



Διαγνωστική μέθοδος για την ανίχνευση μετάλλαξης που
εμπλέκεται στην ανθεκτικότητα της αφίδας *Aphis gossypii*
(Glover) (Hemiptera: Aphididae) στα πυρεθροειδή

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΜΠΟΥΛΗ ANNA

ΛΑΡΙΣΑ 2010



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

Αριθ. Εισ.: 8147/1

Ημερ. Εισ.: 28-04-2010

Δωρεά:

Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ

2010

ΜΠΟ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087082



Διαγνωστική μέθοδος για την ανίχνευση μετάλλαξης που
εμπλέκεται στην ανθεκτικότητα της αφίδας *Aphis gossypii*
(Glover) (Hemiptera: Aphididae) στα πυρεθροειδή

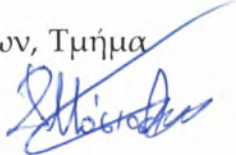


ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
ΜΠΟΥΛΗ ANNA

ΛΑΡΙΣΑ 2010

Η διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας, του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους συνέβαλλαν με το δικό τους τρόπο στην εκπόνηση αυτής της διπλωματικής εργασίας. Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Λέκτορα Δημήτριο Μόσιαλο για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου αναθέτοντάς μου ένα ιδιαίτερα ενδιαφέρον ερευνητικό έργο. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Διδάκτορα Ιωάννη Μαργαριτόπουλο για την καθοδήγηση, το ενδιαφέρον του και τις πολύτιμες συμβουλές κατά την διεξαγωγή των πειραμάτων όπως επίσης και κατά τη συγγραφή της διατριβής. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Διδάκτορα Κωνσταντίνο Βουδούρη για τη συμβολή του στην πραγματοποίηση των πειραμάτων. Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω όλη την ομάδα του εργαστηρίου Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας και ιδιαίτερα τους υποψήφιους Διδάκτορες, Κώστα Σταμάτη και Ευαγγελία Κουτσογιαννούλη, και τη Λέκτορα μοριακής γενετικής ζωικών οργανισμών, Θεολογία Σαραφίδου, για την πολύτιμη βοήθεια και το φιλικό κλίμα συνεργασίας.

Τριμελής επιτροπή:

1. Δημήτριος Μόσιαλος, Λέκτορας Βιοτεχνολογίας Μικροβίων, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας 
2. Ζήσης Μαμούρης, Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας 
3. Κωνσταντίνος Ματθιόπουλος, Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας 

Περιεχόμενα

Περιεχόμενα	
Ευχαριστίες	2
Περίληψη	5
Εισαγωγή	9
<i>Aphis gossypii</i>	16
Διαχείριση του <i>Aphis gossypii</i>	19
Ανθεκτικότητα	22
Μέθοδοι παρακολούθησης ανθεκτικότητας	29
Σκοπός	32
Υλικά και μέθοδοι	33
Αποτελέσματα	47
Συζήτηση	52
Βιβλιογραφία	57

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η αφίδα του βάμβακος, *Aphis gossypii* (Glover) (Hemiptera: Aphididae) είναι πολυφάγο είδος και προσβάλλει διάφορες καλλιέργειες όπως βαμβάκι, καλλωπιστικά φυτά, κολοκυθοειδή και αμπέλι. Στο βαμβάκι προκαλεί σοβαρές ζημιές και μπορεί να μειώσει την παραγωγή και την ποιότητα της παραγόμενης ίνας. Για την καταπολέμηση της αφίδας στις καλλιέργειες του βάμβακος χρησιμοποιούνται διάφορα εντομοκτόνα και αρκετά συχνά πυρεθροειδή. Ωστόσο, η υπερβολική και μακροχρόνια χρήση των εντομοκτόνων μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας στις αφίδες. Κύριος στόχος των πυρεθροειδών είναι τα τασσεοεξαρτώμενα κανάλια νατρίου στις μεμβράνες των νευρικών κυττάρων. Στην παρούσα εργασία παρουσιάζεται διαγνωστική μέθοδος για την ανίχνευση της σημειακής μετάλλαξης *super-kdr* (*super knockdown resistance*) που εντοπίζεται στην ενδοκυτταρική θηλιά μεταξύ των διαμεμβρανικών τμημάτων S4-S5 στην υπομονάδα II της πρωτεΐνης του καναλιού νατρίου. Η μετάλλαξη αφορά τη μετατροπή του αμινοξέος μεθειονίνη σε λευκίνη, M918L. Γενικά, μετάλλαξη στο σημείο 918 έχει βρεθεί σε διάφορα έντομα και προσδίδει μέχρι ~1000 φορές ανθεκτικότητα στα πυρεθροειδή. Μελετήθηκαν 92 παρθενογενετικές σειρές της αφίδας από καλλιέργειες βάμβακος από τις περιοχές Μελιά Λάρισας και Αλεξάνδρεια Ημαθίας. Μετά την απομόνωση του DNA από αφίδες και την ενίσχυση τμήματος του καναλιού νατρίου με PCR ακολούθησε η τεχνική RFLP (*restriction fragment length polymorphism*). Το προϊόν της PCR επωάζεται με το περιοριστικό ένζυμο *SspI* και στην συνέχεια τα δείγματα ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου. Το ένζυμο αναγνωρίζει ένα συγκεκριμένο σημείο στις αλληλουχίες που περιέχουν την *super-kdr* μετάλλαξη. Επιπλέον, αλληλουχήθηκε τμήμα του γονιδίου του καναλιού νατρίου σε οκτώ παρθενογενετικές σειρές για να

διαπιστωθεί η ύπαρξη της σημειακής μετάλλαξης *kdr*, η οποία μετατρέπει το αμινοξύ της λευκίνης σε φαινυλαλανίνη, F1014L, και εντοπίζεται στο διαμεμβρανικό τμήμα S6 της υπομονάδας II της πρωτεΐνης. Μετά τη διεξαγωγή των πειραμάτων διαπιστώθηκε ότι το 37% των δειγμάτων δεν έχουν την *super-kdr* μετάλλαξη (SS γενότυποι). Στο 63% των δειγμάτων βρέθηκε η *super-kdr* μετάλλαξη σε ετερόζυγη κατάσταση (RS γενότυποι). Η αλληλούχηση για τη διερεύνηση της *kdr* μετάλλαξης έδειξε ότι κανένα από τα οκτώ δείγματα που εξετάστηκαν δεν έχει τη συγκεκριμένη μετάλλαξη. Η μελέτη επιβεβαίωσε σημαντική παρουσία ανθεκτικότητας στα πυρεθροειδή, καθώς το 63% των δειγμάτων βρέθηκαν ετεροζύγωτα στην *super-kdr* μετάλλαξη, καθιστώντας προβληματικό τον έλεγχο της αφίδας με τα συγκεκριμένα εντομοκτόνα. Επίσης, επεμβάσεις με πυρεθροειδή έναντι άλλων εχθρών του βάμβακος μπορεί να οδηγήσουν σε έξαρση των πληθυσμών της αφίδας. Οι αφίδες δεν επηρεάζονται αρκετά, αντίθετα με τους φυσικούς της εχθρούς που θανατώνονται. Τέλος, η απουσία της *super-kdr* σε ομοζύγωτη κατάσταση πιθανώς σχετίζεται με αυξημένο κόστος ανθεκτικότητας στους ομοζύγους γενότυπους (π.χ. μη φυσιολογική συμπεριφορά, αδυναμία αντίληψης εξωτερικών ερεθισμάτων) με αποτέλεσμα να μην επικρατούν.

ABSTRACT

Aphis gossypii (Glover), known as cotton or melon aphid, is a remarkable species of geographical and host plant range. It is extremely polyphagous infesting many plant species. The aphid has become a serious pest of field especially cotton and grape. Aphid management takes place using various insecticides including pyrethroids. However, the excessive and long-lasting use of insecticides leads to resistance development in aphids. Main target of pyrethroid are the voltage-gated sodium channels of the nerve membranes. The present study examines the occurrence of point mutations related to pyrethroid resistance in *Aphis gossypii* (Glover) parthenogenetic lineages coming from cotton fields in Greece. In particular, we developed a novel diagnostic method, based on RFLP-PCR, to detect the super-*kdr* mutation in individual aphids. Ninety two parthenogenetic aphid lines originated from cotton fields in the region of Melia Larissas and Alexandria Imathias were studied. Total DNA extraction took place from individual aphids followed by PCR aiming to amplify a segment (250 bp) of the sodium channel gene. PCR products were digested by the restriction enzyme *SspI* and subsequently separated and visualized on polyacrylamide gel. The restriction enzyme recognizes a six base pair sequence containing the super-*kdr* mutation. Sixty three percent of the aphids examined revealed the mutation in heterozygote state (RS) while 37% were susceptible (SS). The homozygote resistant genotype (RR) was not found at all. Furthermore, sequencing of a segment of the sodium channel gene presumably encompassing the *kdr* mutation did not reveal this mutation in eight aphid lineages. The results suggest the development of resistance to pyrethroids in *A. gossypii* from cotton fields, this information should be taken into account in pest management strategies dealing with chemical insecticide use. In addition, the lack of RR resistant genotypes might suggest enhanced fitness cost and these genotypes maybe

selected against even in cases of pyrethroid selection pressure.

Εισαγωγή

Αφίδες

Οι αφίδες αποτελούν μια μεγάλη οικογένεια εντόμων, που εμφανίζεται συχνά σε ποικίλλες καλλιέργειες. Τα έντομα αυτά είναι γνωστά με διάφορα ονόματα όπως μελίγκρα, ψείρα, μέλουρα και φυτόψειρα. Ανήκουν στην υπεροικογένεια Aphidoidea και στη τάξη Hemiptera, στην οποία έχουν περιγραφεί περίπου 4000 είδη. Ο μεγαλύτερος αριθμός ειδών αφίδων απαντάται στις εύκρατες περιοχές όπου το 25% των φυτικών ειδών προσβάλλονται από αφίδες. Υπάρχουν για σχεδόν 280 εκατομμύρια χρόνια και από την αρχή είχαν μικρό μέγεθος και αναπαράγονταν σεξουαλικά και παρθενογενετικά (Dixon 1998).

Χαρακτηριστικά αφίδων

Οι αφίδες είναι μικρόσωμα έντομα, μήκους συνήθως 1-7 mm, έχουν σώμα μαλακό και σχήμα ωοειδές. Έχουν συνήθως μακριά πόδια με διάρθρους ταρσούς, μακρύ ρύγχος και κεραίες που αποτελούνται από ένα έως έξι άρθρα. Οι πτερωτές μορφές έχουν δύο ζεύγη διαφανών πτερυγών. Τα περισσότερα είδη είναι πολυμορφικά. Εκτός από τα μορφολογικά χαρακτηριστικά της υπεροικογένειας στην οποία ανήκουν, οι πιο πολλές αφίδες έχουν στο νωτιαίο τεργίτη του 5ου κοιλιακού δακτυλίου ένα ζεύγος σωληνόμορφων αποφύσεων, που ονομάζονται σιφώνια ή κεράτια (siphunculi) και στην άκρη της κοιλιάς μια απόφυση που λέγεται ουρίτσα ή ουρά (cauda). Ρόλος των σιφωνίων είναι η απελευθέρωση φερομόνης συναγερμού όταν προσβληθεί ή εκτεθεί σε κίνδυνο η αφίδα από κάποιο εχθρό, προκαλώντας τη διασπορά των υπολοίπων αφίδων που βρίσκονται πλησίον της (Dixon 1998).

Ενδιαίτημα

Τα συγκεκριμένα έντομα ζουν κυρίως σε τρυφερούς βλαστούς και τρυφερά φύλλα διαφόρων φυτών. Μερικά είδη είναι ριζόβια (προσβάλουν τις ρίζες) ή φυλλόβια και ριζόβια (προσβάλουν φύλλα και ρίζες) και αρκετά είναι κηκιδόβια (ζουν μέσα σε κηκίδες που δημιουργούνται στο φύλλωμα των φυτών ξενιστών τους, όπου τρέφονται π.χ. το *Pemphigus betae* Doane (Hemiptera: Aphididae)). Ζουν συνήθως σε ομάδες το ένα κοντά στο άλλο με την κεφαλή συνήθως προς τη βάση του βλαστού ή του φύλλου. Πολλά είδη δημιουργούν πυκνές αποικίες και την άνοιξη μπορεί να καλύψουν ολόκληρο το κορυφαίο μέρος των νέων βλαστών ορισμένων φυτών.

