

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ – ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΧΕΡΣΑΙΩΝ ΚΑΙ ΘΑΛΛΑΣΙΩΝ
ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΠΟΡΩΝ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΘΕΜΑ:

«Γενετική και μοριακή ανάλυση της ανθεκτικότητας του
τετρανύχου, *Tetranychus urticae* (Acari : Tetranychidae) στις
αβερμεκτίνες»

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: Βόντας Ι.



Μαρία Ρήγα

ΗΡΑΚΛΕΙΟ, 2011

UNIVERSITY OF CRETE
BIOLOGY DEPARTMENT

GSP
ENVIRONMENTAL BIOLOGY

MASTER THESIS

SUBJECT:

«Genetics and molecular analysis of resistance in the two-spotted spider mite
Tetranychus urticae (Acari : Tetranychidae) in avermectins»

SUPERVISOR: Vontas J.



Maria Riga

HERAKLION, 2011

Υπογραφή Επιβλέποντος

Τριμελής Επιτροπή:

Βόντας Ι.

Τσαγκαράκου Α.

Οικονομόπουλος Α. Π.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<u>ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ</u>	5
<u>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</u>	6
<u>ABSTRACT</u>	7
<u>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</u>	8
<u>1 Γενικά στοιχεία για το είδος <i>Tetranychus urticae</i></u>	8
<u>1.1 Συστηματική του τετρανύχου</u>	8
<u>1.2 Βιολογικός Κύκλος</u>	8
<u>1.3 Προσβολή καλλιεργειών</u>	10
<u>2 Καταπολέμηση</u>	11
<u>2.1 Βιολογική Καταπολέμηση</u>	11
<u>2.2 Χημική καταπολέμηση και δράση των εντομοκτόνων - Αβερμεκτίνες</u>	11
<u>3. Ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα και μηχανισμοί ανθεκτικότητας - Ανθεκτικότητα στις αβερμεκτίνες</u>	12
<u>4. Μεθοδολογία ανάλυσης της ανθεκτικότητας</u>	14
<u>4.1 Βιοδοκιμές</u>	14
<u>4.2 Βιοχημικές Μέθοδοι</u>	15
<u>4.3 Κλασική γενετική ανάλυση της ανθεκτικότητας</u>	15
<u>4.4 Μοριακή ανάλυση</u>	15
<u>5. Παρεμβολή RNA (RNAi)</u>	16
<u>6. Υπόβαθρο της συγκεκριμένης εργασίας</u>	18
<u>7. Σκοπός της μελέτης</u>	19
<u>Ενότητα 1</u>	20
<u>Φαινότυπος της ανθεκτικότητας του τετρανύχου στις αβερμεκτίνες</u>	20
<u>1.1 ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ</u>	20
<u>1.1.1 Στελέχη τετρανύχου</u>	20
<u>1.1.2 Διασταυρώσεις</u>	20
<u>1.1.3 Κυριαρχία του φαινοτύπου της ανθεκτικότητας</u>	21
<u>1.1.4 F1 backcrossing, βιοδοκιμές και αριθμός γονιδίων</u>	23
<u>1.1.5 Γονοτύπιση καναλιών γλωρίου</u>	24
<u>1.1.5.1 Συλλογή τετρανύχων</u>	24
<u>1.1.5.2 Εξαγωγή DNA</u>	25
<u>1.1.5.3 Σχεδιασμός εκκινητών για την απομόνωση των γονιδίων των καναλιών γλωρίου</u>	25
<u>1.1.5.4 PCR, Καθαρισμός προϊόντος και αλληλούχιση</u>	26
<u>1.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</u>	27

<u>1.2.1 Κυριαρχία του φαινοτύπου της ανθεκτικότητας</u>	27
<u>1.2.2 Αριθμός γονιδίων</u>	28
<u>1.2.3 Γονότυπιση των καναλιών γλωρίου 1 και 3</u>	30
<u>1.3 ΣΥΖΗΤΗΣΗ</u>	34
<u>Ενότητα 2</u>	37
<u>Ανάπτυξη Μεθόδου Παρεμβολής RNA</u>	37
<u>2.1 ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ</u>	37
<u>2.1.1 Δίκλωνο RNA (dsRNA)</u>	37
<u>2.1.2 Απομόνωση τετρανύχων</u>	38
<u>2.1.3 Μέθοδος των μικροενέσεων</u>	39
<u>2.1.4 PCR σε πραγματικό χρόνο - Real Time PCR</u>	40
<u>2.1.5 Φαινοτυπικός έλεγχος</u>	42
<u>2.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</u>	43
<u>2.2.1 Αποτελέσματα Real Time PCR για καταστολή του γονιδίου της ακετυλοχολινεστεράσης (AChE)</u>	43
<u>2.2.2 Φαινοτυπικός έλεγχος</u>	44
<u>2.3 ΣΥΖΗΤΗΣΗ</u>	46
<u>3 ΓΕΝΙΚΗ ΣΥΖΗΤΗΣΗ</u>	48
<u>4 ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΑ ΣΧΕΔΙΑ</u>	50
<u>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</u>	51
<u>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ</u>	56

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μελέτη εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Μοριακής Εντομολογίας του Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης, με επιβλέποντα τον Αναπληρωτή Καθηγητή Εντομολογίας κ. Ι. Βόντα στον οποίο χρωστάω ένα μεγάλο ευχαριστώ γιατί με δέχτηκε στο εργαστήριο και με βοήθησε με κάθε τρόπο να μάθω πολλά πράγματα.

Ένα άλλο τμήμα της εργασίας πραγματοποιήθηκε στο ΕΘ.Ι.ΑΓ.Ε στο εργαστήριο της ερευνήτριας κ. Τσαγκαράκου Ν. η οποία με βοήθησε αρκετά σε κάθε βήμα και πάντα ήταν παρούσα οποιαδήποτε δύσκολη στιγμή κατά τη διάρκεια των πειραμάτων.

Θα ήθελα βέβαια πάνω από όλα να ευχαριστήσω έναν άνθρωπο ο οποίος με μύησε στα θέματα της Εντομολογίας και με βοήθησε πάρα πολύ στα πρώτα μου βήματα σε αυτόν τον τομέα. Φυσικά δεν θα μπορούσα να μιλούσα για κάποιον άλλο εκτός από τον Ομότιμο Καθηγητή Εντομολογίας κ. Α. Π. Οικονομόπουλο.

Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα έναν εξωτερικό συνεργάτη τον Thomas Van Leeuwen, ο οποίος με δέχτηκε για 3 μήνες δίπλα του και μου έμαθε απίστευτα πολλά πράγματα. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου στο Βέλγιο μιας και ο καθένας με τον τρόπο του με έκανε να αισθανθώ ότι βρίσκομαι στον τόπο μου, εκτός από τον καιρό φυσικά!!!

Μιας και κάποια πειράματα έγιναν στις εγκαταστάσεις του ΙΤΕ, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Λειβαδάρα Ι. ο οποίος έκανε μικροενέσεις σε πάνω από 2000 τετρανύχους και κάθε φορά έκανα ό,τι καλύτερο μπορούσε για την επιτυχία των πειραμάτων.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στο Μάνο ο οποίος μου στάθηκε όσο κανένας άλλος και πέρσι μου μετρούσε λανθασμένα τους τετρανύχους!!! Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τους Νίκο και Έλλη που εδώ και δύο χρόνια ξεσπάμε στην μπιρίμπα!

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου που ήταν εκεί όταν τους χρειάστηκα. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Άρη με τον οποίο κουραστήκαμε να διασταυρώνουμε 500 τετρανύχους αλλά το αποτέλεσμα είναι φυσικά που μετράει και ήταν πολύ καλό!!!

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω πάνω από όλα την οικογένειά μου που με έχει στηρίξει όλα αυτά τα χρόνια, άσχετα των παραπόνων που δέχομαι κατά καιρούς.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο τετράνυχος *Tetranychus urticae* (Koch) (Acari : Tetranychidae) αποτελεί έναν από τους πιο σοβαρούς εχθρούς των καλλιεργειών. Η καταπολέμησή του γίνεται κυρίως με χημικά μέσα με συνέπεια να εμφανίζει υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας σε πολλές τοξικές ουσίες.

Στη συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιήθηκε ένα ελληνικό ανθεκτικό (TU82) στις αβερμεκτίνες, αλλά και σε άλλα εντομοκτόνα, στέλεχος *T. urticae* το οποίο συλλέχθηκε από θερμοκηπιακή καλλιέργεια τριανταφυλλιάς από το Μαραθώνα Αττικής, με ιδιαίτερα επιβεβαρυσμένο ιστορικό καταπολέμησης.

Οι αβερμεκτίνες είναι μακροκυκλικές λακτόνες και παράγονται φυσικά από το μύκητα *Streptomyces avermitillis*. Η ουσία αυτή δρα κυρίως στο γ-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA) και στους διαύλους χλωρίου (glutamate gated-chloride channels), οδηγώντας σε ενεργοποίηση των καναλιών χλωρίου με τελικό στόχο την παράλυση του οργανισμού στόχου.

Είχε προηγουμένως βρεθεί ότι τα επίπεδα ανθεκτικότητας του υπό μελέτη πληθυσμού είναι 2000 φορές (χρειάζονταν 2000 φορές μεγαλύτερη ποσότητα εντομοκτόνου προκειμένου να θανατωθεί το 50% του πληθυσμού των ανθεκτικών ακάρεων, σε σχέση με αυτά του ευαίσθητου), και ότι δύο μεταλλαγές στους διαύλους χλωρίου σχετίζονται με το φαινότυπο – ο ρόλος ωστόσο μίας από αυτές δεν είναι εξακριβωμένος.

Με κλασσικές μεθόδους γενετικής μελετήθηκε ο τύπος της κυριαρχίας της ανθεκτικότητας στις αβερμεκτίνες (κυρίαρχος, υπολειπόμενος ή ενδιάμεσος), το αν η ανθεκτικότητα αυτή οφείλεται σε περισσότερα του ενός γονίδια, και η γενετική συσχέτιση της δεύτερης μεταλλαγής με την ανθεκτικότητα στις αβερμεκτίνες. Βρήκαμε ότι ο τύπος της κυριαρχίας είναι ενδιάμεσος και ότι η ανθεκτικότητα ελέγχεται από περισσότερα του ενός γονίδια. Επίσης, η δεύτερη μεταλλαγή συσχετίζεται σημαντικά με το φαινότυπο της ανθεκτικότητας.

Τέλος, με βάση δεδομένα, τα ευρήματα της εργασίας αλλά και πειράματα μικροσυστοιχιών που επίσης δείχνουν ότι η ανθεκτικότητα οφείλεται σε πολλά γονίδια, αναπτύξαμε μεθοδολογία βασισμένη στην παρεμβολή RNA (RNAi) για την εξειδικευμένη αποσιώπηση γονιδίων, η έκφραση των οποίων σχετίζεται με την ανθεκτικότητα. Με τον τρόπο αυτό μπορεί να ελεγχθεί η πιθανή λειτουργική τους σύνδεση με το φαινότυπο. Δοκιμάστηκε η μέθοδος των μικροενέσεων και επιτεύχθηκε σίγηση γονιδίου του κεντρικού νευρικού συστήματος (AChE), όταν όμως εφαρμόστηκαν σε συγχρονισμένα άτομα διπλές μικροενέσεις (double injections).

