

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΚΑΙ
ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ



Πτυχιακή εργασία

**Γενετική αξιολόγηση του ρόλου της οξειδάσης
CYP392A16 στην ανθεκτικότητα του *Tetranychus*
urticae στα ακαρεοκτόνα**

Νικολέττα Αρέστη

Επιβλέπων καθηγητής: Βόντας Ιωάννης

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Είθισται, στο τέλος των προπτυχιακών σπουδών, να απευθύνονται ευχαριστίες σε ορισμένους ανθρώπους, που με διάφορους τρόπους βοήθησαν ή συμπαραστάθηκαν κάποια περίοδο ή σε όλη τη διάρκεια των σπουδών μας. Έτσι, από τη θέση αυτή, θέλω να ευχαριστήσω θερμά τον καθηγητή κ. Ι. Βόντα που με βοήθησε με κάθε τρόπο στο πρώτο μου βήμα προς την επιστημονική σκέψη, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε καθώς και για την ευκαιρία να δουλέψω σε ένα αξιόλογο εργαστήριο. Η παραμυθένια εικόνα που καταφέρνει να δώσει στην ανταγωνιστική όψη της έρευνας καθώς και ο ενθουσιασμός, το πάθος του και η αγάπη του για την επιστήμη θα αποτελούν πάντα κίνητρο για μένα.

Ο χρόνος παραμονής μου στο περιβάλλον του εργαστηρίου, αποτέλεσε μια τεράστια πηγή γνώσης και συναναστροφής με υψηλής ποιότητας- ακαδημαϊκής και ανθρώπινης- ερευνητές. Έτσι νιώθω την τεράστια ανάγκη, να ευχαριστήσω -καθένα ξεχωριστά- όλα τα μέλη του εργαστηρίου Μοριακής Εντομολογίας για τη βοήθεια και τις συμβουλές τους. Θα ήταν παράληψή μου να μην ευχαριστήσω ιδιαίτερα την Κυριακή-Μαρία Παπαποστόλου και τη Μαρία Ρήγα για την καθοδήγησή τους στην πορεία των πειραμάτων καθώς και το χρόνο που μου αφιέρωσαν.

Απόλυτα καθοριστική υπήρξε η ηθική και υλική συμπαράσταση των γονιών μου, γιατί πίστεψαν στο έργο με το οποίο είχα καταπιαστεί και δεν έφυγαν στιγμή από το πλευρό μου. Τους ευχαριστώ από τα βάθη της καρδιάς μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	1
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	2
1. Γενικά στοιχεία για το είδος <i>Tetranychus urticae</i>	2
1.1 Συστηματική.....	2
1.2 Αναπτυξιακά στάδια - Βιολογικός κύκλος.....	2
1.3 Προσβολή καλλιεργειών.....	6
2. Καταπολέμηση.....	7
2.1 Βιολογική καταπολέμηση.....	7
2.2 Χημική καταπολέμηση.....	7
3. Ανθεκτικότητα.....	10
3.1 Ανθεκτικότητα εντόμων και ακάρεων στα εντομοκτόνα.....	10
3.2 Μηχανισμοί ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα	11
3.2.1 Τα ένζυμα της οικογένειας Cytochromes P450 (CYPs)	13
3.3 Μηχανισμοί ανθεκτικότητας στις αβερμεκτίνες / Υπόβαθρο	17
4. Μεθοδολογία ανάλυσης ανθεκτικότητας	18
4.1 Βιοδοκιμές.....	18
4.2 Βιοχημικές μέθοδοι.....	19
4.3 Κλασσική γενετική ανάλυση ανθεκτικότητας	19
4.4 Μοριακές μέθοδοι ανάλυσης γονιδιακής έκφρασης και μεταλλαγών στόχου, σε σχέση με την ανθεκτικότητα	19
5. Γονιδιακή ρύθμιση	20
6. Σκοπός της μελέτης	21
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	22
1. Πληθυσμοί τετρανόχων.....	22
2. Εκτροφές πληθυσμών.....	22
3. “Καθαρισμός” γενετικού υποβάθρου πληθυσμών	23
4. Γενετικές διασταυρώσεις	24
5. Απομόνωση DNA.....	25
6. PCR, καθαρισμός προϊόντος και αλληλούχιση	27
7. Πέψη του προϊόντος της PCR με το περιοριστικό ένζυμο SspI.....	29
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	31
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	38
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	42

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο τετράνυχος *Tetranychus urticae* αποτελεί ένα από τους σημαντικότερους εχθρούς των καλλιεργειών. Η καταπολέμησή του βασίζεται κατά κύριο λόγο στη χρήση ακαρεοκτόνων. Ωστόσο, ο τετράνυχος αναπτύσσει ανθεκτικότητα σε σύντομο χρονικό διάστημα και μάλιστα σε υψηλά επίπεδα.

Στόχος της μελέτης ήταν η γενετική αξιολόγηση του ρόλου της οξειδάσης CYP392A16 στην ανθεκτικότητα του τετρανύχου στο ακαρεοκτόνο abamectin. Είναι ήδη γνωστό από τη βιβλιογραφία πως η CYP392A16 εμφανίζει υψηλά επίπεδα έκφρασης σε ανθεκτικούς πληθυσμούς τετρανύχων και επίσης έχει δειχθεί πως *in vitro* είναι ικανή να μεταβολίζει το ακαρεοκτόνο abamectin σε μια λιγότερο τοξική χημική ένωση.

Αρχικά πρέπει να δούμε πως ρυθμίζεται η έκφραση του γονιδίου του εν λόγω ενζύμου αποτοξικοποίησης. Αυτό μπορεί να απαντηθεί με γενετικές διασταυρώσεις μεταξύ ενός πληθυσμού που υπερεκφράζει το γονίδιο ενδιαφέροντος και ενός ευαίσθητου πληθυσμού με σκοπό την ενσωμάτωση/απομόνωση του γονιδίου - αλληλομόρφου από τον ανθεκτικό πληθυσμό σε ευαίσθητο γενετικό υπόβαθρο. Με qPCR θα διαπιστώσουμε αν η ρύθμιση του γονιδίου είναι *cis* ή *trans*. Αν είναι *cis*, τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου στο νέο πληθυσμό θα είναι ίδια με τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου στον ανθεκτικό πληθυσμό από τον οποίο απομονώθηκε. Έπειτα θέλουμε να δούμε ποια είναι η σχετική συνεισφορά της CYP392A16 στην ανθεκτικότητα που εμφανίζει ο ανθεκτικός πληθυσμός στο abamectin και αυτό θα γίνει μέσω βιοδοκιμών. Έτσι θα καταφέρουμε να ερευνήσουμε το ρόλο της CYP392A16 στο φαινότυπο ανθεκτικότητας του τετρανύχου.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Γενικά στοιχεία για το είδος *Tetranychus urticae*

1.1 Συστηματική

Ο τετράνυχος ταξινομικά ανήκει στο φύλο Arthropoda, στην κλάση Arachnida, στην τάξη Prostigmata και στην οικογένεια Tetranychidae. Η κοινή του ονομασία ποικίλει, ωστόσο είναι ευρύτερα γνωστός ως «τετράνυχος ο δύστικτος» λόγω δύο ευδιάκριτων στιγμάτων στο ιδίοςωμα. Είναι πολυφάγο φυτοφάγο άκαρι παγκόσμιας εξάπλωσης και έχει μεγάλο εύρος ξενιστών. Στην χώρα μας απαντάται σε κηπευτικές καλλιέργειες, βιομηχανικά και κτηνοτροφικά φυτά, ανθοκομικά και καλλωπιστικά φυτά, εσπεριδοειδή, οπωροφόρα δέντρα και αμπέλια. (“UF/IFAS - University of Florida, Institute of Food and Agricultural Sciences” n.d.)



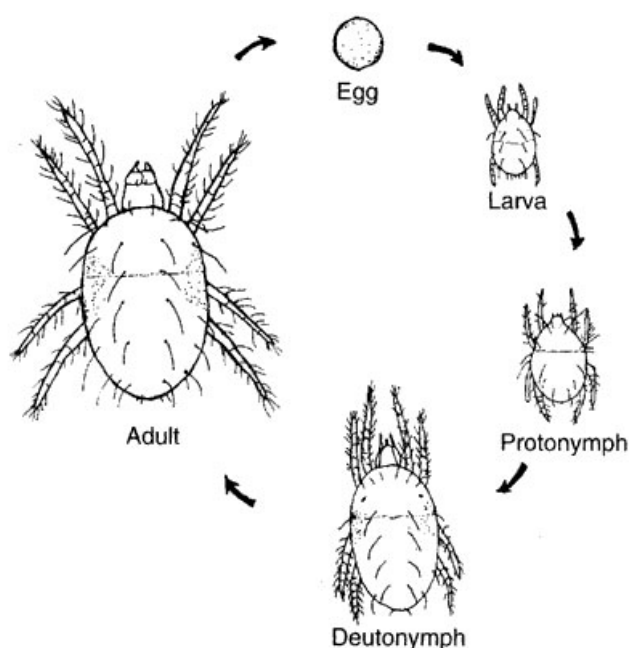
Εικόνα 1: Ακμαίο θηλυκό άτομο με ευδιάκριτα στίγματα στο ιδίοςωμα (“*Tetranychus*” 2018)

1.2 Αναπτυξιακά στάδια - Βιολογικός κύκλος

Ο βιολογικός κύκλος του τετράνυχου διακρίνεται στα παρακάτω στάδια. Πριν την ενηλικίωση, διέρχεται από τα στάδια ωό, εξάποδη προνύμφη, πρωτονύμφη και δευτερονύμφη. Μεταξύ των κινητών σταδίων παρεμβάλλονται τα ακίνητο στάδια, οι χρυσαλίδες, που διαρκούν 1-1½ ημέρα (Bonnemaison 1964). Εκτός του ωού και της

χρυσασαλίδα όλα τα υπόλοιπα στάδια είναι κινητά και μεταβολικά ενεργά. Κατά τη μετάβαση από το ένα στάδιο στο άλλο τα ακάρεα υφίστανται εκδύσεις.

Πιο αναλυτικά τα αυγά είναι σφαιρικά χρώματος λευκό-υποκίτρινο και διαμέτρου 100-150 μ m (Crooker, 1985). Ακολούθως η προνύμφη αποτελεί το πρώτο στάδιο μετά την εκκόλαψη του αυγού. Αρχικά είναι άχρωμη αλλά αφού τραφεί εμφανίζει έναν υποκίτρινο χρωματισμό (Crooker, 1985). Η νύμφη έπειτα, χωρίζεται σε 2 στάδια α) πρωτονύμφη και β) δευτερονύμφη όπου έχουν 4 ζεύγη ποδιών. Μεταξύ της προνύμφης και της πρωτονύμφης εμφανίζεται το ακίνητο στάδιο η πρωτοχρυσασαλίδα, ενώ η δευτεροχρυσασαλίδα αποτελεί το επίσης ακίνητο στάδιο μεταξύ της πρωτονύμφης και της δευτερονύμφης. Τέλος μετά τη δευτερονύμφη και πριν το ενήλικο στάδιο είναι το στάδιο της τελειοχρυσασαλίδας (Crooker, 1985). Τα ενήλικα άτομα είναι 0,4 – 0,5mm σε μήκος, με τα θηλυκά να είναι μεγαλύτερα σε μήκος από τα αρσενικά. Το σώμα του θηλυκού είναι ελλειπτικό ενώ του αρσενικού απιοειδές και οξυκατάληκτο (Crooker, 1985). Τα αυγά που αποτίθενται από τα θηλυκά και εκκολάπτονται μετά από 3-4 ημέρες.



Εικόνα 2: Βασικά στάδια του βιολογικού κύκλου του *T. urticae* ("Mites.Jpg (400×405)" n.d.)



Εικόνα 3: Α: Αυγά, Β: Ακμαίο θηλυκό άτομο Γ: Ακμαίο αρσενικό άτομο (“*Tetranychus*” 2018; Belgium 2010; Martin 2010)

Οι ευνοϊκότερες συνθήκες για την ανάπτυξή τους είναι 25 – 34⁰C και χαμηλή σχετική υγρασία. Ο βιολογικός κύκλος (ωό – ακμαίο) διαρκεί 5 – 20 ημέρες. Η διάρκεια ωοτοκίας του θηλυκού είναι περίπου 2 εβδομάδες, κατά την διάρκεια των οποίων γεννά 50 - 100 ωά, ωστόσο ο αριθμός μπορεί να ξεπεράσει τα 300 (Crooker, 1985). Η γονιμότητα αυξάνει με τη θερμοκρασία και μειώνεται με την υγρασία και την πυκνότητα των πληθυσμών. Οι διακυμάνσεις των βιολογικών χαρακτηρισμών (γονιμότητα, ποσοστό εκκόλαψης, διάρκεια ωοτοκίας, διάρκεια ζωής, ταχύτητα ανάπτυξης) σε σχέση με τις περιβαλλοντικές συνθήκες (θερμοκρασία, υγρασία, ποιότητα τροφής, ακαρεοκτόνα) μελετήθηκαν από μεγάλο αριθμό συγγραφέων (Crooker, 1985).

Τα αρσενικά άτομα ωριμάζουν πιο γρήγορα από τα θηλυκά άτομα με συνέπεια να παραμένουν πάνω ή δίπλα από τις θηλυκές τελειοχρυσαλίδες με σκοπό την άμεση γονιμοποίηση τους. Η σύζευξη λαμβάνει χώρα σχεδόν αμέσως μετά την «ανάδυση» του νεαρού θηλυκού από τη μορφή της τελειοχρυσαλίδας (Crooker, 1985). Ο τρόπος αναπαραγωγής του τετρανύχου είναι η αρρενοτόκος παρθενογένεση. Δηλαδή τα αγονιμοποίητα θηλυκά θα γεννήσουν αρσενικούς απογόνους που θα έχουν ένα ζεύγος χρωμοσωμάτων (απλοειδείς οργανισμοί), ενώ τα γονιμοποιημένα θηλυκά θα δώσουν θηλυκούς απογόνους που θα έχουν δύο ζεύγη χρωμοσωμάτων (διπλοειδείς οργανισμοί).

Το γεγονός ότι τα αρσενικά άτομα είναι απλοειδής οργανισμοί, σημαίνει ότι μεταλλαγές στα αρσενικά άτομα θα εκφραστούν ανεξάρτητα αν είναι

υπολειπόμενες ή επικρατείς. Μέσω της φυσικής επιλογής οι μεταλλαγές θα εγκαθιδρυθούν πολύ γρήγορα στον πληθυσμό. Εξαιτίας αυτής της ιδιομορφίας του οργανισμού η ανάπτυξη γενετικής ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα / ακαρεοκτόνα ενισχύεται από τον τρόπο αναπαραγωγής. Επιπρόσθετα, ο τετράνυχος μπορεί να αναπτύξει ανθεκτικότητα σε σύντομο χρονικό διάστημα εξαιτίας του υψηλού αναπαραγωγικού δυναμικού, των σύντομων γενεών και της αυξημένης χρήσης τοξικών ουσιών (Van Leeuwen et al. 2010).

Κατά τις αντίξοες συνθήκες του χειμώνα (χαμηλή θερμοκρασία, υψηλή υγρασία) διαχειμάζουν ως γονιμοποιημένα θηλυκά. Το θηλυκό του χειμώνα είναι ερυθρού χρωματισμού. Η διάπαυση καθορίζεται από τρεις κυρίως παράγοντες: την φωτοπερίοδο, τη θερμοκρασία και τη θρεπτική κατάσταση των φυτών. Στην πράξη εάν δύο από αυτούς τους παράγοντες είναι προς την κατάσταση της δημιουργίας διαπαύσεως το μεγαλύτερο μέρος του πληθυσμού θα εισέλθει σε διάπαυση. Τα διαχειμάζοντα άτομα δεν τρέφονται και αντίθετα με τα μη διαχειμάζοντα είναι αρνητικώς φωτοτροπικά. Στα θερμοκήπια συχνά οι τετράνυχτοι βρίσκονται σε σχισμές και καταφύγια της κατασκευής. Με την εμφάνιση ευνοϊκών συνθηκών κατά την άνοιξη τα θηλυκά δραστηριοποιούνται και αρχίζουν να ωοτοκούν στα νεαρά φυτά των ανοιξιάτικων καλλιεργειών ή στη νεαρή βλάστηση των δέντρων (Εμμανουήλ, 1998).