Διατροφικές συνήθειες

Οι αφίδες είναι μυζητικά έντομα και τρέφονται σχεδόν συνεχώς καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής τους. Αφαιρούν μεγάλη ποσότητα χυμού από τα φυτά και το νύγμα πολλών ειδών προκαλεί συστρόφη των φύλλων. Τα μελιτώδη απεκκρίματα ορισμένων ειδών ρυπαίνουν το φύλλωμα και τους καρπούς και ευνοούν την ανάπτυξη καπνιάς, που δημιουργείται από ανάπτυξη σαπροφυτικών μυκήτων. Σε πολλά είδη έχουν αναπτυχθεί σχέσεις συμβίωσης με μυρμήγκια, τα οποία συλλέγουν τα μελιτώδη απεκκρίματα προστατεύοντας τις αφίδες από διάφορους εχθρούς (Dixon 1973).

Ζημιές

Οι αφίδες είναι από τις κυριότερες κατηγορίες εντόμων που μεταδίδουν στα φυτά παθογόνους ιούς. Είναι φορείς διαφόρων ιών και προκαλούν σοβαρές ζημιές στα καλλιεργούμενα φυτά. Οι πυκνοί πληθυσμοί τους, ο μεγάλος αριθμός γενεών το έτος, που συχνά ξεπερνά τις 10 και η μετάδοση ιών στα φυτά κατατάσσουν τις αφίδες ανάμεσα

στους πιο βλαβερούς εχθρούς των καλλιεργούμενων φυτών.

Επιβίωση

Οι αφίδες είναι άφθονες, κυρίως την άνοιξη και το φθινόπωρο, και γενικά σε μετρίως θερμό και υγρό καιρό. Την άνοιξη τα παρθενογενετικά θηλυκά αναπαράγονται ταχύτατα γιατί οι συγκεκριμένες καιρικές συνθήκες και τα πολυάριθμα τρυφερά φύλλα και βλαστοί ευνοούν την ανάπτυξή τους. Σε κλίματα όπως της Ελλάδας, οι θερμοί και ξηροί μήνες του καλοκαιριού δεν ευνοούν τη συνεχή αναπαραγωγή των αφίδων και οι πληθυσμοί τους τότε περιορίζονται σημαντικά. Στην Ελλάδα αυξημένος αριθμός αφίδων παρατηρείται κατά το μήνα Μάιο. Παράλληλα οι αφίδες έχουν και ένα μεγάλο αριθμό φυσικών εχθρών που συμβάλλουν στον έλεγχο των πληθυσμών τους. Οι σπουδαιότεροι φυσικοί εχθροί είναι έντομα. Μεταξύ αυτών υπάρχουν είδη Διπτέρων (Syrphidae, Cecidomyiidae), Νευροπτέρων (Chrysopidae, Hemerobiidae), Κολεοπτέρων (Coccinellidae, Carabidae, Staphyllinidae), Υμενοπτέρων (Proctotrupidae, Chalcididae, Braconidae, Aphidiidae).



Εικόνα 1: Άπτερες μορφές *Aphis gossypii*

Βιολογικός κύκλος

Ο πολυμορφισμός που παρατηρείται στα περισσότερα είδη της υπεροικογένειας Aphidoidea σχετίζεται με την εναλλαγή φυλετικά αναπαραγόμενων και παρθενογενετικών γενιών και με την εποχική εναλλαγή ξενιστών. Στις αφίδες εμφανίζονται συνήθως οι μορφές των θεμελιωτικών θηλυκών (fundatrices), των παρθενογενετικών θηλυκών (άπτερων και πτερωτών), των θηλυτόκων, των ωτόκων, των αρσενικών και σε ορισμένα είδη των ειδικών διαθεριζόντων ή διαχειμαζόντων ατόμων και των στρατιωτών.

Τα είδη των αφίδων κατατάσσονται με βάση το βιολογικό τους κύκλο σε μονόοικα (μη μεταναστευτικά) και ετερόοικα (μεταναστευτικά). Τα μονόοικα είδη ολοκληρώνουν το βιολογικό τους κύκλο σε έναν ξενιστή (πολυετές ή ποώδες φυτό). Αντίθετα, τα ετερόοικα είδη εναλλάσσουν ξενιστές κατά τη διάρκεια του έτους και μεταναστεύουν από τον κύριο ξενιστή στο δευτερεύοντα (Blackman & Eastop 1984). Τα μονόοικα είδη, π.χ. *Aphis rumicis* L. (Hemiptera: Aphididae) πραγματοποιούν τον βιολογικό τους κύκλο στο ίδιο φυτό ή σε φυτά του ίδιου είδους. Το φθινόπωρο άπτερα παρθενογενετικά θηλυκά (φυλογόνα) θα γεννήσουν ωτόκα και αρσενικά που είναι συνήθως άπτερα αφού δε χρειάζεται να μεταναστεύσουν για να συμπληρωθεί ο βιολογικός τους κύκλος. Τα περισσότερα μονόοικα είδη σε ποώδη φυτά πιστεύεται ότι εξελίχθηκαν μέσα από την ετεροοικία ενώ αρκετά από αυτά παρουσιάζουν μεγάλη συγγένεια με ετερόοικα είδη που χρησιμοποιούν το συγκεκριμένο ποώδες φυτό ως δευτερεύοντα ξενιστή (Dixon 1998). Τα ετερόοικα είδη της οικογένειας Aphididae εναποθέτουν χειμερινά αυγά στο φλοιό του κύριου ξενιστή το φθινόπωρο. Τα αυγά εκκολάπτονται στις αρχές της άνοιξης και δίνουν άπτερα, παρθενογενετικά θηλυκά, που ονομάζονται θεμελιωτικά ή ιδρυτικά (fundatrices). Τα θεμελιωτικά δίνουν αρχικά έναν αριθμό άπτερων, παρθενογενετικών γενιών (fundatrigeniae) και στη

συνέχεια αρχίζουν σταδιακά να γεννούν αυξανόμενους αριθμούς πτερωτών, παρθενογενετικών θηλυκών (fundatrigeniae). Τα πτερωτά μεταναστεύουν στους ποώδεις, δευτερεύοντες ξενιστές. Κατά τη διάρκεια της βλαστικής περιόδου του έτους, παρατηρείται παρθενογενετική αναπαραγωγή επί πολλές γενιές, στους δευτερεύοντες ξενιστές. Οι απόγονοι που προκύπτουν είναι άπτεροι και πτερωτοί (alienicolae). Κατά τα τέλη του καλοκαιριού ή ως τις αρχές φθινοπώρου, στους δευτερεύοντες ξενιστές γεννιούνται πτερωτά θηλυτόκα (gynoparae) και πτερωτά αρσενικά άτομα, που μεταναστεύουν στους κύριους ξενιστές. Εκεί, τα θηλυτόκα γεννούν ωτόκα θηλυκά (oviparae), τα οποία μετά από σύζευξη με τα αρσενικά, εναποθέτουν τα χειμερινά αυγά. Σε ετερόοικα είδη άλλων οικογενειών αφίδων της υπεροικογένειας Aphidoidea (π.χ. Pemphigidae), παράγεται μόνο μια μεταναστευτική μορφή στους δευτερεύοντες ξενιστές, τα ονομαζόμενα φυλογόνα άτομα (sexuparae). Αυτά είναι πτερωτά, παρθενογενετικά θηλυκά που γεννούν άπτερα αρσενικά και ωτόκα θηλυκά στους πρωτεύοντες ξενιστές. Χαρακτηριστικό των φυλογόνων που επιστρέφουν στους πρωτεύοντες ξενιστές, είναι ότι συχνά διαφέρουν μορφολογικά από τα άτομα που μεταναστεύουν την άνοιξη προς τους δευτερεύοντες ξενιστές (Blackman & Eastop 1984). Σε περιοχές με ήπιο χειμώνα οι πληθυσμοί των ετερόοικων ειδών διαχειμάζουν και ως παρθενογενετικά άτομα. Η διαχείμαση γίνεται συνήθως σε δευτερεύοντες ξενιστές, όπως οι χειμερινές καλλιέργειες και τα αυτοφυή είδη.

Ένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό των αφίδων είναι η τηλεσκοπική ανάπτυξη των γενεών, συνδυασμένη με την ζωτοκία. Η ανάπτυξη του εμβρύου δηλαδή αρχίζει πριν ακόμη γεννηθεί η μητέρα του, ενώ με την ενηλικίωσή της το έντομο είναι έτοιμο να γεννηθεί. Η τηλεσκοπική παραγωγή συντομεύει τη διάρκεια του βιολογικού κύκλου και σε συνδυασμό με τη ζωτοκία επιτρέπει την ανάπτυξη μεγάλων

πληθυσμών. Παράλληλα οδηγεί και στη μείωση της μέσης διάρκειας γενιάς των αφίδων, με αποτέλεσμα τη γρήγορη αύξηση των πληθυσμών τους. Επιπρόσθετα, το χαρακτηριστικό αυτό έχει ως αποτέλεσμα οι αφίδες να συμπληρώνουν την ανάπτυξή τους σε χρόνο τρεις φορές μικρότερο από άλλα ισομεγέθη έντομα και οι πληθυσμοί τους να επιτυγχάνουν ρυθμούς αύξησης όμοιους με αυτούς μικρότερων ζώων, όπως π.χ. τα ακάρεα (Dixon 1998).

Ένα επιπλέον χαρακτηριστικό των αφίδων αποτελεί η ανολοκυκλικότητα, η έλλειψη δηλαδή της ικανότητας για σεξουαλική αναπαραγωγή το οποίο εμφανίζεται συχνά κατά τη διάρκεια του βιολογικού κύκλου των αφίδων. Έχουν βρεθεί είδη αφίδων, που είναι αποκλειστικά ανολοκυκλικά και αναπαράγονται όλο το χρόνο παρθενογενετικά. Υπάρχουν όμως και είδη που είναι μερικώς ανολοκυκλικά. Στα μερικώς ανολοκυκλικά είδη οι ανολοκυκλικοί γενότυποι είτε βρίσκονται στην ίδια περιοχή μαζί με ολοκυκλικούς, είτε σε άλλες περιοχές του εύρους εξάπλωσης του είδους (Blackman & Eastop 2000). Από την άλλη πλευρά, φαίνεται, ότι η σεξουαλική αναπαραγωγή προσδίδει σημαντικές δυνατότητες προσαρμογής και επιβίωσης στις αφίδες. Ανεξάρτητα από τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματα του ενός ή του άλλου τρόπου αναπαραγωγής, φαίνεται ότι ο πολυμορφισμός που παρουσιάζουν διάφορα είδη αφίδων προσδίδει σε αυτές μια μεγαλύτερη ικανότητα επιβίωσης, καθώς μπορούν και προσαρμόζονται σε διάφορα περιβάλλοντα και να αξιοποιούν περισσότερους πόρους.

Aphis gossypii (Glover)

Συστηματική κατάταξη

<i>Aphis gossypii</i> (Glover)	
Φύλο	Arthropoda
Υπέρταξη	Aphidoidea
Κλάση	Insecta
Τάξη	Hemiptera
Οικογένεια	Aphididae
Γένος	Aphis

Περιγραφή

Το *Aphis gossypii* είναι πολυφάγο είδος και έχει μεγάλο εύρος ξενιστών. Πρόκειται δηλαδή για παμφάγο είδος. Συνολικά έχουν καταγραφεί περισσότεροι από 900 ξενιστές παγκοσμίως (Inaizumi 1980). Στην Ελλάδα αποτελεί σημαντικό εχθρό κυρίως για το βαμβάκι και τα κολοκυνθοειδή. Γενικά προσβάλλει και φυτά του γένους *Citrus* (εσπεριδοειδή), το καφεόδεντρο, το κακάο, τη μελιτζάνα, τη μπάμια, την πατάτα, διάφορα λαχανοκομικά είδη κ.α. Έχει πολλές γενιές το έτος. Το συγκεκριμένο είδος ευνοείται από σχετικά χαμηλές θερμοκρασίες και υψηλή σχετικά υγρασία. Οι συγκεκριμένες συνθήκες απαντώνται στα πρώτα στάδια ανάπτυξης των βαμβακόφυτων (Τόλης 1986). Απαντάται σχεδόν σε όλες τις χώρες που έχουν ηπειρωτικό ή υποτροπικό κλίμα και κατά συνέπεια σε όλες τις παραμεσόγειες χώρες (Blackman & Eastop 2000).