Λέξεις κλειδιά: *Tetranychus urticae*, κυριαρχία, αβερμεκτίνες, RNAi, AChE, μεταλλαγές,

ABSTRACT

The two spotted spider mite (TSSM), *Tetranychus urticae* (Koch) (Acari : Tetranychidae) is one of the most important pests in many agricultural crops worldwide. This species becomes highly resistant in many of the commercial compounds which are used for its control.

An avermectin resistant strain of *T. urticae* (TU82) that was isolated from a heavily sprayed rose plant greenhouse near Athens (Marathonas) and had high levels of resistance against avermectins (2000 fold: 2000-fold higher dose was needed in order to kill 50% of TU82 mites, compared to susceptible strain).

Avermectins belong to the class of macrocyclic lactones and are derived from the fermentation of the microorganism *Streptomyces avermitilis*. The target site of these compounds is GABA and glutamate – gated chloride channels.

Two point mutations in glutamate - gated chloride channels have been associated with avermectin resistance, one previously characterized and another one that has been more recently found in our lab but not yet characterised.

I used genetic crosses in order to, (a) study the dominance of the avermectin resistance phenotype of TU82, (b) investigate the number of genes involved in the resistance and (c) investigate the role of the novel mutation in resistance. The results showed that the mode of inheritance is intermediate and resistance is controlled by more than one gene. Furthermore, the second point mutation seems to play an important role on the phenotype of resistance to avermectins.

Finally, we developed a RNA interference method for the functional validation of the role of specific genes in *T. urticae* non target site resistance. The dsRNA was introduced into the organisms via micro-injections and it successfully silenced the AChE gene when the injections were done to synchronous (same age) mites by applying double injections.

Key words: *Tetranychus urticae*, resistance, dominance, avermectins, RNAi, AChE, point mutations

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 είναι τετράνυχος ο δίστικτος λόγω των δύο στιγμάτων που φέρει στο ιδιόσωμά του (**Εικόνα 1**). Το σώμα του τετρανύχου διακρίνεται σε δύο μέρη: I) Το γναθόσωμα και II) το ιδιόσωμα. Το γναθόσωμα περιλαμβάνει μόνο τα στοματικά εξαρτήματα. Το ιδιόσωμα είναι το υπόλοιπο σώμα και ευθυγραμμίζει το κεφάλι, το θώρακα και την κοιλιά. Μετά την εκκόλαψη του αυγού, η πρώτου σταδίου προνύμφη φέρει τρία ζεύγη ποδιών. Τα υπόλοιπα νυμφικά στάδια καθώς και η ενήλικη μορφή φέρουν τέσσερα ζεύγη ποδιών. Θεωρείται ότι βρίσκεται σε εύκρατες περιοχές αλλά έχει βρεθεί και σε περιοχές της υποτροπικής ζώνης (<http://edis.ifas.ufl.edu>).

1.2 Αναπτυξιακά στάδια - Βιολογικός κύκλος

- ▶ **Ωά:** Τα αυγά είναι σφαιρικά, λευκά, διαμέτρου 100-150μm (Crooker, 1985).
- ▶ **Προνύμφη:** Αποτελεί το πρώτο στάδιο μετά την εκκόλαψη του αυγού. Αρχικά είναι άχρωμη αλλά αφού τραφεί εμφανίζει έναν υποκίτρινο χρωματισμό (Crooker, 1985).
- ▶ **Νύμφη:** Υπάρχουν δύο νυμφικά στάδια: I) Πρωτονύμφη και II) Δευτερονύμφη. Τα δύο αυτά στάδια έχουν τέσσερα ζεύγη προ-ποδιών. Η διάρκεια παραμονής του αρθροπόδου τόσο στο προνυμφικό όσο και στα νυμφικά στάδια κυμαίνεται από 1-3 ημέρες ανάλογα με τη θερμοκρασία. Επιπλέον, εμφανίζονται και μη τρεφόμενα στάδια τα οποία είναι 3.
 - i. Κατά τη μεταμόρφωση από προνύμφη σε πρωτονύμφη εμφανίζεται το μη τρεφόμενο στάδιο της νυμφοχρυσαλίδας ή πρωτοχρυσαλίδας.
 - ii. Μεταξύ των δύο νυμφικών σταδίων εμφανίζεται το μη τρεφόμενο στάδιο της δευτεροχρυσαλίδας και τέλος
 - iii. Εμφανίζεται η τελειοχρυσαλίδα η οποία αποτελεί το μεταβατικό στάδιο από τη δευτερονύμφη σε ενήλικο (Crooker, 1985).

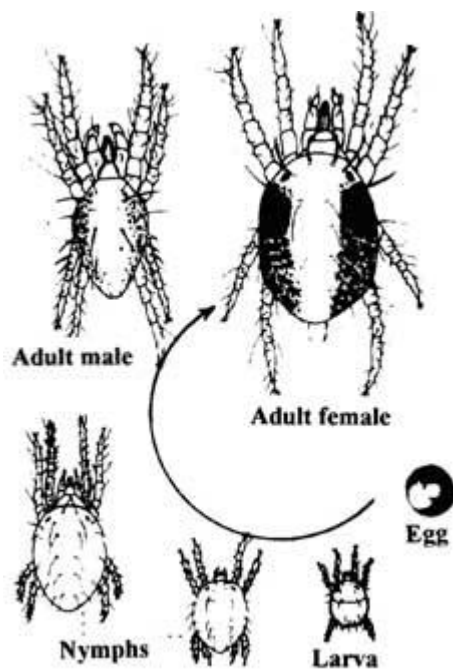
- ▶ **Ενήλικο:** Τα ενήλικα άτομα είναι 0,4 – 0,5mm σε μήκος, με τα θηλυκά να είναι μεγαλύτερα σε μήκος από τα αρσενικά. Το σώμα του θηλυκού είναι ελλειπτικό ενώ του αρσενικού απιοειδές και οξυκατάληκτο (Crooker, 1985).

Τα ωά αποτίθενται από τα ενήλικα θηλυκά στον ιστό που έχουν δημιουργήσει και εκκολάπτονται σε περίπου 3-4 ημέρες. Η περίοδος μεταμόρφωσης από το ωό ως το ακμαίο στάδιο ποικίλλει ανάλογα με τις επικρατούσες περιβαλλοντικές συνθήκες. Υπό ευνοϊκές συνθήκες, 25°C, το είδος ολοκληρώνει την ανάπτυξη του σε 5 με 20 ημέρες (**Εικόνα 1**). 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 την θερμοκρασία και μειώνεται με την υγρασία και την πυκνότητα των πληθυσμών. Οι διακυμάνσεις των βιολογικών χαρακτήρων (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 και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται από τους Sabelis (1985) και Wrensch (1985).

Πρέπει να αναφερθεί ότι τα αρσενικά ωριμάζουν νωρίτερα από τα θηλυκά και τοποθετούνται δίπλα στις θηλυκές τελειοχρυσσαλίδες μέχρις ότου τα θηλυκά να ωριμάσουν. Η σύζευξη λαμβάνει χώρα σχεδόν αμέσως μετά την «ανάδυση» του νεαρού θηλυκού από τη μορφή της τελειοχρυσσαλίδας (Crooker, 1985). Ο τρόπος αναπαραγωγής του τετρανύχου είναι αρρενότοκη παρθενογένεση. Δηλαδή τα αρσενικά προέρχονται από αγονιμοποίητα αυγά και έχουν ένα ζεύγος χρωμοσωμάτων (απλοειδείς οργανισμοί). Αντίθετα τα θηλυκά προέρχονται από γονιμοποιημένα αυγά και έχουν δύο ζεύγη χρωμοσωμάτων (διπλοειδείς οργανισμοί).

Εξαιτίας του γεγονότος ότι τα αρσενικά είναι απλοειδείς οργανισμοί, οι μεταλλαγές που θα λάβουν χώρα θα εκφραστούν αμέσως στα αρσενικά άτομα του πληθυσμού ανεξάρτητα από το αν αυτές οι μεταλλαγές είναι επικρατείς ή υπολειπόμενες. Μέσω της φυσικής επιλογής αυτά τα χαρακτηριστικά θα προστεθούν – εγκαθιδρυθούν γρήγορα μέσα στον πληθυσμό (Helle and Overmeer, 1973). Έτσι, το δυναμικό ανάπτυξης γενετικής ανθεκτικότητας των τετρανύχων στα εντομοκτόνα και στα ακαρεοκτόνα μπορεί να ενισχυθεί σε μεγάλο βαθμό από τον τρόπο αναπαραγωγής που τα διακρίνει (απλο- διπλοειδία). Ο τετρανύχος 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., 2009).



Εικόνα 1: Βιολογικός κύκλος του τετράνυχου (<http://new.dpi.vic.gov.au>)

1.3 Προσβολή Καλλιεργειών

Ο τετράνυχος αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους εχθρούς των καλλιεργούμενων φυτών. Προκαλούν ζημιές στα φυτά απομυζώντας χυμούς από το δρυφακτοειδές παρέγχυμα των φύλλων με την βοήθεια στιλέτων μειώνοντας έτσι τόσο την διαδικασία της φωτοσύνθεσης όσο και της διαπνοής. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την εμφάνιση αρχικά υπόλευκων στιγμάτων στα φύλλα τα οποία στην 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 et al., 2001).

2. Καταπολέμηση

2.1. Βιολογική Καταπολέμηση

Ο τετράνυχος έχει στη φύση πολλούς φυσικούς εχθρούς, αρπακτικά που μπορούν να ελέγξουν τους πληθυσμούς του. Μεταξύ των φυσικών εχθρών του τετρανύχου τα αρπακτικά ακάρεα της οικογένειας Phytoseiidae αποτελούν αναμφισβήτητα τον πλέον επιτυχημένο παράγοντα βιολογικής καταπολέμησής τους. Τα περισσότερα Phytoseiidae είναι πολυφάγα και το είδος *Phytoseiulus persimilis* φαίνεται ότι τρέφεται αποκλειστικά (στα θερμοκήπια) με Tetranychidae. Εκτός των Phytoseiidae εχθροί του τετράνυχου αποτελούν έντομα των γενών *Syrphus*, *Stethorus*, *Orius*, *Leptothrips*, *Chrysopa* (<http://www.ipm.ucdavis.edu>).

2.2. Χημική καταπολέμηση και δράση των εντομοκτόνων – αβερμεκτίνες

Σήμερα η καταπολέμηση του τετρανύχου γίνεται με τη χρήση χημικών σκευασμάτων που έχουν εντομοκτόνο και 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.

Για παράδειγμα, τα οργανοφωσφορικά και τα καρβαμιδικά εντομοκτόνα δεσμεύονται στο ενεργό κέντρο της ακετυλοχολινεστεράσης που αποτελεί βασικό ένζυμο του κεντρικού νευρικού συστήματος των εντόμων και των ακάρεων, με συνέπεια να αναστέλλεται η λειτουργία της (Ζιώγας και Μάρκογλου, 2007). Επίσης, τα οργανοχλωριωμένα εντομοκτόνα και τα πυρεθρινοειδή δρουν στοχεύοντας στα διαμεμβρανικά κανάλια μεταφοράς ιόντων νατρίου (sodium channel) αποσυντονίζοντας έτσι την λειτουργία των οργανισμών και τον έλεγχο ροής ιόντων κατά μήκος του νευρικού άξονα οδηγώντας στην παράλυση και σταδιακά στο θάνατο των ατόμων (Ζιώγας και Μάρκογλου, 2007). Η υποομάδα των κυκλοδιενίων που ανήκει στην κατηγορία των οργανοχλωριωμένων εμφανίζει διαφορετική δράση παρεμποδίζοντας τα κανάλια μεταφοράς γλωρίου (GABA, gamma aminobutyric acid) με συνέπεια να αποτρέπεται η είσοδος των ιόντων γλωρίου (Ζιώγας και Μάρκογλου, 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 avermitillis*. Από αυτή τη διαδικασία προκύπτουν τέσσερα ομόλογα ζεύγη συστατικών: αβερμεκτίνες A1, A2, B1 και B2. Η αβερμεκτίνη B1 κυρίως απομονώνεται από τη ζύμωση του μικρο-οργανισμού 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 χλωρίου (glutamate gated-chloride channels), οδηγώντας σε ενεργοποίηση των καναλιών χλωρίου με αποτέλεσμα την παράλυση του οργανισμού στόχου (Ozoe et al., 2009, Van Leeuwen et al., 2009).

