. Για παράδειγμα, κάποιες διαφορές που παρατηρήθηκαν μεταξύ πληθυσμών από γειτονικές περιοχές (αποστάσεις μεταξύ τους 5-10km), θα μπορούσαν να αποδοθούν σε απομόνωση μεταξύ συμπατρικών πληθυσμών, όπως έχει προταθεί από τους Skouras et al. (2007). Αυτό θα μπορούσε να έχει συμβεί σε γειτονικούς πληθυσμούς που εξετάστηκαν, όπως της Λευκάδας (Απόλπαινα, Τσουκαλάδες, με απόσταση μεταξύ των δύο περιοχών 4-5 χλμ.) ή και σε πληθυσμούς από γειτονικές περιοχές της Κρήτης (Πόμπια, Τυμπάκι, Μοίρες) (Κάινα, Αποκόρωνος), με αντίστοιχες αποστάσεις (5-10 χλμ.).

Οι μετακινήσεις ατόμων του είδους ίσως έχουν συνεισφέρει στη μεταβολή των συχνοτήτων εμφάνισης αλληλομόρφων ανθεκτικότητας σε κάποιο πληθυσμό του είδους. Για παράδειγμα, η εισροή ανθεκτικών ατόμων από γειτονικές περιοχές σε περιοχές όπου έχει ασκηθεί ισχυρή επιλογή μέσω των ψεκασμών ίσως έχει ως αποτέλεσμα, λόγω της υψηλότερης συχνότητας αλληλομόρφων ανθεκτικότητας στα άτομα που μεταναστεύουν, την αύξηση του επιπέδου ανθεκτικότητας στην περιοχή όπου μεταναστεύουν. Αυτό έχει παρατηρηθεί στην περίπτωση του *Drosophila*

*simulans* (Sturtevant) (Diptera:Drosophilidae), όπου η μετανάστευση ανθεκτικών ατόμων σε περιοχή όπου ήδη είχε ασκηθεί ισχυρή πίεση επιλογής είναι πιθανό να συνεισέφερε στην αυξημένη ανθεκτικότητα των πληθυσμών σε αυτήν την περιοχή (Windelspecht et al. 1995).

Πέρα από τη φυσική μετανάστευση του είδους, δεν μπορεί να αποκλειστεί η πιθανότητα (έστω και μικρή) συμπτωματικής μεταφοράς νυμφών *B. oleae* από μια περιοχή της Μεσογείου (ή αλλης ελαιοπαραγωγικής περιοχής) στην Ελλάδα, μέσω του εμπορίου ελιών.

Αν και υπάρχουν πολλά δεδομένα σχετικά με την ανθεκτικότητα του *B.oleae* στα οργανοφωσφορικά, δεν υπάρχουν ακόμη διαθέσιμα στοιχεία για τα πυρεθροειδή. Σε συγγενικά είδη προς το δάκο όμως, υπάρχουν διαθέσιμα στοιχεία που δείχνουν ότι υπάρχει δυνατότητα ανάπτυξης ανθεκτικότητας στα πυρεθροειδή. (π.χ. *Bactrocera dorsalis* (Hendel)). Αντίθετα, στο *Dacus ciliatus* (Loew) παρατηρήθηκε ότι τα πυρεθροειδή ήταν πολύ αποτελεσματικά. Συγκεκριμένα, τα πυρεθροειδή (fenpropathrin, bifenthrin, cypermethrin) βρέθηκαν πολύ αποτελεσματικά κατά του *D. ciliatus* σε μελέτες τοξικότητας στο Ισραήλ (Maklakov et al. 2001). Ταχύτερη ήταν η δράση του cypermethrin, προκαλώντας αποσυντονισμό, κατάρριψη, αφυδάτωση και τελικά το θάνατο των εντόμων.

Οι Hsu et al. (2004) διερεύνησαν τη δυνατότητα ανάπτυξης ανθεκτικότητας του *B. dorsalis* (Hendel) σε έξι οργανοφωσφορικά (naled, trichlorfon, fenitrothion, fenthion, formothion, malathion), ένα καρβαμιδικό (methomyl) και τρία πυρεθροειδή (cyfluthrin, cypermethrin, fenvalerate), κάτω από συνεχή διαδικασία επιλογής σε εργαστηριακές συνθήκες. Παρατηρήθηκε ότι το *B. dorsalis* ανέπτυξε ανθεκτικότητα στα πυρεθροειδή μετά την όγδοη γενιά επιλογής και μεταξύ των τριών που εξετάστηκαν, ο βραδύτερος ρυθμός ανάπτυξης ανθεκτικότητας παρατηρήθηκε στο cypermethrin και ο ταχύτερος στο fenvalerate. Η ανθεκτικότητα όμως ήταν σε κάθε περίπτωση σημαντικά μικρότερη από αυτήν στα οργανοφωσφορικά.

Εντούτοις, στενά συγγενικά είδη εντόμων ίσως παρουσιάζουν διαφορετικές αντιδράσεις στα εντομοκτόνα, οπότε είναι πιθανό η απόκριση του *B. oleae* να είναι διαφορετική από αυτήν του *B. dorsalis*. Έχουν βρεθεί για παράδειγμα διαφορές μεταξύ των στενά συγγενών ειδών *D. melanogaster* και *D. simulans* στην απόκριση στο ίδιο εντομοκτόνο (Windelspecht et al. 1995). Υπεύθυνοι για τις διαφορές αυτές είναι κυρίως οικολογικοί και γενετικοί παράγοντες, εκτός από τη διαφορετική πίεση επιλογής που υφίσταται κάθε είδος από τις επεμβάσεις με εντομοκτόνα. Οι διαφορές

στην απόκριση σε πίεση επιλογής που ασκήθηκε με πυρεθροειδή, μεταξύ των στενά συγγενικών ειδών *Helicoverpa punctigera* (Wallengren) και *H. armigera*, ίσως είναι αποτέλεσμα μεγαλύτερου αποτελεσματικού μεγέθους πληθυσμού στο *H. punctigera* (Forrester 1993). Το μέγεθος του πληθυσμού αυξάνει αποτελεσματικά την εισροή ευαίσθητων ατόμων του *H. punctigera*, μειώνοντας το γενικό επίπεδο ανθεκτικότητας του πληθυσμού (Forrester 1993).

Σε άλλα Δίπτερα, έχουν διερευνηθεί οι ενζυμικοί μηχανισμοί μεταβολισμού πυρεθροειδών και βρέθηκε ότι τον κύριο μηχανισμό αποτοξίκωσης συνήθως αποτελεί η δράση των οξειδασών. Στην περίπτωση του *A. aegypti*, οι Rodríguez et al. (2005) βρήκαν ότι ανθεκτικός πληθυσμός στο deltamethrin ανέπτυξε ισχυρή ανθεκτικότητα κάτω από εντατική πίεση επιλογής στο εργαστήριο και διασταυρωτή ανθεκτικότητα σε άλλα πυρεθροειδή (*λ*-cyhalothrin, cypermethrin, cyfluthrin). Επιπλέον, το εργαστηριακό στέλεχος ήταν ανθεκτικό και στο DDT, κάτι που έδειξε ότι η ανθεκτικότητα οφειλόταν πιθανότατα σε μετάλλαξη τύπου *kdr*. Τα ενζυμικά συστήματα που εμπλέκονταν στην ανθεκτικότητα ήταν οι τρανσφεράσες της γλουταθειόνης, οι εστεράσες και οι μονοοξυγενάσες.

Από μελέτες συνεργισμού με το PB, βρέθηκε ότι η αποτελεσματικότητα του cypermethrin στο *D. ciliatus* επαυξήθηκε από το PB, κάτι που δείχνει ότι ο μεταβολισμός πυρεθροειδών οφείλεται κυρίως στη δράση του P450 (Maklakon et al. 2001).

Το PB παρουσίασε σημαντική συνεργιστική δράση για όλα τα πυρεθροειδή και στην περίπτωση του *B. dorsalis* (Hsu et al. 2004). Στην ίδια μελέτη, βρέθηκε ότι το DEF αύξησε την τοξικότητα του cypermethrin και του fenvalerate στις ανθεκτικές σειρές. Διασταυρωτή ανθεκτικότητα παρατηρήθηκε μεταξύ των έξι οργανοφωσφορικών, του methomyl και του cyfluthrin. Εντούτοις, οι έξι ανθεκτικές στα οργανοφωσφορικά σειρές και η ανθεκτική σειρά στο methomyl δεν έδειξαν διασταυρωτή ανθεκτικότητα στο cypermethrin και το fenvalerate. Σημαντική ήταν η διασταυρωτή ανθεκτικότητα μεταξύ των τριών πυρεθροειδών, καθώς και μεταξύ cypermethrin, fenvalerate και fenitrothion. Είναι πιθανό ότι οι σειρές με μεταβολισμό λόγω δράσης εστερασών μπορούν να αναπτύξουν πολλαπλή ανθεκτικότητα σε ουσίες όπως το fenitrothion, το formothion και το cyfluthrin (Hsu et al. 2004).

Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκαν ενζυμικά συστήματα που εμπλέκονται στην ανθεκτικότητα σε πυρεθροειδή {γενικές εστεράσες, μονοοξυγενάσες μικτής λειτουργίας (MFOs) και τρανσφεράσες της γλουταθειόνης (GSTs)}. Τα αποτελέσματα

έδειξαν ότι αν και γενικά δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των φυσικών πληθυσμών και του εργαστηριακού πληθυσμού, η δραστηριότητα των MFOs σε ορισμένους πληθυσμούς παρουσίασε κάποια συσχέτιση με τις τιμές LD<sub>50</sub> των πληθυσμών που εξετάστηκαν ( $r= 0,750$ ,  $N=9$ ,  $P<0,032$ ). Αυτή είναι μια ένδειξη συμμετοχής του συγκεκριμένου μηχανισμού στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας, σε σημαντικότερο βαθμό από τα άλλα ένζυμα, κάτι που έχει παρατηρηθεί και σε προηγούμενες σχετικές εργασίες. Αν και ανιχνεύθηκε κάποια δραστηριότητα α- και β-εστερασών στους πληθυσμούς που εξετάστηκαν, δε φαίνεται ότι τα συγκεκριμένα ένζυμα έχουν κάποια συμμετοχή στην ανθεκτικότητα. Οι τρανσφεράσες της γλουταθειόνης (GSTs) τέλος, αν και εντοπίστηκαν σε όλους τους πληθυσμούς που εξετάστηκαν, δε φάνηκε να διαδραματίζουν κάποιο ρόλο στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας. Αντίθετα, όλοι οι πληθυσμοί παρουσίασαν χαμηλότερες τιμές δραστηριότητας των GSTs σε σύγκριση με τον εργαστηριακό πληθυσμό και μάλιστα χωρίς σημαντικές διαφορές μεταξύ τους.

Η δραστηριότητα των γενικών εστερασών στον εργαστηριακό πληθυσμό ήταν υψηλότερη (χωρίς όμως σημαντικές διαφορές) από τις αντίστοιχες σε όλους τους φυσικούς πληθυσμούς, εκτός από δύο (Μοίρες, Καλαμάτα). Αυτό είναι πιθανό να οφείλεται στο γεγονός ότι κατά την εκτροφή του δάκου στο εργαστήριο επί πολλές γενιές οι συχνότητες των γονιδίων εστερασών αυξάνονται, οδηγώντας σε αυξημένη ποσοτικά παραγωγή ενζύμων. Αυτό είχε τεκμηριωθεί παλιότερα στο *B. oleae* από τον Tsakas (1970) και αργότερα από τους Rodríguez et al. (2005), σε εργαστηριακή εκτροφή στελέχους του *A. aegypti*. Στην τελευταία περίπτωση, οι αρχικές συχνότητες γονιδίων εστερασών στο φυσικό πληθυσμό πενταπλασιάστηκαν στην 6<sup>η</sup> γενιά απογόνων και μειώθηκαν σε τριπλάσια περίπου τιμή, ως τη 12<sup>η</sup> γενιά απογόνων (0,12, 0,66 και 0,38 αντίστοιχα). Το ίδιο φαινόμενο παρατηρήθηκε και για τη συχνότητα εμφάνισης του γονιδίου της GST, η οποία διπλασιάστηκε από τον αρχικό πληθυσμό ως τη 12<sup>η</sup> γενιά απογόνων (0,43 και 0,88 αντίστοιχα).

Συμπερασματικά, πιθανά αίτια για την ανάπτυξη ανθεκτικότητας του δάκου στο alpha cypermethrin ίσως αποτελούν η δράση του P450 και η παρουσία μεταλλάξεων στους πληθυσμούς του. Ωστόσο, δεν έχει ανιχνευθεί ως τώρα η παρουσία μετάλλαξης αντίστοιχης με αυτές που έχουν ανιχνευθεί σε άλλα είδη με ανθεκτικότητα τύπου *kdr* (Βόντας, προσωπική επικοινωνία).

Τα πυρεθροειδή χρησιμοποιούνται ως εναλλακτική λύση στους δολωματικούς ψεκασμούς έναντι των οργανοφωσφορικών που χρησιμοποιήθηκαν παλιότερα

(fenthion) ή συνεχίζουν να χρησιμοποιούνται (dimethoate). Με δεδομένο όμως ότι ο δάκος έχει αναπτύξει πλέον ισχυρή ανθεκτικότητα στα οργανοφωσφορικά, όπως τεκμηριώθηκε από πολλές εργασίες που αφορούσαν πληθυσμούς του εντόμου από την Ελλάδα (Stasinakis et al. 2001, Vontas et al. 2001, Hawkes et al. 2005, Σκούρας 2005), η προσεκτική χρησιμοποίηση των πυρεθροειδών γίνεται απαραίτητη.

Η ορθολογική χρησιμοποίηση πυρεθροειδών, σε συνδυασμό με προγράμματα παρακολούθησης της εξέλιξης της ανθεκτικότητας του *B. oleae* στις χρησιμοποιούμενες κλάσεις εντομοκτονων, σε τακτικά χρονικά διαστήματα, μπορούν να αποτελέσουν σημαντικά μέσα για τη διαχείριση του προβλήματος της ανθεκτικότητας. Ενδιαφέρον θα παρουσίαζε για αυτό το σκοπό η διερεύνηση της δυνατότητας ανάπτυξης διασταυρωτής ανθεκτικότητας μεταξύ οργανοφωσφορικών και πυρεθροειδών από τους πληθυσμούς του δάκου. Παράλληλα, διαγνωστικές μέθοδοι, βασιζόμενες σε μοριακές τεχνικές, μπορούν να χρησιμεύσουν για τη λεπτομερέστερη κατανόηση των μοριακών μηχανισμών που εμπλέκονται στην ανθεκτικότητα και να συμβάλλουν από κοινού με άλλα μέτρα (εισαγωγή νέων κατηγοριών εντομοκτόνων όπως τα σπινোসινοειδή που εξετάζονται σε πειραματικό επίπεδο, προγράμματα παρακολούθησης της εξέλιξης ανθεκτικότητας, εναλλακτικές μέθοδοι καταπολέμησης όπως η μαζική παγίδευση κάτω από κατάλληλες προϋποθέσεις), στην ολοκληρωμένη διαχείριση των πληθυσμών του *B. oleae*.



**BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

- Anstead, J.A, Mallet, J. and Denholm, I., 2007, Temporal and spatial incidence of alleles conferring knockdown resistance to pyrethroids in the peach-potato aphid, *Myzus persicae* (Hemiptera:Aphididae), and their association with other insecticide resistance mechanisms, *Bulletin of Entomological Research*, 97: 243-252.
- Anstead, J.A, Williamson, M.S. and Denholm, I., 2005, Evidence for multiple origins of identical insecticide resistance mutations in the aphid *Myzus persicae*, *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 35: 249-256.
- Busvine, J.R., 1951, Mechanism of resistance to insecticide in houseflies, *Nature*, 168: 193-195.
- Carriere, Y., Deland, J.-P. Roff, D.A. and Vincent, C., 1994, Life-History Costs Associated with the Evolution of Insecticide Resistance, *Proceedings of the Royal Society-Biological Sciences (Series B)*, 258: 35-40.
- Catania, F., Kauer, M.O., Daborn, P.J., Yen, J.L., French-Constant, R.H. and Schlötterer, C., 2004, World-wide survey of an *Accord* insertion and its association with DDT resistance in *Drosophila melanogaster*, *Molecular Ecology*, 13: 2491-2504.
- Chaniotakis, N., 1994, Protection of olive orchards in organic farming, *Proceedings of the National Conference of Organic Farming in Kalamata*:135.
- Cohen, M.B. and Feyereisen, R., 1995, A cluster of cytochrome P450 genes of the CYP6 family in the house fly, *DNA and Cell Biology*, 14: 73-82.
- Denholm, I. and Jespersen, J. B., 1998, Insecticide resistance management in Europe: recent developments and prospects, *Pesticide Science*, 52:153-159.
- De Sousa, G., Cuany, A., Brun, A, Amichot, M., Rahmani, R and Berge, J.-B., 1995, A microfluorometric method for measuring ethoxycoumarin-O-deethylase activity on individual *Drosophila melanogaster* abdomens: Interest for screening resistance in insect populations, *Analytical Biochemistry*, 229: 86-91.
- Devonshire, A.L., Field, L.M., Foster, S.P., Moores, G.D, Williamson, M.S. and Blackman, R.L., 1998, The evolution of insecticide resistance in the peach-potato aphid, *Myzus persicae*, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B Biological Sciences*, 353: 1677-1684.
- Fletcher, B.S., 1989, Life history strategies of Tephritid Fruit Flies, In: *World Crop Pests, Volume 3B, Fruit Flies, Their Biology, Natural Enemies and Control*, Editors: Robinson and Hooper, Elsevier Science, Publishers, Amsterdam, Holland: 195-208.
- Fletcher, B.S. and Kapatos, E., 1983, The influence of temperature, diet and olive fruits on the maturation rates of female olive flies at different times of the year, *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 33: 244-252.
- Fletcher, B.S., Pappas, S. and Kapatos, E., 1978, Changes in the ovaries of olive flies (*Dacus oleae* (Gmelin)) during the summer and their relationship to temperature, humidity, and fruit availability, *Ecological Entomology*, 3: 99-107.
- Forrester, N.W., 1993, Pyrethroid and endosulfan resistance in *Helicoverpa punctigera*: field and laboratory studies, *Bulletin of Entomological Research*, Suppl.Sept: 115-119.
- Foster, S.P., Woodcock, C.M., Williamson, M.S., Devonshire, A.L., Denholm, I. and Thompson, R., 1999, Reduced alarm response by peach-potato aphids, *Myzus persicae* (Hemiptera:Aphididae), with knock-down resistance to insecticides (kdr) may impose a fitness cost through increased vulnerability to natural enemies, *Bulletin of Entomological Research*, 89: 133-138.
- Fournier, D., Bride, J.M., Poirie, M., Berge, J.B. and Plapp, F.W., 1992, Insect glutathione S-transferases. Biochemical characteristics of the major forms from