Εικόνα 2: Πτερωτά και άπτερα *Aphis gossypii*

Το *Aphis gossypii* εμφανίζεται κυρίως στην κάτω επιφάνεια των φύλλων. Προσβάλλει τα φυτά-ξενιστές σε νεαρό στάδιο κυρίως την άνοιξη και λιγότερο το φθινόπωρο. Στα διάφορα φυτά-ξενιστές και κυρίως στο βαμβάκι η μεγαλύτερη πυκνότητα πληθυσμού εμφανίζεται τους μήνες Απρίλιο και Μάιο (Tsitsipis *et al.*, 1998). Απομυζά χυμούς από τα νέα φύλλα και τους βλαστούς, ενώ παράλληλα εκκρίνει μελίτωμα (ζαχαρώδες απέκκριμα) σε μεγάλες ποσότητες με αποτέλεσμα το φράξιμο των στοματιών των φύλλων. Στο μελιτώδες έκκριμα αναπτύσσεται καπνιά που μαυρίζει το φυτό ενώ παράλληλα μειώνει τη φωτοσύνθεση. Μεγάλες προσβολές στα πρώιμα στάδια ανάπτυξης των φυταρίων διακόπτουν την ανάπτυξη, οι άκρες των νέων φύλλων γυρίζουν προς τα κάτω ενώ ορισμένα φυτάρια νεκρώνονται. Στην περίοδο της καρποφορίας προκαλούν κιτρίνισμα των μεγαλύτερων φύλλων και καρπόπτωση. Στο βαμβάκι μειώνεται σημαντικά η βλαστική ικανότητα και το βάρος των σπόρων, υποβαθμίζονται οι νηματουργικές ιδιότητες

των ινών και μειώνεται η εμπορική του αξία.



Εικόνα 3: Αποικίες *Aphis gossypii*

Διαχείριση του *Aphis gossypii*

Βιολογική καταπολέμηση

Η βιολογική καταπολέμηση εντόμων και άλλων εχθρών των φυτών αφορά τη χρησιμοποίηση των φυσικών εχθρών τους όπως διάφορα παρασιτοειδή και αρπακτικά καθώς και παθογόνοι μικροοργανισμοί με σκοπό την μείωση των πληθυσμών τους. Παρασιτοειδές χαρακτηρίζεται εκείνο το είδος εντόμου το οποίο συνήθως έχει μέγεθος παρόμοιο με τον ξενιστή του και απαιτεί για τη συμπλήρωση της ανάπτυξής του ένα μόνο άτομο του ξενιστή το οποίο και τελικά θανατώνει (π.χ. *Encarsia formosa*). Αρπακτικό χαρακτηρίζεται ένα έντομο το οποίο είναι συνήθως μεγαλύτερο από τη λεία του, από την οποία τρέφεται με περισσότερα του ενός άτομα για να συμπληρώσει την ανάπτυξή του και ζει ελεύθερα καθόλη τη διάρκεια της ζωής του (π.χ. *Coccinella septempunctata*).

Ο βιολογικός έλεγχος βασίζεται σε:

1. Εισαγωγή γενικών αρπακτικών ή παρασιτοειδών
2. Ενίσχυση της παρουσίας ωφέλιμων εντόμων
3. Χρησιμοποίηση εντομοπαθογόνων μικροοργανισμών π.χ. μύκητες, βακτήρια, ιοί κλπ

Πλεονεκτήματα βιολογικής αντιμετώπισης εντόμων

Η χρήση βιολογικών μεθόδων για την αντιμετώπιση των εντόμων υπερτερεί σε πολλά σημεία και για το λόγο αυτό ολοένα και περισσότερο χρησιμοποιείται. Έχει αποδειχτεί ότι δεν επηρεάζει αρνητικά την υγεία των ανθρώπων αλλά και των ζώων. Μπορεί να εφαρμοστεί αποτελεσματικά εκτός από την βιολογική γεωργία και στα συστήματα συμβατικής γεωργίας. Επιπλέον, είναι φανερό πως δε ζημιώνει το περιβάλλον. Συχνά, έχει εξειδικευμένη δράση χωρίς να επηρεάζει άλλα

ζωικά είδη, αντίθετα με τη χρήση των χημικών σκευασμάτων. Τέλος οι μέθοδοι αυτές μπορούν να περιορίσουν τους πληθυσμούς των φυτοπαράσιτων για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα από ότι η χρήση χημικών φυτοπροστατευτικών προϊόντων.

Μειονεκτήματα βιολογικής αντιμετώπισης εντόμων

Υπάρχουν βέβαια αρκετά μειονεκτήματα της βιολογικής αντιμετώπισης που μειώνουν σημαντικά την χρήση τους. Ένα σημαντικό μειονέκτημα είναι το γεγονός ότι απαιτεί λεπτομερή σχεδιασμό, εντατική διαχείριση και επομένως εξειδικευμένο προσωπικό για την εφαρμογής της. Επιπλέον, είναι σημαντικό ότι είναι αδύνατη η εφαρμογή της σε μικρούς μεμονωμένους αγρούς και εφαρμόζεται μόνο σε μεγάλες αγροτικές. Σε αντίθεση με τη χρήση των εντομοκτόνων που τα αποτελέσματα από την εφαρμογή τους είναι άμεσα, με αυτή τη μέθοδο αυτό καθίσταται αδύνατο. Τέλος, η εξειδικευμένη δράση επί ενός μόνο φυτοφάγου εντόμου από πλεονέκτημα μπορεί να μετατραπεί σε μειονέκτημα σε σχέση με την ευρέως φάσματος δράση εντομοκτόνων.

Μέθοδοι βιολογικής αντιμετώπισης

Γενικά η βιολογική καταπολέμηση των επιζήμιων εντόμων πραγματοποιείται μέσω τριών μεθόδων η κάθε μία από τις οποίες περιλαμβάνει μια σειρά ενεργειών. Οι μέθοδοι αυτές είναι:

1. Η Κλασική βιολογική καταπολέμηση.
2. Η Μαζική εκτροφή και απελευθέρωση φυσικών εχθρών.
3. Η Διατήρηση και η αύξηση της δράσης των υπαρχόντων φυσικών εχθρών με κατάλληλους χειρισμούς στα αγροοικοσυστήματα.

Για την καταπολέμηση των αφιδών χρησιμοποιείται κατα κύριο λόγο η μαζική εκτροφή και απελευθέρωση φυσικών εχθρών. Διάφορα είδη αφιδών μπορούν να αναπτύξουν μεγάλους πληθυσμούς στις κηπευτικές

καλλιέργειες στη Ελλάδα. Μέσα σε αυτά ανήκουν το εξεταζόμενο *Aphis gossypii* αλλά και άλλα όπως είναι το *Myzus persicae*, *Macrosiphum euphorbiae* κ.α. Στα πλαίσια της βιολογικής τους αντιμετώπισης χρησιμοποιούνται Υμενόπτερα παρασιτοειδή που ανήκουν στις οικογένειες των Aphidiidae και Aphelinidae με κυριότερα το *Aphidius colemani*, *Aphidius matricariae* και *Aphelinus abdominalis*. Το *Aphidius colemani* είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικό εναντίον του *Aphis gossypii*.

Χημική καταπολέμηση

Η χημική καταπολέμηση αφορά τη χρήση χημικών ουσιών οι οποίες δρουν με διάφορους τρόπους εναντίον των επιβλαβών οργανισμών. Ο τρόπος αυτός καταπολέμησης είναι σήμερα ο πιο διαδεδομένος και χρησιμοποιείται σε μεγάλη έκταση και για την αντιμετώπιση των εντόμων. Η χημική καταπολέμηση χρησιμοποιείται σε συγκεκριμένες φάσεις του βιολογικού κύκλου ζωής του εντόμου. Συγκεκριμένα εφαρμόζεται κατά την περίοδο δραστηριότητας του εντόμου, εναντίον των αυγών (πριν εκκολαφθούν) ή των νεαρών προνυμφών πριν εισέλθουν στον καρπό. Μερικές βασικές κατηγορίες χημικών εντομοκτόνων που χρησιμοποιούνται στην καταπολέμηση των αφιδών είναι οι εξής: οργανοφωσφορικά, καρβαμιδικά, πυρεθροειδή, νέονικοτινοειδή.

Πυρεθροειδή Εντομοκτόνα

Τα πυρεθροειδή εντομοκτόνα είναι συνθετικά ανάλογα των φυσικών εντομοκτόνων, πυρεθρινών, που βρίσκονται στο φυτό *Chrysanthemum cinerariaefolium*. Η εντομοκτόνος δράση των πυρεθρινών είναι γνωστή για χρόνια όμως η χρήση τους στην καταπολέμηση διαφόρων εντόμων ήταν περιορισμένη εξαιτίας της ταχύτατης διάσπασής τους στο φως, (Pyrethrin I, Cinerin I). Το γεγονός αυτό οδήγησε στην παραγωγή συνθετικών

πυρεθροειδών τα οποία ήταν πιο σταθερά στο φως (deltamethrin, permethrin), (Bhupinder P.S. 2002). Τη δεκαετία του 1970 ξεκίνησε η εμπορευματοποίηση των συνθετικών πυρεθροειδών τα οποία ήταν σταθερά στο φως. Τα πυρεθροειδή είναι εστερικές ενώσεις που συνδέουν ένα οξύ με τριγωνικό δακτύλιο υδρογονάνθρακα, με έναν πενταμελή δακτύλιο αλκοόλης. Οι πυρεθροειδείς εστέρες είναι έλαια διαλυτά σε αλκοόλες, ακετόνη και πετρελαιοειδή αλλά αδιάλυτα στο νερό. Υδρολύονται εύκολα από ένζυμα με αποτέλεσμα να μην μπορούν να σκοτώσουν τα έντομα σαν στομαχικά δηλητήρια αλλά να δρουν σαν εφήμερα δηλητήρια επαφής. Τα πυρεθροειδή χαρακτηρίζονται από υψηλότερη εντομοκτόνο δράση και ταυτόχρονα ταχεία δράση με απότομη πτώση των εντόμων.

Ανθεκτικότητα αφιδών

Ανάπτυξη ανθεκτικότητας

Από το 1950 τα οργανικά εντομοκτόνα χρησιμοποιήθηκαν εντατικά στην προστασία της καλλιέργειας εναντίον των εντομών λόγω του χαμηλού κόστους και της γρήγορης αποτελεσματικότητάς τους. Η λανθασμένη χρήση τους όμως (τρόπος, χρόνος και συχνότητα εφαρμογής) οδήγησε στην γρήγορη ανάπτυξη ανθεκτικότητας (McKenzie 1996). Αυτή οφείλεται στην επιλογή αλληλομόρφων που προσδίδουν ανθεκτικότητα με συνέπεια, με την πάροδο των γενεών, ευπαθείς αρχικά πληθυσμοί να μετατρέπονται σε ανθεκτικούς. Η ταχύτητα εξάπλωσης της ανθεκτικότητας στη φύση εξαρτάται κυρίως από τον αριθμό γενεών και απογόνων, τον τρόπο αναπαραγωγής, την προσαρμοστικότητα αλληλομόρφων που ελέγχουν την ανθεκτικότητα, τη μετανάστευση και τα καταφύγια. Τη δεκαετία του 1950 περιγράφηκε για πρώτη φορά στη μύγα *Musca domestica* (Soderlund 2007) ανθεκτικότητα στο DDT και στις

πυρεθρίνες ενώ στα μέσα της δεκαετίας του 1970 εμφανίστηκε στη μύγα *Musca domestica* και ανθεκτικότητα στα πυρεθροειδή. Μέχρι τη δεκαετία του 1980 είχαν εμφανίσει ανθεκτικότητα πάνω από 200 έντομα-ξενιστές (Davies 2008). Έρευνα σχετικά με την τοξικότητα του DDT και των πυρεθροειδών εντομοκτόνων έχει δείξει ότι και τα δύο αυτά είδη είναι ισχυρά νευροτοξικά και παρεμβαίνουν στη λειτουργία της νευρικής μεμβράνης. Συνεπώς μπορεί να αναφερθεί ότι η ανάπτυξη της ανθεκτικότητας των εντόμων-ξενιστών στο DDT μπορεί να προσδίδει ανθεκτικότητα και στα πυρεθροειδή. Ο συγκεκριμένος μηχανισμός ανθεκτικότητας είναι γνωστός με την ονομασία *knockdown resistance(kdr)* και προκαλεί 10-20 φορές μείωση της ευαισθησίας στη θέση-στόχο.