Ο τετράνυχος αποτελεί κύριο στόχο των αβερμεκτινών μιας και φέρει ακαρεοκτόνο δράση. Ανθεκτικότητα του τετρανύχου στη συγκεκριμένη τοξική ουσία έχει αναφερθεί και παρατηρηθεί στην Καλιφόρνια, Φλόριντα και Ολλανδία (Campos et al., 1995, Campos et al., 1996), Βραζιλία και Κολομβία (Stumpf and Nauen, 2002, Sato et al., 2005), Ουάσιγκτον (Beers et al., 1998), στη Νότια Κορέα (Kwon et al., 2010b) στην Τουρκία (Yorulmaz and Ay, 2009). Στην Ελλάδα υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας στην αβερμεκτίνη (RR = 250) έχουν διαπιστωθεί σε *T. urticae* από εντατική καλλιέργεια τριαντάφυλλου στον Μαραθώνα (Μπιρουράκη, 2008).

3. Ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα και μηχανισμοί ανθεκτικότητας – Ανθεκτικότητα στις αβερμεκτίνες

Η ανθεκτικότητα είναι ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα στην προσπάθεια ελέγχου των επιβλαβών για την 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 καθώς τα «ευαίσθητα» άτομα θανατώνονται. Με αυτόν τον τρόπο και την πάροδο των γενεών, αρχικά ευπαθείς πληθυσμοί μετατρέπονται σε ανθεκτικούς (Βόντας κ.α., 2007) .

Η ανάπτυξη ανθεκτικότητας στα 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 (Van Leeuwen et al., 2010). Τα προβλήματα ανθεκτικότητας σε καλλιέργειες υπό κάλυψη είναι ιδιαίτερα αυξημένα λόγω των ευνοϊκών συνθηκών και των συχνών εφαρμογών φυτοφαρμάκων (Ζιώγας και Μάρκογλου, 2007).

Οι μηχανισμοί ανθεκτικότητας των εντόμων και των ακάρεων εμφανίζονται με διάφορες μορφές. Επιδερμικές διαφοροποιήσεις και αλλαγές στη συμπεριφορά των αρθροπόδων που είτε εμποδίζουν την είσοδο είτε αυξάνουν την απέκκριση των εντομοκτόνων (φυσιολογική – ηθολογική ανθεκτικότητα) αποτελούν 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 αυτές φτάσουν στο στόχο. Βασικά ένζυμα της βιοχημικής ανθεκτικότητας είναι οι εστεράσες, οι μονοοξυγενάσες (P450s) και οι τρανσφεράσες της γλουταθειόνης (GSTs). Αυτοί οι δύο μηχανισμοί αφορούν τη μείωση της δραστικής ποσότητας της εντομοκτόνου ουσίας που φτάνει στο στόχο (Βόντας κ.α., 2007).

Ο τελευταίος μηχανισμός ανθεκτικότητας που αναπτύσσουν τα έντομα και τα ακάρεα αποτελεί η τροποποίηση στόχου. Δηλαδή, η μοριακή δομή των πρωτεϊνών – στόχων διαφοροποιείται με συνέπεια να είναι λιγότερο ευαίσθητες στις τοξικές ουσίες, με αποτέλεσμα να μειώνεται η αποτελεσματικότητα της δραστικής ουσίας (Βόντας κ.α., 2007).

Πολλές μελέτες έχουν ρίξει φως στους μηχανισμούς ανθεκτικότητας στις αβερμεκτίνες. Συγκεκριμένα οι Stumpf and Nauen (2002) έδειξαν ότι σημαντικό ρόλο στην ανθεκτικότητα των τετρανύχων στην ακαρεοκτόνο ουσία abamectin παίζουν τα ένζυμα αποτοξικοποίησης, P450s και GST. Το συμπέρασμα ήταν πως το φαινόμενο της ανθεκτικότητας του τετρανύχου στις αβερμεκτίνες είναι πολυπαραγοντικό, εμπλέκοντας τόσο τον οξειδωτικό μεταβολισμό όσο και την αυξημένη σύζευξη (conjugation) στη γλουταθειόνη.

Επίσης, οι Kwon et al. (2010a) μελέτησαν δύο στελέχη τετρανύχου ανθεκτικά στις αβερμεκτίνες (στελέχη PTF και AbaR). Κάνοντας βιοχημικές μελέτες παρατήρησαν πως τα ένζυμα αποτοξικοποίησης P450s και εστεράσες εμφανίζουν αυξημένη ενεργότητα. Όμως η ενεργότητα αυτή των ενζύμων στο AbaR στέλεχος δεν

καθίσταται αρκετή για να δικαιολογήσει την υψηλή ανθεκτικότητα του στελέχους στη συγκεκριμένη δραστική ουσία. Έτσι πρότειναν ότι στην ανθεκτικότητα του AbaR στελέχους ίσως να εμπλέκεται και επιπρόσθετος μηχανισμός, όπως ο μηχανισμός στόχου. Σε επόμενη μελέτη τους, οι Kwon et al. (2010b) μελέτησαν τυχόν μεταλλαγές στους διαύλους χλωρίου και βρήκαν πως υπάρχει αντικατάσταση του αμινοξέος γλυκίνη από ασπαρτικό οξύ στη θέση 323 της αλληλουχίας (G323D). Κάνοντας βιοδοκιμές και συλλέγοντας επιζήσαντα και «νεκρά» άτομα έκαναν γονοτύπηση για το 1^ο κανάλι χλωρίου. Έτσι βρήκαν ότι όλα τα άτομα που επιβίωσαν φέρουν τη μεταλλαγή αυτή η οποία φαίνεται να συνεισφέρει στην ανθεκτικότητα του τετρανύχου στις αβερμεκτίνες.

Για να αντιμετωπιστεί η ανθεκτικότητα χρειάζεται λεπτομερής επιστημονική προσέγγιση. Απαιτούνται μελέτες τόσο στο εργαστήριο όσο και στον αγρό για την κατανόηση της ανθεκτικότητας, την αντιμετώπισή της και τον κίνδυνο εμφάνισής της. Απαιτείται προσδιορισμός των παραμέτρων της ανθεκτικότητας, όπως του επιπέδου ανθεκτικότητας, της κατανομής του πληθυσμού, της ύπαρξης διασταυρωτής ανθεκτικότητας, των βιοχημικών μηχανισμών ανθεκτικότητας και κυρίως του γενετικού ελέγχου της ανθεκτικότητας (Ζιώγας και Μάρκογλου, 2007).

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 (Leaf - Spray) με 5 – 7 δόσεις εντομοκτόνου ουσίας. Μέσω αυτών των βιοδοκιμών μπορεί προσδιοριστεί η συγκέντρωση που σκοτώνει το 50% των ατόμων ενός πληθυσμού (LC₅₀) και γενικότερα τα επίπεδα ανθεκτικότητας σε ένα συγκεκριμένο εντομοκτόνο – ακαρεοκτόνο (Helle and Overmeer, 1985). Μέσω της μεθόδου των βιοδοκιμών μπορούν να προσδιοριστούν τα επίπεδα ανθεκτικότητας ενός συγκεκριμένου πληθυσμού στα εντομοκτόνα, συνήθως σε σχέση με ένα πληθυσμό αναφοράς. Βιοδοκιμές μπορούν επίσης να γίνουν παρουσία συννεργιστών - 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

Ένας άλλος τρόπος ανάλυσης της ανθεκτικότητας είναι η χρήση βιοχημικών μεθόδων. Με τη μέθοδο αυτή και χρησιμοποιώντας τα κατάλληλα υποστρώματα που αφορούν τα κατάλληλα ένζυμα αποτοξικοποίησης μπορεί να γίνει η ανάλυση της ενεργότητας των ενζύμων αποτοξικοποίησης (P450s, εστεράσες, τρανσφεράσες της γλουταθειόνης) που είναι γνωστό ότι παίζουν ρόλο σε συγκεκριμένες χαρακτηρισμένες περιπτώσεις ανθεκτικότητας, και έτσι μπορούν εν συνεχεία να χρησιμοποιηθούν σαν δείκτες για τη διάγνωσή της (για παράδειγμα Stumpf and Nauen, 2002, Kajehali et al., 2009, Van Pottelberge et al., 2009).

4.3 Κλασσική γενετική ανάλυση ανθεκτικότητας

Μια άλλη προσέγγιση για την ανάλυση της ανθεκτικότητας είναι με κλασσικές 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 φαινόμενο.

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

Δεδομένου ότι γνωρίζουμε τα γονίδια που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα και έχοντας αλληλουχηθεί τα γονιδιώματα πολλών εντόμων και ακάρεων, αλλά κυρίως του τετρανύχου, μπορούν να χρησιμοποιηθούν μοριακές μέθοδοι 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 (στην περίπτωση των μικροσυστοιχιών) που σχετίζονται με τον 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. Παρεμβολή RNA

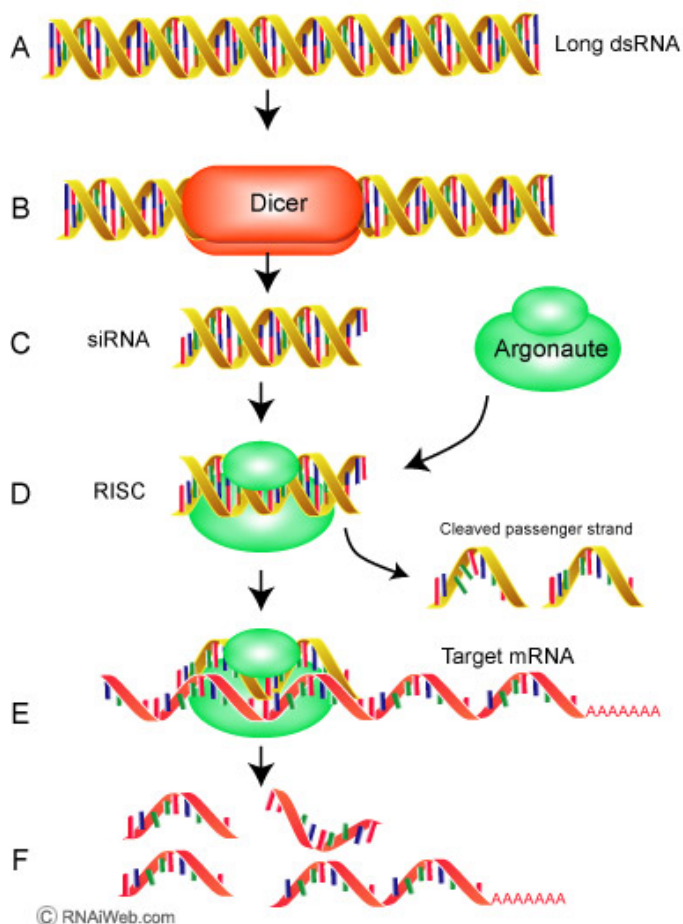
Η παρεμβολή RNA (RNA interference - RNAi) αποτελεί μια μορφή μετα-μεταγραφικής σίγησης γονιδίων και έχει περιγραφεί σε ένα μεγάλο αριθμό οργανισμών όπως νηματώδεις, πρωτόζωα και ασπόνδυλα είδη. Η παρεμβολή RNA χαρακτηρίζεται από ένα αριθμό χαρακτηριστικών όπως, επαγωγή από δίκλωνο RNA (double stranded RNA – dsRNA), υψηλή εξειδίκευση στόχου, αξιοσημείωτη δραστικότητα και διασπορά πέραν των κυτταρικών ορίων και διατήρηση της σίγησης του γονιδίου στόχου (Liu et al., 2010).