- houseflies susceptible and resistant to insecticides, *Journal of Biology and Chemistry*, 267: 1840-1845.
- Ffrench-Constant, R.H., Daborn, P.J. and Le Goff, G., 2004, The genetics and genomics of insecticide resistance, *Trends in Genetics*, 20: 163-170.
- Gazave, E., Chevillon, C., Lenormand, T., Marquine, M. and Raymond, M., 2001, Dissecting the cost of insecticide resistance genes during the overwintering period of the mosquito *Culex pipiens*, *Heredity*, 87: 441-448.
- Georghiou, G.P., 1994, Principles of insecticide resistance management, *Phytoprotection*, 75: 51-59.
- Girolami, V., Vianello, A., Stapazzon, A., Ragazzi, E. and Veroneze, G., 1981, Ovipositional deterrents in *Dacus oleae*, *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 29: 177-188.
- Grant, D.F. and Matsumura, F., 1989, Glutathione S-transferase 1 and 2 in susceptible and insecticide resistant *Aedes aegypti*, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 33: 132-143.
- Guerrero, F.D., Jamroz, R.C., Kammlah, D. and Kunz, S.E., 1997, Toxicological and Molecular Characterization of Pyrethroid-resistant Horn Flies, *Haematobia irritans*: Identification of kdr and super-kdr Point Mutations, *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 27: 745-755.
- Haniotakis, G.E, Mazomenos, B.E. and Hardakis, I.M., 1981, In Etat d' advancement des travaux et echanges d' informations sur les problemes poses par la lutte integree en oleiculture, *Proceedings of CEC Experts Meeting, November 1981*, Antibes, 46-60.
- Hawkes, J.N., , Janes, R.W., Hemingway, J. and Vontas, J., 2005, Development and validation of diagnostic assays for two resistance-associated point mutations of organophosphate-insensitive acetylcholinesterase in the olive fruit fly, *Bactrocera oleae* (Gmelin), *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 81: 154-163.
- Head, D.J., McCaffery, A.R. and Callaghan, A., 1998, Novel mutations in the para-homologous sodium channel gene associated with phenotypic expression of nerve insensitivity resistance to pyrethroids in Heliiothine Lepidoptera, *Insect Molecular Biology*, 7: 191-196.
- Hsu, J.C., Feng, H.T. & Wu, W.J., 2004, Resistance and Synergistic Effects of Insecticides in *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae) in Taiwan, *Journal of Economic Entomology*, 97: 1682-1688.
- Ingles, P.J., Adams, P.M., Knipple, D.C. and Soderlund, D.M., 1996, Characterization of voltage-sensitive sodium channel gene coding sequences from insecticide-susceptible and knockdown-resistant house fly strains, *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 26: 319-326.
- Kapatos, E. and Fletcher, B.S., 1984, The phenology of the olive fruit fly, *Dacus oleae* (Gmelin) (Diptera, Tephritidae), in Corfu, *Zeitschrift fur Angewandte Entomologie*, 97: 360-370.
- Katsoyannos, B.I., 1983, Captures of *Ceratitits capitata* and *Dacus oleae* flies (Diptera: Tephritidae) by McPhail and Rebell color traps suspended on citrus, fig and olive trees on Chios, Greece. In: R. Cavalloro (Editor), *Fruit Flies of Economic Importance*, Balkema, Rotterdam, 451-456.
- Kasai, S., Weerashinghe, I.S. and Shono, T., 1998, P450 Monooxygenases Are an Important Mechanism of Permethrin Resistance in *Culex quinquefasciatus* Say Larvae, *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 37: 47-56.
- Kasai, S., Shono, T. and Yamakawa, M., 1998, Molecular cloning and nucleotide sequence of a cytochrome P450 cDNA from a pyrethroid-resistant mosquito, *Culex quinquefasciatus* Say, *Insect Molecular Biology*, 7: 185-190.

- Kostaropoulos, I., Papadopoulos, A.I., Metaxakis, A., Boukouvala, E. and Papadopoulou-Mourkidou, E., 2001, Glutathione S-transferase in the defence against pyrethroids in insects, *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 31: 313-319.
- Lagadic, L., Cuany, A., Berge, J.B. and Echaubard, M., 1993, Purification and partial characterization of glutathione S-transferases from insecticide-resistant and lindane-induced susceptible *Spodoptera littoralis* (Boisd.) larvae, *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 23: 467-474.
- Lee, S.H., Dunn, J.B., Marshall Clark, J. and Soderlund, D.M., 2000, Molecular analysis of kdr-like resistance in a permethrin-resistant strain of Colorado potato beetle, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 63: 63-75.
- Lindberg, R.L. and Negishi, M., 1989, Alteration of mouse cytochrome P450c<sub>1</sub> substrate specificity by mutation of a single amino-acid residue, *Nature*, 339: 632-634.
- Liu, Z., Valles, S.M. and Dong, K., 2000, Novel point mutations in the German cockroach para sodium channel gene are associated with knockdown resistance (kdr) to pyrethroid insecticides, *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 30: 991-997.
- Liu N. and Scott J.G., 1998, Increased transcription of CYP6D1 causes cytochrome P450-mediated insecticide resistance in house fly, *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 28: 531-535.
- Liu N. and Scott J.G., 1997, Inheritance of CYP6D1-mediated pyrethroid resistance in house fly (Diptera: Muscidae), *Journal of Economical Entomology*, 90: 1478-1481.
- Liu N., Tomita T. and Scott J.G., 1995, Allele-specific PCR reveals that the cytochrome P450<sub>pr</sub> gene is on chromosome 1 in the house fly *Musca domestica*, *Experientia*, 51: 164-167.
- Lougarre, A., Bride, J.M. and Fournier, D., 1999, Is the insect glutathione S-transferase I gene family intronless?, *Insect Molecular Biology*, 8(1): 141-143.
- Maitra, S., Dombrowski, S.M., Waters, L.C. and Ganguly, R., 1996, Three second chromosome-linked clustered Cyp6 genes show differential constitutive and barbital-induced expression in DDT-resistant and susceptible strains of *Drosophila melanogaster*, *Gene*, 180: 165-171.
- Maklakov, A., Ishaaya, I., Freidberg, A., Yawetz, A., Horowitz, A.R. and Yarom, I., 2001, Toxicological studies of organophosphate and pyrethroid insecticides for controlling the fruit fly *Dacus ciliatus* (Diptera: Tephritidae), *Journal of Economic Entomology*, 94: 1059-1066.
- Martinez-Torres, D., Chevillon, C., Brun-Barale, A., Bergé, J.B., Pasteur, N. and Pauron, D., 1999, Voltage-dependent Na<sup>+</sup> channels in pyrethroid-resistant *Culex pipiens* L. mosquitoes, *Pesticide Science*, 55 : 1012-1020.
- Martinez-Torres, D., Foster, S.P., Field, L.M., Devonshire, A.L. and Williamson, M.S., 1999, A sodium channel point mutation is associated with resistance to DDT and pyrethroid insecticides in the peach potato aphid, *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae), *Insect Molecular Biology*, 8: 339-346.
- Miyazaki, M., Ohyama, K., Dunlap, D.Y. and Matsumura, F., 1996, Cloning and sequencing of the para-type sodium channel gene from susceptible and kdr-resistant German cockroaches (*Blattella germanica*) and house fly (*Musca domestica*), *Molecular and General Genetics*, 252: 61-68.
- Morin, S., Williamson, M.S., Goodson, S.J., Brown, J.K., Tabashnik, B.E. and Dennehy, T.J., 2002, Mutations in the *Bemisia tabaci* para sodium channel gene associated with resistance to a pyrethroid plus organophosphate mixture, *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32: 1781-1791.