Μηχανισμοί ανθεκτικότητας

Ηθολογική ανθεκτικότητα

Η ηθολογική ανθεκτικότητα οφείλεται σε διαφοροποιήσεις στην συμπεριφορά των ανθεκτικών ατόμων. Έτσι τα άτομα αποφεύγουν την επαφή με το εντομοκτόνο ή περιορίζουν τη διάρκεια επαφής ώστε να δεχτούν μικρότερη ποσότητα.

Φυσιολογική ανθεκτικότητα

Η Φυσιολογική ανθεκτικότητα σχετίζεται με την ταχύτητα διείσδυσης σε συνδυασμό με την ταχύτητα απέκκρισης καθώς και με την πιθανή αποθήκευση σε μη ευπαθείς ιστούς. Τα ανθεκτικά άτομα έχουν εξωσκελετό λιγότερο διαπερατό στο εντομοκτόνο, γεγονός που οδηγεί στη βραδύτερη διείσδυσή του. Ένας τέτοιος μηχανισμός αντίστασης, που σχετίζεται με μειωμένη διείσδυσης διαμέσου του δερματίου, έχει περιγραφθεί για τα πυρεθροειδή στο είδος *Blattella germanica* L. (Bull & Patterson 1993). Επίσης, μηχανισμός ταχύτερης απέκκρισης των

μεταβολιτών έχει παρατηρηθεί στα ανθεκτικά άτομα του *Plutella xylostella* L. (Doichuanngam *et al.* 1992).

Βιοχημική ανθεκτικότητα (αυξημένη αποικοδόμηση εντομοκτόνων)

Η βιοχημική ανθεκτικότητα βασίζεται σε ενζυμικά συστήματα που με τη δράση τους οδηγούν σε αποδόμηση των εντομοκτόνων σε μη τοξικά παράγωγα πριν αυτό φτάσει στο στόχο του. Οι πιο γνωστοί τύποι που εμπλέκονται στην βιοχημική ανθεκτικότητα είναι οι εξής:

α) Μονοξυγενάσες

Αυξημένος οξειδωτικός μεταβολισμός των εντομοκτόνων από το κυττόχρωμα P450 **μονοοξυγενάσης**. Οι οξειδάσες μικτής λειτουργίας P450 ή μονοξυγενάσες είναι μικροσωμικές αιμοπρωτείνες που καταλύουν την οξειδωτική διάσπαση των εντομοκτόνων και εντοπίζονται κυρίως στο ενδοπλασματικό δίκτυο και τα μιτοχόνδρια (Scott 1999).

Η διαδικασία αυτή μπορεί να προκαλέσει ανθεκτικότητα σε όλες τις σημαντικότερες ομάδες εντομοκτόνων, εκτός από τα κυκλοδιένια. Ωστόσο τα περισσότερα στοιχεία γι' αυτό τον μηχανισμό είναι έμμεσα και βασίζονται στην ικανότητα του βουτοξειδίου του πυπερονιλίου (Piperonyl Butoxide) ή συγγενών ουσιών, που είναι γνωστές ως αναχαιτιστές του κυττοχρώματος P450 της μονοοξυγενάσης να καταστέλλουν την ανθεκτικότητα όταν χρησιμοποιούνται ως συνεργιστές σε βιοδοκιμές.

β) S-τρανσφεράσες της γλουταθειόνης

Αυξημένη δραστηριότητα του ενζύμου τρανσφεράση της γλουταθειόνης. Ο μεταβολισμός των ξενοβιοτικών επιτυγχάνεται είτε μέσω συζευκτικών αντιδράσεων με την ανοιγμένη γλουταθειόνη, γεγονός που καθιστά τους μεταβολίτες διαλυτούς και βοηθάει την έκκρισή τους είτε μέσω αντίδρασης αφυδροχλωρίωσης.

γ) Καρβοξυλεστεράσες

Αποτελούν μία μεγάλη οικογένεια πρωτεϊνών οι οποίες δεσμεύουν εντομοκτόνα στον εξωκυτταρικό χώρο και υδρολύουν τους εστερικούς δεσμούς, γεγονός που μπορεί να συσχετιστεί με ανθεκτικότητα στα οργανοφωσφορικά, καρβαμιδικά και πυρεθροειδή (Wheloch *et al.* 2005).

Η ανθεκτικότητα μπορεί να προκύψει είτε με ποιοτική αλλαγή του ενζύμου, αυξάνοντας την ικανότητα του ενζύμου να δεσμεύει τα εντομοκτόνα, είτε με ποσοτική αλλαγή στην παραγωγή ενός ενζύμου το οποίο ήδη υπάρχει στα ευαίσθητα άτομα (Field *et al.*, 1997)

Μείωση της ευαισθησίας του στόχου δράσης των εντομοκτόνων

Η εμφάνιση ανθεκτικότητας μπορεί να οφείλεται στη διαφοροποίηση της μοριακής δομής των πρωτεϊνών-στόχων, γεγονός που τις καθιστά λιγότερο ευαίσθητες στα τοξικά μόρια, με αποτέλεσμα τη μείωση ή την απώλεια της αποτελεσματικότητας των εντομοκτόνων. Δύο βασικές πρωτεΐνες στις οποίες έχουν περιγραφεί μεταλλαγές και οι οποίες αποτελούν και τον κύριο στόχο δράσης των περισσότερων εντομοκτόνων είναι οι εξής:

α) Ακετυλοχολινεστεράση (AChE)

Αλλαγές στην μοριακή δομή της πρωτεΐνης AChE μπορούν να οδηγήσουν στην εμφάνιση ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα που ανήκουν στις χημικές οικογένειες των οργανοφωσφορικών και των καρβαμιδικών. Η ανθεκτικότητα μπορεί να οφείλεται:

α) στην τροποποίηση της στερεοδομής της AChE, που έχει ως αποτελέσματα τα μόρια του εντομοκτόνου να μη δημιουργούν σύμπλοκα μαζί της και να μη την δεσμεύουν (Opertnooth 1985)

β) στην ικανότητα του εντόμου να παράγει μεγαλύτερη ποσότητα

πρωτεΐνης AChE. Επομένως, παρόλο που μία ποσότητα δεσμεύεται από τα εντομοκτόνα, υπάρχει περίσσεια ώστε να δημιουργείται σύμπλοκο με την ακετυλοχολίνη στις νευρικές συνάψεις και έτσι να μην επηρεάζεται η λειτουργία του κεντρικού νευρικού συστήματος (Fournier *et al.* 1993).

β) Πρωτεϊνικό κανάλι μεταφοράς ιόντων νατρίου (Na^+)

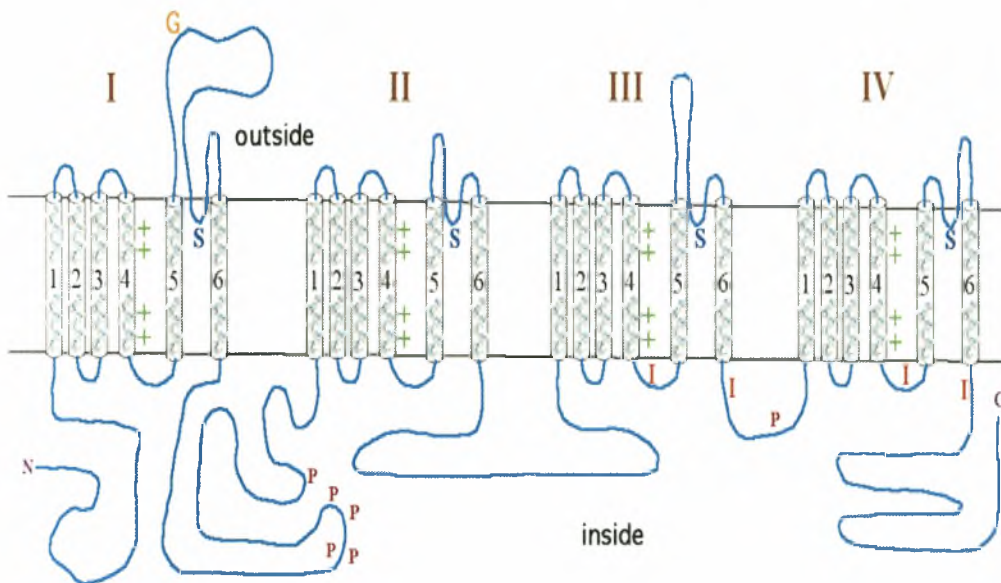
Σημειακές μεταλλάξεις στη μοριακή δομή των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών μεταφοράς ιόντων νατρίου μειώνουν τη συνάφεια των πυρεθροειδών εντομοκτόνων με αποτέλεσμα τη μείωση της ευαισθησίας των εντόμων (knock down resistance, *kdr*) (Miyazaki *et al.* 1996). Οι μεταλλαγές αυτές είναι εξαιρετικά συντηρημένες και προσδίδουν υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα που στοχεύουν το συγκεκριμένο κανάλι ιόντων (Ffrench-Constant *et al.* 1998). Σε ορισμένα είδη έχει ταυτοποιηθεί και μια δεύτερη μετάλλαξη στο πρωτεϊνικό κανάλι μεταφοράς ιόντων Na^+ , που προσδίδει ανθεκτικότητα στα παραπάνω εντομοκτόνα (super knock down resistance *super-kdr*) (Williamson *et al.* 1996).

Τασεοεξαρτώμενο κανάλι νατρίου

Τα πυρεθροειδή εντομοκτόνα δρουν στο τασεοεξαρτώμενο κανάλι νατρίου. Το κανάλι νατρίου είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη, η οποία βρίσκεται στις μεμβράνες των νευρικών κυττάρων και έχει τη μορφή πόρου, (ενός υδρόφιλου πόρου μέσα στην υδρόφοβη διπλοστιβάδα) και βοηθάει στη διατήρηση και τον έλεγχο του δυναμικού μέσω της πλασματικής μεμβράνης των ζωντανών κυττάρων επιτρέποντας την ροή των ιόντων. Η ενεργοποίηση των καναλιών ιόντων γενικά προκαλείται από μια αλλαγή στη διαμόρφωση, που επιφέρει το δυναμικό και η οποία ανοίγει τον διαμεμβρανικό πόρο. Κατα συνέπεια το κανάλι περιέχει ένα

δομικό στοιχείο το οποίο λειτουργεί ως αισθητήρας δυναμικού και εξαιτίας της εκπόλωσης αλλάζει τη δομή του ή τη θέση του στη μεμβράνη. Αποτελείται από μια α -υπομονάδα, η οποία έχει 4 επαναλαμβανόμενες περιοχές-δομές I-IV, η κάθε μια από τις οποίες έχει 6 διαμεμβρανικά τμήματα S1-S6 τα οποία διαπερνούν τη μεμβράνη με την μορφή α -έλικας. Το S4 τμήμα και των 4 δομών είναι συντηρημένο και δρα σαν αισθητήρας του δυναμικού. Το τμήμα αυτό περιέχει ένα επαναλαμβανόμενο μοτίβο ενός θετικά φορτισμένου αμινοξέος και δύο υδρόφοβων αμινοξέων.

Το τασεοεξαρτώμενο κανάλι νατρίου μπορεί να εμφανιστεί σε 3 διαφορετικές καταστάσεις: κατάσταση ηρεμίας (κλειστό), ενεργοποιημένο (ανοιχτό), απενεργοποιημένο (κλειστό). Μόνο στην ενεργοποιημένη κατάσταση το κανάλι διαπερνάται από τα ιόντα. Στην απενεργοποιημένη και στην κατάσταση ηρεμίας παραμένει κλειστό. Για μια εκ νέου διάνοιξη το κανάλι πρέπει να επανέλθει από την ενεργοποιημένη στην κατάσταση ηρεμίας. Ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο η εκπόλωση οδηγεί στην κίνηση του αισθητήρα του δυναμικού δεν είναι ακόμη γνωστός. Μετα την ενεργοποίηση και το άνοιγμα, το κανάλι απενεργοποιείται. Στην απενεργοποίηση των καναλιών νατρίου εμπλέκεται η N-τελική περιοχή, η οποία είναι αυτο-ανασταλτική. Η N-τελική περιοχή, η οποία παίρνει τη μορφή σφαίρας, συνδέεται με το κανάλι μέσω μιας ευέλικτης αλυσίδας 200 αμινοξέων. Κατά την απενεργοποίηση η "σφαιρική" πλέον N-τελική περιοχή ευθυγραμμίζεται στην είσοδο του πόρου και τον κλείνει. Για να ανοίξει εκ νέου το κανάλι πρέπει να μεταβεί από την απενεργοποιημένη στην κατάσταση ηρεμίας, διαδικασία που περιλαμβάνει αλλαγή της στερεοδιαμόρφωσης του.