Ο τετράνυχος ζει συνήθως σε αποικίες αποτελούμενες από συγγενικά άτομα. Τα θηλυκά που διασπείρονται μόλις φτάσουν σε ένα νέο φυτό αρχίζουν να τρέφονται πλέκοντας έναν ιστό, σύνθετο και ανομοιόμορφο, στον οποίο αφήνουν τα ωά τους. Εντός αυτής της κάλυψης αναπτύσσονται τα ανώριμα στάδια (Saito, 1985). Ο ιστός επιτρέπει στα ακάρεα να διατηρήσουν ένα μικροκλίμα ευνοϊκό για τους πληθυσμούς, παρέχει προστασία από αρπακτικά και μειώνει τον ανταγωνισμό εμποδίζοντας την εγκατάσταση άλλων φυτοφάγων ειδών. Ο ιστός συμβάλλει επίσης στον εντοπισμό των τελειοχρυσαλίδων από τα αρσενικά άτομα καθώς και στη διασπορά των αποικιών από φυτά που είχαν καταστραφεί ή ψεκαστεί με ακαρεοκτόνα (Gerson, 1979 και 1985).



Εικόνα 3: Ιστός τετρανύχου
("Spider Mites - Bugwoodwiki" n.d.)

1.3 Προσβολή καλλιεργειών

Ο τετράνυχος προσβάλλει πολλά είδη φυτών, γεωργικής και οικονομικής σημασίας και αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους εχθρούς (Tsagkarakou et al. 2009). Προκαλούν ζημιές στα φυτά απομυζώντας χυμούς από το δυφρακτοειδές παρέγχυμα των φύλλων με τη βοήθεια σιλιέτων μειώνοντας έτσι τόσο τη διαδικασία της φωτοσύνθεσης όσο και της διαπνοής. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την εμφάνιση αρχικά υπόλευκων στιγμάτων στα φύλλα τα οποία στη συνέχεια παρουσιάζουν χλωρώσεις, συστροφές, ξηράνσεις και σχισίματα. Σε έντονες προσβολές παρατηρούνται νεκρωτικές κηλίδες στα φύλλα και φυλλόπτωση, ανθόρροια, πρόωρη ωρίμανση καρπών, αλλοίωση φύλλων και καρπών καθώς επίσης και ολοκληρωτική ξήρανση των φυτών. Ο τετράνυχος διανύει μικρές αποστάσεις βαδίζοντας ή μεταφέρεται παθητικά με τον άνεμο σε μεγάλες αποστάσεις αναπτύσσοντας νέες προσβολές (Devine, Barber, and Denholm 2001).



Εικόνα 4: Φύλλο κισσού προσβεβλημένο από τετράνυχος
("Insects-Bugs-Houseplants-Spider-Mites" n.d.)

2. Καταπολέμηση

Η καταπολέμηση του τετρανύχου γίνεται χρησιμοποιώντας είτε βιολογικούς εχθρούς του τετρανύχου είτε χημικά σκευάσματα. Παρόλα αυτά η χρήση εντομοκτόνων ουσιών είναι ο κύριος τρόπος καταπολέμησης του, όπως περιγράφεται παρακάτω.

2.1 Βιολογική καταπολέμηση

Η βιολογική καταπολέμηση γίνεται με τη χρήση των φυσικών εχθρών του τετρανύχου. Ο τετρανύχος έχει στη φύση πολλούς φυσικούς εχθρούς, κυρίως αρπακτικά που μπορούν να ελέγξουν την εξάπλωση του μέσω θήρευσης. Μεταξύ των φυσικών εχθρών του τετρανύχου, τα αρπακτικά ακάρεα της οικογένειας Phytoseiidae αποτελούν αναμφισβήτητα τον πλέον επιτυχημένο παράγοντα βιολογικής καταπολέμησης τους. Τα περισσότερα Phytoseiidae είναι πολυφάγα και το είδος *Phytoseiulus persimilis* φαίνεται ότι τρέφεται αποκλειστικά (στα θερμοκήπια) με Tetranychidae (Εμμανουήλ και Παπαδούλης, 2000). Εκτός των Phytoseiidae, άλλοι εχθροί του τετρανύχου είναι έντομα των γενών *Syrphus*, *Stethorus*, *Orius*, *Leptothrips*, *Chrysopa* (Εμμανουήλ και Παπαδούλης, 2000).



Εικόνα 5: *Phytoseiulus persimilis* τρέφεται με τετράνυχο
("Persimilis (*Phytoseiulus Persimilis*) – Biological Services, Australia" n.d.)

2.2 Χημική καταπολέμηση

Παρ' όλο που η βιολογική καταπολέμηση κερδίζει όλο και πιο πολύ έδαφος, η χρήση χημικών σκευασμάτων παραμένει ο κύριος τρόπος αντιμετώπισης του τετρανύχου. Υπάρχουν εντομοκτόνα με ακαρεοκτόνο δράση όπως ορυκτέλαια, οργανοφωσφορικές και καρβαμιδικές ενώσεις, χλωριωμένοι υδρογονάνθρακες, πυρεθρινοειδή,

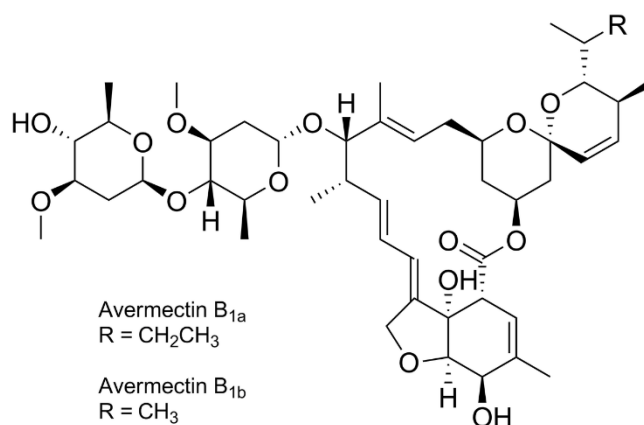
αβερμεκτίνες και εντομοκτόνα νέας γενιάς που χρησιμοποιούνται για την προστασία των καλλιεργειών από φυτοφάγα ακάρεα. Η δράση των περισσότερων εντομοκτόνων εντοπίζεται στο νευρικό σύστημα.

Τα οργανοφωσφορικά και τα καρβαμιδικά εντομοκτόνα δεσμεύονται στο ενεργό κέντρο της ακετυλοχολινεστεράσης (βασικό ένζυμο του κεντρικού νευρικού συστήματος των εντόμων και των ακάρεων) αναστέλλοντας τη λειτουργία της. Η ακετυλοχολινεστεράση καταλύει την μετατροπή της ακετυλοχολίνης σε χολίνη, με αποτέλεσμα να διακόπτεται η μεταφορά μηνυμάτων και να απορυθμίζεται το νευρικό σύστημα. Κάθε αίτιο που προκαλεί αναστολή της δράσης της χολινεστεράσης ή δεσμεύει τους μετασυναπτικούς υποδοχείς της ακετυλοχολίνης, έχει ως αποτέλεσμα την υπερβολική παρουσία ακετυλοχολίνης, με συνέπεια το διαρκή νευρικό ερεθισμό. Ακολουθεί παράλυση του νευρικού συστήματος και θάνατος των εντόμων (Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2007).

Τα οργανοχλωριωμένα εντομοκτόνα και τα πυρεθρινοειδή δρουν στοχεύοντας τα διαμεμβρανικά κανάλια μεταφοράς ιόντων γλωρίου (GABA) και νατρίου (sodium channel) αποσυντονίζοντας έτσι τη λειτουργία τους και τον έλεγχο ροής ιόντων κατά μήκος του νευρικού άξονα οδηγώντας στην παράλυση και σταδιακά στο θάνατο των ατόμων (Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2007).

Οι αβερμεκτίνες είναι μακροκυκλικές λακτόνες που ανήκουν σε μια νέα γενιά εντομοκτόνων-ακαρεοκτόνων, με φυσική προέλευση και εξειδικευμένη δράση. Εμφανίζουν ανθελμινθική, ακαρεοκτόνο και εντομοκτόνο δράση (Stumpf and Nauen 2002). Προέρχονται φυσικά από τη ζύμωση του ακτινομύκητα *Streptomyces avermitilis*. Από αυτή τη διαδικασία προκύπτουν τέσσερα ομόλογα ζεύγη συστατικών: αβερμεκτίνες A1, A2, B1, B2. Η αβερμεκτίνη B1 κυρίως απομονώνεται από τη ζύμωση του μικροοργανισμού και η δραστική ουσία αποτελεί μείγμα των ομολόγων B1α (80%) και B1β (20%) (Clark et al. 1995). Η ουσία αυτή δρα κυρίως στο γ-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA) και στους διαύλους γλωρίου (glutamate gated-chloride channels), οδηγώντας σε ενεργοποίηση των καναλιών γλωρίου με αποτέλεσμα την παράλυση του οργανισμού στόχου (Ozoe, Takeda, and Matsuda 2009), (Van Leeuwen et al. 2009). Οι εντομοκτόνες ιδιότητες των αβερμεκτινών τις καθιστούν ιδανικές για την αντιμετώπιση αρθροπόδων διαφόρων κλάσεων όπως κολεόπτερα, ομόπτερα, δίπτερα, ορθόπτερα, ισόπτερα, υμενόπτερα, λεπιδόπτερα και ακάρεα, όπως

ο τετρανύχος (Riga et al. 2014), (Putter et al. 1981). Υπάρχουν πολλές καταγεγραμμένες περιπτώσεις ανθεκτικότητας στην αβερμεκτίνη σε πληθυσμούς τετρανύχου στο πεδίο ανά τον κόσμο. Η ανθεκτικότητα του τετρανύχου στη συγκεκριμένη τοξική ουσία έχει αναφερθεί και παρατηρηθεί στην Καλιφόρνια, Φλόριντα και Ολλανδία (Campos, Dybas, and Krupa 1995), (Campos, Krupa, and Dybas 1996), Βραζιλία και Κολομβία (Stumpf and Nauen 2002), (Sato et al. 2005), Ουάσιγκτον (Beers, Riedl, and Dunley 1998), στη Νότια Κορέα (Kwon et al. 2010), στην Τουρκία (“UF/IFAS - University of Florida, Institute of Food and Agricultural Sciences” n.d.). Στην Ελλάδα υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας στην αβερμεκτίνη (RR=250) έχουν διαπιστωθεί σε *T.urticae* από εντατική καλλιέργεια τριαντάφυλλου στο Μαραθώνα (Μπιρουράκη, 2008).



Εικόνα 6: Χημική δομή αβερμεκτίνης
("Abamectin" 2019)

Οι ρυθμιστές ανάπτυξης (Insect Growth Regulators) παρεμβαίνουν σε φυσιολογικές λειτουργίες των εντόμων όπως τη βιοσύνθεση της χιτίνης, καθώς και τη διαδικασία της έκδυσης και της μεταμόρφωσης.

Έχουν αναπτυχθεί και δραστικές ουσίες που έχουν μόνο ακαρεοκτόνο δράση. Τα ακαρεοκτόνα σκευάσματα διακρίνονται βάσει βιολογικών και φυσικοχημικών ιδιοτήτων. Όσον αφορά τις φυσικοχημικές ιδιότητες τα σκευάσματα διαχωρίζονται σε ομάδες όπως οργανοθειούχα, οργανοκασσιτερούχα, οργανοχλωριωμένα, φορμαμίδνες, παράγωγα φαινόλης, σουλφίδια, τετραζίνες κ.α καθώς επίσης και σε ακαρεοκτόνα νέας γενιάς όπως METI ακαρεοκτόνα.

Τα οργανοκασσιτερούχα ακαρεοκτόνα δρουν μέσω επαφής ή/ και κατάποσης εναντίων των κινητών σταδίων των ακάρεων ως παρεμποδιστές της οξειδωτικής φωσφορίλωσης. Τα METI ακαρεοκτόνα δρουν σαν παρεμποδιστές μεταφοράς ηλεκτρονίων στα μιτοχόνδρια. Τέλος υπάρχει το ακαρεοκτόνο Spirodiclofen το οποίο πιθανά δρα ως παρεμποδιστής της λιπιδιακής σύνθεσης (TETR, tetronic acid derivatives) σε όλα τα στάδια του τετρανύχου (Rauch and Nauen 2002)

3. Ανθεκτικότητα

3.1 Ανθεκτικότητα εντόμων και ακάρεων στα εντομοκτόνα

Η ανθεκτικότητα είναι ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα στην προσπάθεια ελέγχου των επιβλαβών για τη γεωργία φυτοπαρασίτων.

Είναι κληρονομούμενη ιδιότητα και ορίζεται ως η ικανότητα ενός πληθυσμού να επιβιώνει μετά από έκθεση σε δόσεις δραστικής ουσίας που κανονικά θα ήταν θανατηφόρες.

Πριν την εφαρμογή ενός φυτοπροστατευτικού προϊόντος ο πληθυσμός του στοχευόμενου φυτοπαρασίτου είναι ετερογενής, δηλαδή στο σύνολο του πληθυσμού απαντούν ευαίσθητα και ανθεκτικά άτομα. Με την πίεση της επιλογής επιλέγονται τα ανθεκτικά γονίδια ενώ τα ευαίσθητα θανατώνονται. Με αυτόν τον τρόπο, με την πάροδο των γενεών, αρχικά ευπαθείς πληθυσμοί μετατρέπονται σε ανθεκτικούς (Βόντας κ.α., 2007).

Η ανάπτυξη ανθεκτικότητας οδηγεί σε απώλεια της αποτελεσματικότητας των φυτοφαρμάκων. Η λανθασμένη χρήση των φυτοπροστατευτικών προϊόντων οδηγεί σε ανάπτυξη ανθεκτικότητας, επιβαρύνοντας οικονομικά τόσο τον παραγωγό και τον καταναλωτή, όσο και το περιβάλλον.

Η ανάπτυξη ανθεκτικότητας που εμφανίζουν τα έντομα και τα ακάρεα ευνοείται από το υψηλό αναπαραγωγικό τους δυναμικό, τον σύντομο βιολογικό τους κύκλο, τον μεγάλο αριθμό γενεών ανά έτος, ιδιαίτερα σε θερμές συνθήκες περιβάλλοντος και την εγγενή αναπαραγωγή που επιτρέπει τους ανασυνδυασμούς του γενετικού υλικού. Τα προβλήματα ανθεκτικότητας σε καλλιέργειες υπό κάλυψη είναι ιδιαίτερα αυξημένα

λόγω των ευνοϊκών καιρικών συνθηκών και των συχνών εφαρμογών φυτοφαρμάκων (Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2007).

Για την αντιμετώπιση της ανθεκτικότητας χρειάζεται λεπτομερής επιστημονική προσέγγιση. Απαιτούνται μελέτες τόσο στο εργαστήριο όσο και στον αγρό για την κατανόηση της ανθεκτικότητας, την αντιμετώπισή της και την αποφυγή εμφάνισής της. Απαιτείται προσδιορισμός των παραμέτρων της ανθεκτικότητας, όπως του επιπέδου ανθεκτικότητας, της κατανομής του πληθυσμού, της ύπαρξης διασταυρωτής ανθεκτικότητας, των βιοχημικών μηχανισμών ανθεκτικότητας, του γενετικού ελέγχου της ανθεκτικότητας και της προσαρμοστικότητας των ανθεκτικών πληθυσμών (Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2007).

Απαραίτητη προϋπόθεση για την αντιμετώπιση της ανθεκτικότητας είναι η έγκαιρη διάγνωση της και η παρακολούθηση των πληθυσμών για τον έλεγχο της κατανομής των ανθεκτικών γονιδίων. Η γνώση του μεγέθους της γενετικής διαφοροποίησης των πληθυσμών ενός είδους συμβάλει στην επιλογή της στρατηγικής είτε για την καθυστέρηση εμφάνισης είτε για τη διαχείριση της ανθεκτικότητας (Tsagkarakou et al, 1996).

Η αντιμετώπιση της ανθεκτικότητας εστιάζεται στον περιορισμό της επιλεκτικής πίεσης των εντομοκτόνων. Για να επιτευχθεί αυτό απαιτείται ρύθμιση της δόσης εντομοκτόνων και του αριθμού των επεμβάσεων, χρησιμοποίηση εντομοκτόνων χαμηλής υπολειμματικής διάρκειας, χρησιμοποίηση συνεργιστικών ουσιών, εφαρμογή τοπικών επεμβάσεων καθώς και η σωστή εναλλαγή εντομοκτόνων (Tsagkarakou et al, 1996).

3.2 Μηχανισμοί ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα

Οι μηχανισμοί ανθεκτικότητας που εμφανίζουν τα έντομα και τα ακάρεα είναι τρεις και περιγράφονται αναλυτικά πιο κάτω.