Η παρεμβολή RNA αποτελεί ένα πολλά υποσχόμενο εργαλείο για τη μελέτη της λειτουργικότητας των γονιδίων, ειδικά για οργανισμούς που είναι δύσκολο να γίνουν διαγονιδιακοί, όπως είναι τα έντομα (Huvette and Smagghe, 2010).

Το ένζυμο Dicer κόβει κυτοπλασμικά δίκλινα RNA σε μικρά δίκλινα RNA (small interfering RNAs - siRNAs) τα οποία αποτελούνται από 21 με 23 νουκλεοτίδια περίπου. Αυτά τα μικρά δίκλινα RNA ενσωματώνονται σε ένα σύμπλοκο πρωτεϊνών, το σύμπλοκο RISC (RNA-inducing silencing complex), όπου η αντινοηματική αλυσίδα του μικρού δίκλινο RNA οδηγεί το σύμπλοκο RISC στο ομόλογό του mRNA στόχο έτσι ώστε να ακολουθήσει ενδονουκλεοτιδικό κόψιμο, δηλαδή να το σιγήσει (Liu et al., 2010) – (Εικόνα 2).

Εξωγενές δίκλινο RNA μπορεί να μεταφερθεί στα έντομα με διάφορους τρόπους όπως είναι μέσω τεχνητής διαίτας, μικροενέσεων και διαγονιδιακών φυτών (Bautista et al., 2009, Khila and Grbic, 2007, Mao et al., 2007, Zha et al., 2011). Η παροχή δίκλινο RNA μέσω τροφής έχει το πλεονέκτημα ότι δεν τραυματίζει τον οργανισμό, άρα δεν είναι επεμβατική τεχνική. Το μειονέκτημα όμως που έχει αυτή η τεχνική είναι πως δεν είναι δυνατόν να υπολογισθεί η ακριβής ποσότητα δίκλινο RNA που έχει καταναλωθεί από τους οργανισμούς. Επιπρόσθετα είναι δύσκολο να λάβει χώρα η τεχνική της τεχνητής διαίτας σε οργανισμούς που η διαίτα δεν έχει επιτυχία (Turner et al., 2006).

Αντίθετα, η μέθοδος των μικροενέσεων για την εισαγωγή δίκλωνου RNA στον οργανισμό χρησιμοποιείται ευρέως και σε πολλά είδη εντόμων. Το πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι ότι μπορεί να ελεγχθεί ο όγκος που εισάγεται στον οργανισμό. Οργανισμοί στους οποίους έχει επιτευχθεί η σίγηση γονιδίων με τη μέθοδο των μικροενέσεων είναι η *Drosophila melanogaster*, *Apis mellifera*, *Acyrtosiphon pisum*, *Tetranychus urticae* και *Pediculus humanus humanus* (Dzitoyeva et al., 2001, Blandin et al., 2002, Amdam et al., 2003, Jaubert-Possamai et al., 2007, Khila and Grbic, 2007, Yoon et al., 2011).



Εικόνα 2: Μηχανισμός παρεμβολής RNA (<http://www.rnaiweb.com>).

6. Υπόβαθρο της συγκεκριμένης εργασίας

Σε προηγούμενες εργασίες, απομονώθηκε στέλεχος από θερμοκηπιακή καλλιέργεια στο Μαραθώνα (Marathonas strain ή TU82) με επιβεβαρωμένο ιστορικό ψεκασμών. Το συγκεκριμένο στέλεχος εμφανίζει υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας στις αβερμεκτίνες, είναι 2000 φορές πιο ανθεκτικό σε σχέση με έναν/τον κανονικό πληθυσμό. Επιπλέον εμφανίζει πολλαπλή ανθεκτικότητα, δηλαδή είναι ανθεκτικό σε πολλές τοξικές ουσίες με διαφορετική δράση.

Όπως προαναφέρθηκε, οι αβερμεκτίνες δρουν στο γ-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA) και στους διαύλους χλωρίου (glutamate gated-chloride channels), οδηγώντας σε ενεργοποίηση των καναλιών χλωρίου με τελικό στόχο την παράλυση του οργανισμού στόχου. Από τη βιβλιογραφία (Kwon et al., 2010b) έχει βρεθεί στέλεχος τετρανύχου (επιλέχθηκε από ευαίσθητο στέλεχος) το οποίο εμφανίζει σημειακή μεταλλαγή στη θέση 323 και έχει αντικατασταθεί το αμινοξύ γλυκίνη από ασπαρτικό οξύ (G323D) και συνεισφέρει στην ανθεκτικότητα του τετρανύχου στις αβερμεκτίνες, μετά από πειράματα βιοδοκιμών και γονοτύπιση των «νεκρών» / ζωντανών ατόμων. Ωστόσο, με βάση το γονιδίωμα του τετρανύχου, η αλληλούχιση του οποίου μόλις φέτος ολοκληρώθηκε, ο τετρανύχος έχει πέντε γονίδια που κωδικοποιούν κανάλια χλωρίου, τα οποία θα μπορούσαν να είναι στόχοι της abamectin. Μοριακή ανάλυση στόχου έδειξε ότι στο στέλεχος του Μαραθώνα, εκτός από τη γνωστή - χαρακτηρισμένη μεταλλαγή που προαναφέρθηκε και εντοπίζεται στο 1^ο κανάλι χλωρίου, υπάρχει και μία δεύτερη μεταλλαγή στην ίδια θέση (G323E), εντοπίζεται σε διαφορετικό κανάλι, στο 3^ο κανάλι χλωρίου (Van Leeuwen, προσωπική επικοινωνία). Ο ρόλος της μεταλλαγής στην ανθεκτικότητα δεν είναι ξεκάθαρος.

Επιπρόσθετα, ανάλυση μικροσυστοιχιών έδειξε συσχέτιση της έκφρασης ενός αριθμού γονιδίων με το φαινότυπο της ανθεκτικότητας.

7. Σκοπός της μελέτης

Σκοπός της συγκεκριμένης εργασίας είναι:

(α) Να διερευνηθεί η γενετική βάση της ανθεκτικότητας στελέχους τετρανύχου το οποίο είναι ανθεκτικό στις αβερμεκτίνες και έχει συλλεχθεί από θερμοκηπιακή καλλιέργεια τριανταφυλλιάς στον Μαραθώνα Αττικής. Είναι ο φαινότυπος της ανθεκτικότητας κυρίαρχος; Οφείλεται σε ένα και μόνο γονίδιο ή σε περισσότερα γονίδια;

(β) Βιβλιογραφικά (Kwon et al., 2010b) έχει βρεθεί σημειακή μεταλλαγή στο 1^ο κανάλι χλωρίου (G323D) η οποία συνεισφέρει στην ανθεκτικότητα του τετρανύχου στις αβερμεκτίνες. Μοριακή ανάλυση στόχου έδειξε ότι στο στέλεχος του Μαραθώνα (Marathonas strain ή TU82) εκτός της γνωστής μεταλλαγής στο 1^ο κανάλι χλωρίου, υπάρχει μια νέα δεύτερη μεταλλαγή στο 3^ο κανάλι χλωρίου (G323E) (Van Leeuwen, προσωπική επικοινωνία). Ποιος είναι ο ρόλος αυτής της δεύτερης νέας μεταλλαγής (αν υπάρχει) στην ανθεκτικότητα;

(γ) Να αναπτύξουμε μέθοδο παρεμβολής RNA για τον τετρανύχο, η οποία θα χρησιμοποιηθεί για την αξιολόγηση του πιθανού ρόλου γονιδίων που σχετίζονται με το φαινότυπο (όπως αυτά που προέχρονται από την ανάλυση των μικροσυστοιχιών) στην ανθεκτικότητα.

ΕΝΟΤΗΤΑ 1: ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΤΕΤΡΑΝΥΧΟΥ ΣΤΙΣ ΑΒΕΡΜΕΚΤΙΝΕΣ

Με τα συγκεκριμένα πειράματα μελετήθηκε ο φαινότυπος της ανθεκτικότητας του τετρανύχου στις αβερμεκτίνες με κλασσικές γενετικές διασταυρώσεις, βιοδοκιμές και γονοτύπιση, προκειμένου να απαντήσουμε στα εξής ερωτήματα:

1. Ποιός είναι ο τύπος της κυριαρχίας του φαινοτύπου της ανθεκτικότητας;
2. Οφείλεται σε ένα και μόνο γονίδιο ή σε περισσότερα;
3. Ποιος είναι ο ρόλος της δεύτερης νέας μεταλλαγής (αν υπάρχει) στην ανθεκτικότητα;

1.1. ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ

1.1.1. Στελέχη τετρανύχου

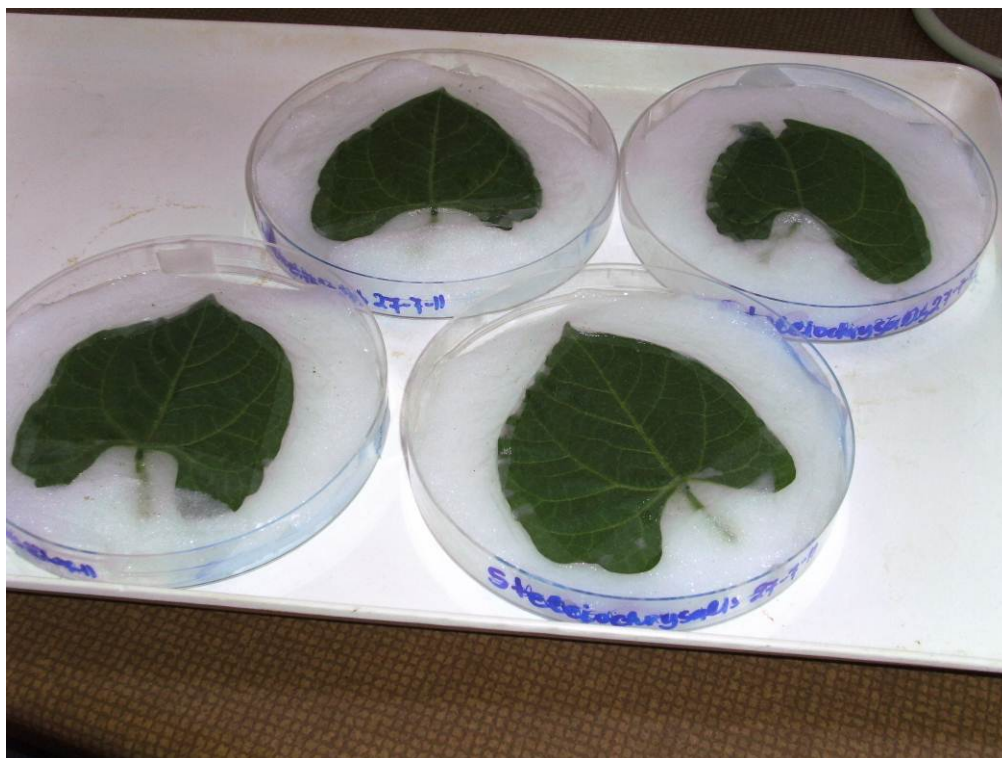
Στη συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιήθηκαν δύο στελέχη τετρανύχου, ένα ανθεκτικό (Tu82) και ένα ευαίσθητο (London). Το ανθεκτικό στέλεχος (Tu82) συλλέχθηκε από θερμοκήπιο τριανταφυλλιάς στο Μαραθώνα και εμφανίζει ανθεκτικότητα στην ακαρεοκτόνο ουσία abamectin. Τα στελέχη αυτά καλλιεργούνται σε φυτά φασολιού στους 25°C με φωτοπερίοδο 16:8 L:D.