Εικόνα 4: Δομή της κύριας α -υπομονάδας ενός τασεο-εξαρτώμενου καναλιού ιόντων Na^+ .

Μέθοδοι παρακολούθησης ανθεκτικότητας

Για την σωστή και αποτελεσματική αντιμετώπιση της ανθεκτικότητας είναι απαραίτητο να χρησιμοποιηθούν οι κατάλληλες μέθοδοι ώστε να υπάρξει γρήγορη και άμεση διάγνωση στους πληθυσμούς που απαιτείται. Για το σκοπό αυτό έχουν αναπτυχθεί διάφορες μέθοδοι. Οι κυριότερες κατατάσσονται σε 3 κατηγορίες : τις κλασσικές βιοδοκιμές, τις βιοχημικές και τις μοριακές μεθόδους.

Βιοδοκιμές

Η μέθοδος των βιοδοκιμών είναι η πιο διαδεδομένη και περιλαμβάνει βιοδοκιμές με διαφορετικές δόσεις του εντομοκτόνου που εξετάζεται κάθε φορά. Οι βιοδοκιμές μπορεί να γίνουν με: τοπική εφαρμογή, ακριβή ψεκασμό πρότυπων διαλυμάτων, έκθεση των ουσιών σε φιλμ, χαρτί ή γυαλί και εμβάπτιση του εντόμου. Η επιλογή της μεθόδου εξαρτάται κυρίως από το είδος και το μέγεθος του εντόμου. Σε όλες τις περιπτώσεις, οι πληθυσμοί των εντόμων δέχονται τις δόσεις των εντομοκτόνων και στη συνέχεια υπολογίζεται το LD₅₀ ώστε να διαπιστωθεί η ανθεκτικότητα και σε συγκεκριμένη δόση. Η μέθοδος αυτή είναι αποτελεσματική και αποκαλύπτει αν ο πληθυσμός που εξετάζεται είναι ανθεκτικός. Παρόλα αυτά είναι μια χρονοβόρα διαδικασία και δεν είναι ικανή να δώσει περισσότερες πληροφορίες σχετικά με το μηχανισμό ανθεκτικότητας.

Βιοχημικές

Οι βιοχημικές μέθοδοι χρησιμοποιούν κυρίως φασματομέτρο ή φθορισμόμετρο για τη διαπίστωση μορφών ανθεκτικότητας που έχουν σχέση με κινητικότητα, υπερπαραγωγή ή τροποποίηση ενζύμων. Τέτοιου είδους μηχανισμοί ανθεκτικότητας είναι η τροποποιημένη ακετυλοχολινεστεράση (MACE), η αυξημένη παραγωγή εστερασών, ο οξειδωτικός μεταβολισμός από το κυτόχρωμα P₄₅₀ της μονοοξυγενάσης και η αυξημένη δραστηριότητα του ενζύμου γλουταθειόνη-τρανσφεράση. Οι μέθοδοι αυτές είναι γρήγορες και αποτελεσματικές.

Μοριακές

Οι μοριακές μέθοδοι παρακολούθησης της ανθεκτικότητας είναι αυτές που χρησιμοποιούνται κατά κύριο λόγο αφού έχουν το πλεονέκτημα της ακρίβειας των αποτελεσμάτων τους. Με αυτές τις

τεχνικές ανιχνεύονται σημειακές μεταλλάξεις που σχετίζονται με τους μηχανισμούς αλλαγής του στόχου δράσης των εντομοκτόνων. Συγκεκριμένα οι μηχανισμοί αλλαγής στόχου μπορούν να προσδιοριστούν με τη χρήση PCR σε συνδυασμό με συγκεκριμένους μοριακούς δείκτες (π.χ. Field & Devonshire 1996, Steichen et al. 1994).

Υπάρχουν διάφορες μεθοδολογίες που χρησιμοποιούν τους μοριακούς δείκτες και που συνεχώς εξελίσσονται και μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην παρακολούθηση της ανθεκτικότητας. Μερικές από τις πιο σημαντικές είναι οι εξής:

α) Αλλοένζυμα

Πρόκειται για πρωτεΐνες που παράγονται από το DNA και μπορεί να ποικίλουν εξαιτίας του πολυμορφισμού που παρουσιάζεται στο θεμελιώδες DNA.

β) Πολυμορφισμός μεγέθους περιοριστικών τμημάτων DNA (*Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP*)

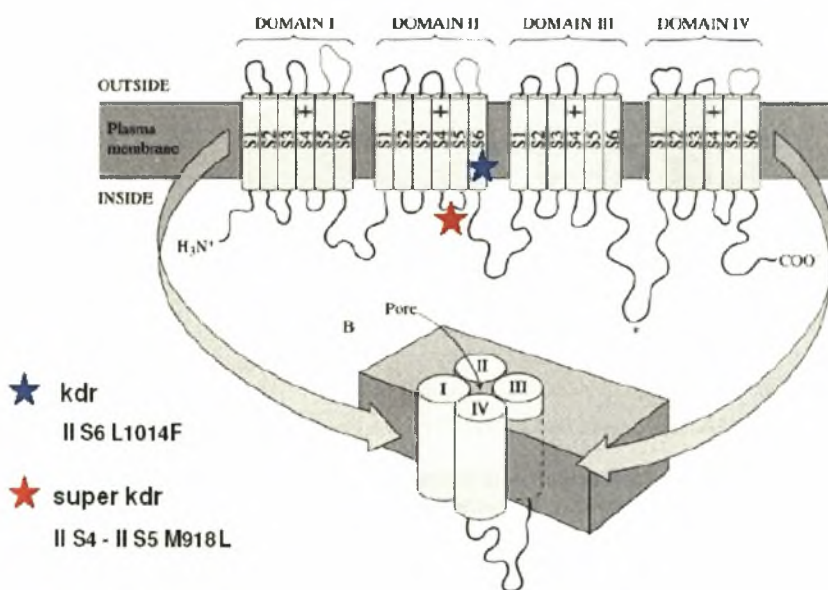
Η μεθοδολογία του πολυμορφισμού μεγέθους περιοριστικών τμημάτων DNA (RFLP) βασίζεται σε δύο τεχνικές, στην πέψη του DNA από ένζυμα περιορισμού και στην ηλεκτροφόρησή του σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου ή αγαροζης.

γ) Πολυμορφισμός μήκους ενισχυμένων τμημάτων (*Amplified Fragment Length Polymorphism, AFLP*)

Η μεθοδολογία AFLP βασίζεται στην επιλεκτική ενίσχυση μιας υποομάδας τμημάτων που έχουν παραχθεί μετά τη πέψη του γονιδιωματικού DNA με ένζυμα περιορισμού από ένα πολυσύνθετο σύνολο τμημάτων DNA του γονιδιώματος.

Σκοπός της εργασίας

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η ανίχνευση δύο μεταλλάξεων που εντοπίζονται στο τάσεοεξαρτώμενο κανάλι νατρίου των μεμβρανών, των νευρικών κυττάρων της αφίδας *Aphis gossypii* και προσδίδουν ανθεκτικότητα στα πυρεθροειδή εντομοκτόνα. Πρόκειται για τις εξής σημειακές μεταλλάξεις: α) την M918L μετάλλαξη, που αφορά τη μετατροπή του αμινοξέος μεθειονίνη σε λευκίνη και εντοπίζεται στην ενδοκυτταρική θηλιά της πρωτεΐνης, μεταξύ της S4-S5 διαμεμβρανικής περιοχής και καλείται *super-kdr*, και β) την L1014F μετάλλαξη που αφορά τη μετατροπή του αμινοξέος λευκίνη σε φαινυλαλανίνη, βρίσκεται στην S6 διαμεμβρανική περιοχή της πρωτεΐνης και είναι γνωστή με την ονομασία *kdr*.



Εικόνα 5: Το τάσεοεξαρτώμενο κανάλι Na⁺. Σημειώνονται οι μεταλλάξεις *super-kdr* και *kdr*.

Υλικά και μέθοδοι

Δείγματα

Για την παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν έντομα από δύο φυσικούς πληθυσμούς της Ελλάδας. Συνολικά μελετήθηκαν 92 δείγματα από άτομα *Aphis gossypii*, τα οποία συλλέχθηκαν από τις τοποθεσίες Μελιά Λάρισας και Αλεξάνδρεια Ημαθίας, το καλοκαίρι του 2008 (Ιούλιος, Αύγουστος).

Για την ανίχνευση της μετάλλαξης στην περιοχή της ενδοκυτταρικής θηλιάς μεταξύ IIS4-IIS5 χρησιμοποιήθηκε DNA από 92 άτομα ενώ για την ανίχνευση της μετάλλαξης της διαμεμβρανικής περιοχής IIS6 χρησιμοποιήθηκε DNA από 8 άτομα.

Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από ενήλικες αφίδες από ένα άτομο

Για κάθε απομόνωση χρησιμοποιείται ένα άτομο *A.gossypii* και ακολουθούνται οι εξής πειραματικές διαδικασίες :

1. Ομογενοποιούμε σε σωλήνα eppendorf με 50μl απεσταγμένο νερό και 5% (0,0027gr) Chelex 100 (Bio-Rad) ένα άτομο *A. gossypii*.
2. Αναδεύουμε έντονα (vortex) για 5-10 sec.
3. Επωάζουμε στους 56°C για 35 min.
4. Στην συνέχεια επωάζουμε στους 95°C για 15 min.
5. Αναδεύουμε έντονα (vortex) για 5-10 sec.
6. Φυγοκεντρούμε στις 12.000rpm για 3min στους 4°C.

7. Μεταφέρουμε προσεκτικά το υπερκείμενο σε νέο σωλήνα eppendorf.
8. Αποθηκεύουμε το απομονωμένο DNA στους 4°C για άμεση χρήση ή στους -20°C για μελλοντική χρήση.

Στη συγκεκριμένη διαδικασία απομόνωσης χρησιμοποιούνται δύο διαφορετικές θερμοκρασίες. Η πρώτη επώαση γίνεται σε θερμοκρασία 56°C με σκοπό να γίνει η ομοιοπολική σύνδεση των ιόντων ρητίνης με τα ιόντα μετάλλων ενώ η δεύτερη επώαση γίνεται σε θερμοκρασία 95°C με σκοπό την αποδιάταξη του DNA.

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Για την ενίσχυση των δυο τμημάτων DNA πραγματοποιήθηκε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης. Για την ενίσχυση του τμήματος της ενδοκυτταρικής θηλιάς μεταξύ IIS4-IIS5 χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές AGSKDRF/AGSKDRR ενώ για την ενίσχυση της διαμεμβρανικής περιοχής IIS6 χρησιμοποιήθηκαν οι AGSKDRF/AGKDRR2(πίνακας 1).

Πίνακας 1. Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν.