Ανθεκτικότητα μπορεί να προκαλείται από επιδερμικές διαφοροποιήσεις και αλλαγές στη συμπεριφορά με αποτέλεσμα είτε να εμποδίζεται η είσοδος είτε να αυξάνεται η απέκκριση των εντομοκτόνων-ακαρεοκτόνων. Αυτός ο τύπος ανθεκτικότητας ονομάζεται φυσιολογική ή ηθολογική ανθεκτικότητα και αποτελεί την πρώτη γραμμή άμυνας (Βόντας κ.α., 2007).

Δεύτερη γραμμή άμυνας αποτελεί η βιοχημική ανθεκτικότητα. Σε αυτή την περίπτωση, πρωτεΐνες-ένζυμα μεταβολίζουν τις τοξικές ουσίες πριν φτάσουν στο στόχο όπου θα δράσουν. Βασικά ένζυμα της βιοχημικής ανθεκτικότητας είναι οι εστεράσες, οι μονοοξυγενάσες P450 και οι τρανσφεράσες της γλουταθειόνης (GSTs) (Βόντας κ.α., 2007).

Οι εστεράσες (καρβοξυλεστεράσες), είναι μια μεγάλη οικογένεια πρωτεϊνών, μέλη της οποίας δεσμεύουν και κατακρατούν εντομοκτόνα μόρια στον εξωκυτταρικό χώρο υδrolύοντας εστερικούς δεσμούς (Hemingway et al. 2004). Οι εστεράσες οδηγούν σε ανθεκτικότητα σε όλες σχεδόν τις ομάδες εντομοκτόνων, συνηθέστερα όμως στα οργανοφωσφορικά και τα καρβαμιδικά. Υπάρχουν περιπτώσεις όπου η ποιοτική διαφοροποίηση εστερασών, με συνέπεια να επιλέγονται ενζύμα με αυξημένη καταλυτική ικανότητα για τα εντομοκτόνα μόρια.

Συνήθως όμως η ανθεκτικότητα οφείλεται σε επιλογή ατόμων που διαθέτουν μεγάλες ποσότητες της πρωτεΐνης, κάτι που συνήθως επιτυγχάνεται με τον μηχανισμό της γονιδιακής ενίσχυσης (Vontas, Small, and Hemingway 2001), (Kim et al. 2004).

Μια άλλη σημαντική οικογένεια ενζύμων που προκαλεί βιοχημική ανθεκτικότητα είναι οι μεικτής λειτουργίας P450 οξειδάσες ή μονοοξυγενάσες. Πρόκειται για μικροσωμικές αιμοπρωτεΐνες που καταλύουν την οξειδωτική διάσπαση των εντομοκτόνων (Scott 1999). Για την ανθεκτικότητα των εντόμων ευθύνονται κυρίως ποσοτικές αλλαγές μελών της οικογένειας που έχουν την ικανότητα να μεταβολίζουν τα μόρια των εντομοκτόνων ουσιών και σπανίως ποιοτικές διαφοροποιήσεις (Scott, 1999), (Van Leeuwen, Van Pottelberge, and Tirry 2005).

Ανθεκτικότητα αναφέρεται σε όλες σχεδόν τις ομάδες εντομοκτόνων, όπως οργανοφωσφορικά, πυρεθρινοειδή, οργανοχλωριωμένα, νεονικοτινοειδή και αβερμεκτίνες και συχνά έχουν ευρύ χαρακτήρα (έμμεση-πολλαπλή ανθεκτικότητα), αφού ορισμένες P450 οξειδάσες έχουν την ικανότητα να αναγνωρίζουν ως υπόστρωμα και να μεταβολίζουν πολύ διαφορετικά τοξικά μόρια (Daborn 2002).

Η τρίτη ομάδα ενζύμων που εμπλέκονται στη βιοχημική ανθεκτικότητα είναι οι μεταφοράσες ή τρανσφεράσες της γλουταθειόνης. Τα ένζυμα αυτά καταλύουν την προσθήκη γλουταθειόνης στο λιπόφιλο μόριο των εντομοκτόνων αυξάνοντας τη υδατοδιαλυτότητά τους και διευκολύνοντας κατ'αυτόν τον τρόπο την αποβολή τους από τον οργανισμό. Σε μερικές περιπτώσεις τα ένζυμα αυτά μεταβολίζουν το

εντομοκτόνο χωρίς την προσθήκη γλουταθειόνης στο τοξικό μόριο, κάτι που συμβαίνει στην αντίδραση αποϋδροχλωρίνωσης του DDT. Οι τρανσφεράσες της γλουταθειόνης προκαλούν σχετικά ήπια επίπεδα ανθεκτικότητας σε όλες σχεδόν τις κατηγορίες εντομοκτόνων (Mutero et al. 1994), (Vontas, Small, and Hemingway 2001), (Stumpf and Nauen 2002).

Οι δύο αυτοί μηχανισμοί ανθεκτικότητας (φυσιολογική και βιοχημική ανθεκτικότητα) συντελούν στη μείωση της ποσότητας του εντομοκτόνου που φτάνει τελικά στο στόχο (Βόντας κ.α., 2007).

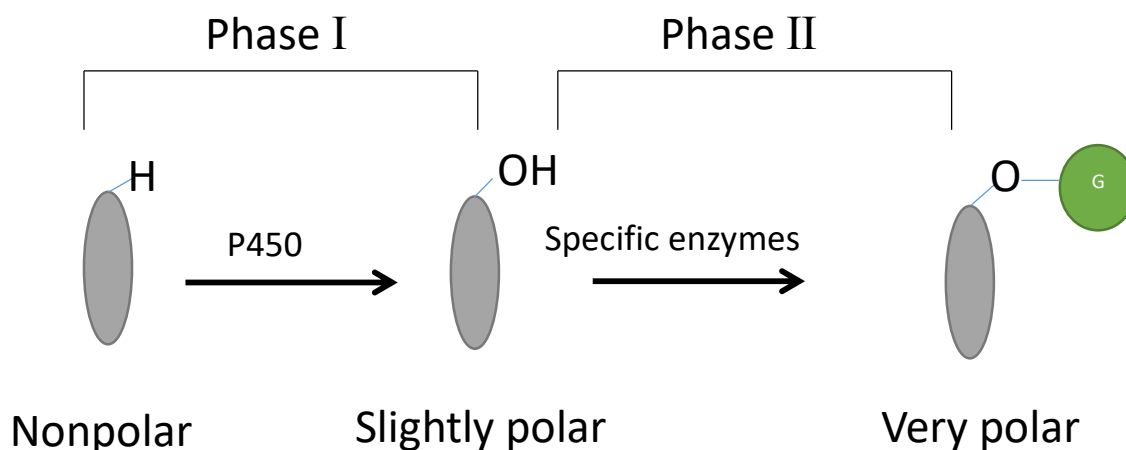
Η τρίτη και τελευταία γραμμή άμυνας των εντόμων, που συχνά προκαλεί και τα πιο εντυπωσιακά επίπεδα ανθεκτικότητας, είναι η ανθεκτικότητα στόχου. Αυτός ο τύπος ανθεκτικότητας οφείλεται σε σημειακές μεταλλαγές σε γονίδια-στόχους των εντομοκτόνων με αποτέλεσμα τη δυσκολία πρόσδεσης των εντομοκτόνων στο στόχο όπου δρουν. Αφορά δηλαδή, διαφοροποιήσεις στην μοριακή δομή των πρωτεϊνών στόχων, που τις κάνουν μη προσβάσιμες σε τοξικά μόρια με αποτέλεσμα τη μείωση ή την απώλεια της αποτελεσματικότητας των εντομοκτόνων (Βόντας κ.α., 2007), (Van Leeuwen et al. 2010).

3.2.1 Τα ένζυμα της οικογένειας Cytochromes P450 (CYPs)

Τα ένζυμα P450 είναι ικανά να μεταβολίζουν δομικά διαφορετικές ενώσεις, συμπεριλαμβανομένων και των εντομοκτόνων. Γι'αυτό το λόγο θεωρούνται οι πιο "ευέλικτοι βιολογικοί καταλύτες" (Porter and Coon 1991). Λαμβάνουν μέρος στη πρώτη φάση της διαδικασίας αποτοξικοποίησης.

Η διαδικασία αποτοξικοποίησης του εκάστοτε ξενοβιοτικού παράγοντα χωρίζεται σε τρεις φάσεις, φάση I-ενζυμικός μετασχηματισμός, φάση II-ενζυμική σύζευξη και φάση III-μεταφορά. Τα ένζυμα CYP στη φάση I, ξεκινούν τη διαδικασία της αποτοξικοποίησης με το να μετασχηματίζουν, λιποδιαλυτές ενώσεις σε υδατοδιαλυτές, προετοιμάζοντάς τις έτσι για τη φάση II. Στη φάση II, παρόλο που η τοξική ουσία έχει γίνει υδατοδιαλυτή, εξακολουθεί να είναι ακατάλληλη για άμεση έκκριση από τα κύτταρα. Αυτό γιατί, οι αντιδράσεις της πρώτης φάσης δεν επαρκούν για να κάνουν αρκετά υδατοδιαλυτή την τοξική ουσία ώστε να μπορέσει να εκκριθεί. Έτσι στη φάση II τροποποιούνται ακόμη περαιτέρω τα προϊόντα που προέκυψαν από τη φάση I.

Γίνονται ακόμη πιο υδατοδιαλυτά με πολύ μειωμένη τοξικότητα, ικανά πλέον να εκκριθούν από τους μεταφορείς στη φάση III (www.youtube.com/watch?v=zkS7PZUE27g).

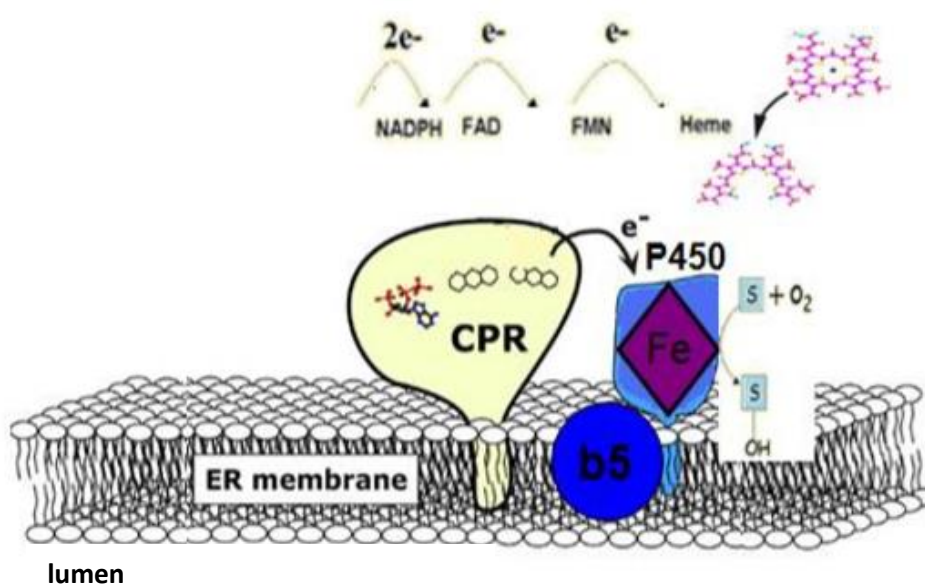


Εικόνα 7: Διαγραμματικά οι δυο πρώτες φάσεις του ξενοβιοτικού μεταβολισμού (Nikoletta Aresti 2019)

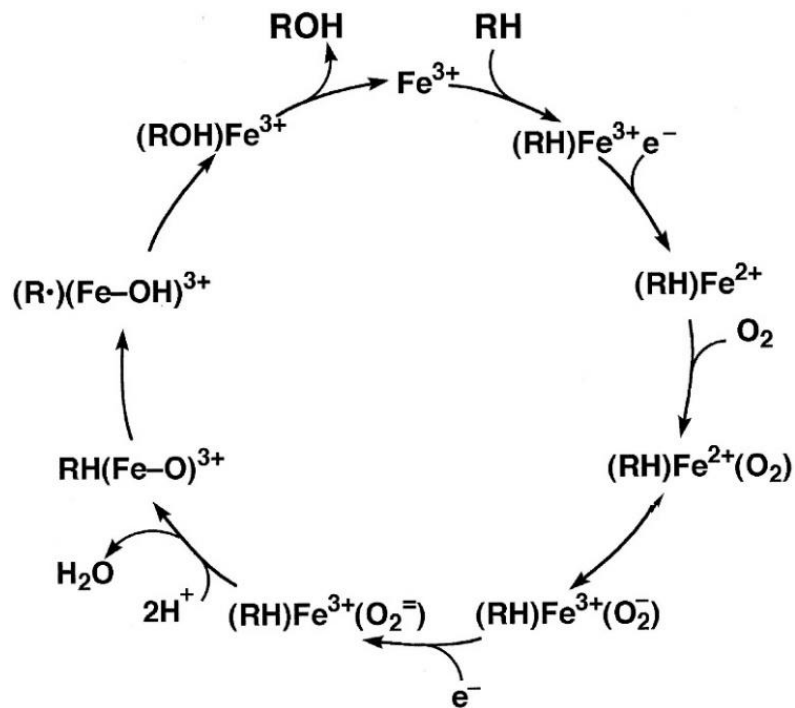
Τα κυτοχρώματα P450 είναι μια από τις μεγαλύτερες οικογένειες ενζυμικών πρωτεϊνών. Τα p450 γονίδια συναντώνται από τα βακτήρια μέχρι και τα θηλαστικά. Οι αμινοξικές αλληλουχίες τους είναι πολύ διαφορετικές και σε μερικές περιπτώσεις τα επίπεδα ομοιότητας τους είναι χαμηλότερα από 16%. Εξελικτικά όμως η δομική τους αναδίπλωση παραμένει παντού η ίδια. Στους προκαρυώτες, τα ένζυμα P450 είναι διαλυτές πρωτεΐνες, ενώ στους ευκαρυώτες συχνά συνδέονται με το ενδοπλασματικό δίκτυο ή με την εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων (Berge et al., 1998).

Το ενεργό κέντρο των ενζύμων P450 περιέχει μια ομάδα αίμης στο εσωτερικό του, η οποία περικλείει ένα άτομο σιδήρου (κέντρο αιμικού σιδήρου) και γι' αυτό το λόγο τα ένζυμα αυτά ανήκουν στην υπεροικογένεια των αιμοπρωτεϊνών. Όταν ο αιμικός σίδηρος των ενζύμων P450 αναχθεί, σχηματίζει σύμπλοκο με το αέριο μονοξείδιο του άνθρακα (CO) με αποτέλεσμα το ένζυμο P450 να απορρόφα φως σε μήκος κύματος κοντά στα 450 nm. Αυτό το φάσμα απορρόφησης αποτελεί κύριο χαρακτηριστικό τους και τους προσδίδει την ονομασία τους (Omura and Sato, 1964).

Η λειτουργία των περισσότερων P450 είναι να καταλύουν την οξείδωση οργανικών υποστρωμάτων, όπως λιπιδίων, φαρμάκων, διάφορων τοξικών χημικών ουσιών κ.α. Συχνά αποτελούν μέρος σε πολυσύνθετες αλυσίδες μεταφοράς ηλεκτρονίων. Η πιο κοινή αντίδραση που καταλύεται από αυτά είναι η αντίδραση μονοοξυγενάσης, δηλαδή τα ένζυμα P450 δεσμεύουν το μοριακό οξυγόνο και λαμβάνουν ηλεκτρόνια από το NADPH για να εισάγουν ένα άτομο οξυγόνου σε ένα οργανικό υπόστρωμα (S), ενώ το άλλο άτομο οξυγόνου ανάγεται σε νερό σύμφωνα με την αντίδραση: $\text{υπόστρωμα (S)} + (\text{NADPH} + \text{H}^+) + \text{O}_2 \rightarrow \text{S(O)} + \text{NADP}^+ + \text{H}_2\text{O}$. Τα απαραίτητα ηλεκτρόνια για αυτή την αντίδραση μεταφέρονται από το NADPH πάνω στο σύμπλοκο 'υπόστρωμα - P450' είτε από μια NADPH P450-reductase του κυτοχρώματος (CPR) είτε από το κυτόχρωμα b5 (Berge et al.,1998). Αυτή η δράση μονοοξυγενάσης των P450 ενζύμων σχετίζεται επίσης με το μεταβολισμό των περισσότερων εντομοκτόνων, οδηγώντας κατά κύριο λόγο στην αποτοξικοποίησή τους (Scott et al., 1999).



Εικόνα 8: Ροή ηλεκτρονίων κατά τη διαδικασία του ξενοβιοτικού μεταβολισμού (Τσακιρέλη Δήμητρα, Μεταπτυχιακή μελέτη 2011)



Εικόνα 9: Καταλυτικός κύκλος των P450 ενζύμων
 (“The P450 Catalytic Cycle” n.d.)