- Nardi, F., Carapelli, A., Dallai, R., Roderick, G.K. and Frati, F., 2005, Population structure and colonization history of the olive fly, *Bactrocera oleae* (Diptera, Tephritidae), *Molecular Ecology*, 14: 2729-2738.
- Neuenschwander, P., Mihelakis, S., Mikros, I. and Mathioudi, M., 1980, Compensation for early fruit drop caused by *Dacus oleae* (Gmel.) (Diptera, Tephritidae) due to an increase in weight and oil content of the remaining olives, *Zeitschrift fur Angewandte Entomologie*, 89: 514-525.
- Oppenoorth F.J., 1984, Biochemistry of Insecticide resistance, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 22: 187-193.
- Park, Y., Taylor, M.F.J. and Feyereisen, R., 1997, A Valine421 to Methionine mutation in IS6 of the hscp voltage-gated sodium channel associated with pyrethroid resistance in *Heliothis virescens* F., *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 239: 688-691.
- Pittendrigh, B, Reenan, R., ffrench-Constant, R.H. and Ganetzky, B., 1997, Point mutations in the *Drosophila* sodium channel gene *para* associated with resistance to DDT and pyrethroid insecticides, *Molecular and General Genetics*, , 256: 602-610.
- Pittendrigh, B., Aronstein, K., Zinkovsky, E., Andreev, O., Campbell, B., Daly, J., Trowell, S. and ffrench-Constant, R.H., 1997, Cytochrome P450 genes from *Helicoverpa armigera*: Expression in a pyrethroid- susceptible and -resistant strain, *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 27: 507-512.
- Plapp, F.W.Jr., 1984, The genetic basis of insecticide resistance in the house fly: Evidence that a single locus plays a major role in metabolic resistance to insecticides, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 22: 194-201.
- Ranasinghe, C. and Hobbs, A.A., 1998, Isolation and characterization of two cytochrome P450 cDNA clones for CYP6B6 and CYP6B7 from *Helicoverpa armigera* (Hübner): Possible involvement of CYP6B7 in pyrethroid resistance, *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 28: 571-580.
- Ranasinghe, C., Headlam, M. and Hobbs, A.A., 1997, Induction of the mRNA for CYP6B2, a pyrethroid inducible cytochrome P450, in *Helicoverpa armigera* (Hubner) by dietary monoterpenes, *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 34: 99-109.
- Ranson, H. and Hemingway, J., 2000, Mosquito glutathione transferases, *Methods in Enzymology*, 401: 226-241.
- Ranson, H., Jensen, B., Vulule, J.M., Wang, X., Hemingway, J. and Collins, F.H., 2000, Identification of a point mutation in the voltage-gated sodium channel gene of Kenyan *Anopheles gambiae* associated with resistance to DDT and pyrethroids, *Insect Molecular Biology*, 9: 491-491.
- Reidy, G.F., Rose, H.A., Visetson, S. and Murray, M., 1990, Increased glutathione S-transferase activity and glutathione content in an insecticide-resistant strain of *Tribolium castaneum* (Herbst), *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 36: 269-276.
- Roditakis, E., Tsagkarakou, A. and Vontas, J., 2006, Identification of mutations in the para sodium channel of *Bemisia tabaci* from Crete, associated with resistance to pyrethroids, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 85: 161-166.
- Rodríguez, M.M., Bisset, J.A., De Arma, Y. and Ramos, F., 2005, Pyrethroid insecticide-resistant strain of *Aedes aegypti* from Cuba induced by deltamethrin selection, *Journal of the American Mosquito Control Association*, 21 : 437-445.
- Sheehan, D., Meade, G., Foley, V.M. and Dowd, C.A., 2001, Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily, *Biochemistry Journal*, 360: 1-13.

- Scharf, M.E., Neal, J.J., Marcus, C.B. and Bennett, G.W., 1998, Cytochrome P450 purification and immunological detection in an insecticide resistant strain of German cockroach (*Blattella germanica* L.), *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 28: 1-9.
- Schuler, T.H., Martinez-Torres, D., Thompson, A.J., Denholm, I., Devonshire, A.L., Duce, I.R., and Williamson, M.S., 1998, Toxicological, electrophysiological, and molecular characterisation of knockdown resistance to pyrethroid insecticides in the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.), *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 59: 169-182.
- Scott, J.G., 1999, Cytochromes P450 and insecticide resistance, *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 29: 757-777.
- Scott, J.G., Liu, N. and Wen Z., 1998, Insect cytochromes P450: Diversity, insecticide resistance and tolerance to plant toxins, *Comparative Biochemistry and Physiology-Part C Pharmacology toxicology and Endocrinology*, 121: 147-155.
- Scott, J.G. and Dong, K., 1994, *kdr*- Type resistance in insects with special reference to the German cockroach, *Blattella germanica*, *Comparative Biochemistry and Physiology*, 109: 191-198.
- Skouras, P.J., Margaritopoulos, J.T., Seraphides, N.A., Ioannides, I.M., Kakani, E.G, Mathiopoulou, K.D. and Tsitsipis, J.A., 2007, Organophosphate resistance in olive fruit fly, *Bactrocera oleae*, populations in Greece and Cyprus, *Pest Management Science*, 63: 42-48.
- Small, G.J. and Hemingway, J., 2000, Molecular characterization of the amplified carboxylesterase gene associated with organophosphorus insecticide resistance in the brown plant hopper, *Nilaparvata lugens*, *Insect Molecular Biology*, 9: 647-653.
- Soderlund, D.M. and Knipple, D.C., 2003, The molecular biology of knockdown resistance to pyrethroid insecticides, *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 33: 563-577.
- Sogorb, M.A. and Vilanova, E., 2002, Enzymes involved in the detoxification of organophosphorus, carbamate and pyrethroid insecticides through hydrolysis, *Toxicology Letters*, 128: 215-228.
- Stasinakis, P., Katsares, V. and Mavragani- Tsipidou, P., 2001, Organophosphate resistance and allelic frequencies of esterases in the olive fruit fly *Bactrocera oleae*, (Diptera:Tephritidae), *Journal of Agricultural and Urban Entomology*, 18: 157-168.
- Stumpf, N. and Nauen, R, 2002, Biochemical Markers Linked to Abamectin Resistance in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae), *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 69: 111-121.
- Tomita, T., Liu, N., Smith, F.F., Sridhar, P. and Scott, J.G., 1995, Molecular mechanisms involved in increased expression of a cytochrome P450 responsible for pyrethroid resistance in the housefly, *Musca domestica*, *Insect Molecular Biology*, 4: 135-140.
- Tsakas, S.C. and Zouros, E., 1980, Genetic differences among natural and laboratory-reared populations of the olive-fruit fly *Dacus oleae* (Diptera:Tephritidae), *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 28: 268-276.
- Tsiropoulos, G.J., 1983, Microflora associated with wild and laboratory reared olive flies (*Dacus oleae* Gmel.). *Zeitschrift für Angewandte Entomologie*, 96: 337-340.
- Tsitsipis, J.A., 1975, Mass rearing of the olive fruit fly, *Dacus oleae* (Gmelin), at "Democritos". In: Controlling Fruit Flies by the Sterile-insect Technique, International Atomic Energy Agency IAEA-PL-582/9, STI/PUB/392: 93-100.
- Tsitsipis, J.A., 1977a, Development of a caging and eggging system for mass rearing the olive fruit fly, *Dacus oleae* (Gmel.) (Diptera, Tephritidae), *Zeitschrift für Angewandte Entomologie*, 83: 96-105.