1.1.2 Διασταυρώσεις

Διασταυρώθηκαν ανθεκτικά θηλυκά με ευαίσθητα αρσενικά τα οποία αποτελούν την πατρική γενιά. Αυτή η γενιά θα δώσει απογόνους που θα αποτελούν την πρώτη θυγατρική γενιά (F1). Η θυγατρική γενιά διασταυρώθηκε τόσο με ανθεκτικά όσο και με ευαίσθητα αρσενικά. Οι απόγονοι αυτών των διασταυρώσεων αποτελούν τη δεύτερη θυγατρική γενιά (F2), οι οποίοι όμως διαφέρουν γενετικά. Επιπλέον, απομονώθηκαν ενήλικα θηλυκά της πρώτης θυγατρικής γενιάς έτσι ώστε να δώσουν μόνο αρσενικούς απογόνους, οι οποίοι αποτελούν και αυτοί F2 γενιά.

Για κάθε διασταύρωση απομονώνονταν σε φύλλο φασολιού τελειοχρυσάλιδες του ανθεκτικού στελέχους, περίπου 100 – 150 άτομα. Όταν ενηλικιώνονταν, προσθέτονταν αρσενικά από το ευαίσθητο στέλεχος, περίπου στον ίδιο αριθμό. Τα

φύλλα φασολιού τοποθετούνταν σε υγρό βαμβάκι μέσα σε τριβλίο διαμέτρου 13,5 cm. Για να εξασφαλιστεί μεγάλος αριθμός απογόνων δημιουργήθηκαν πέντε (5) τριβλία. Τα άτομα αφήνονταν πάνω στο φύλλο για 24 ώρες και τα άτομα μετακινούνταν κάθε μέρα για 5 ημέρες (**Εικόνα 3**).



Εικόνα 3: Τριβλία που χρησιμοποιούνταν για την απομόνωση τελειοχρυσαλίδων.

1.1.3. Κυριαρχία του φαινοτύπου της ανθεκτικότητας

Για να ελεγχθεί η κυριαρχία του φαινοτύπου της ανθεκτικότητας χρησιμοποιήθηκε η πρώτη θυγατρική γενιά (F1). Έτσι έγιναν βιοδοκιμές σε 5 συγκεντρώσεις, με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων, του ακαρεοκτόνου abamectin (Vertimec 1,8 EC) στα άτομα της πρώτης γενιάς. Για κάθε συγκέντρωση πραγματοποιήθηκαν 4 επαναλήψεις των 25 ατόμων (**Εικόνα 4**). Τα άτομα αυτά τοποθετούνταν σε τριβλία Petri τα οποία αποτελούνταν από υγρό βαμβάκι και πάνω σε αυτό ένα φύλλο φασολιού. Έπειτα, το κάθε τριβλίο με τους τετρανύχους ψεκαζόταν με την επιθυμητή συγκέντρωση (**Εικόνα 5**), αρχίζοντας από το μάρτυρα που ψεκάζεται με 1ml νερού καταλήγοντας στη μεγαλύτερη συγκέντρωση. Οι βιοδοκιμές ελέγχθηκαν μετά από 48 ώρες από τη στιγμή του ψεκασμού και καταγράφηκαν τα νεκρά άτομα. Ως νεκρά θεωρούνταν τα άτομα που δεν ήταν ικανά να διανύσουν απόσταση ίση με δύο φορές του μήκους του σώματός τους.

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με το λογισμικό Probit 3.3 (Praxeme Version 3.3, Licence 193019), το οποίο παρέχει πληροφορίες για το ποσοστό θνησιμότητας, την κλίση της ευθείας, τις θανατηφόρες συγκεντρώσεις (lethal concentrations, LC), τα όρια εμπιστοσύνης κάθε μιας και το συντελεστή ανθεκτικότητας RR (Resistance Ratio).



Εικόνα 4: Φύλλα φασολιού που θα χρησιμοποιηθούν για βιοδοκιμή.



Εικόνα 5: Συσκευή ψεκασμού Potter tower (Μπιρουράκη, 2008).

Για τον έλεγχο της κυριαρχίας του φαινότυπου της ανθεκτικότητας χρησιμοποιήθηκε ο τύπος του Stone (1968):

$$D = 2 \cdot X_2 - X_3 - X_1 / X_3 - X_1$$

όπου, X_2 είναι ο λογάριθμος του LC50 της F1 γενιάς, X_3 ο λογάριθμος του LC50 του ανθεκτικού γονέα και X_1 ο λογάριθμος του LC50 του ευαίσθητου γονέα. Η μεταβλητή D υποδηλώνει την κυριαρχία και η τιμή της κυμαίνεται από -1 αν ο φαινότυπος είναι υπολειπόμενος και 1 αν είναι κυρίαρχος – επικρατής.

1.1.4. F1 γενιά backcrossing, βιοδοκιμές και αριθμός εμπλεκόμενων γονιδίων

Ενήλικα θηλυκά της F1 γενιάς επαναδιασταυρώθηκαν τόσο με ευαίσθητα αρσενικά όσο και με ανθεκτικά αρσενικά. Οι απόγονοι από αυτές τις διασταυρώσεις αποτελούν την F2 γενιά. Η μέθοδος των διασταυρώσεων που ακολουθήθηκε περιγράφηκε στην ενότητα 1.1.2. Για κάθε διάσταυρωση υπήρχαν 5 επαναλήψεις και τα άτομα μεταφέρονταν κάθε 24 ώρες για 5 ημέρες. Επιπλέον, θηλυκές τελειοχρυσαλίδες της F1 γενιάς απομονώθηκαν σε τριβλία με φύλλο φασολιού πάνω σε υγρό βαμβάκι, έτσι ώστε να δώσουν μόνο αρσενικούς απογόνους που αποτελούν επίσης F2 γενιά. Για να υπάρχει ο επιθυμητός αριθμός απογόνων δημιουργήθηκαν 5 επαναλήψεις των 100 – 150 ατόμων, τα οποία μεταφέρονταν κάθε μέρα για 5 ημέρες. Οι βιοδοκιμές έγιναν και επεξεργάστηκαν με την ίδια μέθοδο που περιγράφηκε στην ενότητα 1.1.3.

Με την εφαρμογή της μεθόδου των βιοδοκιμών στα άτομα της F2 γενιάς μπορεί να υπολογιστεί ο αριθμός των γονιδίων που εμπλέκονται στο φαινότυπο της ανθεκτικότητας. Δηλαδή αν το φαινόμενο οφείλεται σε ένα και μόνο γονίδιο ή σε περισσότερα. Πιο ξεκάθαρα αποτελέσματα παρέχονται από τα αρσενικά άτομα της F2 γενιάς. Αν το φαινόμενο της ανθεκτικότητας ελέγχεται από ένα και μόνο γονίδιο θα πρέπει να εμφανιστεί ένα plateau στο 50% θνησιμότητας. Επιπρόσθετα, ο αριθμός των γονιδίων που εμπλέκονται στο φαινόμενο της ανθεκτικότητας υπολογίστηκε από τον παρακάτω τύπο (Georghiou, 1969):

$$c = 0,5 \cdot W (\text{parent 1}) + 0,5 \cdot W (\text{parent 2}),$$

όπου, c είναι η αναμενόμενη θνησιμότητα σε συγκεκριμένη δόση εντομοκτόνου και W είναι η παρατηρούμενη θνησιμότητα του κάθε γονέα σε συγκεκριμένη δόση. Ανάλυση χ^2 goodness – of – fit χρησιμοποιήθηκε για να προσδιοριστεί πόσο καλά ταιριάζουν οι παρατηρούμενες τιμές θνησιμότητας της F2 γενιάς με τις αναμενόμενες.

1.1.5 Γονοτύπιση καναλιών χλωρίου

1.1.5.1 Συλλογή τετρανύχων

Για να πραγματοποιηθεί η γονοτύπιση των καναλιών χλωρίου 1 και 3, αρχικά συλλέχθηκαν άτομα της δεύτερης θυγατρικής γενιάς σε erpendorf tubes και σε κάθε tube τοποθετείτο ένα άτομο. Τα άτομα αυτά προέρχονταν από τις βιοδοκιμές που έγιναν για να βρεθεί ο αριθμός των γονιδίων που εμπλέκονται στο φαινότυπο της ανθεκτικότητας. Από αυτά τα άτομα συλλέχθηκαν τόσο ζωντανά άτομα όσο και «νεκρά» άτομα από διαφορετικές δόσεις. Το σύνολο των ατόμων που συλλέχθηκαν φαίνονται στον **Πίνακα 1**.

Πίνακας 1: Συλλογή ατόμων F2 γενιάς.

Διασταύρωση	Δόση (ppm)	«Νεκρά»	Ζωντανά
RSxS (F2 θηλυκά)	0,3 ppm	5	5
RSxS (F2 θηλυκά)	1 ppm	5	5
RSxS (F2 θηλυκά)	3 ppm	5	5
RSxS (F2 θηλυκά)	10 ppm	5	5
RSxR (F2 θηλυκά)	30 ppm	17	17
RSxR (F2 θηλυκά)	100 ppm	10	10
RS (F2 αρσενικά)	0,1 ppm	1	1
RS (F2 αρσενικά)	1 ppm	5	5
RS (F2 αρσενικά)	3 ppm	12	12
RS (F2 αρσενικά)	10 ppm	4	3
RS (F2 αρσενικά)	30 ppm	2	2

Κατά τη διάρκεια της συλλογής τοποθετούνταν σε πάγο και έπειτα μεταφέρονταν στους -80 °C.

1.1.5.2 Εξαγωγή DNA

Από τη στιγμή που συλλέχθηκαν τα μοναδιαία άτομα κάποια από αυτά επιλέχθηκαν για την εξαγωγή DNA. Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε είναι σύμφωνα με τους Navajas et al., (1998) και αναλυτικά περιγράφεται παρακάτω:

- Προθέρμανση του ρυθμιστικού διαλύματος CTAB (5% CTAB, 1,4 M NaCl, 0,5 M EDTA pH = 8, 1M Tris pH = 8, 0,2 % β-mercaptethanol) στους 65 °C.
- Προσθήκη 50μl του ρυθμιστικού διαλύματος στο δείγμα ακολουθούμενο από ομογενοποίηση.
- Προσθήκη επιπλέον 150μl (αν είναι 1 τετράνυχος) ή 600μl αν είναι τουλάχιστον 50 άτομα.
- Επώαση των δειγμάτων στους 65 °C για 5 - 60 λεπτά.
- Προσθήκη ίσου όγκου χλωροφορμίου – ισοαμυλικής αλκοόλης (24:1).
- Ελαφριά ανακίνηση για 5 λεπτά και φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 8000 rpm (ή 6000g).
- Μεταφορά υπερκειμένου σε νέο tube.
- Προσθήκη ίσου όγκου ισοπροπανόλης.
- Ανάμιξη του δείγματος και επώαση στους -20°C για 30 – 60 λεπτά.
- Φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στους 4 °C στις μέγιστες στροφές.
- Απομάκρυνση υπερκειμένου.
- Προσθήκη 400μl 70% παγωμένης αιθανόλης και φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στους 4°C.
- Απομάκρυνση υπερκειμένου και στέγνωμα της πελέτας στους 55°C για 5 λεπτά.
- Επαναιώρηση δείγματος σε 20μl με ddH₂O.