Για πολλά έντομα, η αποτοξικοποίηση είναι τόσο ενεργή που το εντομοκτόνο δε φτάνει στο μοριακό του στόχο, αφού θα έχει μεταβολιστεί κι αποικοδομηθεί από αυτά τα ένζυμα, καθιστώντας τα έντομα αυτά ανθεκτικά στα εντομοκτόνα (Berge et al., 1998). Για τη μειωμένη ευαισθησία των εντόμων ευθύνονται ποσοτικές αλλαγές μελών της οικογένειας των P450 και σπανίως ποιοτικές διαφοροποιήσεις (Van Leeuwen et al., 2005), (Scott et al., 1999).

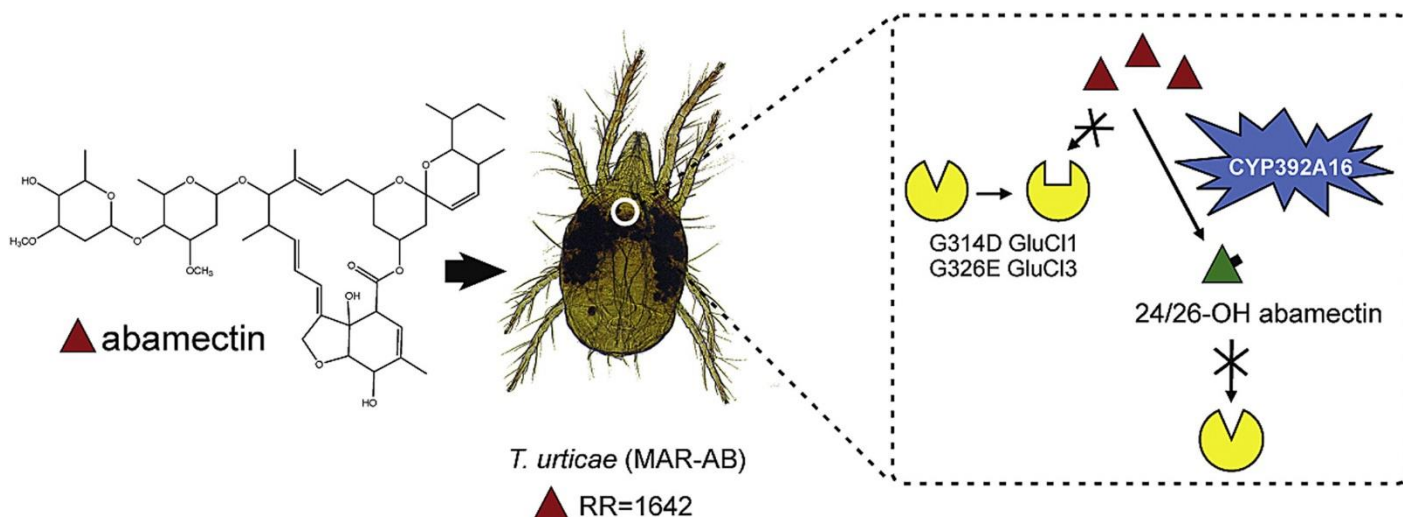
3.3 Μηχανισμοί ανθεκτικότητας στις αβερμεκτίνες / Υπόβαθρο

Όπως προαναφέρθηκε οι αβερμεκτίνες χρησιμοποιούνται για την καταπολέμηση του τετρανύχου. Η ανθεκτικότητα του στην ουσία αυτή έχει συσχετιστεί τόσο με τη βιοχημική ανθεκτικότητα όσο και με την ανθεκτικότητα στόχου.

Με την αλληλούχιση του γονιδιώματος του τετρανύχου βρέθηκε πως υπάρχουν 6 γονίδια που κωδικοποιούν για τα κανάλια χλωρίου τα οποία αποτελούν δυνητικούς στόχους των αβερμεκτινών (Grbić et al. 2011). Σε μεταγενέστερη μελέτη από τους Dermauw et al (2012), βρέθηκε πως ανθεκτικό στις αβερμεκτίνες στέλεχος (Μαραθώνας) εμφανίζει δύο μεταλλαγές σε δύο διαφορετικά γονίδια που κωδικοποιούν για τα κανάλια χλωρίου. Εμφανίζει τη G314D μεταλλαγή στο GluCl1, η οποία είχε ήδη αναφερθεί από τους Kwon et al (2010) και μια νέα μεταλλαγή τη G326E στο GluCl3. Η παρουσία της δεύτερης μεταλλαγής σε ομοζυγωτία σε άτομα που επιβίωσαν σε υψηλή συγκέντρωση της ουσίας αυτής πιθανόν να σχετίζεται με υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας στις αβερμεκτίνες (Dermauw et al. 2012). Ταυτόχρονα, γενετικές διασταυρώσεις έδειξαν πως οι μεταλλαγές αυτές κληρονομούνται ανεξάρτητα και η ανθεκτικότητα στις αβερμεκτίνες είναι πολυγονιδιακό φαινόμενο, δηλαδή περισσότερα του ενός γονίδια παίζουν ρόλο στο φαινότυπο της ανθεκτικότητας στην ουσία αυτή.

Σε μεταγενέστερη μελέτη, απομονώθηκε μικρή γονιδιακή περιοχή που περιλαμβάνει τις προαναφερθείσες μεταλλαγές σε ευαίσθητο γενετικό υπόβαθρο. Παρατηρήθηκε, πως η κάθε μεταλλαγή από μόνη της προσδίδει αρκετά χαμηλά επίπεδα ανθεκτικότητας στις αβερμεκτίνες. Αντίθετα, ο συνδυασμός τους προσδίδει (περίπου 10-20 φορές υψηλότερη ανθεκτικότητα σε σχέση με το ευαίσθητο στέλεχος), (Μ. Ρήγα, 2016, Διδακτορική Διατριβή) αλλά δε φτάνουν στα ίδια επίπεδα με αυτά του πατρικού πληθυσμού (>1000x).

Πιθανότατα λοιπόν η ανθεκτικότητα στις αβερμεκτίνες οφείλεται σε συνδυασμό μηχανισμών. Βρέθηκε επίσης, πως η ουσία abamectin μεταβολίζεται *in vitro* από μια κυτοχρωμική οξειδάση του τετρανύχου την, CYP392A16, σε μια λιγότερο τοξική ουσία (Riga et al. 2014).



Εικόνα 13: Μηχανισμοί ανθεκτικότητας στις αβερμεκτίνες που εμφανίζει το στέλεχος *T. urticae* (MAR-AB) (Riga et al. 2014)

4. Μεθοδολογία ανάλυσης ανθεκτικότητας

4.1 Βιοδοκιμές

Η ανάλυση της ανθεκτικότητας μέσω βιοδοκιμών πραγματοποιείται με την εξής μεθοδολογία. Κατά κύριο λόγο τα άτομα του υπό μελέτη πληθυσμού ψεκάζονται απ' ευθείας στο φύλλο με 5 – 7 δόσεις εντομοκτόνου ουσίας. Μέσω αυτής της διαδικασίας προσδιορίζεται η συγκέντρωση που σκοτώνει το 50% των ατόμων ενός πληθυσμού (LC₅₀) και γενικότερα τα επίπεδα ανθεκτικότητας σε ένα συγκεκριμένο εντομοκτόνο – ακαρεοκτόνο (Helle and Sabelis 1985). Η ανάλυση αυτή γίνεται σε σύγκριση με έναν πληθυσμό αναφοράς. Βιοδοκιμές μπορούν επίσης να γίνουν παρουσία συνεργιστών - ενζυμικών παρεμποδιστών, με σκοπό την εξακρίβωση ή όχι της συμμετοχής ενζύμων αποτοξικοποίησης στο μηχανισμό της ανθεκτικότητας π.χ. εάν η ανθεκτικότητα αναστέλλεται σε κάποιο βαθμό, σημαίνει ότι συμμετέχουν ένζυμα αποτοξικοποίησης.

4.2 Βιοχημικές μέθοδοι

Επιπρόσθετος και συμπληρωματικός τρόπος ανάλυσης της ανθεκτικότητας επιτυγχάνεται με τη χρήση βιοχημικών μεθόδων. Χρησιμοποιώντας συγκεκριμένα υποστρώματα που αφορούν τα κατάλληλα ένζυμα αποτοξικοποίησης μπορεί να γίνει ανάλυση της ενεργότητας των ενζύμων αποτοξικοποίησης (P450s, εστεράσες, τρανσφεράσες της γλουταθειόνης). Με αυτό τον τρόπο μπορούν εν συνεχεία να χρησιμοποιηθούν αυτά τα ένζυμα σαν δείκτες για τη διάγνωσή της ανθεκτικότητας (Stumpf and Nauen 2002), (Khajehali, Van Leeuwen, and Tirry 2009), (Van Pottelberge et al. 2009).

4.3 Κλασική γενετική ανάλυση ανθεκτικότητας

Μια άλλη προσέγγιση για την ανάλυση της ανθεκτικότητας είναι με κλασικές γενετικές διασταυρώσεις. Αυτές μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να καθορισθεί αν ο φαινότυπος της ανθεκτικότητας οφείλεται σε αυτοσωμικά ή φυλετικά γονίδια, αν η ανθεκτικότητα είναι επικρατής, υπολειπόμενη ή ενδιάμεση, αν το φαινόμενο ελέγχεται από ένα ή περισσότερα γονίδια. Ο συνδυασμός διασταυρώσεων, βιοδοκιμών και μοριακών μεθόδων χρησιμοποιείται για να εξακριβώσουμε αν συγκεκριμένες μεταλλαγές σχετίζονται με το φαινότυπο. Η πιο ακριβής προσέγγιση για τη μελέτη της ανθεκτικότητας που σχετίζεται με μεταλλαγές είναι με τη χρήση isogenic στελεχών (Kwon et al, 2010) ή με τη μέθοδο πολλαπλών διασταυρώσεων με ευαίσθητο στέλεχος όπου ένα μικρό τμήμα του χρωμοσώματος που περιλαμβάνει τη μεταλλαγή ενδιαφέροντος εισάγεται σε ευαίσθητο γενετικό υπόβαθρο.

4.4 Μοριακές μέθοδοι ανάλυσης γονιδιακής έκφρασης και μεταλλαγών στόχου, σε σχέση με την ανθεκτικότητα

Δεδομένου ότι γνωρίζουμε αρκετά από τα γονίδια που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα και έχοντας αλληλουχίσει το γονιδίωμα πολλών εντόμων και ακάρεων, μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε μοριακές μεθόδους για την ανάλυση της ανθεκτικότητας. Δηλαδή, γίνεται σύγκριση των αλληλουχιών των γονιδίων στόχων μεταξύ ευαίσθητων και ανθεκτικών ατόμων ανιχνεύοντας μεταλλαγές καθώς και άλλα γονίδια στόχους που σχετίζονται με το φαινότυπο της ανθεκτικότητας. Ακόμα μπορεί να αναπτυχθεί μια μεθοδολογία μελέτης της έκφρασης των γονιδίων στόχων μεταξύ

ευαίσθητων και ανθεκτικών στελεχών έτσι ώστε να βρεθούν τα γονίδια των οποίων η έκφραση σχετίζεται με την ανθεκτικότητα. Έχοντας λοιπόν αυτές τις πληροφορίες, μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη συνέχεια η μέθοδος παρεμβολής RNA, (RNAi), έτσι ώστε να αξιολογηθεί ο λειτουργικός ρόλος των γονιδίων στόχων.

5. Γονιδιακή ρύθμιση

Η έκφραση των γονιδίων ρυθμίζεται από περιοχές που βρίσκονται παρακείμενα στο γονίδιο που εκφράζεται και αυτές ονομάζονται *cis*-ρυθμιστικές περιοχές. Στις περιοχές υπάρχουν τα *cis*-δραστικά στοιχεία, όπως είναι οι υποκινητές (promoters) οι οποίοι φέρουν θέσεις πρόσδεσης για τα *trans*-δραστικά στοιχεία όπως οι μεταγραφικοί παράγοντες. Μεταλλαγές στις *cis*-ρυθμιστικές περιοχές είναι δυνατόν να οδηγήσουν σε αυξημένη έκφραση των γονιδίων αποτοξικοποίησης που συμβάλλει στον φαινότυπο της ανθεκτικότητας.

Παραδείγματος χάριν, στην αφίδα έχει βρεθεί ότι η κυτοχρωμική οξειδάση CYP6CY3 υπερεκφράζεται και αυτό εν μέρει οφείλεται σε μια δι-νουκελοτιδική επανάληψη στον υποκινητή της συγκεκριμένης οξειδάσης (Bass et al., 2013). Επιπρόσθετα, η υπερέκφραση των οξειδασών CYP6AY1 και CYP6ER1 σε ανθεκτικά στελέχη του εντόμου *Nilaparvata lugens* τόσο στο imidacloprid όσο και στο buprofezin έχει συσχετισθεί με μεταλλαγές στον υποκινητή (Pang et al., 2014, Zimmer et al., 2018). Όπως προαναφέρθηκε, η έκφραση των γονιδίων μπορεί να οφείλεται και σε *trans*-δραστικούς παράγοντες. Οι πιο γνωστοί είναι οι CncC και Maf, οι οποίοι για να επάγουν την έκφραση ενός γονιδίου παρουσία ξενοβιοτικών διμερίζονται, με συνέπεια αυτό το σύμπλοκο να προσδένεται σε *cis*-ρυθμιστικές περιοχές και να επάγει την αυξημένη έκφραση του γονιδίου. Στο έντομο αποθηκών *Tribolium castaneum* βρέθηκε πως η υπερέκφραση των οξειδασών CYP6BQ οφείλεται στην πρόσδεση του συμπλόκου CncC και Maf (Kasli and Palli 2015). Τέλος, σε ανθεκτικό στέλεχος τετρανύχου στην ουσία fenpropathrin μελετήθηκαν οι μηχανισμοί που οφείλεται η αυξημένη έκφραση των κυτοχρωμικών οξειδασών και βρέθηκε πως οι υποκινητές των γονιδίων ρυθμίζονται από την πρόσδεση των μεταγραφικών παραγόντων CncC και Maf (Shi et al., 2017).

6. Σκοπός της μελέτης

Ο σκοπός της συγκεκριμένης εργασίας είναι να μελετήσουμε το ρόλο της οξειδάσης CYP392A16 στην ανθεκτικότητα που εμφανίζει ο *Tetranychus urticae* στα ακαρεοκτόνα.

Είναι ήδη γνωστό από τη βιβλιογραφία πως η πρωτεΐνη CYP392A16 εμφανίζει υψηλά επίπεδα έκφρασης σε ανθεκτικούς πληθυσμούς τετρανύχων. Επίσης έχει αποδειχθεί με *in vitro* προσεγγίσεις πως είναι ικανή να μεταβολίζει το ακαρεοκτόνο abamectin σε μια λιγότερο τοξική χημική ένωση (Riga et al. 2014).

Αρχικά λοιπόν, θα ελέγξουμε πως ρυθμίζεται το γονίδιο της CYP392A16. Για να εξακριβώσουμε λοιπόν πώς ρυθμίζεται η συγκεκριμένη οξειδάση (*cis* ή *trans*), ενσωματώνουμε το αλληλόμορφο ενδιαφέροντος από ένα ανθεκτικό πληθυσμό σε ευαίσθητο γενετικό υπόβαθρο. Αυτό θα επιτευχθεί μέσω γενετικών διασταυρώσεων (backcrosses) επί 7-9 γενιές (Tang et al. 2014). Στη συνέχεια με qPCR θα διαπιστώσουμε αν το γονίδιο της CYP392A16 ρυθμίζεται *cis* ή *trans*. Τέλος (σε περίπτωση *cis* ρύθμισης) θέλουμε να δούμε ποια είναι η σχετική συνεισφορά της CYP392A16 στην ανθεκτικότητα που εμφανίζει ο ανθεκτικός πληθυσμός στο εντομοκτόνο-ακαρεοκτόνο abamectin και αυτό θα γίνει μέσω βιοδοκιμών.