- Tsitsipis, J.A., 1977b, An improved method for mass rearing of the olive fruit fly, *Dacus oleae* (Gmel.) (Diptera: Tephritidae), *Zeitschrift für Angewandte Entomologie*, 83: 419-426.
- Tsitsipis, J.A., 1983b, Optimization of a holididic diet for the larvae of the olive fruit fly. In: R. Cavalloro (Editor), *Fruit Flies of Economic Importance*, Proceedings of the CEC/IOBC International Symposium, Athens, Greece, 16-19 November 1982: 416-422.
- Tsitsipis, J.A., and Kontos, A., 1983, Improved solid adult diet for the olive fruit fly, *Entomologia Hellenica*, 1: 24-29.
- Vontas, J.G., Enayati, A.A., Small, G.J. and Hemingway, J., 2000, A Simple Biochemical Assay for Glutathione S-Transferase Activity and Its Possible Field Application for Screening Glutathione S-Transferase-Based Insecticide Resistance, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 68: 184-192.
- Vontas, J., Cosmidis, N., Loukas, M., Tsakas, S., Hejazi, M.J., Ayoutanti, A. and Hemingway, J., 2001, Altered acetylcholinesterase confers organophosphate resistance in the olive fruit fly *Bactrocera oleae*, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 71: 124-132.
- Vontas J., Hejazi M.J., Hawkes N.J., Cosmidis N., Loukas M. and Hemingway, J., 2002, Resistance-associated point mutations of organophosphate insensitive acetylcholinesterase in the olive fruit fly *Bactrocera oleae*, *Insect Molecular Biology*, 11: 329-336.
- Walton, M.P., 1995, Integrated Pest Management in olives, In: D. Dent (editor), *Integrated Pest Management*, London: Chapman & Hall: 222-240.
- Waters, L.C., Zelhof, A.C., Shaw, B.J., Ch'ang, L.-Y., 1992, Possible involvement of the long terminal repeat of transposable element 17.6. in regulating expression of an insecticide resistance-associated P450 gene in *Drosophila*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89: 4855-4859.
- Wheelock G.D. and Scott, J.G., 1992, The role of cytochrome P450Ipr in deltamethrin metabolism by pyrethroid resistant and susceptible strains of house flies, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 43: 67-77.
- Williamson, M.S., Martinez-Torres, D., Hick, C.A. and Devonshire, A.L., Identification of mutations in the housefly para-type sodium channel gene associated with knockdown resistance (kdr) to pyrethroid insecticides, *Molecular and General Genetics*, 252: 51-60.
- Windelspecht, M., Richmond, R.C. and Cochrane, B.J., Malathion resistance levels in sympatric populations of *Drosophila simulans* (Diptera: Drosophilidae) and *D. melanogaster* differ by two orders of magnitude, *Journal of Economic Entomology*, 88: 1138-1143.
- Zhang, M. and Scott, J.G., 1996, Cytochrome *b5* is essential for cytochrome P450 6D1-mediated cypermethrin resistance in LPR house flies, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 55: 150-156.
- Zhang, M. and Scott, J.G., 1994, Cytochrome *b5* involvement in cytochrome P450 monooxygenase activities in house fly microsomes, *Archives of insect biochemistry and physiology*, 27: 205-216.
- WHO, 1957, 7<sup>th</sup> Report in: *WHO Technical Report Ser.* WHO Expert Committee on Insecticides World Health Organization.
- FAO 2007, Προσπελάσιμο στο διαδικτυακό τόπο: <http://faostat.fao.org/site/340/DesktopDefault.aspx?PageID=340>
- Ζιώγας Β.Ν., 1996, Ο δάκος της ελιάς, Εκδόσεις Υπουργείου Γεωργίας, Περιφερειακό Κέντρο Προστασίας Φυτών & Ποιοτικού Έλεγχου Πειραιά.

- Λέντζα-Ρίζου, Χ., 2000, *Γεωργική Φαρμακολογία, Ειδική Φαρμακολογία, Σημειώσεις για τους Φοιτητές*, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Θεσσαλίας, Βόλος, σ. 302.
- Μιχελάκης, Σ., Αλεξανδράκης, Β, Προφήτου-Αθανασιάδου, Δ., 2001, Ολοκληρωμένη αντιμετώπιση των εντομολογικών εχθρών της ελιάς, *Πρακτικά 3<sup>ης</sup> Πανελληνίας Συνάντησης Φυτοπροστασίας, Η Φυτοπροστασία στην Ολοκληρωμένη Διαχείριση της Παραγωγής*, Λάρισα, 6-8 Μαρτίου 2001, σ. 329-340.
- Μπρούμας, Θ., 1994, Ο δάκος της ελιάς, Ανασκόπηση της βιολογίας και της χημικής καταπολέμησης, *Γεωργία – Κτηνοτροφία*, Τεύχος 8, σ. 26-31.
- Σκούρας, Π., 2005, Μελέτη της ανθεκτικότητας πληθυσμών του δάκου της ελιάς σε εντομοκτόνα, *Μεταπτυχιακή Διατριβή*, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Νέα Ιωνία, Σεπτέμβριος 2005, σ. 56-65.
- Τζανακάκης, Μ.Ε. & Κατσόγιαννος, Β.Ι., 2003, *Έντομα καρποφόρων δέντρων και της αμπέλου*, Αθήνα, Εκδόσεις Αγρότυπος, σ. 265-273.
- Τζανακάκης, Μ.Ε., 1995, *Εντομολογία*, Εκδόσεις University Studio Press, Θεσσαλονίκη, σ. 209-214.

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ



## 1) ΣΥΛΛΟΓΗ ΤΩΝ ENTOMΩΝ

### 1.1) Συλλογή δειγμάτων από φυσικούς πληθυσμούς του *Bactrocera oleae*

Η συλλογή προσβεβλημένων από δάκο καρπών ελιάς από τους ελαιώνες έγινε από όσο το δυνατό μεγαλύτερη έκταση. Μετά τη συλλογή, οι καρποί συσκευάζονταν σε χαρτοσακούλες και μεταφέρονταν στο εργαστήριο. Στο εργαστήριο, οι καρποί τοποθετούνταν μέσα σε πλαστικές λεκάνες, οι οποίες είχαν προηγουμένως απολυμανθεί με διάλυμα υποχλωριώδους νατρίου 8 % (χλωρίνη εμπορίου). Στις λεκάνες γινόταν, μετά την απολύμανση, στρώση με αδρανές υλικό νύμφωσης (πριονίδι), με πάχος κάλυψης 1cm περίπου. Το πριονίδι είχε προηγουμένως αποστειρωθεί, στους 100° C για 1 ώρα, για να αποφευχθούν επιμολύνσεις του καρπού από μικροοργανισμούς (Tsitsipis 1977b). Στη συνέχεια, απομακρύνονταν οι σάπιοι καρποί και οι υπόλοιποι τοποθετούνταν πάνω στο στρώμα πριονιδιού. Η κάλυψη των λεκανών γινόταν με διαφανή πλαστική μεμβράνη, στην οποία διανοίγονταν μικροί πόροι για τον εξαερισμό του εσωτερικού. Μετά την τοποθέτηση στις λεκάνες, τα δείγματα παρέμεναν στο εργαστήριο, σε σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας ( $23 \pm 0,5^\circ \text{C}$ ), σχετικής υγρασίας ( $65 \pm 5 \%$ ) και φωτοπεριόδου (L: D 16: 8) (Tsitsipis 1977a) και καθημερινά γινόταν έλεγχος για απομάκρυνση σάπιων καρπών και συλλογή ενηλίκων που εξέρχονταν από τη νύμφωση ή νυμφών από το πριονίδι. Η συλλογή των νυμφών γινόταν με κοσκίνισμα του πριονιδιού (Tsitsipis 1977b), ενώ των ενηλίκων με διοχέτευση για λίγα δευτερόλεπτα ρεύματος CO<sub>2</sub> στο εσωτερικό των λεκανών νύμφωσης, έτσι ώστε αυτά να αναισθητοποιηθούν και να συλλεχθούν προσεκτικά με λαβίδα. Στη συνέχεια, τα ενήλικα τοποθετούνταν σε κλωβούς εκτροφής, όπου και παρέμεναν στις ίδιες συνθήκες ως την πραγματοποίηση των βιοδοκιμών. Οι νύμφες τοποθετούνταν σε μικρά πλαστικά διαφανή κουτιά, όπου και παρέμεναν μέχρι την έξοδο από αυτές των ενηλίκων, στις ίδιες επίσης συνθήκες.

## 2) ΕΚΤΡΟΦΗ ΤΩΝ ENTOMΩΝ

### 2.1) Εκτροφή των ενηλίκων του εργαστηριακού στελέχους δάκου

Το εργαστηριακό στέλεχος του δάκου, που χρησιμοποιήθηκε ως μέτρο σύγκρισης κατά τις βιοδοκιμές, προήλθε από το Ερευνητικό Κέντρο «Δημόκριτος» και δεν είχε δεχτεί την επίδραση επεμβάσεων από εντομοκτόνα για περισσότερο από 30 χρόνια. Για την εκτροφή του εργαστηριακού στελέχους χρησιμοποιήθηκαν μικροί κλωβοί από plexiglass (Εικόνα 1).