1.1.5.3 Σχεδιασμός εκκινήτων για την απομόνωση των γονιδίων των καναλιών χλωρίου

Οι αλληλουχίες των γονιδίων που αντιστοιχούν στην κωδικοποίηση των καναλιών χλωρίου 1 και 3 για τον *T. urticae* είναι πλέον γνωστή αφού έχει αλληλουχηθεί ολόκληρο το γονιδίωμα του. Το προσδοκώμενο μέγεθος είναι 200 –

300 bp. Έτσι, χρησιμοποιήθηκαν ειδικοί εκκινητές για την απομόνωση των γονιδίων αυτών (**Πίνακας 2**).

Πίνακας 2: Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή προϊόντος από PCR. Η αλληλουχία αναγράφεται με την κατεύθυνση 5' → 3'.

Εκκινητής	Αλληλουχία
GluC11_F1	TTGGATTGACCCTAACTCAGCA
GluC11_R1	TTGCACCAACAATTCCTTGA
GluC13_F1	CCGGGTCAGTCTTGGTGTTA
GluC13_R1	CACCACCAAGAACCTGTTGA

1.1.5.4 PCR, Καθαρισμός προϊόντος και αλληλούχιση.

Χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της PCR με σκοπό την ανάκτηση και ενίσχυση τμημάτων του γονιδίου στόχου των 2 καναλιών χλωρίου.

Για την αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν:

10x Buffer A	5 μl
10 mM dNTPs	1 μl
10 mM GluC11_F1/GluC13_F1	2 μl
10 mM GluC11_R1/GluC13_R1	2 μl
Kapa Taq Polymerase	0,3 μl
H ₂ O (μέχρι τα 50 μl)	35,7 μl

Οι συνθήκες της αντίδρασης ήταν οι ακόλουθες: αποδιάταξη στους 95°C για δύο λεπτά, ακολουθούμενο από 34 κύκλους των βημάτων αποδιάταξη στους 95°C για 30 δευτερόλεπτα, υβριδισμός των εκκινητών στους 58°C για 30 δευτερόλεπτα, επιμήκυνση στους 72°C για 30 δευτερόλεπτα και τελική επιμήκυνση στους 72°C για 2 λεπτά.

Ο καθαρισμός των προϊόντων έγινε με το kit Nucleospin extract II (Macherey-Nagel, Cat. No:740609.250) και ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο που παρέχει η εταιρεία.

Έπειτα τα δείγματα στάλθηκαν για αλληλούχιση και η ανάλυση των δεδομένων έγινε με το λογισμικό πρόγραμμα BioEdit. (Hall, 1999).

1.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1.2.1 Κυριαρχία του φαινοτύπου της ανθεκτικότητας

Στο συγκεκριμένο πείραμα εξετάστηκε η κυριαρχία του φαινοτύπου της ανθεκτικότητας του τετρανύχου στις αβερμεκτίνες με τη χρήση βιοδοκιμών. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον **Πίνακα 3**.

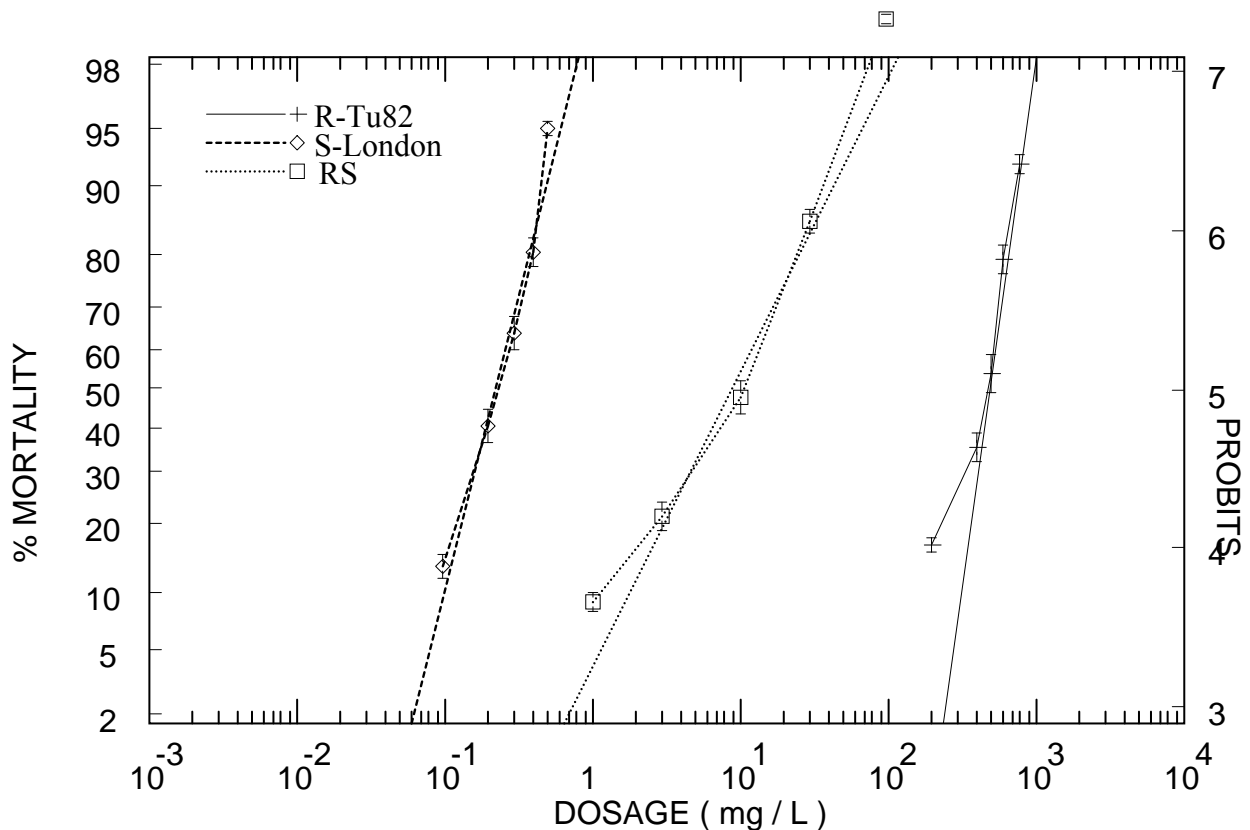
Πίνακας 3: Αποτελέσματα ανθεκτικότητας και κυριαρχίας του φαινοτύπου.

Strains	N	Slope \pm SE	χ^2 (df)	LC50(95 % C.I.)	RR(LC50)	D
London females (S)	600	3,7 (\pm 0,371)	4.7(3)	0,225 (0,199-0,248)		
TU82 females (R)	543	6,1(\pm 1,2)	23.6(3)*	494 (423-576)	2111	
TU82x London (F1) – (RS)	601	1,8(\pm 0,14)	5.3(3)	8,8 (7,2 – 10,6)	40	0 (-0,02)

(N: συνολικός αριθμός τετρανύχων, Slope \pm SE: κλίση ευθείας και απόκλιση, χ^2 και df: X^2 δοκιμής καλής αντιπροσώπευσης από ευθεία και βαθμοί ελευθερίας * $P < 0.05$, LC50 (95 % C.I.): συγκέντρωση που θανατώνει το 50% του πληθυσμού, RR (Resistance Ratio): συντελεστής ανθεκτικότητας και D: Κυριαρχία του φαινοτύπου της ανθεκτικότητας).

Στον παραπάνω πίνακα παρουσιάζονται συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα ανθεκτικότητας του ανθεκτικού (R) και του υβριδικού (RS) πληθυσμού σε σχέση με τον ευαίσθητο (S). Το σημαντικό είναι τα επίπεδα ανθεκτικότητας του υβριδικού που προήλθε από τη διασταύρωση ανθεκτικών ατόμων και ευαίσθητων ατόμων, που είναι μεταξύ των γονέων.

Παρατηρώντας το **Διάγραμμα 1** φαίνεται πως ο RS πληθυσμός εμφανίζει ενδιάμεσα επίπεδα ανθεκτικότητας με συνέπεια να εμφανίζει ενδιάμεση κυριαρχία. Αυτό επιβεβαιώνεται και από την τελευταία στήλη του **Πίνακα 3**, που έχει υπολογιστεί από τον τύπο του Stone (1968), υποδεικνύοντας πως η κυριαρχία του φαινοτύπου είναι μηδενική (0). Με αυτό τον τρόπο **υποδηλώνεται ως ενδιάμεση κυριαρχία**. Δηλαδή υπάρχουν αλληλόμορφα που προέρχονται από τον ανθεκτικό γονέα και εμφανίζονται επικρατέστερα έναντι των ίδιων αλληλομόρφων που προέρχονται από τον ευαίσθητο γονέα. Έτσι, οι απόγονοι είναι εν μέρει ανθεκτικοί στις αβερμεκτίνες. Παράλληλα, οι ευαίσθητοι γονείς κληροδοτούν στους απογόνους αλληλόμορφα που ίσως να είναι επικρατέστερα έναντι των ίδιων αλληλομόρφων που προέρχονται από τους ανθεκτικούς γονείς, με συνέπεια η έκφραση αυτών να προσδίδει ευαισθησία στους απογόνους για τη συγκεκριμένη τοξική ουσία.