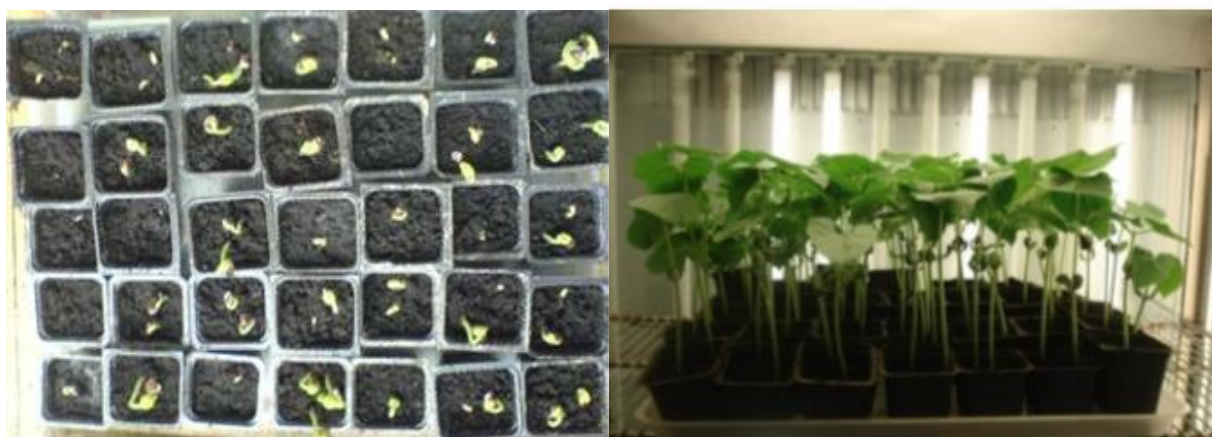
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Πληθυσμοί τετρανύχων

Στη συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν δυο στελέχη τετρανύχου, ένα ανθεκτικό (Μαραθώνας) και ένα ευαίσθητο (Wasatch). Το ανθεκτικό στέλεχος του Μαραθώνα συλλέχθηκε το 2009 από ένα θερμοκήπιο τριανταφυλλιάς - στη περιοχή του Μαραθώνα - και είναι ένα πολυανθεκτικό στέλεχος. Το ευαίσθητο στέλεχος του Wasatch συλλέχθηκε από ένα θερμοκήπιο ντομάτας κοντά στο Salt Lake City, Utah, των ΗΠΑ.

2. Εκτροφές πληθυσμών

Για την εκτροφή των πληθυσμών χρησιμοποιήθηκαν φυτά φασολιού. Οι σπόροι φυτεύονταν σε γλαστράκια και μεταφέρονταν σε θάλαμο ελεγχόμενης θερμοκρασίας (25°C). Αφού μεγαλώσουν τα φυτά, έξι από αυτά τοποθετούνται το ένα δίπλα στο άλλο σε λεκάνη με λίγο νερό και ο κάθε πληθυσμός μεταφέρεται στα φρέσκα αυτά φυτά. Οι λεκάνες διατηρούνταν σε ειδικό θάλαμο ανάπτυξης (growth chamber) με ελεγχόμενες συνθήκες. Για τη συντήρηση των εκτροφών κάθε 5 μέρες περίπου, τα παλιά φύλλα κόβονταν και τοποθετούνταν πάνω στα νέα φυτά έτσι ώστε να γίνει η μετακίνηση των πληθυσμών.



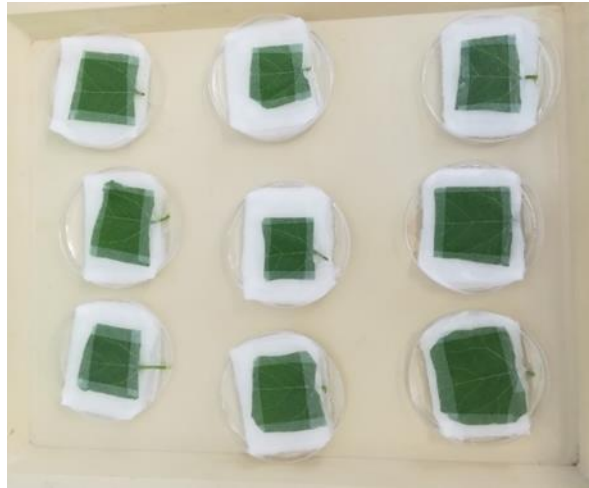
Εικόνα 14: Α: Σπόροι φασολιού και Β: φυτά φασολιού, εντός θαλάμου ελεγχόμενης θερμοκρασίας



Εικόνα 15: Εκτροφή πληθυσμού εντός θαλάμου ανάπτυξης

3. “Καθαρισμός” γενετικού υποβάθρου πληθυσμών

Είκοσι παρθένα θηλυκά (τελειοχρυσαλίδες) από τον κάθε πληθυσμό τοποθετήθηκαν σε τρυβλία με εμποτισμένο βαμβάκι με νερό και πάνω σ' αυτό τοποθετήθηκε φύλλο φασολιού με την κάτω επιφάνεια εφαπτόμενη στο βαμβάκι. Σε κάθε τρυβλίο τοποθετήθηκε ένα παρθένο θηλυκό. Τα τρυβλία παρέμειναν στους 25 °C μέχρι να γεννήσει το κάθε θηλυκό περίπου τριάντα αυγά. Έπειτα τα θηλυκά τοποθετήθηκαν σε καινούργια τρυβλία, ένα ανά τρυβλίο, και μεταφέρθηκαν στους 8°C μέχρι να εκκολαφθούν τα αυγά και να προκύψουν οι αρσενικοί απόγονοι (αρρενοτόκος παρθενογένεση). Στους 8°C η ανάπτυξη περιορίζεται και τα θηλυκά μπορούν να παραμείνουν ζωντανά μέχρι να γίνουν ώριμα άτομα οι αρσενικοί απόγονοι. Καθημερινά ελέγχονταν στο στερεοσκόπιο τόσο τα θηλυκά άτομα όσο και οι απόγονοι για να είμαστε βέβαιοι για την επιβίωσή τους. Έπειτα στο κάθε τρυβλίο, με το θηλυκό άτομο, τοποθετήσαμε τυχαία ένα αρσενικούς τους απογόνους και τους αφήσαμε να ζευγαρώσουν (25°C). Καθημερινά και πάλι ελέγχονταν στο στερεοσκόπιο όλα τα τρυβλία και γινόταν καταμέτρηση των αυγών. Όταν ο αριθμός των αυγών ήταν περίπου τριάντα, συλλέχθηκαν ξεχωριστά οι δύο πλέον γονείς και τοποθετήθηκαν με τη βοήθεια πινέλου σε 1,5ml eppendorf tubes για περαιτέρω ανάλυση.

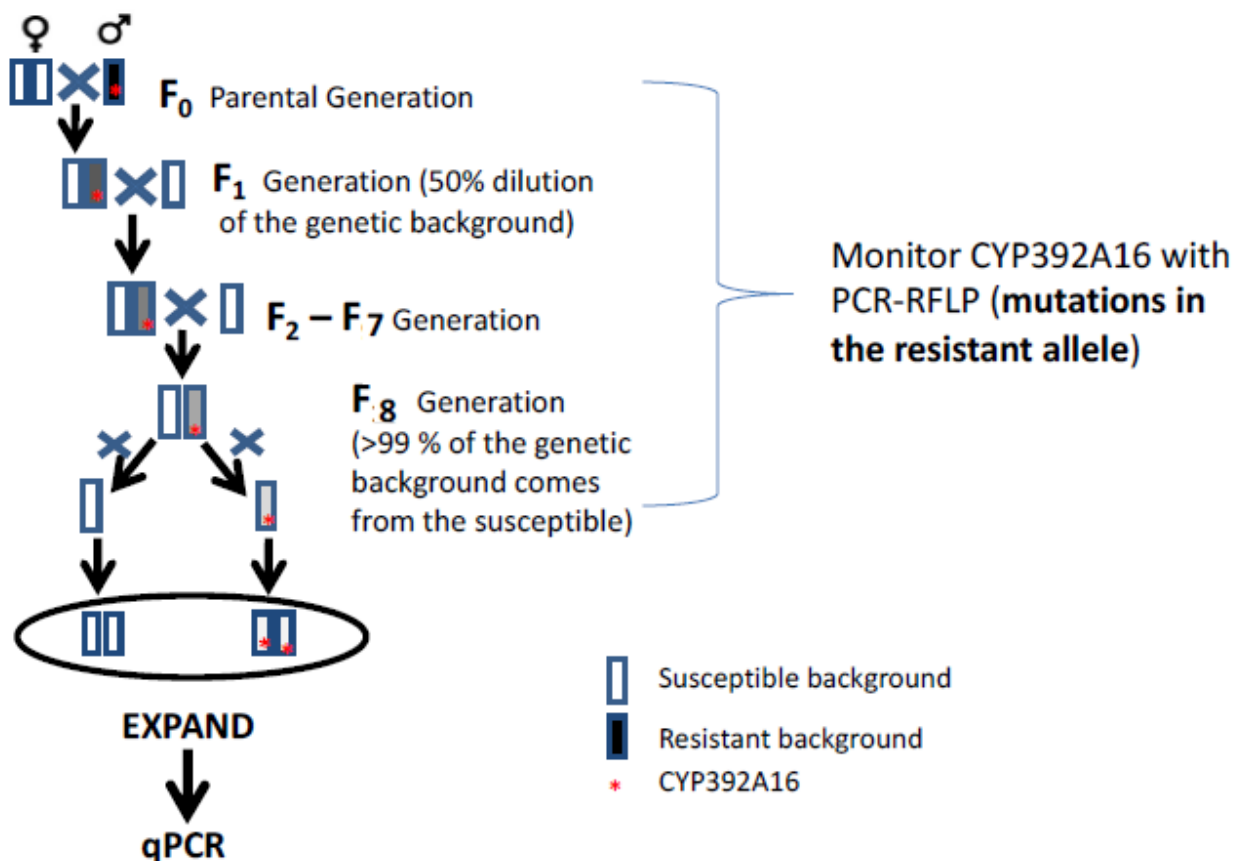


Εικόνα 16: Τρυβλία με φύλλα φασολιού στα οποία θα τοποθετηθούν τα παρθένα θηλυκά

4. Γενετικές διασταυρώσεις

Για τη μελέτη της ρύθμισης του γονιδίου *cyp392a16* έγιναν γενετικές διασταυρώσεις, με σκοπό την ενσωμάτωση (integration) του γονιδίου-αλληλομόρφου *cyp392a16* από τον ανθεκτικό πληθυσμό σε ευαίσθητο γενετικό υπόβαθρο.

Εν συντομία, οι γενετικές διασταυρώσεις που ακολουθούμε για βρούμε πως ρυθμίζεται το γονίδιο *cyp392a16* έχουν ως εξής. Ένα απλοειδές αρσενικό του ανθεκτικού στελέχους διασταυρώνεται με ένα παρθένο θηλυκό του ευαίσθητου στελέχους. Τα προκύπτοντα ετερόζυγα παρθένα θηλυκά διασταυρώνονται με ευαίσθητα αρσενικά και οι γονότυποι των ετερόζωγων ατόμων ταυτοποιούνται με PCR/RFLP. Αυτή η διαδικασία επαναλαμβάνεται για επτά έως εννέα γενιές. Στην τελευταία γενιά, διασταυρώνονται ετερόζυγα παρθένα θηλυκά με τους πρώτους γεννημένους γιους τους που αντιπροσωπεύουν είτε ευαίσθητο (απουσία μετάλλαξης) είτε ανθεκτικό (παρουσία μετάλλαξης) γονότυπο. Έτσι τελικά θα οδηγηθούμε σε ομόζυγα άτομα για το αλληλόμορφο που προέρχεται από τον ανθεκτικό πληθυσμό καθώς επίσης και σε ομόζυγα άτομα για το αλληλόμορφο που προέρχεται από τον ευαίσθητο πληθυσμό (Tang et al. 2014).



Εικόνα 17: Διαγραμματική απεικόνιση γενετικών διασταυρώσεων (adapted 2016_PhD_Maria Riga_)

5. Απομόνωση DNA

Η απομόνωση του γενωμικού υλικού πραγματοποιήθηκε σε μοναδιαία άτομα, θηλυκά ή/και αρσενικά άτομα (τόσο κατά τη διαδικασία του “καθαρισμού” των στελεχών όσο και κατά τις διασταυρώσεις). Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε ήταν το εξής. Προσθήκη 20μl direct PCR Buffer (10Mm Tris-HCl pH7-8, 100Mm NaCl, 1Mm EDTA pH8) και 2μl proteinate K (10mg/ml) σε κάθε eppendorf tube. Ακολούθως ομογενοποιείται το δείγμα με τη βοήθεια ενός pestle και του ομογενοποιητή (grinder). Στη συνέχεια ανακινούμε καλά και επωάζουμε για 30 λεπτά στους 37°C. Ακολούθως επωάζουμε για 5 λεπτά στους 95 °C. Τέλος τοποθετούμε τα δείγματά μας απευθείας στον πάγο ή τα αποθηκεύουμε στους -80°C για μελλοντική χρήση.

Όταν χρειάστηκε να γίνει απομόνωση γενωμικού υλικού από pool πληθυσμών ακολουθήθηκε η μέθοδος απομόνωσης με τη χρήση της CTAB μεθόδου (Navajas, 1998). Εν συντομία, διάλυμα ομογενοποίησης αποτελείται από 2% CTAB, 20 mM EDTA, 1,4 M NaCl, 100 mM TrisHCl, 0,2% β-mercaptoethanol. Σε κάθε eppendorf tube προστίθενται 50μl διαλύματος και ομογενοποιείται το δείγμα. Έπειτα, προσθέτουμε 150μl ώστε να έχουμε τελικό όγκο 200μl και το επωάζουμε στους 65°C για 15 λεπτά. Στην συνέχεια προσθέτουμε 200μl ισοαμλική αλκοόλη: χλωροφόρμιο (1:24), ανακινούμε καλά και φυγοκεντρούμε για 10 λεπτά στις 8000 rpm στους 25°C . Μεταφέρουμε την πάνω φάση σε ένα καινούργιο eppendorf tube, προσθέτουμε ίσο όγκο ισοπροπανόλης και επωάζουμε στους -20°C για 30-60 λεπτά. Στην συνέχεια φυγοκεντρούμε σε μέγιστη ταχύτητα για 15 λεπτά στους 4°C . Αφαιρούμε την ισοπροπανόλη, προσθέτουμε 70% παγωμένη αιθανόλη και φυγοκεντρούμε στους 4°C σε μέγιστη ταχύτητα για 15 λεπτά. Τέλος, αφαιρούμε την αιθανόλη και στεγνώνουμε την πελέτα στους 55 °C για 5 λεπτά. Επαναδιαλύουμε την πελέτα σε 20μl dd H₂O.

6. PCR, καθαρισμός προϊόντος και αλληλούχιση

Χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της PCR με σκοπό την ανάκτηση και ενίσχυση τμήματος ή/και ολόκληρου του γονιδίου *cyp392a16* (τόσο κατά τη διαδικασία του “καθαρισμού” των στελεχών όσο και κατά τις γενετικές διασταυρώσεις). Για την κάθε αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν:

Πίνακας 1: Αντίδραση για ενίσχυση τμήματος γονιδίου *cyp392a16*

5x phusion Minotech Buffer	6μl
10x mM dNTPs	0,6μl
10μM A16ext_F	1,5μl
10μM A16ext_R primer	1,5μl
Template	1μl
HF phusion Minotech Taq polymerase	0,3μl
H ₂ O	19,1μl

Οι συνθήκες της αντίδρασης για ανάκτηση και ενίσχυση τμήματος γονιδίου *cyp392a16* ήταν οι εξής: αποδιάταξη στους 98°C για 30 δευτερόλεπτα, ακολουθούμενο από 40 κύκλους των βημάτων αποδιάταξη στους 98°C για 10 δευτερόλεπτα, υβριδισμός εκκινητών στους 55°C για 30 δευτερόλεπτα, επιμήκυνση στους 72°C για 20 δευτερόλεπτα και τελική επιμήκυνση στους 72°C για 5 λεπτά.

Πίνακας 2: Αντίδραση για ενίσχυση ολόκληρου του γονιδίου cyp392a16

10x BufferA	5μl
10x mM dNTPs	1μl
10μM A16_TOPOFal	2μl
10μM A16_TOPO_R	2μl
Template	2μl
Kapa Taq polymerase	0,3μl
H ₂ O	37,7μl

Πίνακας 3: Αλληλουχίες εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάκτηση και ενίσχυση τμήματος του γονιδίου cyp392a16, καθώς και για ολόκληρο το γονίδιο cyp392a16

Εκκινητής	Αλληλουχία (5'→3')	
A16_ext_F	CGTCGATACACATATTCAAGATGA	Προϊόν 382bp
A16_ext_R	ATTGTTTGCAACAACAGAACC	
A16_TOPOFal	ATGTTTTTAATTAGTAATTTGCTGTCAT	Προϊόν 1512bp
A16_TOPO_R	TTAGTTGGAATTGGAAATTTTCTC	

Οι συνθήκες της αντίδρασης για ανάκτηση και ενίσχυση ολόκληρου του γονιδίου cyp392a16 ήταν οι εξής: αποδιάταξη στους 95°C για 5 λεπτά, ακολουθούμενο από 40 κύκλους των βημάτων αποδιάταξη στους 95°C για 30 δευτερόλεπτα, υβριδισμός εκκινητών στους 50°C για 40 δευτερόλεπτα, επιμήκυνση στους 72°C για 2 λεπτά και τελική επιμήκυνση στους 72°C για 4 λεπτά.