**Εικόνα 1.** Κλωβός εκτροφής ενηλίκων του *Bactrocera oleae* (Φωτο:N.Καλογιάννης).

Οι κλωβοί που χρησιμοποιήθηκαν είχαν διαστάσεις 8\*8\*8 cm και στις 2 τους πλευρές αντί για πλαστικό υλικό, καλύπτονταν από τούλι με λεπτούς πόρους. Στο κορυφαίο τμήμα του κλωβού υπήρχε άνοιγμα κυκλικής διατομής, που χρησιμεύει για την τοποθέτηση του καλύμματος. Στο εσωτερικό του κλωβού τοποθετούταν ένας κώνος, αποτελούμενος από πλαστική κυκλική βάση στο άνω μέρος, που χρησιμεύει για τη συγκράτηση του κώνου στο κυκλικό άνοιγμα του κλωβού και τούλι, σε σχήμα κώνου. Η βάση του κώνου τοποθετούταν σε κυκλικό άνοιγμα, στη βάση του κλωβού. Για την κάλυψη των πόρων στο τούλι, χρησιμοποιήθηκε μείγμα παραφίνης, με σημείο τήξης σε θερμοκρασίες 46-48° C και 52-54° C. Μετά την τήξη της παραφίνης σε θερμοκρασία 130° C, γινόταν εμβάπτιση του κώνου στο υγρό μείγμα (Tsitsipis 1977a). Μετά την εμβάπτιση, ο κώνος είχε πλέον πολύ μικρούς πόρους, μέσα στους οποίους τα ενήλικα θηλυκά του δάκου ωοτοκούσαν.

Οι νύμφες του εργαστηριακού στελέχους τοποθετήθηκαν στον κλωβό αναπαραγωγής, όπου και διατηρήθηκαν σε συνθήκες σταθερής θερμοκρασίας ( $23 \pm 0,5^\circ \text{C}$ ), σχετικής υγρασίας ( $65 \pm 5 \%$ ) και φωτοπεριόδου (L: D 16: 8). Μετά την έξοδο, τα ενήλικα διατηρούνταν στους κλωβούς, στις ίδιες συνθήκες. Στη βάση των κλωβών υπήρχαν 3 κυκλικά ανοίγματα, που χρησίμευαν για την τοποθέτηση, στο εσωτερικό των κλωβών, των νυμφών του εργαστηριακού στελέχους, τροφής σε μικρούς πλαστικούς δίσκους, ίδιας με τα ανοίγματα διατομής, καθώς και απεσταγμένου νερού, μέσα σε μικρό πλαστικό μπουκάλι, σταθερά κολλημένο σε πλαστικό δίσκο. Τα ενήλικα έπιναν νερό από μικρό κομμάτι βαμβακιού, τοποθετημένου στο λαιμό του μπουκαλιού. Για τη διατροφή των ενηλίκων χρησιμοποιούταν στερεά τροφή, αποτελούμενη από λειοτριβημένο μίγμα υδρολυμένης πρωτεΐνης και κρυσταλλικής ζάχαρης σε αναλογία 1:3 (τροποποίηση της σύστασης τροφής των Tsitsipis & Kontos 1983) (πίνακας 1). Τα ενήλικα

τρέφονταν και αναπαράγονταν στους κλωβούς. Η απομάκρυνση των νεκρών ατόμων γινόταν τακτικά, ενώ σε τακτικά χρονικά διαστήματα γινόταν και αντικατάσταση των κλωβών με νέους, καθαρούς.

**Πίνακας 1.** Σύσταση τροφής ενηλίκων του *Bactrocera oleae*

Συστατικό	Ποσοστιαία αναλογία στο μείγμα
Υδρολυμένη μαγιά	25 %
Ζάχαρη (κρυσταλλική)	75 %

## 2.2) Συλλογή των αυγών του δάκου

Μετά την πάροδο 3-4 ημερών στις συγκεκριμένες συνθήκες, άρχιζε η συλλογή των αυγών από τον κώνο ωοτοκίας. Στο καπάκι που τοποθετούταν στο άνοιγμα του κλωβού, υπήρχε ένα κομμάτι σφουγγαριού. Το σφουγγαράκι διατηρούταν συνεχώς υγρό, έτσι ώστε να διατηρείται η επιθυμητή τιμή σχετικής υγρασίας στο εσωτερικό του κώνου και η βιωσιμότητα των αυγών. Η βάση του κώνου διατηρούταν κλειστή, με κάλυψη του κυκλικού ανοίγματος στη βάση του κλωβού με parafilm. Αντικατάσταση των κώνων με νέους γινόταν κάθε 15-20 ημέρες. Η συλλογή των αυγών γινόταν με έκπλυση των κώνων με απεσταγμένο νερό, χρησιμοποιώντας υδροβολέα. Η συλλογή του απεσταγμένου νερού και των αυγών από τον κώνο, γινόταν σε μικρά ποτήρια ζέσης. Στη συνέχεια, γινόταν μεταφορά των αυγών, με πιπέτα σε τρυβλία Petri στα οποία είχε τοποθετηθεί διηθητικό χαρτί, εμποτισμένο σε διάλυμα προπιονικού οξέος 0,3 % (Tsitsipis 1975). Μετά από 3-4 ημέρες διατήρησης των αυγών σε σταθερές συνθήκες (θερμοκρασία  $23 \pm 0,5^\circ \text{C}$ , σχετική υγρασία  $95 \pm 5\%$  και φωτοπερίοδος L: D 16: 8), γινόταν έκπλυση των διηθητικών χαρτιών σε ποτήρι ζέσης, με σκοπό τη συλλογή των αυγών. Η συλλογή των αυγών γινόταν με πιπέτα με μεγάλο άνοιγμα, για να μην τραυματιστούν τα αυγά.

## 2.3) Εκτροφή των προνυμφών του δάκου

Οι νεαρές προνύμφες μετά την εκκόλαψη τρέφονταν στην τροφή (Πίνακας 2), μέσα σε πλαστικά διαφανή κουτιά και μετά 10-12 ημέρες νυμφώνονταν μέσα στα κουτιά. Τελικά, γινόταν συλλογή των νυμφών του δάκου. Για τη διατήρηση υγιεινής κατά τη διαδικασία εκτροφής του εργαστηριακού στελέχους, γινόταν πλύση και απολύμανση των σκευών, σε διάλυμα υποχλωριώδους νατρίου και στη συνέχεια με

απεσταγμένο νερό. Επιπλέον, γινόταν πλύση των χεριών και απολύμανση των πάγκων εργασίας με αλκοόλη.

**Πίνακας 2.** Σύσταση τροφής προνυμφών του εργαστηριακού στελέχους του *Bactrocera oleae* (Tsitsipis 1983b).

Συστατικό	Ποσοστιαία αναλογία στο μείγμα
Νερό βρύσης	53,2 %
Κυτταρίνη	31,6 %
Μαγιά μύρας	7,3 %
Υδρολυμένη σόγια	2,9 %
Ζάχαρη κρυσταλλική	1,9 %
Ελαιόλαδο	1,9 %
Tween-80	0,7 %
Σορβικό κάλιο	0,05 %
Νιπαγκίνη (Nipagin)	0,2 %
HCl (διάλυμα 2N)	0,2 %

### 3) ΒΙΟΔΟΚΙΜΕΣ

#### 3.1) Υλικά βιοδοκιμών

Για την εκτέλεση των βιοδοκιμών χρησιμοποιήθηκε ο ακόλουθος εξοπλισμός:

1. 6 γυάλινα φιαλίδια όγκου 100 ml για την παρασκευή των διαλυμάτων καθορισμένων συγκεντρώσεων του εντομοκτόνου .
2. Μια μικροσύριγγα τύπου Hamilton των 10 μl.
3. Μικροί κλωβοί εκτροφής του δάκου της ελιάς από plexiglass, διαστάσεων 8\*8\*8 cm. Στους κλωβούς τοποθετούνταν τροφή και νερό για τη διατήρηση των εντόμων μετά την εφαρμογή του εντομοκτόνου και για διάστημα 48 ωρών.
4. Μια φιάλη CO<sub>2</sub>, που συνδέεται με αεροστεγές κουτί μεγαλύτερων διαστάσεων από το κλουβί εκτροφής του δάκου. Στο αεροστεγές κουτί τοποθετούνταν ο κλωβός συλλογής των εντόμων πριν τη βιοδοκιμή, προκειμένου να γίνει αναισθητοποίηση των εντόμων με εφαρμογή CO<sub>2</sub> για λίγα δευτερόλεπτα.
5. Ακετόνη (pro analysis, 98 % w.v.) που χρησιμοποιούταν ως διαλύτης του εντομοκτόνου.
6. Πιπέτες όγκου 2-20 μl και 2-1000 μl, για τη παρασκευή των διαλυμάτων εντομοκτόνου.
7. Λαβίδες για το χειρισμό των εντόμων.