Εκκινητής	Αλληλουχία
AGSKDRF Forward	5'-TCT TGG CCC ACA CTT AAT CTT T-3'
AGSKDRR Reverse	5'-GGA AGC TCG TGG TCT TTG AA-3'
AGSKDRF Forward	5'-TCT TGG CCC ACA CTT AAT CTT T-3'
AGKDRR2 Reverse	5'-TGT TGG TTT CGT TGT CAG-3'

Η σύσταση των διαλυμάτων των αντιδράσεων που πραγματοποιήθηκαν περιγράφεται παρακάτω:

A) Για την ενίσχυση της ενδοκυτταρικής θηλιάς μεταξύ IIS4-IIS5 χρησιμοποιήθηκαν τα εξής:

Εκμαγείο DNA	2,5μl
dNTPs(10mM each)	2μl
MgCl ₂ (50mM)	0,75μl
Buffer 10x	2,5μl
Εκκινητής	0,3μl
Fw50pmol/μl	
Εκκινητής	0,3μl
Rv50pmol/μl	
Taq Polymerase	0.2μl
5 U/μl	
ddH ₂ O	16,45μl

Συνολικός όγκος 25μl

Β) Για την ενίσχυση της IIS6 χρησιμοποιήθηκαν τα εξής:

Εκμαγείο DNA	2,5μl
dNTPs(10mM each)	2μl
MgCl ₂ (50mM)	1μl
Buffer 10x	2,5μl
Εκκινητής	0,3μl
Fw50pmol/μl	
Εκκινητής	0,3μl
Rv50pmol/μl	
Taq Polymerase	0.2μl
5 U/μl	
ddH ₂ O	16,2μl

Συνολικός όγκος 25μl

Οι συνθήκες ενίσχυσης της ενδοκυτταρικής θηλιάς μεταξύ IIS4-IIS5 ήταν οι εξής:

Αρχική αποδιάταξη : 95° C για 2 min

Αποδιάταξη: 94° C για 30 sec

Συγκόλληση εκκινητών : 55° C για 30 sec

Επιμήκυνση: 72° C για 45 sec

Τελική επιμήκυνση: 72° C για 10 min

} 30 κύκλοι

Οι συνθήκες ενίσχυσης της IIS6 ήταν οι εξής:

Αρχική αποδιάταξη : 94 ° C για 2 min

Αποδιάταξη: 94 ° C για 30 sec

Συγκόλληση εκκινητών: 50 ° C για 30 sec

Επιμήκυνση: 72 ° C για 45 sec

} 35 κύκλοι

Τελική επιμήκυνση: 72 ° C για 10 min

Τα προϊόντα PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης.

Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό τμημάτων DNA ανάλογα με το μέγεθος τους. Το μέγεθος των τμημάτων εκτιμάται με βάση κάποιο μάρτυρα μοριακών μεγεθών τμημάτων DNA. Τα διαλύματα που χρησιμοποιούνται για την τεχνική αυτή είναι τα εξής:

TAE 50x (500ml)

Tris Base 121gr

Acetic Acid 28,5ml

EDTA 0,5M 50ml

ddH₂O έως τα 500ml

Loading buffer 6x (10ml)

Bromophenol blue 1% w/v 1ml

TBE 20x 0,5ml

Glycerol 5ml

ddH₂O έως τα 10ml

Αρχικά παρασκευάζουμε διάλυμα TAE 1x αραιώνοντας το διάλυμα stock 50x (20ml σε τελικό όγκο 1lt). Για την προετοιμασία της πηκτής διαλύουμε 0,6gr αγαρόζης σε 30ml TAE 1x (τελική συγκέντρωση 2% w/v) με θέρμανση και προσθέτουμε 3ml βρωμιούχου αιθιδίου (10mg/ml). Η συγκέντρωση της πηκτής αγαρόζης διαφοροποιείται ανάλογα με το μέγεθος των τμημάτων DNA που πρέπει να διαχωριστούν. Το βρωμιούχο αιθίδιο προστίθεται για να είναι εμφανείς οι ζώνες του DNA κατά την παρατήρηση της πηκτής σε λάμπα υπεριώδους φωτός. Η πηκτική τοποθετείται σε ειδικό καλούπι όπου και πολυμερίζεται.

Για την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων απαιτείται η προσθήκη loading buffer σε αυτά. Σε 5μl PCR προϊόντος προστίθενται 3μl loading buffer. Μαζί με τα δείγματα ηλεκτροφορείται και ένας μάρτυρας μεγέθους τμημάτων DNA. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται στα 100 volts και ακολουθεί παρατήρηση της πηκτής σε λάμπα υπεριώδους φωτός.

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζης πραγματοποιείται για την ποσοτικοποίηση και τον έλεγχο της ποιότητας των PCR προϊόντων που χρησιμοποιούνται σε περαιτέρω πειράματα για την ανάλυση των πολυμορφισμών.

Ανάλυση RFLP (Πολυμορφισμός Μεγέθους Περιοριστικών τμημάτων DNA)

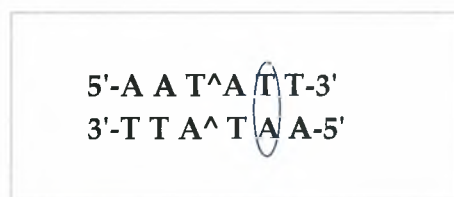
Μια μέθοδος που χρησιμοποιείται ευρέως για τις ανάγκες της πληθυσμιακής γενετικής, βασίζεται στη χρήση δεικτών RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism- Πολυμορφισμός Μεγέθους Περιοριστικών Τμημάτων). Πρόκειται για πολυμορφισμούς οι οποίοι δημιουργούνται από τις τυχαίες νουκλεοτιδικές αλλαγές που μπορεί να συμβούν σε μια περιοχή του DNA, με αποτέλεσμα την καταστροφή της θέσης αναγνώρισης μιας συγκεκριμένης ενδονουκλεάσης περιορισμού.

Επομένως μόνο δυο αλληλόμορφα υπάρχουν για τους δείκτες αυτού του τύπου, παρουσία ή απουσία της θέσης αναγνώρισης. Τα RFLPs κληρονομούνται ως συνυπερέχοντες Μεντελικοί δείκτες, γεγονός πολύ σημαντικό εφ' όσον υπάρχει η δυνατότητα διάκρισης των ομοζυγωτικών από τα ετεροζυγωτικά άτομα. Είναι επίσης άφθονα στο γονιδίωμα των περισσότερων ευκαρυωτικών οργανισμών. Ένα όμως μειονέκτημα αυτής της ομάδας των γενετικών δεικτών είναι ότι μόνο ένα μικρό μέρος του συνολικού γονιδιώματος μπορεί να εξεταστεί ταυτόχρονα, ενώ η απαίτηση για μεγάλη ποσότητα DNA την καθιστά δύσχρηστη σε πληθυσμιακές μελέτες. Για την ανίχνευση των πολυμορφισμών που προκύπτουν μετά από πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες υπάρχουν δυο εναλλακτικές μέθοδοι : η ανάλυση κατά Southern και η διαδικασία της PCR. Σκοπός και των δυο μεθόδων είναι να διακριθεί το συγκεκριμένο τμήμα στο οποίο υπάρχει αλλαγή στη θέση αναγνώρισης του ενζύμου μεταξύ του συνόλου των τμημάτων που προκύπτουν μετά από μια τέτοια πέψη. Σύμφωνα λοιπόν με την πρώτη μέθοδο, η ανάλυση κατά Southern των τμημάτων χρησιμοποιώντας ως ανιχνευτή μια αλληλουχία που να περιλαμβάνει τη συγκεκριμένη αλληλουχία αναγνώρισης του ενζύμου περιορισμού, επιτρέπει το διαχωρισμό των ατόμων στα οποία υπάρχει η θέση αναγνώρισης του ενζύμου από εκείνα στα οποία λόγω κάποιας μετάλλαξης δεν υπάρχει πια. Τα τελευταία χρόνια έχει αναπτυχθεί μια νέα μέθοδος για την ανίχνευση RFLP δεικτών, η οποία βασίζεται στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) (Karl and Avise, 1993). Σε αυτήν την περίπτωση σχεδιάζονται εκκινητές για τις αλληλουχίες που περιβάλλουν τη θέση αναγνώρισης του ενζύμου και το προϊόν της PCR πέπτεται με τη συγκεκριμένη ενδονουκλεάση περιορισμού. Μετά από ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της πέψης σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, το άτομο στο οποίο η θέση αναγνώρισης δεν υπάρχει εμφανίζει άθικτο το ενισχυόμενο από την PCR τμήμα. Με τη μέθοδο αυτή

εξασθενούν πολλά από τα αρχικά μειονεκτήματα διευκολύνοντας τη χρησιμοποίησή των RFLPs στην πληθυσμιακή ανάλυση. Στην ηλεκτροφόρηση πήκτωμάτων, τα ενισχυμένα δείγματα DNA φορτώνονται σε ένα πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου όπου ηλεκτρικό ρεύμα περνά μέσα από αυτό. Καθώς το DNA έχει αρνητικό φορτίο, θα μεταναστεύσει προς το θετικά φορτισμένο πόλο της συσκευής σύμφωνα με το διαφορετικό μέγεθος των τεμαχίων. Το DNA έτσι θα χωριστεί σε μεμονωμένες ζώνες, με το κάθε ένα τμήμα να φαίνεται σταδιακά ξεκινώντας από αυτό που έχει το μικρότερο μέγεθος. Οι ζώνες DNA που προκύπτουν οπτικοποιούνται μετά από χρώση με νιτρικό άργυρο. Γενικά πρόκειται για μια απλή και αξιόπιστη μέθοδο με υψηλή επαναληψιμότητα.

Διαδικασία

Για την ανίχνευση της μετάλλαξης που εντοπίζεται στην ενδοκυτταρική θηλιά IIS4-IIS5 χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος RFLPs σε συνδυασμό με τη μέθοδο της PCR. Το ένζυμο SspI αναγνωρίζει μια αλληλουχία 6 βάσεων και κόβει μεταξύ 3ης και 4ης βάσης (εικόνα 4). Το ένζυμο πέπτει την αλληλουχία μόνο όταν έχει πραγματοποιηθεί η σημειακή μετάλλαξη που αλλάζει το νουκλεοτίδιο της αδενίνης σε θυμίνη (εικόνα 6, σημειωμένος κύκλος).



Εικόνα 6: Οι 6 βάσεις που αναγνωρίζει το ένζυμο περιορισμού SspI και πέπτει μεταξύ 3ης και 4ης βάσης.

Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν:

3,9 μl ddH₂O

1 μl buffer ενζύμου

0,1μl SspI

5 μl PCR

Τα δείγματα επωάζονται για 4 ώρες στους 37°C.

Παρασκευή πηκτής πολυακρυλαμιδίου

Για την παρασκευή των πηκτών πολυακρυλαμίδης χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα διαλύματα :

Διάλυμα ακρυλαμίδης 30% (100ml)

Ακρυλαμίδα 29gr

Bis-acrylamide 1gr

Διήθηση

ddH₂O έως τα 100ml

Το διάλυμα διατηρείται στους 4° C.

TBE 20x (1lt)

Tris Base 121gr

Boric acid 61.7gr

EDTA 80ml 0.5M pH=8

ddH₂O έως τα 1lt

APS 20% w/v

TEMED

Για την παρασκευή πηκτής πολυακρυλαμίδης 10% χρησιμοποιήθηκαν:

30 ml ddH₂O

11,2 gr ουρίας

23,27 ml μητρικού διαλύτος πολ/μίδης

4,62 ml TBE 20X

Το διάλυμα διηθείται και συμπληρώνεται με ddH₂O έως τα 70ml. Για να αρχίσει ο πολυμερισμός της ακρυλαμίδης, στο παραπάνω διάλυμα προσθέτουμε :

93,24 μl TEMED

560 μl διαλύματος APS 20%

Αμέσως μετά το διάλυμα χύνεται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και τοποθετείται η χτένα δημιουργίας πηγαδιών.

Τα δείγματα μετά τη πέψη με το ένζυμο περιορισμού φορτώνονται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης μαζί με κάποιο μάρτυρα μοριακών μεγεθών τμημάτων DNA, με βάση τον οποίο εκτιμάται το μέγεθος των τμημάτων. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται στα 220 volts και διαρκεί περίπου δύο ώρες και τριάντα λεπτά.

Χρώση των πηκτών πολυακρυλαμιδίου με νιτρικό άργυρο (Silver Staining)

Για την εμφάνιση των αποτελεσμάτων της ηλεκτροφόρησης γίνεται χρώση των πηκτών με νιτρικό άργυρο. Η τεχνική αυτή βασίζεται στο γεγονός ότι ο άργυρος συνδέεται στο DNA και στη συνέχεια αντιδρά με την φορμαλδεΐδη, παρουσία βάσης. Οι ζωνώσεις του DNA εμφανίζονται με καφέ χρώμα σε κίτρινο φόντο.