Ο καθαρισμός των προϊόντων έγινε με εμπορικό kit (Macherey-Nagel™ NucleoSpin™ Gel and PCR Clean-up Kit) και ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο που παρέχει η εταιρεία.

Τέλος τα δείγματα ετοιμάστηκαν ανάλογα με τις οδηγίες της εταιρείας (CEMIA) και στάλθηκαν για αλληλούχιση.

7. Πέψη του προϊόντος της PCR με το περιοριστικό ένζυμο SspI

Για την ανίχνευση των ετερόζυγων θηλυκών ατόμων τόσο κατά τη διαδικασία του “καθαρισμού” των στελεχών όσο και κατά τις γενετικές διασταυρώσεις ακολουθούσε την αντίδραση PCR η πιο κάτω αντίδραση πέψης με επώαση στους 37°C για 2 ώρες και ακολούθως άλλη μια επώαση στους 65°C για 10 λεπτά. Το αλληλόμορφο ενδιαφέροντος του ανθεκτικού πληθυσμού φέρει SNP στο σημείο κοπής του περιοριστικού ενζύμου με αποτέλεσμα να μην κόβεται από αυτό.

Πίνακας 4: Αντίδραση πέψης με το περιοριστικό ένζυμο SspI

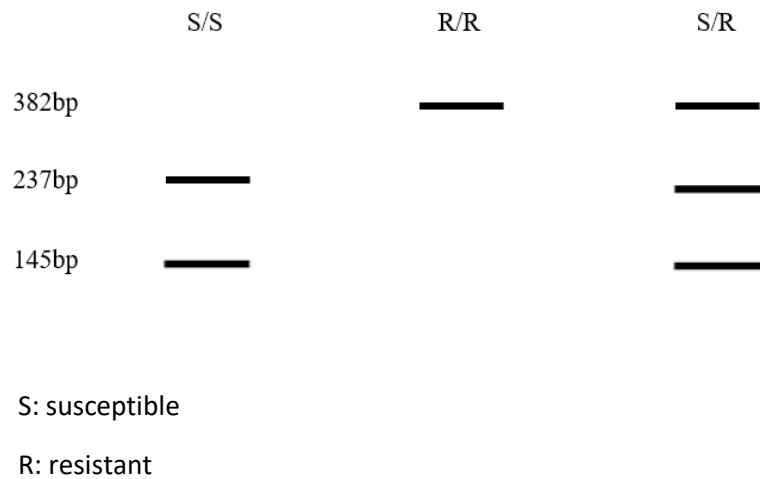
SspI Buffer (high Minotech)	3μl
10x BSA	3μl
PCR product	15μl
SspI 100u/μl	1μl
H ₂ O	8μl



Εικόνα 18: Σημείο κοπής του περιοριστικού ενζύμου SspI

A16_resistant
 GGACGATAAATTTACCATTTAAATATATTGAAACGAAATGCTGGT
 GGACGATAAATTTACCATTTGAAATATTGAGACGCAATGCTGGT
 A16_susceptible

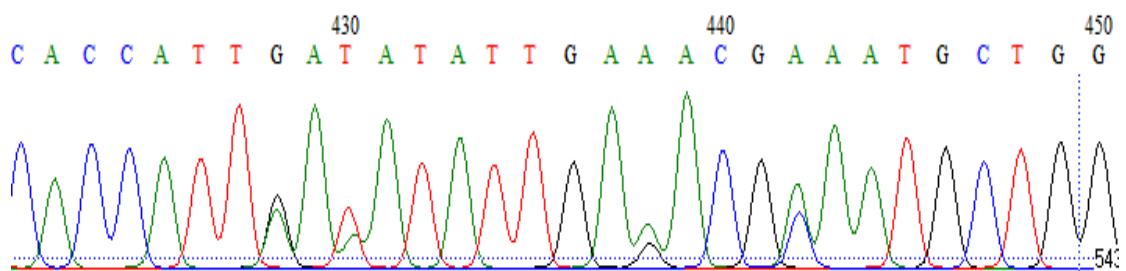
Εικόνα 19: SNP που εμφανίζει ο ανθεκτικός πληθυσμός στο σημείο κοπής του SspI περιοριστικού ενζύμου



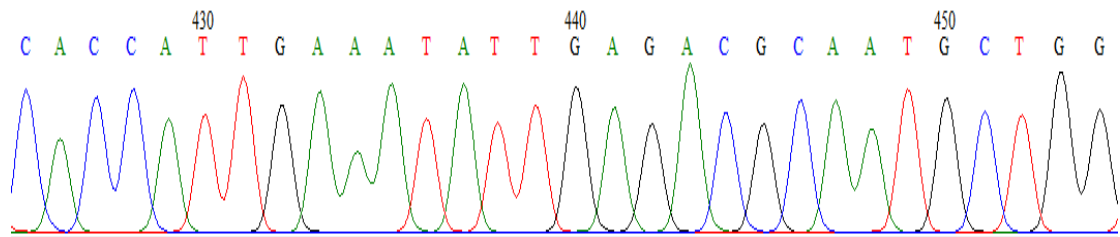
Εικόνα 20: Αναμενόμενο πρότυπο πέψης σε τζελ αγαρόζης με το περιοριστικό ένζυμο SspI

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

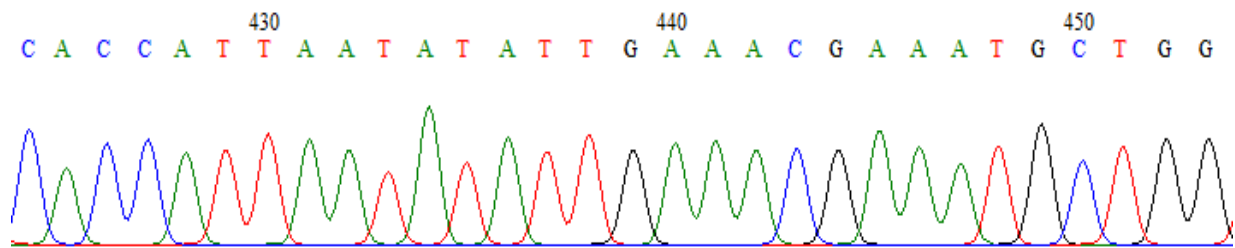
Αρχικά στάλθηκαν δείγματα και από τους δυο πληθυσμούς (Μαραθώνας, Wasatch) για αλληλούχιση για ολόκληρο το γονίδιο *cyp392a16*. Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης έδειξαν ότι ο πληθυσμός Wasatch φέρει δύο διαφορετικά αλληλόμορφα για το γονίδιο *cyp392a16* όπως παρατηρήθηκε από την εμφάνιση δυο κορυφών στην ίδια νουκλεοτιδική θέση από το χρωματογράφημα (εικόνα 21). Έτσι (με τη διαδικασία του “καθαρισμού” του γενετικού υποβάθρου) δημιουργήθηκε ένα στέλεχος το οποίο φέρει μόνο το αλληλόμορφο αγρίου τύπου σύμφωνα με το γονιδίωμα του τετρανύχου. Μετά τον καθαρισμό, δείγμα 50 ατόμων χρησιμοποιήθηκε για απομόνωση DNA, πολλαπλασιασμό του γονιδίου *cyp392a16* και στάλθηκε εν τέλη για αλληλούχιση. Όπως φαίνεται στην εικόνα 22 τα αποτελέσματα της αλληλούχισης υπέδειξαν ότι το πλέον δημιουργηθέν στέλεχος φέρει μόνο το αγρίου τύπου αλληλόμορφο. Απόγονοι από αυτόν τον πληθυσμό (που φέρει σε ομοζυγωτία το ευαίσθητο αλληλόμορφο) πολλαπλασιάστηκαν και στην συνέχεια επιλέχθηκαν παρθένα θηλυκά για τις γενετικές διασταυρώσεις.



Εικόνα 21: Τμήμα αλληλουχίας Wasatch με τα δυο αλληλόμορφα για το γονίδιο *cyp392a16* (πριν τον “καθαρισμό” του γενετικού υποβάθρου)



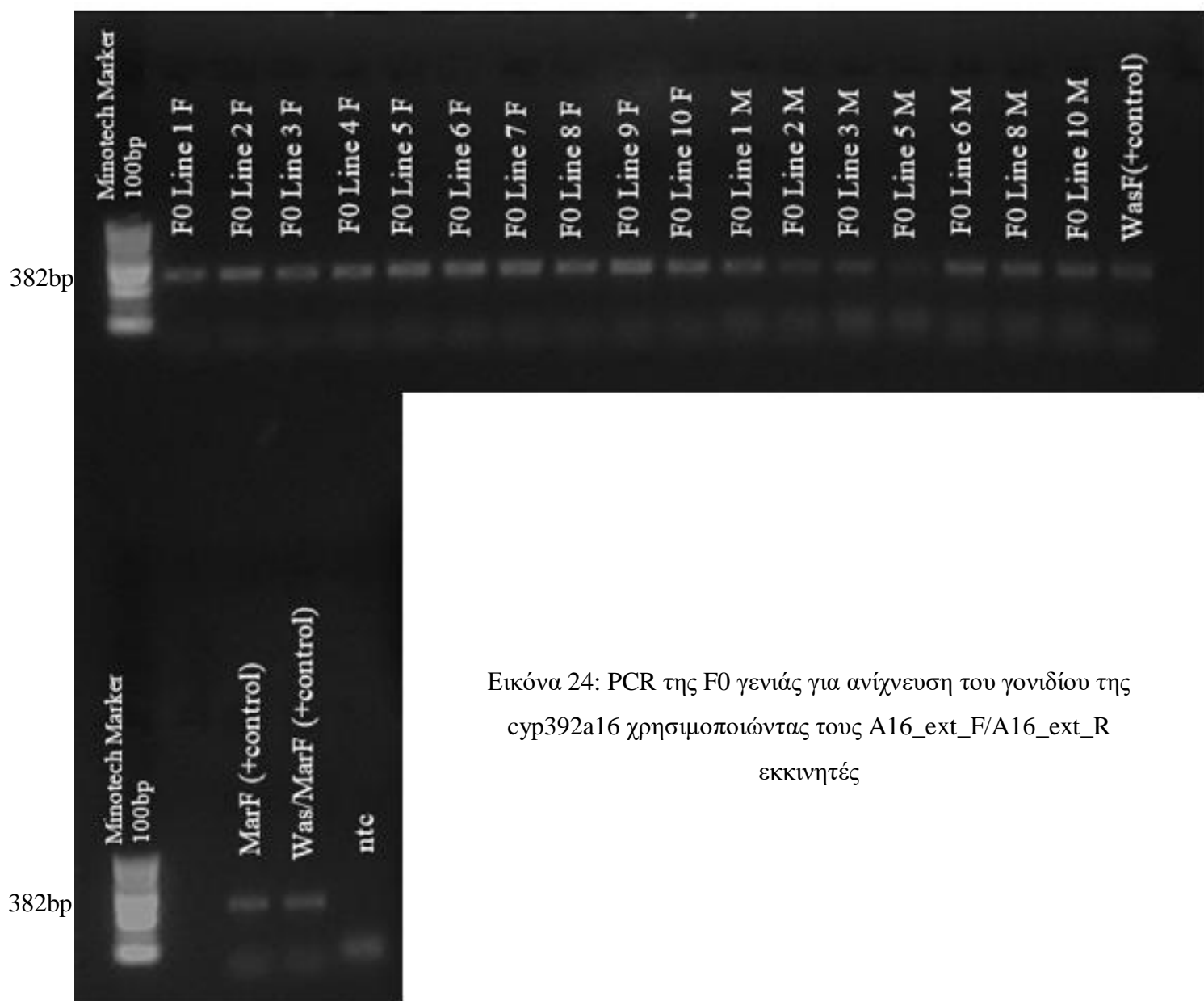
Εικόνα 22: Τμήμα αλληλουχίας Wasatch με το ευαίσθητο αλληλόμορφο για το γονίδιο *cyp392a16* (μετά τον “καθαρισμό” του γενετικού υποβάθρου)



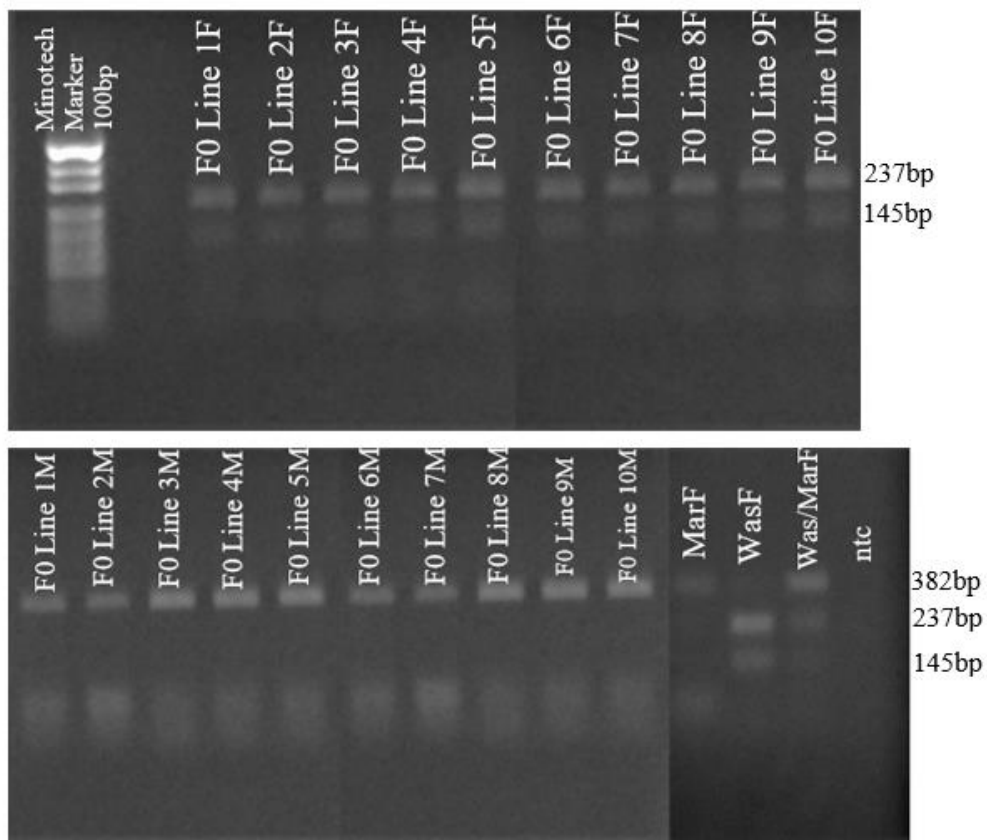
Εικόνα 23: Τμήμα αλληλουχίας Μαραθώνα με το ανθεκτικό αλληλόμορφο για το γονίδιο *cyp392a16*

Γενετικές Διασταυρώσεις

Στην πατρική γενιά (F0) διασταυρώθηκαν ευαίσθητα θηλυκά με ανθεκτικά αρσενικά και όπως ήταν αναμενόμενο όλα τα θηλυκά άτομα είχαν πρότυπο πέψης ευαίσθητου γονοτύπου ενώ όλα τα αρσενικά άτομα είχαν ανθεκτικού γονοτύπου.