### 3.2) Μέθοδος βιοδοκιμών

Αρχικά, γινόταν προετοιμασία των κλωβών για τη διατήρηση. Στους κλωβούς τοποθετούταν μικρό πλαστικό φιαλίδιο, με βαμβάκι εμποτισμένο στο περιεχόμενο στο φιαλίδιο απεσταγμένο νερό. Επιπλέον, τοποθετούταν τεχνητή, στερεά τροφή. Η τροφή ήταν λειοτριβημένο μίγμα υδρολυμένης μαγιάς και κρυσταλλικής ζάχαρης, σε αναλογία 1: 3. Το απεσταγμένο νερό προστίθεται σε πλαστικά φιαλίδια με ένα τεμάχιο βαμβακιού στην κορυφή τους, από το οποίο τα έντομα απομυζούσαν νερό.

Στο επόμενο στάδιο, παρασκευάζονταν τα διαλύματα γνωστών συγκεντρώσεων του εντομοκτόνου. Για τις βιοδοκιμές χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της τοπικής εφαρμογής εντομοκτόνου. Σε κάθε βιοδοκιμή παρασκευάζονταν διαλύματα γνωστών συγκεντρώσεων alpha-cypermethrin με διαλύτη ακετόνη (pro analysis, 98 %). Το εντομοκτόνο που χρησιμοποιούταν είναι εμπορικό σκεύασμα (FASTAC 10 SC, BASF). Επιλέχθηκε η μέθοδος με πλήρες εύρος δόσεων (full dose bioassay), με δόσεις εντομοκτόνου ίσες με το 1/ 128, το 1/ 64, το 1/ 32, το 1/ 16, το 1/ 8 ή και το 1/ 80 και 1/ 12 της προτεινόμενης δόσης (30 ng/ έντομο). Σε όλες τις βιοδοκιμές συμπεριλήφθηκε και μάρτυρας (ακετόνη).

Οι υπολογισμός των όγκων εντομοκτόνου και ακετόνης για κάθε δόση του εντομοκτόνου παρουσιάζεται στον πίνακα 3.

**Πίνακας 3.** Δόσεις του alpha-cypermethrin σε ng/ έντομο\* και μl σκευάσματος που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε βιοδοκιμή

Δόσεις σε ng/ έντομο	0	0,117	0,156	0,234	0,468	0,937
Ακετόνη (ml)	20	100	150	200	400	800
Όγκος εντομοκτόνου (μl)	0	0,9375	0,9375	0,9375	0,9375	0,9375
Συνολικός όγκος διαλύματος (ml)	20	100	150	200	400	800

\* Η προτεινόμενη δόση είναι 30 ng/έντομο.

Οι τιμές του πίνακα 1 είναι ενδεικτικές για το εντομοκτόνο alpha-cypermethrin. Στη πρώτη γραμμή ορίζεται ως 1X η προτεινόμενη δόση του παρασκευαστή του εντομοκτόνου (X= 30 ng/ έντομο), οπότε οι υπόλοιπες δόσεις (1/128 ως 1/8)

ανάγονται σε σχέση με αυτή και εκφράζονται αντίστοιχα σε ng/ έντομο. Στη δεύτερη γραμμή, παρουσιάζονται τα ml ακετόνης που χρειάζεται για τη παρασκευή κάθε διαλύματος. Στη τρίτη σειρά, παρουσιάζονται τα ml του εντομοκτόνου που διαλύονται σε ακετόνη με πιπέτα. Πριν την παρασκευή διαλυμάτων, είναι αναγκαίο τα φιαλίδια να πλένονται και να αποστειρώνονται σε κλίβανο. Μετά την προσθήκη του εντομοκτόνου, γινόταν ανάδευση των διαλυμάτων.

Μετά τη παρασκευή των διαλυμάτων, τοποθετούνταν μέσα στο αεροστεγές κλουβί τα έντομα και ακολουθούσε νάρκωσή τους, με διοχέτευση CO<sub>2</sub> για μερικά δευτερόλεπτα. Στη συνέχεια, γινόταν εφαρμογή του εντομοκτόνου σε κάθε έντομο, με χρησιμοποίηση μικροσύριγγας τύπου Hamilton 10 μl και εφαρμοζόμενη ποσότητα 1 μl διαλύματος εντομοκτόνου της κάθε συγκέντρωσης, στο κοιλιακό στέρνο κάθε εντόμου (abdominal sternum). Για κάθε δόση, χρησιμοποιούνταν 20-30 ενήλικα άτομα του *Bactrocera oleae*, με προσπάθεια τήρησης αναλογίας αρσενικών/ θηλυκά 1/1 σε κάθε δόση.

Μετά την εφαρμογή του εντομοκτόνου, τα έντομα διατηρούνταν σε πλαστικούς κλωβούς διαστάσεων 8\*8\*8 cm. Οι κλωβοί έχουν δυο τοιχώματα καλυμμένα με δικτυωτό υλικό με μικρούς πόρους (τούλι) και τα υπόλοιπα τοιχώματά τους καλυμμένα με διαφανές πλαστικό υλικό (plexiglass). Στα έντομα χορηγούνταν τροφή και απεσταγμένο νερό (τοποθετημένα στο εσωτερικό των κλωβών), για διάστημα 48 ωρών μετά την πραγματοποίηση της βιοδοκιμής.

#### **4) ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΕΣ**

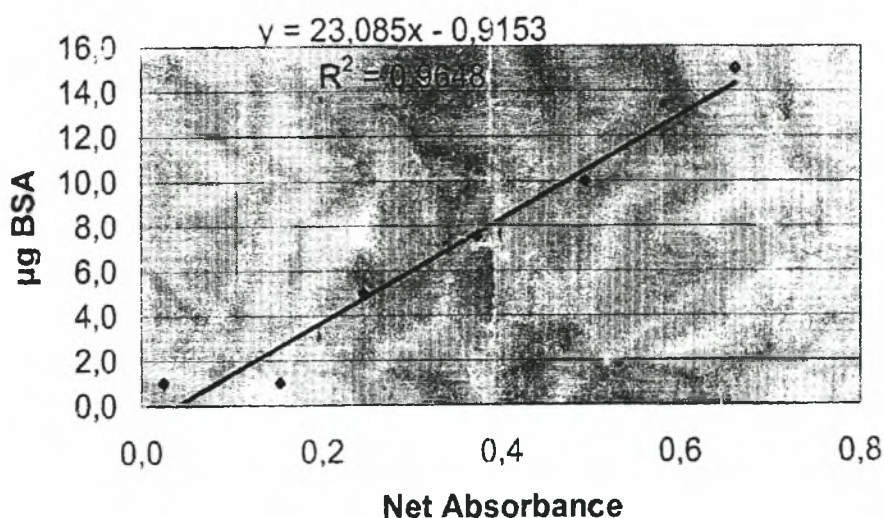
##### **4.1) Μέθοδος ομογενοποίησης εντόμων των Vontas et al. (2001)**

Για την εκτίμηση της ποσότητας (μg) ολικών πρωτεϊνών και της δραστηριότητας γενικών εστερασών χρησιμοποιούνται έντομα χωρίς πτέρυγες (1 ολόκληρο έντομο ανά βοθρίο της πλάκας ELISA). Σε κάθε βοθρίο προστίθενται 200 μl διαλύματος sodium phosphate (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 50mM (pH 7,2)). Η ομογενοποίηση γίνεται μέσα σε κάθε βοθρίο της πλάκας, με πλάκα λειοτρίβησης (Burkhard Scientific).

##### **4.2) Μέθοδος εκτίμησης ολικής πρωτεΐνης των Vontas et al. (2001)**

Για την εκτίμηση της ποσότητας ολικών πρωτεϊνών του εντόμου χρησιμοποιούνται 1,5 μl ομογενοποιημένου, σε 2 επαναλήψεις για το μάρτυρα και 2 για τη μεταχείριση με BioRad. Για κάθε έντομο, προστίθενται σε 2 βοθρία από 300 μl