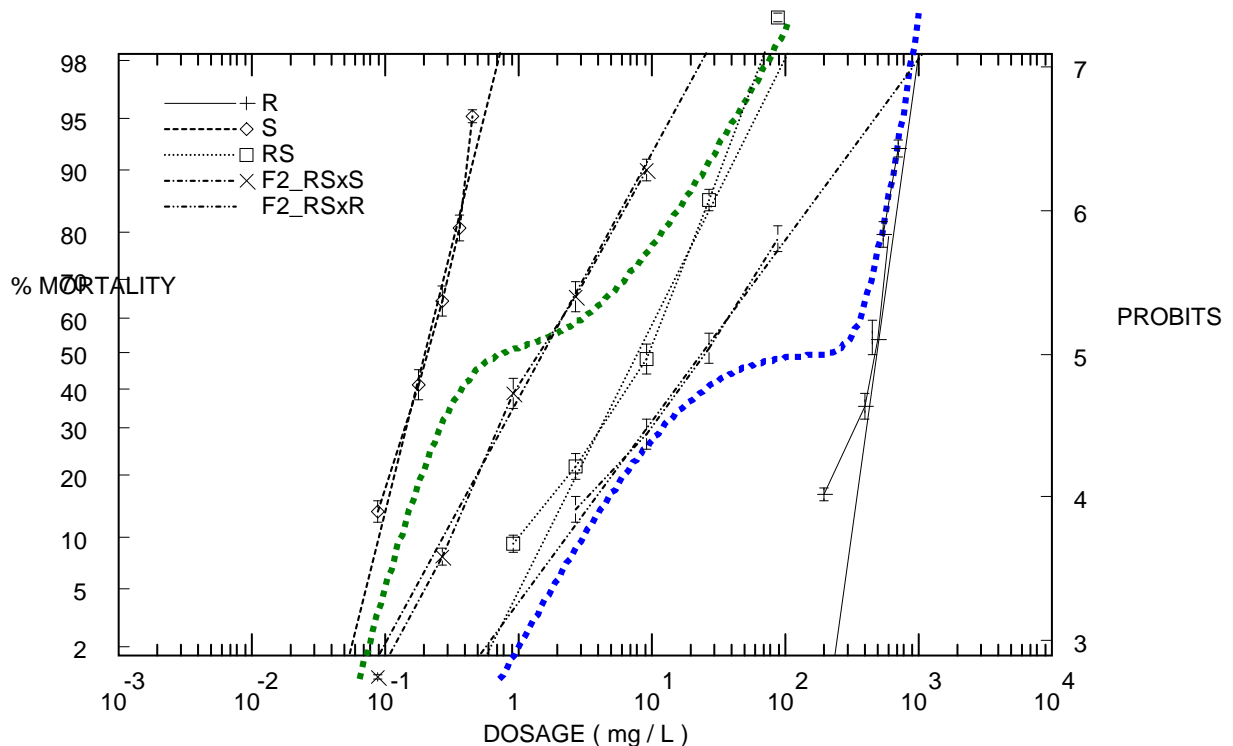


Διάγραμμα 1: Θνησιμότητα ακμαίων θηλυκών *T. urticae* σε σχέση με την εφαρμοζόμενη συγκέντρωση της δραστικής ουσίας. Αριστερά είναι η καμπύλη θνησιμότητας του ευαίσθητου στελέχους (S), στο κέντρο παρουσιάζεται η καμπύλη θνησιμότητας των RS ατόμων και δεξιά είναι η καμπύλη θνησιμότητας του ανθεκτικού στελέχους (R).

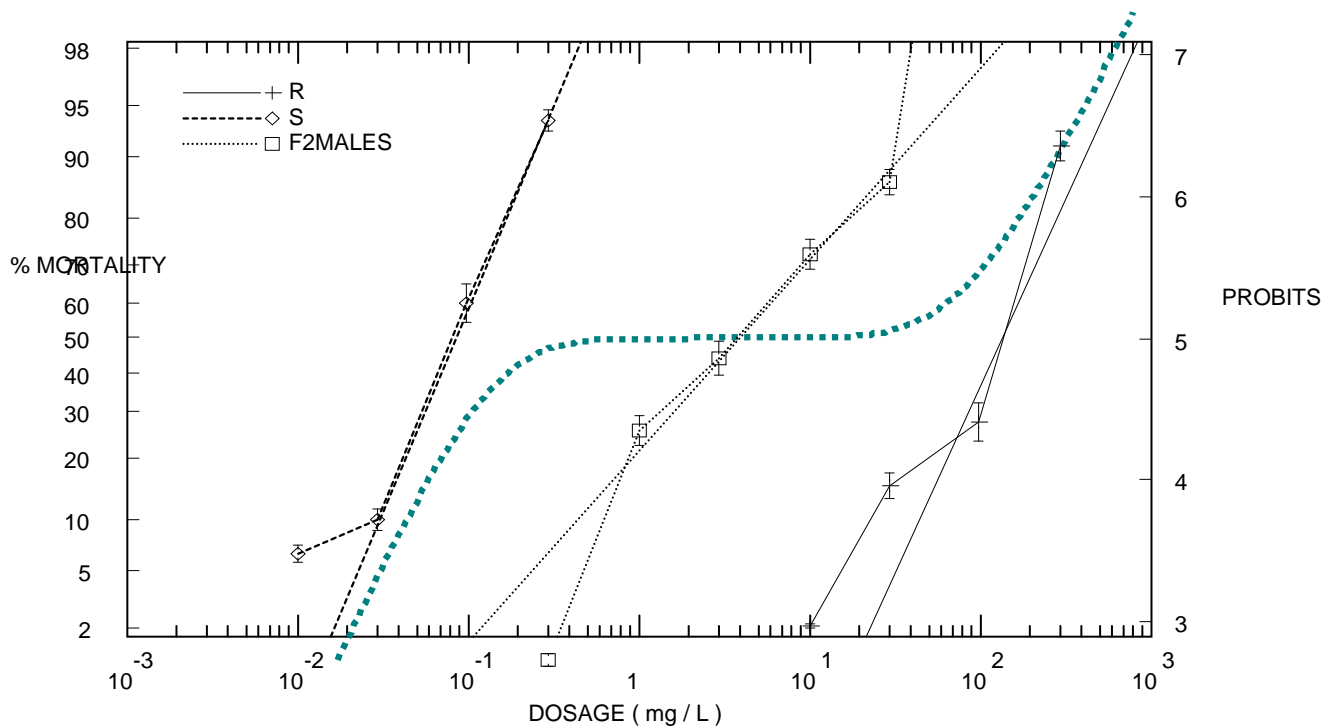
1.2.2 Αριθμός γονιδίων

Για να εξεταστεί αν ο φαινότυπος της ανθεκτικότητας οφείλεται σε ένα ή περισσότερα γονίδια ακολούθησαν βιοδοκιμές στην F2 γενιά θηλυκών και αρσενικών ατόμων και ανάλυση των καμπυλών απόκρισης (**Διαγράμματα 2 & 3** αντίστοιχα). Το Διάγραμμα 2 αναπαριστά τις παρατηρούμενες τιμές θνησιμότητας των F2 θηλυκών στο abamectin. Οι διακεκομμένες καμπύλες του διαγράμματος δείχνουν τις αναμενόμενες τιμές για τα F2 θηλυκά αν η ανθεκτικότητα στο abamectin οφειλόταν σε ένα και μόνο γονίδιο. Επειδή δεν υπάρχει plateau στο επίπεδο του 50% της θνησιμότητας στους απογόνους των επαναδιασταυρώσεων και η παρατηρούμενη θνησιμότητα για αυτές τις διασταυρώσεις (RSxS, RSxR) διαφέρει στατιστικά από τις αναμενόμενες ($\chi^2 = 27,08$, $df = 4$, $\chi^2 = 15,06$, $df = 4$, $P\text{-value} < 0,05$), **η ανθεκτικότητα στο abamectin στο ανθεκτικό στέλεχος (R) οφείλεται σε περισσότερα του ενός γονίδια**. Στο Διάγραμμα 3 απεικονίζονται οι τιμές της θνησιμότητας σε σχέση με τη συγκέντρωση της ακαρεοκτόνου ουσίας για τα F2

αρσενικά. Η διακεκομμένη καμπύλη αναπαριστά τις αναμενόμενες τιμές της θνησιμότητας των F2 αρσενικών αν η ανθεκτικότητα στις αβερμεκτίνες οφειλόταν σε ένα και μόνο γονίδιο. Για τους ίδιους λόγους που περιγράφηκαν για τα F2 θηλυκά, με $\chi^2 = 99,41$, $df = 4$, (P -value < 0,05), για τα αρσενικά υποστηρίζεται ότι η κληρονόμηση της ανθεκτικότητας στις αβερμεκτίνες είναι πολυγονιδιακή. Η ανάλυση έγινε στα αρσενικά άτομα διότι είναι απλοειδείς οργανισμοί και δίνουν πιο ξεκάθαρα αποτελέσματα στον αριθμό των γονιδίων που εμπλέκονται στην κληρονόμηση της ανθεκτικότητας.



Διάγραμμα 2: Θνησιμότητα ακμαίων θηλυκών *T. urticae*. Από αριστερά προς τα δεξιά φαίνεται η καμπύλη θνησιμότητας του ευαίσθητου στελέχους (S, ◇), η καμπύλη θνησιμότητας της F2 γενιάς που προήλθε από τη διασταύρωση RSxS (x), η καμπύλη θνησιμότητας του υβριδικού στελέχους (RS, □), η καμπύλη θνησιμότητας της F2 γενιάς που προήλθε από τη διασταύρωση RSxR (δεν έχει σύμβολο) και η καμπύλη θνησιμότητας του ανθεκτικού στελέχους (R, +). Η πράσινη και η μπλε καμπύλη με διακεκομμένες γραμμές παριστάνουν τις καμπύλες θνησιμότητας της F2 γενιάς που θα προέρχονταν από τις διασταυρώσεις RSxS και RSxR αντίστοιχα σε περίπτωση που ένα και μόνο γονίδιο ήλεγχε τον φαινότυπο της ανθεκτικότητας.



Διάγραμμα 3: Θνησιμότητα ακμαίων αρσενικών *T. urticae*. Από αριστερά προς τα δεξιά φαίνεται η καμπύλη θνησιμότητας του ευαίσθητου στελέχους (S, \diamond), η καμπύλη θνησιμότητας της F2 γενιάς αρσενικών η οποία προήλθε από παρθένα υβριδικά (RS) θηλυκά και η καμπύλη θνησιμότητας του ανθεκτικού στελέχους (R, +). Η διακεκομμένη καμπύλη αναπαριστά την αναμενόμενη καμπύλη θνησιμότητας της F2 γενιάς αρσενικών αν υπόκειτο μονογονιδιακό έλεγχο.

1.2.3 Γονοτύπιση των καναλιών χλωρίου 1 και 3

Ο Πίνακας 4 δείχνει τους αναμενόμενους και τους παρατηρούμενους θυληκούς απογόνους της F2 γενιάς για τις μεταλλαγές που αφορούν το 1^ο και 3^ο κανάλι χλωρίου. Η αναμενόμενη αναλογία των F2 απογόνων και για τις δύο μεταλλαγές θα έπρεπε να είναι 50%, σύμφωνα με την αρχή του διαχωρισμού. Παρατηρώντας τον πίνακα βλέπουμε πως όλοι οι απόγονοι φέρουν τη μεταλλαγή που αφορά το 3^ο κανάλι χλωρίου και κανένα άτομο δεν είναι ετερόζυγο, ενώ το αντίθετο συμβαίνει για τη μεταλλαγή που αφορά το 1^ο κανάλι. Κάνοντας τον έλεγχο χ^2 , (Η κρίσιμη τιμή του ελέγχου χ^2 για 1 βαθμό ελευθερίας και επίπεδο σημαντικότητας $\alpha = 0,05$ δίνεται από τον Πίνακα Α στο Παράρτημα.), οδηγούμαστε στο συμπέρασμα ότι η μεταλλαγή που λαμβάνει χώρα στο 3^ο κανάλι χλωρίου είναι απαραίτητη για να επιβιώσουν τα άτομα σε δόση 100 ppm σε σχέση με τη μεταλλαγή που αφορά το 1^ο κανάλι χλωρίου, που ίσως να μην παίζει ιδιαίτερο ρόλο στην ανθεκτικότητα

δεδομένου ότι και τα επιβιώσαντα και τα αποθανώντα έχουν την ίδια ακριβώς συχνότητα της G323D .