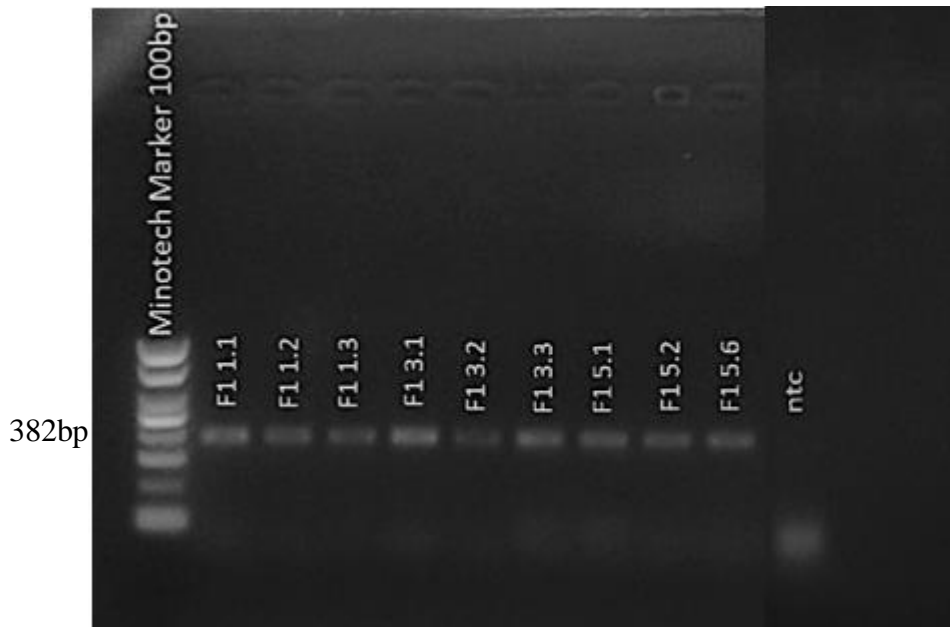


Εικόνα 24: PCR της F0 γενιάς για ανίχνευση του γονιδίου της *cy392a16* χρησιμοποιώντας τους A16_ext_F/A16_ext_R εκκινητές

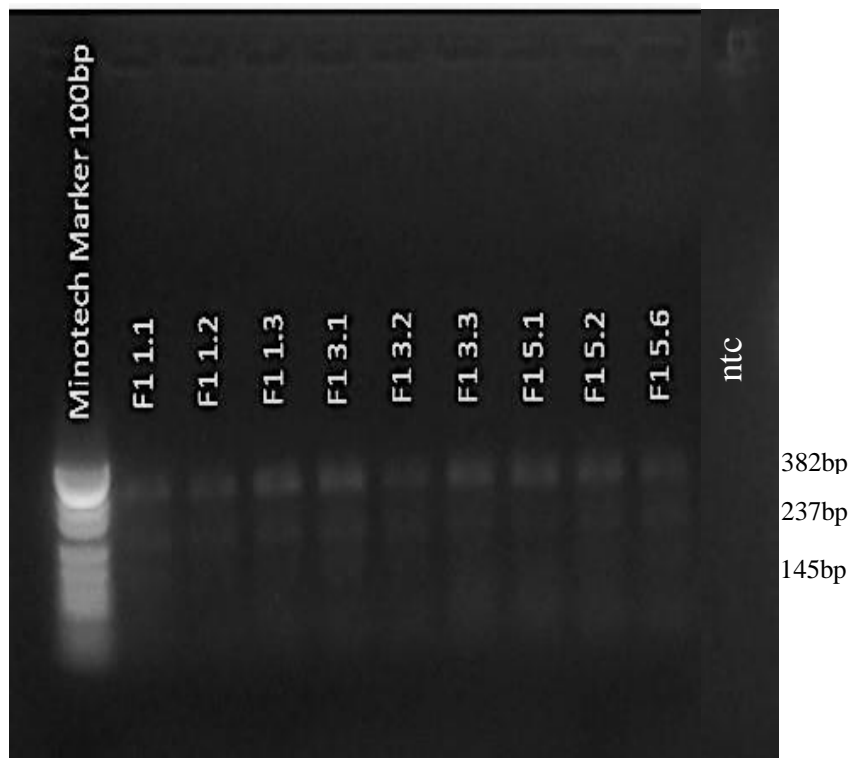


Εικόνα 25: Πέψη του προϊόντος της PCR με το περιοριστικό ένζυμο SspI σε άτομα της F0 γενιάς.

Στην πρώτη γενιά (F1) όλα τα άτομα όπως ήταν αναμενόμενο ήταν ετερόζυγα, αφού προέκυψαν από τη διασταύρωση ενός ευαίσθητου θηλυκού ατόμου με ένα ανθεκτικό αρσενικό άτομο

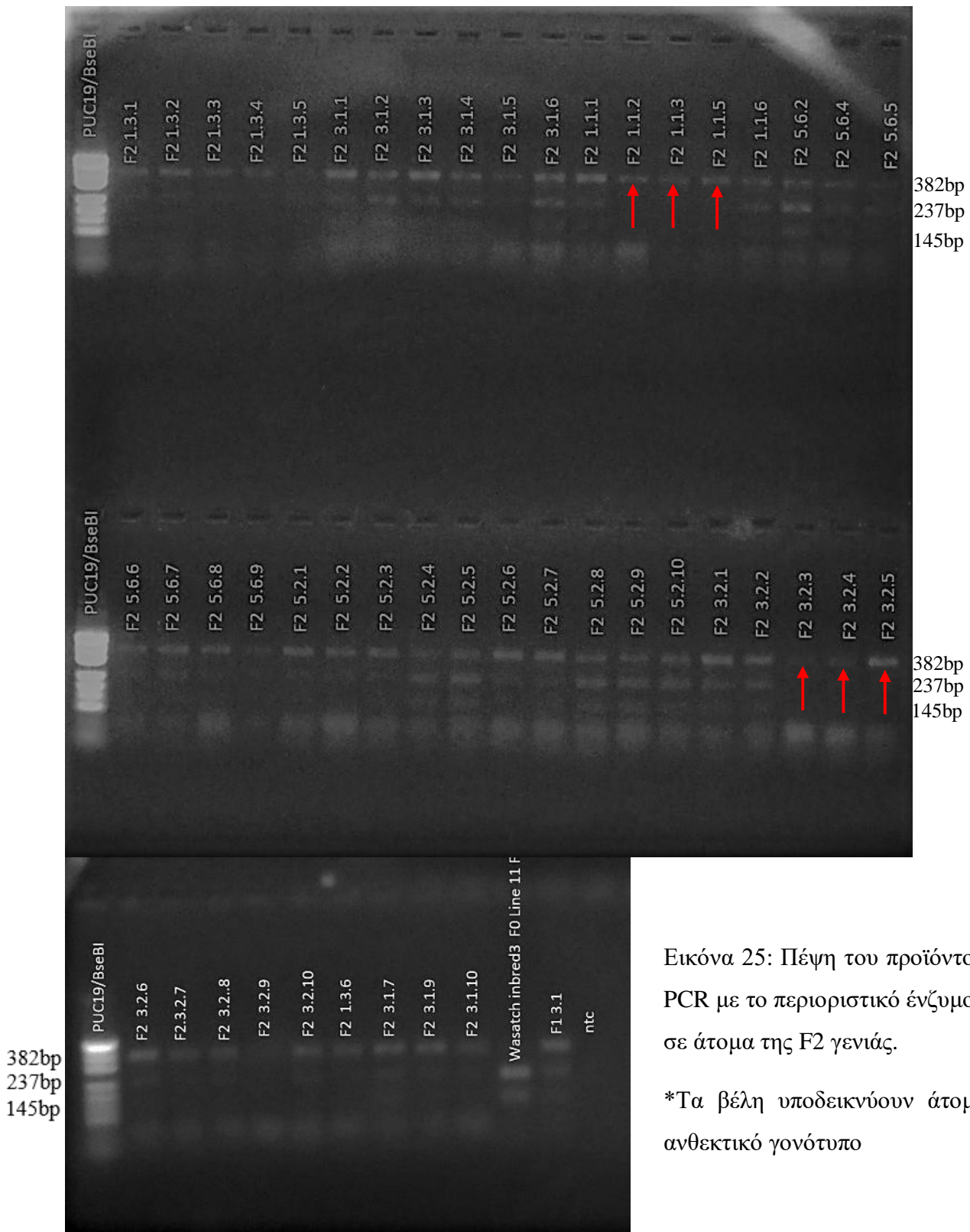


Εικόνα 26: PCR της F1 γενιάς για ανίχνευση του γονιδίου της *cyp392a16* χρησιμοποιώντας τους A16_ext_F/A16_ext_R εκκινητές



Εικόνα 27: Πέψη του προϊόντος της PCR με το περιοριστικό ένζυμο *SspI* σε άτομα της F1 γενιάς

Στη δεύτερη η γενιά (F2) αναμένονταν θηλυκά άτομα, ευαίσθητα ομόζυγα και ετερόζυγα. Μέσω της πέψης με το περιοριστικό ένζυμο, όμως εμφανίστηκε για κάποια θηλυκά άτομα σήμα, που είχε το πρότυπο ανθεκτικού ατόμου. Αυτό έδειξε κάποιου είδους μόλυνση (πιθανά από τα πινέλα που χρησιμοποιούνταν για τη μεταφορά ατόμων) μέσα στον ευαίσθητο πληθυσμό που χρησιμοποιήθηκε για τις διασταυρώσεις. Έτσι, η πειραματική διαδικασία άρχισε ξανά από την αρχή με το πρώτο βήμα, “Καθαρισμός” γενετικού υποβάθρου πληθυσμών .



Εικόνα 25: Πέψη του προϊόντος της PCR με το περιοριστικό ένζυμο SspI σε άτομα της F2 γενιάς.

*Τα βέλη υποδεικνύουν άτομα με ανθεκτικό γονότυπο

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εντάσσεται στο γενικότερο πλαίσιο της ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα. Συγκεκριμένα, ως οργανισμός-μοντέλο χρησιμοποιήθηκε ο *Tetranychus urticae*, ένα πολυφάγο, φυτοφάγο άκαρι παγκόσμιας εξάπλωσης (“UF/IFAS - University of Florida, Institute of Food and Agricultural Sciences” n.d.).

Η κύρια μέθοδος καταπολέμησής του είναι η χρήση εντομοκτόνων / ακαρεοκτόνων ουσιών (Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2007). Όμως, η εντατική χρήση των εντομοκτόνων σε συνδυασμό με τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του, όπως ο σύντομος κύκλο ζωής, το υψηλό αναπαραγωγικό δυναμικό, οι πολλές γενεές μέσα στο χρόνο και η αρρενοτόκος παρθενογένεση του οργανισμού αυτού, συμβάλλουν αποτελεσματικά στην εμφάνιση υψηλών επιπέδων ανθεκτικότητας σε ένα μεγάλο αριθμό εντομοκτόνων / ακαρεοκτόνων, όπως αβερμεκτίνες, mitochondrial electron transport inhibitor (METIs) και πυρεθροειδή (Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2007).

Εξαιτίας των παραπάνω χαρακτηριστικών του, της εύκολης διατήρησής του σε εργαστηριακές συνθήκες καθώς επίσης και το ότι είναι οργανισμός οικονομικής σημασίας, αποτελεί ένα ιδανικό μοντέλο για τη μελέτη του φαινομένου της ανθεκτικότητας. Η ανθεκτικότητα του τετρανύχου στα εντομοκτόνα σχετίζεται τόσο με τη μεταβολική ανθεκτικότητα (υπερέκφραση ενζύμων αποτοξικοποίησης) όσο και με τις αλλαγές στο στόχο του εντομοκτόνου (ανθεκτικότητα στόχου) (Βόντας κ.α., 2007, Van Leeuwen et al. 2010).

Στη συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιήθηκε ένας Ελληνικός πληθυσμός τετρανύχου, ο Μαραθώνας, που είναι ανθεκτικός στις αβερμεκτίνες, αλλά και σε άλλα εντομοκτόνα. Συλλέχθηκε από θερμοκηπιακή καλλιέργεια τριανταφυλλιάς στο Μαραθώνα Αττικής και φέρει ένα ιδιαίτερα επιβαρυσμένο ιστορικό καταπολέμησης. Το ακαρεοκτόνο abamectin στο οποίο μεταξύ άλλων είναι ανθεκτικός ο πληθυσμός αυτός ανήκει στις αβερμεκτίνες και είναι μίγμα φυσικών τοξικών ουσιών που παράγονται από το μύκητα *Streptomyces avermities* (Stumpf and Nauen 2002). Η ουσία αυτή δρα αυξάνοντας την έκλυση γ-αμινοβουτυρικού οξέος (GABA) και τη ροή ιόντων γλωρίου (GluCl) στο νευρικό σύστημα με αποτέλεσμα να επέρχεται υπερδιέγερση, παράλυση και εν τέλη ο θάνατος. Ο φαινότυπος της ανθεκτικότητας του τετρανύχου στις αβερμεκτίνες

εμφανίζει ενδιάμεση κυριαρχία και οφείλεται στη δράση πολλών γονιδίων (Van Leeuwen et al. 2009).

Τοξικολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι ο πληθυσμός Μαραθώνας είναι 1500 φορές πιο ανθεκτικός στο abamectin από έναν κανονικό πληθυσμό. Ο πληθυσμός αυτός δηλαδή χρειάζεται 1500 φορές υψηλότερη δόση για να θανατωθεί σε σχέση με ένα ευαίσθητο πληθυσμό (2016_PhD_Maria Riga). Η ανθεκτικότητα στη δραστική αυτή ουσία έχει συσχετιστεί με μεταλλαγές σε δυο από τα πέντε γονίδια που κωδικοποιούν για τα κανάλια χλωρίου, GluCl1 και GluCl3 (glutamate gated chloride channels) οι οποίες είναι G314D, G326E αντίστοιχα (Dermauw et al. 2012). Μεταγενέστερη μελέτη έδειξε ότι ο Μαραθώνας/ανθεκτικό στέλεχος υπερεκφράζει το γονίδιο *cyp362a16*. (Riga et al. 2014)

Σκοπός της μελέτης ήταν η συνολική γενετική αξιολόγηση του ρόλου της οξειδάσης CYP392A16 στην ανθεκτικότητα του *Tetranychus urticae* στα ακαρεοκτόνα.

Αρχικά έπρεπε να δούμε πως ρυθμίζεται το συγκεκριμένο γονίδιο (*cyp392a16*). Η ρύθμιση μπορεί να είναι *cis* ή *trans*. Αν η ρύθμιση γίνεται *cis* τότε μιλάμε για κάποια μεταλλαγή εντός της *cis*-ρυθμιστικής περιοχής (υποκινητής) του γονιδίου *cyp392a16* η οποία θα κληρονομηθεί (με το γονίδιο) μέσω των γενετικών διασταυρώσεων στην επόμενη γενιά. Σε αυτή την περίπτωση αναμένουμε ότι τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης (γονιδίου) στον ανθεκτικό πληθυσμό (Μαραθώνα) και στο νέο πληθυσμό (που φέρει το ανθεκτικό γονίδιο- αλληλόμορφο *cyp392a16* σε ευαίσθητο γενετικό υπόβαθρο) θα είναι τα ίδια και υψηλότερα σε σχέση με τον ευαίσθητο πληθυσμό. Έτσι στη συνέχεια απαραίτητες θα είναι οι βιοδοκιμές τοξικότητας στους δύο αυτούς πληθυσμούς, οι οποίες θα μας δείξουν εν τέλει τη συνεισφορά της CYP392A16 στο φαινότυπο ανθεκτικότητας που εμφανίζει ο ανθεκτικός πληθυσμός στο εντομοκτόνο abamectin.

Αν όμως η ρύθμιση γίνεται *trans* τότε μιλάμε για κάποια μεταλλαγή η οποία επηρεάζει είτε την *trans*-ρυθμιστική περιοχή είτε ένα *trans* acting παράγοντα (κωδική του περιοχή) ή/και τα επίπεδα έκφρασης του (ρυθμιστική του περιοχή). Έτσι, παρόλο που θα μεταφέρουμε το γονίδιο *cyp392a16* μέσω διασταυρώσεων, δε θα μεταφερθεί ο γενετικός τόπος που επηρεάζει τη ρύθμιση του *cyp392a16*. Σε αυτή την περίπτωση αναμένουμε ότι τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης στον ανθεκτικό πληθυσμό και στο

νέο πληθυσμό (που θα φέρει το ανθεκτικό γονίδιο *cyp392a16* σε ευαίσθητο γενετικό υπόβαθρο) θα διαφέρουν.

Εν συντομία, οι γενετικές διασταυρώσεις που ακολουθούμε για βρούμε πως ρυθμίζεται το γονίδιο *cyp392a16* έχουν ως εξής. Ένα απλοειδές αρσενικό του ανθεκτικού στελέχους διασταυρώνεται με ένα παρθένο θηλυκό του ευαίσθητου στελέχους. Τα προκύπτοντα ετερόζυγα παρθένα θηλυκά διασταυρώνονται με ευαίσθητα αρσενικά και οι γονότυποι των ετερόζωγων ατόμων ταυτοποιούνται με PCR/RFLP. Αυτή η διαδικασία επαναλαμβάνεται για επτά έως εννέα γενιές. Στην τελευταία γενιά, διασταυρώνονται ετερόζυγα παρθένα θηλυκά με τους πρώτους γεννημένους γιους τους που αντιπροσωπεύουν είτε ευαίσθητο (απουσία μετάλλαξης) είτε ανθεκτικό (παρουσία μετάλλαξης) γονότυπο. Έτσι τελικά θα οδηγηθούμε σε ομόζυγα άτομα για το αλληλόμορφο που προέρχεται από τον ανθεκτικό πληθυσμό καθώς επίσης και σε ομόζυγα άτομα για το αλληλόμορφο που προέρχεται από τον ευαίσθητο πληθυσμό (Tang et al. 2014).