Για τη χρώση χρησιμοποιούνται τα εξής διαλύματα :

Διάλυμα 1 (400ml)

EtOH 8ml

Acetic Acid 0,5ml

ddH₂O ως τα 400ml

Διάλυμα 2 (200ml)

Διάλυμα AgNO₃ 1gr/lit

Διάλυμα 3 (200ml)

NaOH 3gr

NaBH₄ 0,01gr

Formaldehyde HCHO 1ml

ddH₂O έως τα 200ml

Διαδικασία χρώσης της πηκτής

Στο πρώτο στάδιο της χρώσης, οι πηκτές εμβαπτίζονται σε 200ml του διαλύματος 1 και αναδεύονται για 5 min. Το διάλυμα 1 απομακρύνεται και η διαδικασία επαναλαμβάνεται. Ακολουθεί πλύση των πηκτών με απεσταγμένο νερό για 1min. Στο δεύτερο στάδιο προστίθεται το διάλυμα AgNO₃ και οι πηκτές αναδεύονται για 15min. Στη συνέχεια

πραγματοποιούνται 2 πλύσεις με απεσταγμένο νερό, διάρκειας 2min η κάθε μια. Στο τρίτο και τελευταίο στάδιο προστίθεται το διάλυμα 3 και πραγματοποιείται ανάδευση για 15-20min μέχρι δηλαδή την εμφάνιση ορατών ζωνών στις πηκτές.

Αλληλούχηση DNA

Για την ανάλυση της περιοχής IIS6 πραγματοποιείται αλληλούχηση του DNA. Τα προϊόντα PCR καθαρίζονται και στέλνονται σε μια εταιρεία (MACROGEN) για να πραγματοποιηθεί η αλληλούχηση. Για το σκοπό αυτό στάλθηκαν δείγματα από 8 διαφορετικά άτομα αφίδας.

Καθαρισμός PCR προϊόντων

1. Σε κάθε σωλήνα erpendorf τοποθετούμε: 15μl PCR προιον ,15μl 5M NH₄OAC (διατηρείται στους 18°C) και 75% αιθανόλη (διατηρείται στους 18°C). Αναδεύουμε έντονα και τα αφήνουμε για 10 min στους 18°C.
2. Φυγοκεντρούμε για 10 min στους 18°C
3. Αδειάζουμε το υγρό και αφήνουμε το ίζημα το οποίο μπορεί να μην φαίνεται καθαρά. Απλά αδειάζουμε το υγρό. Προσθέτουμε σε κάθε erpendorf 150 μl 75% αιθανόλη (διατηρείται στους 4°C). Φυγοκεντρούμε για 5 min στους 18°C.
4. Αδειάζουμε το υγρό και αφήνουμε το ίζημα. Τυλίγουμε με αλουμινόχαρτο τα δείγματα και τα αφήνουμε για 5 min. Προσθέτουμε 15 μl DPC water (απεσταγμένο νερό) και τα τοποθετούμε στη συντήρηση για 5 min.
5. Στην συνέχεια το PCR προιον ελέγχεται ποσοτικά με φωτομέτρηση. Η φωτομέτρηση πραγματοποιείται μετά από αραιώση 1μl δείγματος απομονωμένου DNA σε 49μl ddH₂O.

6. Τα δείγματα τοποθετούνται σε eppendorf των 500μl. Σε κάθε ένα τοποθετούνται: 14 μl καθαρισμένο PCR προιον, 56 μl DPC water, 140μl 100% αιθανόλη (διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου). Ακολουθεί έντονη ανάδευση και τα δείγματα παραμένουν σε θερμοκρασία δωματίου για 15min.
7. Φυγοκεντρούμε τα δείγματα στις 13.000 στροφές για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου.
8. Αφαιρούμε από τα δείγματα το υπερκείμενο και προσθέτουμε 150μl 75% αιθανόλη.
9. Φυγοκεντρούμε στις 13.000 στροφές για 5 min.
10. Αφαιρούμε την αιθανόλη και αφήνουμε τα δείγματα να στεγνώσουν για 5min. ΠΡΟΣΟΧΗ τα δείγματα μετα το τέλος της διαδικασίας θα πρέπει να είναι εντελώς στεγνά.

Στην συνέχεια τα δείγματα στέλνονται στην εταιρεία για την πραγματοποίηση της αλληλούχησης.

Αποτελέσματα

Στην παρούσα εργασία εφαρμόστηκε η μέθοδος PCR-RFLP για την μελέτη της ύπαρξης της μετάλλαξης M918L στο τμήμα της ενδοκυτταρικής θηλιάς IIS4-IIS5 ενώ για την μελέτη της μετάλλαξης L1014F στην διαμεμβρανική περιοχή IIS6 ακολουθήθηκε η διαδικασία της αλληλούχησης του DNA.

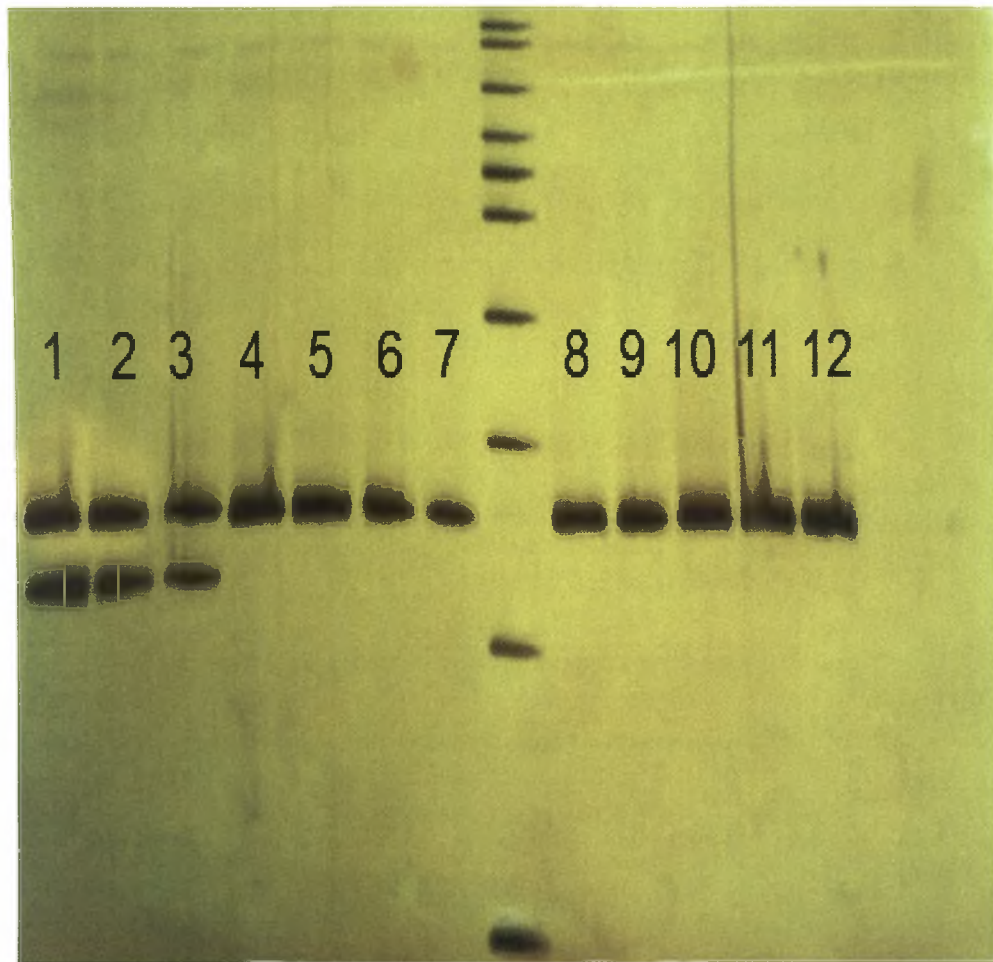
Στην πρώτη φάση της ανάλυσης τα τμήματα ενισχύθηκαν με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης. Έπειτα, αναλύθηκαν τα προϊόντα του πρώτου τμήματος με την μέθοδο RFLP ενώ τα προϊόντα του δεύτερου τμήματος, μετά από τον απαραίτητο καθαρισμό, στάλθηκαν για αλληλούχηση.

Για την ανίχνευση της μετάλλαξης M918L αρχικά απομονώθηκε γενωμικό DNA από τα έντομα *Aphis gossypii*. Με τη διαδικασία της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης και με εκκινητές που σχεδιάστηκαν κατάλληλα προέκυψε ένα τμήμα των 250 bp περίπου. Το προϊόν μετά την αντίδραση πολυμεράσης επώαστηκε με το περιοριστικό ένζυμο SspI. Η μετάλλαξη M918L δημιουργεί μια θέση αναγνώρισης του περιοριστικού ενζύμου, το οποίο πέπτει το ενισχυμένο τμήμα DNA σε δύο μικρότερα κομμάτια, το πρώτο 230bp και το δεύτερο 20bp. Η εφαρμογή της μεθόδου PCR-RFLP για την μελέτη της μετάλλαξης M918L εμφάνισε 2 διαφορετικούς γενότυπους. Κατα τη διαδικασία της ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου στα 34 δείγματα εντοπίστηκε 1 ζώνη, η οποία αντιστοιχεί σε ένα τμήμα DNA των 250bp. Η παρουσία ενός μόνο τμήματος 250bp φανερώνει ότι δεν υπάρχει θέση κοπής του περιοριστικού ενζύμου SspI και επομένως δεν υπάρχει η *super-kdr* μετάλλαξη. Αντίθετα στα 58 δείγματα από αυτά που εξετάστηκαν εντοπίστηκαν 2 ζώνες στο πήκτωμα, η πρώτη των 250bp περίπου ενώ η δεύτερη 230bp περίπου. Το αποτέλεσμα αυτό υποδηλώνει ότι στο ένα αλληλόμορφο δεν υπάρχει η θέση κοπής (250bp). Στο άλλο αλληλόμορφο όμως υπάρχει η θέση κοπής καθώς προκύπτει ένα μικρότερο σε μέγεθος τμήμα (230bp). Υπάρχει ένα

επιπλέον κομμάτι 20bp το οποίο είναι πολύ μικρό σε μέγεθος και δεν εμφανίζεται στο gel. Επομένως τα δείγματα αυτά είναι ετερόζυγα ως προς την *super-kdr* μετάλλαξη και παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα.

ΠΙΝΑΚΑΣ 2: Γενοτυπικές συχνότητες που αφορούν την *super-kdr* μετάλλαξη

Περιοχή	Σύνολο δειγμάτων αφίδας	Αριθμός SS	%SS	Αριθμός SR	%SR
Μελιά Λάρισας	30	18	60	12	40
Αλεξάνδρεια Ημαθείας	62	16	26	46	74
Σύνολο	92	34	37	58	63



Εικόνα 7: Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης 12 δειγμάτων *Aphis gossypii* . Από την εικόνα παρατηρείται ότι τα δείγματα 1-3 είναι ετεροζυγωτικά ως προς την μετάλλαξη M918L καθώς υπάρχουν 2 ζώνες ενώ τα δείγματα 4-12 είναι ομοζυγωτικά ως προς το φυσιολογικό αλληλόμορφο.

Για την ανίχνευση της L1041F μετάλλαξης απομονώθηκε το DNA από τα έντομα και στην συνέχεια ενισχύθηκε με τους κατάλληλους εκίνητες με αποτέλεσμα να προκύψει ένα τμήμα 450bp. Το προϊόν PCR καθαρίστηκε κατάλληλα με σκοπό να αλληλουχηθεί. Από τα αποτελέσματα της αλληλούχησης των 8 δειγμάτων αφίδας που στάλθηκαν κανένα δεν εμφάνισε την υπό μελέτη μετάλλαξη.

```

1 TCT TGG CCC ACA CTT AAT CTT TTAATA TCAATA ATG GGT CGA ACC 45
1 S W P T L N L L I S I M G R T 15

46 ATT GGT GCT TTG GGT AAC CTA ACG TTT GTG TTG TGC ATA ATC ATA 90
16 I G A L G N L T F V L C I I I 30

91 TTT ATA TTC GCC GTT ATG GGT ATG CAG TTA TTT GGA AAA AAC TAC 135
31 F I F A V M G M Q L F G K N Y 45

136 ACA GAA AAA ATG TAC TTA TTC AAA GAC CAC GAG CTT CCC CGG TGG 180
46 T E K M Y L F K D H E L P R W 60

181 AAC TTC ACC GAT TTT TTG CAC TCG TTT ATG ATA GTA TTT CGA GTA 225
61 N F T D F L H S F M I V F R V 75

226 TTA TGT GGT GAA TGG ATT GAA TCA ATG TGG GAC TGC TTA CAC GTC 270
76 L C G E W I E S M W D C L H V 90

271 GGA GAA CCA ACG TGT ATA CCA TTC TTC TTG GCT ACT GTT GTC ATC 315
91 G E P T C I P F F L A T V V I 105

316 GGT AAC CTT GTG GTA TGT 333
108 G N L V V C 111

```

Εικόνα 8: Η αλληλουχία της περιοχής IIS4,IIS5,IIS6 με σημειωμένες τις περιοχές των μεταλλάξεων.