διαλύματος που προκύπτει από αραιώση διαλύματος BioRad (BioRad) σε απεσταγμένο νερό, με αναλογία ενός όγκου BioRad προς τρεις όγκους αποσταγμένου νερού. Η πλάκα παραμένει σε σκοτεινό μέρος επί 5 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου (25° C) και γίνεται λήψη της ένδειξης του φασματοφωτόμετρου (OD: optical density), για το τελικό σημείο της αντίδρασης (end point), στα 630 nm. Πριν τη διαδικασία εκτίμησης της ολικής ποσότητας πρωτεϊνών του εντόμου, κατασκευάζεται η πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης του οργάνου, με πρότυπα διαλύματα BSA (Bovine Serum Albumin) συγκεντρώσεων 0, 1, 2, 5, 7,5, 10 και 15  $\mu\text{g/ml}$  (Σχήμα 1). Για την επεξεργασία των αποτελεσμάτων του οργάνου χρησιμοποιήθηκε το πακέτο KC Junior. Υπολογίστηκε ότι η σχέση που εκφράζει την ποσότητα ολικής πρωτεΐνης (Y) ως συνάρτηση της τιμής OD (X) του οργάνου είναι γραμμική της μορφής  $y=23,085 \cdot x - 0,9153$ . Με βάση τη συγκεκριμένη εξίσωση, υπολογίστηκε η ποσότητα ολικών πρωτεϊνών του εντόμου ( $\mu\text{g}$  ολικής πρωτεΐνης/ έντομο). Ελήφθη μέριμνα ώστε να διατηρούμαστε εντός του γραμμικού εύρους τιμών. Αν η σχετική απόκλιση της χαμηλότερης από την υψηλότερη τιμή Y κάθε δείγματος 8 ατόμων που εξετάζεται είναι ως 40 %, θεωρείται ότι βρισκόμαστε εντός του γραμμικού εύρους συγκεντρώσεων της καμπύλης, οπότε χρησιμοποιούνται 20  $\mu\text{l}$  ομογενοποιημένου κάθε εντόμου για την εκτίμηση δραστηριότητας των γενικών εστερασών. Αν οι σχετικές αποκλίσεις είναι μεγαλύτερες του 40%, οι όγκοι ομογενοποιημένου κάθε εντόμου τροποποιούνται αντιστρόφως ανάλογα με τις τιμές Y και μεταξύ 10-20  $\mu\text{l}$ .



**Σχήμα 1.** Πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης που εκφράζει τα  $\mu\text{g BSA}$  ως συνάρτηση της καθαρής απορρόφησης του οργάνου για κάθε πρότυπο διάλυμα.

#### **4.3) Μέθοδος εκτίμησης της δραστηριότητας των γενικών εστερασών (General Esterases, Naphthyl acetate tests) των Vontas et al. (2001)**

Σε κάθε βοθρίο προστίθενται 20 (ή τροποποιημένα με τον τρόπο που αναφέρθηκε)  $\mu\text{l}$  ομογενοποιημένου και για κάθε έντομο γίνονται 2 επαναλήψεις με  $\alpha$ -Naphthyl acetate και 2 με  $\beta$ -Naphthyl acetate.

Στα 2 βοθρία προστίθενται από 200  $\mu\text{l}$  διαλύματος  $\alpha$ -Naphthyl acetate, που προκύπτει από προσθήκη 120  $\mu\text{l}$  διαλύματος  $\alpha$ -Naphthyl acetate 30 mM (σε μεθανόλη) σε 12 ml διαλύματος  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (sodium phosphate) 0,02 M (pH 7,2).

Στα υπόλοιπα 2 βοθρία, προστίθενται από 200  $\mu\text{l}$  διαλύματος  $\beta$ -Naphthyl acetate, που προκύπτει από προσθήκη 120  $\mu\text{l}$  διαλύματος  $\beta$ -Naphthyl acetate 30 mM (σε μεθανόλη) σε 12 ml διαλύματος  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (sodium phosphate) 0,02 M (pH 7,2).

Η πλάκα διατηρείται σε σκοτεινό σημείο επί 30 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου ( $25^\circ \text{C}$ ). Ακολούθως προστίθενται, σε κάθε βοθρίο στο οποίο είχε προστεθεί διάλυμα  $\alpha$ - ή  $\beta$ - Naphthyl acetate, 50  $\mu\text{l}$  διαλύματος που προκύπτει από προσθήκη 23 mg χρωστικής fast blue σε διάλυμα, αποτελούμενο από 2,25 ml αποσταγμένου νερού και 5,25 ml διαλύματος 5 % SDS (5 % sodium dodecyl sulphate σε διάλυμα phosphate buffer 50 mM). Η πλάκα διατηρείται στη συνέχεια επί 5 λεπτά σε σκοτεινό σημείο, σε θερμοκρασία δωματίου ( $25^\circ \text{C}$ ) και λαμβάνεται η ένδειξη του φασματοφωτόμετρου (OD) στα 630 nm, για το τελικό σημείο της αντίδρασης (end point).

#### **4.4) Μέθοδος εκτίμησης της δραστηριότητας της τρανσφεράσης της γλουταθειόνης των Vontas et al. (2001).**

Στη συγκεκριμένη μέθοδο είναι απαραίτητη η παρασκευή των ακόλουθων διαλυμάτων:

CDNB: αρχικά παρασκευάζεται πρότυπο διάλυμα CDNB (1-χλωρο-2,4-δινιτροβενζόλιο) σε μεθανόλη (συγκεκριμένα διαλύονται 0,13 gr CDNB σε 10 ml μεθανόλης) και στη συνέχεια διατηρείται στους  $4^\circ \text{C}$ , σε δοκιμαστικό σωλήνα σε σκοτεινό χώρο. Στη συνέχεια, 0,06 gr ανηγμένης γλουταθειόνης προστίθενται σε 20 ml ρυθμιστικού φωσφορικού διαλύματος 0,1 M (pH 6,5), στο οποίο είχαν διαλυθεί 0,013 gr CDNB, πολύ καλά διαλυμένου σε 1 ml μεθανόλης. Τελικά, το μίγμα που προκύπτει διατηρείται για 1 λεπτό και το επίπεδο δραστηριότητας της GST εκτιμάται, με εξέταση της οπτικής πυκνότητας του μίγματος αντίδρασης σε φασματοφωτόμετρο,



κινητικά στα 340 nm, ανά 5 λεπτά. Οι μονάδες μέτρησης εκφράζονται σε τιμές mOD/min.

DCNB: η ίδια μέθοδος που περιγράφηκε για το CDNB μπορεί να χρησιμοποιηθεί με DCNB (διχλωρονιτροβενζόλιο) ως υπόστρωμα, με 2 τροποποιήσεις. Προστίθεται ρυθμιστικό φωσφορικό διάλυμα pH 6 και η τελική συγκέντρωση του DCNB είναι 50 %.

Για την εκτίμηση της δραστηριότητας της GST σε μεμονωμένα έντομα, χρησιμοποιούνται εις διπλούν 10 μl ομογενοποιημένου κάθε εντόμου, που προστίθενται στα βιοθρία της πλάκας ELISA. Σε κάθε βιοθρίο, στο οποίο προστέθηκε ομογενοποιημένο έντομο, προστίθενται 200 μl από το μίγμα CDNB που αναφέρθηκε προηγουμένως.

#### **4.5) Μέθοδος εκτίμησης της δραστηριότητας των μονοοξυγενασών μικτής λειτουργίας (MFOs) των Sousa et al. (1995), όπως τροποποιήθηκε από τους Nauen & Stumpf (2002).**

Σύμφωνα με τη μέθοδο, για τον προσδιορισμό χρησιμοποιούνται περίπου 20 κοιλιακά τμήματα ανά πληθυσμό, σε 2 επαναλήψεις. Οι κοιλίες των εντόμων ομογενοποιούνται σε 0,5 ml ρυθμιστικού διαλύματος νατρίου/ καλίου με pH 7,6, που περιείχε 1 mM EDTA, 1mM διθειοθρεϊτόλη και 200 mM σακχαρόζη. Τα ομογενοποιημένα τοποθετούνται σε μικροκάψουλες τύπου Eppendorf και φυγοκεντρώνονται στα 5000g επί 10 λεπτά, στους 4° C. Μετά τη φυγοκέντρηση, το υπερκείμενο στρώμα κάθε ομογενοποιημένου διαχωρίζεται και γίνεται νέα φυγοκέντρηση, στα 15000g επί 15 λεπτά και στη συνέχεια στα 100000g, επί 1 ώρα, στους 4° C. Η διαδικασία αποσκοπεί στην απόκτηση του pellet των μικροσωμάτων, το οποίο στη συνέχεια διαλύεται εκ νέου στο ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα. Χρησιμοποιούνται σχεδόν 200 μg μικροσωμικής πρωτεΐνης ανά πληθυσμό, για να προσδιοριστεί η δραστηριότητα του ένζυμου απαιθυλάση της Ο-αιθοξικουμαρίνης (ECOD, ethoxycoumarin O-deethylase). Η ανίχνευση απελευθέρωσης φθορίζουσας 7-υδροξικουμαρίνης γίνεται στα 380 nm, κατά τη φάση της διέγερσης και στα 480 nm, κατά τη φάση της εκπομπής ακτινοβολίας. Για την ανίχνευση χρησιμοποιείται μια συσκευή ανάγνωσης φθορισμού M2e (Molecular Devices, UK). Μια μονάδα στις ενδείξεις του οργάνου αντιστοιχεί σε σχηματισμό 1 pmol 7-υδροξικουμαρίνης ανά λεπτό και ανά mg μικροσωμικής πρωτεΐνης.





ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000091131