Κατά τη διαδικασία του εντοπισμού γονοτύπου και πιο συγκεκριμένα, στην F2 γενιά, υπήρξε μόλυνση ανάμεσα στα άτομα των δυο πληθυσμών. Αυτό γιατί προέκυψαν άτομα με το ανθεκτικό αλληλόμορφο σε ομοζυγωτία, τα οποία δεν ήταν αναμενόμενα αφού προέρχονταν από διασταύρωση ανάμεσα σε ετερόζυγο θηλυκό και ευαίσθητο αρσενικό. Έτσι χρειάστηκε να γίνει πολύ προσεκτικός “καθαρισμός” του γενετικού υποβάθρου όλων πληθυσμών (inbreeding) του εργαστηρίου, για να ήμαστε βέβαιοι για τα αλληλόμορφα που φέρει ο κάθε πληθυσμός και στη συνέχεια να γίνουν οι γενετικές διασταυρώσεις.

Πιθανότατα στο άμεσο μέλλον θα καθαριστεί και θα χρησιμοποιηθεί άλλο ευαίσθητο στέλεχος αντί του συγκεκριμένου (Wasatch). Αυτό γιατί σε παράλληλες πειραματικές διαδικασίες φάνηκε να είναι ετερόζυγος. Έτσι, επιπλέον στελέχη θα ελεγχθούν γονοτυπικά για το αλληλόμορφο της *CYP392A16* που φέρουν, και στη συνέχεια θα λάβουν χώρα οι γενετικές διασταυρώσεις που περιγράφηκαν πιο πάνω. Στο τέλος αυτής της διαδικασίας θα προκύψει ένα στέλεχος που θα είναι ομόζυγο για το αλληλόμορφο της *CYP392A16* από τον ανθεκτικό πληθυσμό και ένα άλλο στέλεχος που θα είναι ομόζυγο για το αγρίου τύπου αλληλόμορφο της *CYP392A16*. Τα δύο αυτά στελέχη θα χρησιμοποιηθούν σε πειράματα qPCR έτσι ώστε να ελεγχθεί αν η ρύθμιση του γονιδίου γίνεται από *cis* ή *trans* ρυθμιστικά στοιχεία. Έπειτα θα

μελετηθούν οι μεταγραφικοί παράγοντες που οδηγούν στην αυξημένη έκφραση του γονιδίου αυτού και θα μελετηθεί η σχετική συνεισφορά του στο φαινότυπο ανθεκτικότητας.

Μέσω αυτών των πειραμάτων θα αναδυθεί νέα γνώση η οποία αφενός θα βοηθήσει στην κατανόηση των μηχανισμών ανθεκτικότητας και της ρύθμισης τους και αφετέρου θα υποστηρίξει καινοτόμες εφαρμογές φυτοπροστασίας για τη διαχείριση της ανθεκτικότητας.

BIBΛIOΓΡΑΦΙΑ

- “Abamectin.” 2019. In *Wikipedia*.
<https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Abamectin&oldid=898924862>.
- Beers, E. H., H. Riedl, and J. E. Dunley. 1998. “Resistance to Abamectin and Reversion to Susceptibility to Fenbutatin Oxide in Spider Mite (Acari: Tetranychidae) Populations in the Pacific Northwest.” *Journal of Economic Entomology* 91 (2): 352–60. <https://doi.org/10.1093/jee/91.2.352>.
- Belgium, Gilles San Martin from Namur. 2010. *Eggs of the Spider Mite Tetranychus Urticae*. Tetranychus urticae eggs Uploaded by Jacopo Werther.
[https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Tetranychus_urticae_eggs_\(4883553001\).jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Tetranychus_urticae_eggs_(4883553001).jpg).
- Campos, Francisca, Richard A. Dybas, and David A. Krupa. 1995. “Susceptibility of Twospotted Spider Mite (Acari: Tetranychidae) Populations in California to Ahamectin.” *Journal of Economic Entomology* 88 (2): 225–31.
<https://doi.org/10.1093/jee/88.2.225>.
- Campos, Francisca, David A. Krupa, and Richard A. Dybas. 1996. “Susceptibility of Populations of Twospotted Spider Mites (Acari: Tetranychidae) from Florida, Holland, and the Canary Islands to Abamectin and Characterization of Abamectin Resistance.” *Journal of Economic Entomology* 89 (3): 594–601.
<https://doi.org/10.1093/jee/89.3.594>.
- Clark, J. M., J. G. Scott, F. Campos, and J. R. Bloomquist. 1995. “Resistance to Avermectins: Extent, Mechanisms, and Management Implications.” *Annual Review of Entomology* 40: 1–30.
<https://doi.org/10.1146/annurev.en.40.010195.000245>.
- Daborn, P. J. 2002. “A Single P450 Allele Associated with Insecticide Resistance in Drosophila.” *Science* 297 (5590): 2253–56.
<https://doi.org/10.1126/science.1074170>.
- Dermauw, W., A. Ilias, M. Riga, A. Tsagkarakou, M. Grbić, L. Tirry, T. Van Leeuwen, and J. Vontas. 2012. “The Cys-Loop Ligand-Gated Ion Channel Gene Family of Tetranychus Urticae: Implications for Acaricide Toxicology and a Novel Mutation Associated with Abamectin Resistance.” *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 42 (7): 455–65.
<https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2012.03.002>.
- Devine, Gregor J, Mat Barber, and Ian Denholm. 2001. “Incidence and Inheritance of Resistance to METI-Acaricides in European Strains of the Two-Spotted Spider Mite (Tetranychus Urticae) (Acari: Tetranychidae).” *Pest Management Science* 57 (5): 443–48. <https://doi.org/10.1002/ps.307>.

- Grbić, Miodrag, Thomas Van Leeuwen, Richard M. Clark, Stephane Rombauts, Pierre Rouzé, Vojislava Grbić, Edward J. Osborne, et al. 2011. “The Genome of Tetranychus Urticae Reveals Herbivorous Pest Adaptations.” *Nature* 479 (7374): 487–92. <https://doi.org/10.1038/nature10640>.
- Helle, W., and M. W. Sabelis. 1985. *Spider Mites: Their Biology, Natural Enemies and Control: Vol. 1B*. Amsterdam: Elsevier. <https://dare.uva.nl/search?identifier=e44f50f7-31f6-4c4a-ace2-425459a99259>.
- Hemingway, Janet, Nicola J. Hawkes, Lynn McCarroll, and Hilary Ranson. 2004. “The Molecular Basis of Insecticide Resistance in Mosquitoes.” *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 34 (7): 653–65. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2004.03.018>.
- “Insects-Bugs-Houseplants-Spider-Mites.” n.d. Accessed May 31, 2019. <https://www.easygrohydro.com/insects-bugs-houseplants-spider-mites.html>.
- Khajehali, Jahangir, Thomas Van Leeuwen, and Luc Tirry. 2009. “Susceptibility of an Organophosphate Resistant Strain of the Two-Spotted Spider Mite (Tetranychus Urticae) to Mixtures of Bifenazate with Organophosphate and Carbamate Insecticides.” *Experimental and Applied Acarology* 49 (3): 185–92. <https://doi.org/10.1007/s10493-009-9261-3>.
- Kim, Young-Joon, Si-Hyeock Lee, Si-Woo Lee, and Young-Joon Ahn. 2004. “Fenpyroximate Resistance In Tetranychus Urticae (Acari: Tetranychidae): Cross-Resistance and Biochemical Resistance Mechanisms.” *Pest Management Science* 60 (10): 1001–6. <https://doi.org/10.1002/ps.909>.
- Kwon, D. H., K. S. Yoon, J. M. Clark, and S. H. Lee. 2010. “A Point Mutation in a Glutamate-Gated Chloride Channel Confers Abamectin Resistance in the Two-Spotted Spider Mite, Tetranychus Urticae Koch: Abamectin Resistance in T. Urticae.” *Insect Molecular Biology*, June, no-no. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2010.01017.x>.
- Martin, Gilles San. 2010. *Tetranychus Urticae Male*. Photo. <https://www.flickr.com/photos/sanmartin/4883547705/>.
- “Mites.Jpg (400×405).” n.d. Accessed May 30, 2019. <https://www.shanklinpetstores.co.uk/wp-content/uploads/Mites.jpg>.
- Mutero, A., M. Pralavorio, J. M. Bride, and D. Fournier. 1994. “Resistance-Associated Point Mutations in Insecticide-Insensitive Acetylcholinesterase.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91 (13): 5922–26. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.13.5922>.
- Ozoe, Yoshihisa, Makio Takeda, and Kazuhiko Matsuda. 2009. “ γ -Aminobutyric Acid Receptors: A Rationale for Developing Selective Insect Pest Control Chemicals.” In *Biorational Control of Arthropod Pests*, edited by Isaac Ishaaya and A. Rami Horowitz, 131–62. Dordrecht: Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-90-481-2316-2_6.

- “Persimilis (*Phytoseiulus Persimilis*) – Biological Services, Australia.” n.d. Accessed May 31, 2019. <https://biologicalservices.com.au/products/persimilis-30.html>.
- Porter, T. D., and M. J. Coon. 1991. “Cytochrome P-450. Multiplicity of Isoforms, Substrates, and Catalytic and Regulatory Mechanisms.” *The Journal of Biological Chemistry* 266 (21): 13469–72.
- Putter, I., J. G. Mac Connell, F. A. Preiser, A. A. Haidri, S. S. Ristich, and R. A. Dybas. 1981. “Avermectins: Novel Insecticides, Acaricides and Nematicides from a Soil Microorganism.” *Experientia* 37 (9): 963–64. <https://doi.org/10.1007/BF01971780>.
- Rauch, Natascha, and Ralf Nauen. 2002. “Spirodiclofen Resistance Risk Assessment in *Tetranychus Urticae* (Acari: Tetranychidae): A Biochemical Approach.” *Pesticide Biochemistry and Physiology* 74 (2): 91–101. [https://doi.org/10.1016/S0048-3575\(02\)00150-5](https://doi.org/10.1016/S0048-3575(02)00150-5).
- Riga, M., D. Tsakireli, A. Ilias, E. Morou, A. Myridakis, E.G. Stephanou, R. Nauen, et al. 2014. “Abamectin Is Metabolized by CYP392A16, a Cytochrome P450 Associated with High Levels of Acaricide Resistance in *Tetranychus Urticae*.” *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 46 (March): 43–53. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2014.01.006>.
- Sato, Mário E., Marcos Z. da Silva, Adalton Raga, and Miguel F. de Souza Filho. 2005. “Abamectin Resistance in *Tetranychus Urticae* Koch (Acari: Tetranychidae): Selection, Cross-Resistance and Stability of Resistance.” *Neotropical Entomology* 34 (6): 991–98. <https://doi.org/10.1590/S1519-566X2005000600016>.
- Scott, Jeffrey G. 1999. “Cytochromes P450 and Insecticide Resistance.” *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 29 (9): 757–77. [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(99\)00038-7](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(99)00038-7).
- “Spider Mites - Bugwoodwiki.” n.d. Accessed May 31, 2019. https://wiki.bugwood.org/Spider_mites.
- Stumpf, Natascha, and Ralf Nauen. 2002. “Biochemical Markers Linked to Abamectin Resistance in *Tetranychus Urticae* (Acari: Tetranychidae).” *Pesticide Biochemistry and Physiology* 72 (2): 111–21. <https://doi.org/10.1006/pest.2001.2583>.
- “*Tetranychus*.” 2018. In *Wikipedia*. <https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Tetranychus&oldid=831356085>.
- “The P450 Catalytic Cycle.” n.d. Accessed June 1, 2019. <http://www.tcm.phy.cam.ac.uk/~mds21/thesis/node49.html>.

- Tsagkarakou, A., T. Van Leeuwen, J. Khajehali, A. Ilias, M. Grispou, M. S. Williamson, L. Tirry, and J. Vontas. 2009. "Identification of Pyrethroid Resistance Associated Mutations in the *Para* Sodium Channel of the Two-Spotted Spider Mite *Tetranychus Urticae* (Acari: Tetranychidae)." *Insect Molecular Biology* 18 (5): 583–93. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2009.00900.x>.
- "UF/IFAS - University of Florida, Institute of Food and Agricultural Sciences." n.d. Accessed May 30, 2019. <http://entnemdept.ufl.edu/>.
- Van Leeuwen, Thomas, Steven Van Pottelberge, and Luc Tirry. 2005. "Comparative Acaricide Susceptibility and Detoxifying Enzyme Activities in Field-Collected Resistant and Susceptible Strains Of *Tetranychus Urticae*." *Pest Management Science* 61 (5): 499–507. <https://doi.org/10.1002/ps.1001>.
- Van Leeuwen, Thomas, John Vontas, Anastasia Tsagkarakou, Wannes Dermauw, and Luc Tirry. 2010. "Acaricide Resistance Mechanisms in the Two-Spotted Spider Mite *Tetranychus Urticae* and Other Important Acari: A Review." *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 40 (8): 563–72. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2010.05.008>.
- Van Leeuwen, Thomas, John Vontas, Anastasia Tsagkarakou, and Luc Tirry. 2009. "Mechanisms of Acaricide Resistance in the Two-Spotted Spider Mite *Tetranychus Urticae*." In *Biorational Control of Arthropod Pests*, edited by Isaac Ishaaya and A. Rami Horowitz, 347–93. Dordrecht: Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-90-481-2316-2_14.
- Van Pottelberge, Steven, Thomas Van Leeuwen, Jahangir Khajehali, and Luc Tirry. 2009. "Genetic and Biochemical Analysis of a Laboratory-Selected Spirodiclofen-Resistant Strain of *Tetranychus Urticae* Koch (Acari: Tetranychidae)." *Pest Management Science* 65 (4): 358–66. <https://doi.org/10.1002/ps.1698>.
- Vontas, J. G., G. J. Small, and J. Hemingway. 2001. "Glutathione S-Transferases as Antioxidant Defence Agents Confer Pyrethroid Resistance in *Nilaparvata lugens*." *The Biochemical Journal* 357 (Pt 1): 65–72. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3570065>.
- Βόντας Ι., Ροδιτάκης Ε. και Τσαγκαράκου Α. (2007), Η μοριακή βάση της ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα: παραδείγματα εντόμων και ακάρεων Ελληνικού ενδιαφέροντος, Γεωτεχνικά επιστημονικά θέματα, 18: 60-68
- Γιαννοπολίτης Κ.Ν. (2005). Οδηγός γεωργικών φαρμάκων 2005 : 195-326

- Εμμανουήλ Ν.Γ. (1998), Γεωργική Ζωολογία, Ειδικό μέρος Α΄ Φυτοφάγα είδη :190194
- Εμμανουήλ Ν.Γ., Παπαδούλης Γ.Κ. (2000), Τα ακάρεα ως μέσον βιολογικού ελέγχου επιβλαβών αρθροπόδων : 13-30
- Ζιώγας Β.Ν., Μαρκόγλου Α. (2007), Γεωργική Φαρμακολογία, Βιοχημεία, Φυσιολογία, Μηχανισμοί Δράσης και Χρήσεις των Φυτοπροστατευτικών Προϊόντων
- Bass, C., Zimmer, C.T., Riveron, J.M., Wilding, C.S., Wondji, C.S., Kausmann, M., Field, L.M., Williamson, M.S., Nauen R., 2013. Gene amplification and microsatellite polymorphism underlie a recent insect host shift. PNAS, 110(48): 19460-19465
- Shi, L., Wang, M., Zhang, Y., Shen, G., Di, H., Wang, Y., He, L., 2017. The expression of P450 genes mediating fenprothrin resistance is regulated by CncC and Maf in *Tetranychus cinnabarinus* (Boisduval). Compar. Biochem. Physiol. (Part C) 198, 28-36.
- Pang, R., Li, Y., Dong, Y., Liang, Z., Zhang, Y., Zhang, W., 2014. Identification of promoter polymorphisms in the cytochrome P450 CYP6AY1 linked with insecticide resistance in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. Insect Mol. Biology, 23(6): 768-778.
- Zimmer, C.T., Garrood, W.T., Singh, K.S., Randall, E., Lueke, B., Gutbrod, O., Matthiesen, S., Kohler, M., Nauen, R., Davies, T.G>E., Bass, C., 2018. Neofunctionalization of duplicated P450 genes drives the evolution of insecticide resistance in the brown planthopper. Current Biology, 28: 268-274.
- Ελένη Ουρανού, πτυχιακή εργασία 2016
- Μαρία Ρήγα, διδακτορική μελέτη 2016
- Άρης Ηλίας, μεταπτυχιακή μελέτη 2008
- Τσακιρέλη Δήμητρα, μεταπτυχιακή μελέτη 2011
- Χρίστος Θεμιστοκλέους, πτυχιακή εργασία 2017

www.youtube.com/watch?v=zks7PZUE27g