Συζήτηση

Η αφίδα του βάμβακος *Aphis gossypii* κατατάσσεται στην κατηγορία των εντόμων με υψηλή οικονομική σημασία, κυρίως στην νότια Ευρώπη. Στην Ελλάδα, αποτελεί σημαντικότατο εχθρό του βαμβακιού καθώς επίσης και διάφορων κηπευτικών και καλλωπιστικών φυτών. Στο βαμβάκι μπορεί να προκαλέσει σοβαρές ζημιές και να μειώσει την παραγωγή και την ποιότητα της παραγόμενης ίνας. Το έτος 2003 6,5 τόνοι εντομοκτόνου χρησιμοποιήθηκαν για την καταπολέμηση της αφίδας στο βαμβάκι (Bayer CropScience Hellas, pers. Comm) αποδεικνύοντας την αλόγιστη χρήση των εντομοκτόνων που έχει οδηγήσει στην εμφάνιση ανθεκτικών ατόμων.

Η ανθεκτικότητα των αφίδων συγκεκριμένα στα πυρεθροειδή εντομοκτόνα σχετίζεται με πολλαπλές σημειακές μεταλλάξεις που πραγματοποιούνται στο γονίδιο που κωδικοποιεί το κανάλι μεταφοράς ιόντων νατρίου. Συγκεκριμένα οι μεταλλάξεις εντοπίζονται στις IIS5 και IIS6 διαμεμβρανικές περιοχές και στην ενδοκυτταρική θηλιά IIS4-IIS5. Είναι γνωστές αρκετές σημειακές μεταλλάξεις του συγκεκριμένου γονιδίου που σχετίζονται με τα πυρεθροειδή και πολλές από αυτές είναι συντηρημένες καθώς εμφανίζονται και σε άλλα είδη εντόμων (Davies et al. 2008) Οι δύο περιοχές του καναλιού νατρίου IIS4-IIS5 και IIS6 είναι αρκετά συντηρημένες και ταυτόχρονα συντηρημένες είναι και οι θέσεις των εξεταζόμενων μεταλλάξεων M918 και L1014 σε μια πληθώρα εντόμων (Martinez-Torres,1997). Για παράδειγμα στη μελέτη των Martinez-Torres αναφέρεται ότι στις αφίδες *M. persicae*, *A. gossypii* και *P. humuli* η ομοιότητα στη πρωτεΐνη αγγίζει το 99% . Αλλά και σε άλλα έντομα π.χ. (Diptera, Lepidoptera) η ομοιότητα κυμαίνεται από 92% μέχρι 99% γεγονός που αποδεικνύει τον υψηλό βαθμό συντήρησης της συγκεκριμένης αλληλουχίας.

Η συγκεκριμένη μελέτη επιβεβαίωσε την σημαντική παρουσία

ανθεκτικότητας των εντόμων του είδους *Aphis gossypii* στα πυρεθροειδή εντομοκτόνα. Με την συγκεκριμένη μοριακή τεχνική που ακολουθήθηκε για τον εντοπισμό της ύπαρξης της μετάλλαξης *super-kdr* M918L βρέθηκε ότι το 63% των δειγμάτων που εξετάστηκαν ήταν ετεροζύγα ως προς τη μετάλλαξη. Αυτό το αρκετά υψηλό ποσοστό αποδεικνύει την αλόγιστη χρήση των πυρεθροειδών εντομοκτόνων και καθιστά τον έλεγχο της αφίδας με τα συγκεκριμένα εντομοκτόνα προβληματικό.

Επιπλέον, κατά τη μελέτη της *kdr* μετάλλαξης L1014F που πραγματοποιήθηκε σε ένα μικρό αριθμό δειγμάτων, δε βρέθηκε κανένα άτομο αφίδας το οποίο να εμφανίζει τη συγκεκριμένη μετάλλαξη.

Παρόμοια αποτελέσματα έχουν βρεθεί και από τους Williamson *et al.* (αδημοσίευτα στοιχεία), οι οποίοι σε μελέτες με δείγματα *Aphis gossypii* διαπιστώσαν την ύπαρξη της συγκεκριμένης μετάλλαξης *super-kdr* M918L. Επιπλέον, η μετάλλαξη αυτή δε συνοδεύεται από την μετάλλαξη *kdr* L1014F. Στην θέση M918 εκτός από την μετάλλαξη προς λευκίνη έχουν παρατηρηθεί και άλλες παραλλαγές όπως η μετάλλαξη προς θρεονίνη που είναι η πιο διαδεδομένη στα διάφορα είδη εντόμων (Martinez-Torres, 1997) και προς βαλίνη που έχει βρεθεί στον αλευρώδη *Bemisia tabaci*. Οι μεταλλάξεις M918T, L1014F έχουν μελετηθεί περισσότερο στην κοινή μύγα *Musca domestica* καθώς θεωρείται έντομο-μοντέλο. Αξίζει να σημειωθεί ότι η μετάλλαξη M918T δεν έχει ανιχνευθεί μόνη της, χωρίς την απουσία της μετάλλαξης L1014F. (Williamson *et al*, 1996, Miyazaki *et al* 1996). Η μετάλλαξη L1014F όταν υφίσταται μόνη της αυξάνει το επίπεδο της ανθεκτικότητας 10-30 φορές (Soderlund, Knipple 2003). Αντίθετα, όταν συνυπάρχουν και οι δύο μαζί τότε η ανθεκτικότητα ενισχύεται μέχρι και 1000 φορές για μερικά πυρεθροειδή. (Soderlund, Knipple 2003)

Είναι πολύ σημαντικό να αναφερθεί ότι οι επεμβάσεις με πυρεθροειδή εντομοκτόνα έναντι άλλων εχθρών του βάμβακος μπορεί να οδηγήσουν σε έξαρση των πληθυσμών της αφίδας. Οι αφίδες δεν

επηρεάζονται αρκετά, αντίθετα με τους φυσικούς της εχθρούς που θανατώνονται. Παρά τον υψηλό αριθμό των ετερόζυγων ανθεκτικών ατόμων που βρέθηκαν, η συγκεκριμένη μετάλλαξη δεν εμφανίστηκε σε ομόζυγη κατάσταση. Το γεγονός αυτό πιθανώς να σχετίζεται με αυξημένο κόστος ανθεκτικότητας στους ομοζύγους γενότυπους (π.χ. μη φυσιολογική συμπεριφορά, αδυναμία αντίληψης εξωτερικών ερεθισμάτων) με αποτέλεσμα να μην επικρατούν.

Συμπερασματικά, είναι γεγονός ότι η εκτεταμένη χρήση πυρεθροειδών εντομοκτόνων οδηγεί ολοένα και σε μεγαλύτερα ποσοστά ανθεκτικών εντόμων. Είναι σκόπιμο να επεκταθεί η μελέτη σε μεγαλύτερο αριθμό ατόμων ώστε να προσδιοριστεί ακριβέστερα η έκταση του προβλήματος. Βάσει των αποτελεσμάτων που θα προκύψουν θα πρέπει να αποφασιστεί η συνέχιση της χρήσης των εντομοκτόνων ή η χρήση εναλλακτικών μεθόδων αντιμετώπισης.

Βιβλιογραφία

- Blackman, R.L.** (1980) Chromosomes and parthenogenesis in aphids. pp. 133-148. In Blackman, R.L., Hewitt, G.M. & Ashburner, M. (Eds), *Insect Cytogenetics*. Blackwell, Oxford.
- Blackman R.L & Eastop V.F.** (2000) *Aphids on the World's Crops. An Identification And Formation Guide*. Second Edition. John Wiley & Sons, London.
- Bhupinder, P.S.**, 2002. Pyrethroid insecticides. The Royal Society of Chemistry.
- Bull, D. L., Patterson, R. S.** (1993). Characterization of pyrethroid resistance in a strain of the German cockroach (Dyctioptera: Blattellidae). *Journal of Economic Entomology*, 86: 20-25.
- Davies, TG. E., O Reilly, A. O., Field, L.M., Wallace, BA., Williamson, M.S.**, 2008. Perspective Knockdown resistance to DDT and pyrethroids: from target-site mutations to molecular modelling. *Pest management Science*.
- Denholm, I. & Jespersen, J. B.** (1998) Insecticide resistance management in Europe: recent developments and prospects. *Pesticide Science* 52, 153-159.
- Dixon, A.F.G.** (1973) Metabolic acclimatization to seasonal changes in temperature in sycamore aphid *Drepanosiphum platanoides* (SCHR) and lime aphid *Eucallipterus tiliae*. L. *Oecologia*, 13, 205-210.
- Ζίφα, Α.** (2008). Διακυτταρική Επικοινωνία. Πανεπιστημιακές εκδόσεις Θεσσαλίας.
- Dixon, A.F.G.** (1998) *Aphid Ecology*. Second Edition, Chapman and Hall, London, U.K.
- Doichuangam, K., Thornhill, R.A.** (1992). Penetration, excretion and metabolism of ¹⁴C malathion in susceptible and resistant strain of *Plutella xylostella*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 101(3): 583-588.
- Field, L. M., Crick, S.E. & Devonshire, A. L.** (1996) Polymerase chain reaction-based identification of insecticide resistance genes and DNA methylation in the aphid *Myzus persicae* (Sulzer). *Insect Molecular Biology* 5, 197-202.

- Ffrench-Constant, R. H., Pittendrigh, B., Vaughan, A., Antony N. (1998).** Why are there so few resistance-associated mutations in the insecticide target genes? *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.*, 353: 1685-1693.
- Fournier, D., Mutero, A., Pralavorio, M., Bride, J. M. (1993).** Drosophila acetylcholinesterase: Mechanisms of resistance to organophosphates. *Chemical Biological Interactions*, 87: 233-238.
- Jamroz, R.C., Guerrero, F.D., Kammlah, D.M., Kunz, S.E., 1998.** Role of kdr and super-kdr sodium channel mutations in pyrethroid resistance: correlation of allelic frequency to resistance level in wild and laboratory populations of horn flies (*Haematobia irritans*). *Insect Biochem. Mol. Biol.* 28, 1031-1037
- Lees, A.D. (1966)** The control of polymorphism in aphids. *Advanced Insect Physiology*, 3, 207-277.
- Martinez-Torres, D., Devonshire, A.L., Williamson, M.S., 1997.** Molecular studies of knockdown resistance to pyrethroids: cloning of domain II sodium channel gene sequences from insects. *Pesticide Science* 51, 265–270.
- McKenzie, J. A. (1996).** Ecological and evolutionary aspects of insecticide resistance. Environmental Intelligence Unit. R.G. Landes Company
- Miyazaki, M., Ohyama, K., Dunlap, D. Y., Matsumura, F. (1996).** Cloning and sequencing of the *para*-type sodium channel gene from susceptible and *kdr*-resistant German cockroaches (*Blattella germanica*) and housefly (*Musca domestica*). *Molecular and General Genetic*, 252: 61-68.
- Oppenoorth, F. J. (1985).** Biochemistry and genetics of insecticide resistance. In Kerkut G.A., Gilbert, L.I. (Eds) *Comprehensive Insect physiology, Biochemistry, and Pharmacology*. Pergamon press, Oxford. Vol. 12 pp. 731-774.
- Scott, (1999).** Molecular basis of insecticide resistance: cytochromes P450. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 29: 757-777.
- Soderlund, D.M., Knipple, D.C., 2003.** The molecular biology of knockdown resistance to pyrethroid insecticides. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 33, 563–577.

- Soderlund, D.M., 2007. Review Pyrethroids, knockdown resistance and sodium channels. Pest management Science.
- Steichen, J. C. & Ffrench-Constant, R. H. (1994) Amplification of specific cyclodiene insecticide resistance alleles by the polymerase chain reaction. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 48, 1-7.
- Τόλης, Ι.Δ. (1986) Βαμβάκι: Εχθροί, Ασθένειες, Ζιζάνια. Αθήνα.
- Τσιτσιπής, Ι.Α.(1996)Εφαρμοσμένη Εντομολογία. Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας,Βόλος.
- Wheelock, C. E., Shan, G., Ottea, J. (2005). Overview of carboxylesterases and their role in the metabolism of insecticides. *Journal of Pesticide Science*, 30 (2): 75-83.
- Zlotkin, Eliahu., 1999. The insect voltage-gated sodium channel as target of insecticides.