Στον **Πίνακα 5** φαίνονται τα αποτελέσματα από τη γονοτύπιση των καναλιών χλωρίου 1 και 3. Η πρώτη στήλη αποτελεί τα άτομα που συλλέχθηκαν για να γίνει η γονοτύπιση. Παρατηρείται ότι χρησιμοποιήθηκαν πατρικά άτομα από το ευαίσθητο και το ανθεκτικό στέλεχος και θηλυκά άτομα F2 γενιάς που προήλθαν από δύο διασταυρώσεις. Η δεύτερη στήλη δείχνει τον αριθμό των ατόμων που χρησιμοποιήθηκαν για τη γονοτύπιση της κάθε μεταλλαγής. Οι στήλες 3 έως 5 αφορούν την αντικατάσταση του αμινοξέος γλυκίνη από το αμινοξύ ασπαρτικό οξύ για τα άτομα που εξετάστηκαν για το 1^ο κανάλι χλωρίου. Έτσι, στην τρίτη στήλη φαίνεται το ποσοστό ομοζυγωτίας για το αμινοξύ γλυκίνη (Gly, G), στην τέταρτη στήλη εμφανίζεται το ποσοστό ετεροζυγωτίας και η πέμπτη στήλη δείχνει το ποσοστό αντικατάστασης του αμινοξέος γλυκίνης από ασπαρτικό οξύ, άρα και ομοζυγωτίας για το αμινοξύ ασπαρτικό οξύ (Asp, D). Η 6^η στήλη αναπαριστά την συχνότητα της αντικατάστασης της γλυκίνης από ασπαρτικό οξύ για τα άτομα που εξετάστηκαν. Οι στήλες 7 έως 9 αφορούν την αντικατάσταση του αμινοξέος γλυκίνη από το αμινοξύ γλουταμικό οξύ για τα άτομα που εξετάστηκαν για το 3^ο κανάλι χλωρίου. Στην 7^η στήλη παρατηρείται το ποσοστό ομοζυγωτίας για το αμινοξύ γλυκίνη (Gly, G), η 8^η στήλη δείχνει το ποσοστό ετεροζυγωτίας και 9^η στήλη αφορά το ποσοστό αντικατάστασης του αμινοξέος γλυκίνης από γλουταμικό οξύ, άρα και ομοζυγωτίας για το αμινοξύ γλουταμικό οξύ (Glu, E). Η τελευταία στήλη αφορά την συχνότητα αντικατάστασης της γλυκίνης από το γλουταμικό οξύ για τα άτομα που εξετάστηκαν.

Φαίνεται λοιπόν ότι οι θηλυκοί απόγονοι της F2 γενιάς που συλλέχθηκαν ζωντανοί μετά την εφαρμογή abamectin δόσης 100 ppm, να **εμφανίζονται ομόζυγοι για τη μεταλλαγή που αφορά το 3^ο κανάλι χλωρίου**. Οπότε, ίσως αυτή η μεταλλαγή να συνεισφέρει στην ανθεκτικότητα, αλλά ο ρόλος της δεν είναι ακόμα ξεκάθαρος.

Πίνακας 4: Αναμενόμενος και παρατηρούμενος γονότυπος στους F2 απογόνους για τις μεταλλαγές που αφορούν το 1^ο και 3^ο κανάλι χλωρίου.

Γονότυπος (Glu-C13)	Αναμενόμενο	Παρατηρούμενο	(Παρατηρούμενο-Αναμενόμενο) ² / Αναμενόμενο
SR	5	0	5
RR	5	10	5
			$\chi^2 = 10 > \chi^2_{\text{κρ};1;0,05} = 3,84$ (<i>P-value</i> < 0,05)
Γονότυπος (Glu-C11)			
SR	5	6	0,2
RR	5	4	0,2
			$\chi^2 = 0,4 < \chi^2_{\text{κρ};1;0,05} = 3,84$ (<i>P-value</i> > 0,05)

Πίνακας 5: Αποτελέσματα γονοτύπησης για τις μεταλλαγές στο 1^ο και 3^ο κανάλι χλωρίου.

Διασταύρωση	Μεταλλαγή Κανάλι 1 (GluCl1)					Μεταλλαγή Κανάλι 3 (GluCl3)			
	n	Gly/Gly	Gly/Asp	Asp/Asp	G323D frequency %	Gly/Gly	Gly/Glu	Glu/Glu	G323E frequency %
S parental male	10	100	0	0	0	100	0	0	0
R parental male	10	0	0	100	100	0	0	100	100
F2 ♀ (RS female x S male) «νεκρά» (0,3-10ppm)	10	50	50	0	25	60	40	0	20
F2 ♀ (RS female x S male) ζωντανά (0,3-10ppm)	10	10	90	0	45	30	70	0	35
F2 ♀ (RS female x R male) «νεκρά» (30ppm)	10	0	60	40	70	0	70	30	65
F2 ♀ (RS female x R male) ζωντανά (100ppm)	10	0	60	40	70	0	0	100	100

1.3 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το στέλεχος TU82 προέρχεται από θερμοκηπιακές καλλιέργειες τριανταφυλλιάς από το Μαραθώνα Αττικής και εμφανίζει υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας στις αβερμεκτίνες. Σκοπός της συγκεκριμένης πειραματικής ενότητας ήταν να βρεθεί αν ο φαινότυπος της ανθεκτικότητας του συγκεκριμένου στελέχους στις αβερμεκτίνες είναι κυρίαρχος, αν οφείλεται στη δράση ενός γονιδίου ή περισσότερων και τέλος αν η νέα σημειακή μεταλλαγή συνεισφέρει σε αυτή την ανθεκτικότητα.

Μελετήθηκε ο τρόπος κληρονομής της ανθεκτικότητας και βρέθηκε ότι έχει ενδιάμεση ανθεκτικότητα (intermediate dominance) για τις αβερμεκτίνες και οφείλεται στη δράση πολλών γονιδίων (**Πίνακας 3**). Αυτό πιθανότατα σημαίνει ότι υπάρχουν γονίδια που η έκφραση τους είναι κυρίαρχη για μια μεταλλαγή και άλλα γονίδια που η εκφρασή τους προσδίδει υπολλειπόμενο χαρακτήρα με συνέπεια να αλληλεπιδρούν και να προσδίδουν ενδιάμεσο φαινότυπο.

Η πιθανή συμμετοχή πολλών γονιδίων στην ανθεκτικότητα υποδεικνύεται επίσης από πειράματα μικροσυστοιχιών που έγιναν παράλληλα και έδειξαν ότι η έκφραση ενός μεγάλου αριθμού γονιδίων σχετίζεται με το φαινότυπο της ανθεκτικότητας στις αβερμεκτίνες.

Οι Kwon et al. (2010b) σε παρόμοια μελέτη τους βρήκαν ότι ο φαινότυπος της ανθεκτικότητας είναι ατελώς υπολλειπόμενος. Στο ίδιο συμπέρασμα κατέληξαν και οι He et al. (2009) οι οποίοι έκαναν γενετική ανάλυση της ανθεκτικότητας του *T. cinnabarinus* στις αβερμεκτίνες. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο φαινότυπος της ανθεκτικότητας αποτελεί ατελές υπολλειπόμενο χαρακτηριστικό και οφείλεται σε περισσότερα του ενός γονίδια. Οι Pu et al. (2010) εξέτασαν το φαινότυπο της ανθεκτικότητας του εντόμου *Plutella xylostella* στις αβερμεκτίνες. Ο φαινότυπος ναι μεν οφείλεται στο ρόλο πολλών γονιδίων αλλά η κυριαρχία του φαινομένου είναι ατελώς επικρατής. Επίσης οι Yorgulmaz και Ay (2009) εξέτασαν την ανθεκτικότητα του τετρανύχου στις αβερμεκτίνες και τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο φαινότυπος είναι ατελώς επικρατής.

Γενικότερα ο τετρανύχος εμφανίζει ανθεκτικότητα σε πολλά εντομοκτόνα. Για παράδειγμα οι Van Pottelberge et al. (2009) έκαναν γενετική ανάλυση της ανθεκτικότητας του τετρανύχου στο spirodiclofen και βρήκαν ότι το φαινόμενο είναι πολυγονιδιακό και πως ο φαινότυπος της ανθεκτικότητας ήταν ενδιάμεσος. Επίσης, οι

Sato et al. (2004) εξέτασαν την κληρονομία της ανθεκτικότητας του τετρανύχου στην τοξική ουσία fenpyroximate. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο φαινότυπος είναι ατελώς επικρατής και αυτή η ανθεκτικότητα οφείλεται στο ρόλο ενός και μόνο γονιδίου. Οι Herron και Rophail (1993) μελέτησαν την ανθεκτικότητα του τετρανύχου στο hexythiazox και βρήκαν ότι ο φαινότυπος είναι ατελώς επικρατής και οφείλεται στη δράση ενός και μόνο γονιδίου.

Γνωρίζοντας ότι στόχος των αβερμεκτινών είναι τα κανάλια χλωρίου (Glutamate – gated chloride channels) επιλέχθηκε να γίνει γονοτύπιση. Από τη μελέτη των Kwon et al. (2010b) είναι γνωστό πως στο 1ο κανάλι χλωρίου στη θέση 323 έχει γίνει αντικατάσταση του αμινοξέος γλυκίνη από το ασπαρτικό οξύ. Οι συγκεκριμένοι βρήκαν πως τα άτομα που επέζησαν ύστερα από 720 λεπτά μετά τη δράση της ακαρεοκτόνου ουσίας ήταν ομόζυγα για τη μεταλλαγή. Όσα πέθαναν στα πρώτα 45 – 60 λεπτά ήταν είτε ομόζυγα για το αμινοξύ της γλυκίνης είτε ετερόζυγα. Όμως, οι τετράνυχτοι έχουν πέντε κανάλια χλωρίου και στα δύο από αυτά παρατηρείται μεταλλαγή στη θέση 323. Η μία μεταλλαγή αφορά το 1ο κανάλι χλωρίου που μόλις περιγράφηκε και η δεύτερη μεταλλαγή αφορά το 3ο κανάλι χλωρίου. Για το κανάλι (3^ο) αυτό παρατηρείται αντικατάσταση του αμινοξέος γλυκίνη από το γλουταμικό οξύ στη θέση 323 (Van Leeuwen, προσωπική επικοινωνία). Σύμφωνα με τα δεδομένα δεν είναι δυνατό να εξαχθούν πολλά συμπεράσματα λόγω του μικρού αριθμού ατόμων που χρησιμοποιήθηκαν για τη γονοτύπιση και λόγω του ότι στις μικρές δόσεις εξετάστηκαν άτομα από διάφορες δόσεις και όχι από κάποιες συγκεκριμένα. Παρόλα αυτά θα μπορούσε να εικαστεί από αυτά τα αρχικά αποτελέσματα πως τα γονίδια αυτά βρίσκονται σε διαφορετικά χρωμοσώματα και δεν είναι συνδεδεμένα. Όμως χρειάζονται επιπλέον πειράματα για να εξακριβωθεί. Επίσης παρατηρείται πως τα άτομα τα οποία επέζησαν στη μεγαλύτερη δόση (100ppm) είναι ομόζυγα για τη μεταλλαγή που αφορά το 3ο κανάλι χλωρίου κάτι που σημαίνει πως η μεταλλαγή αυτή είναι υπολειπόμενη και συμβάλλει στο φαινότυπο της ανθεκτικότητας. Όμως, αντίθετα με τα αποτελέσματα που βρήκαν οι Kwon et al. (2010b) για τη μεταλλαγή που αφορά το 1ο κανάλι χλωρίου, δεν βρέθηκαν τα αντίστοιχα στην παρούσα μελέτη. Δηλαδή, τα ζωντανά άτομα της μεγαλύτερης δόσης (100 ppm) δε φάνηκε να είναι κατά ανάγκη ομόζυγα για τη μεταλλαγή. Το μεγαλύτερο ποσοστό των ατόμων φάνηκε να είναι ετερόζυγο, κάτι που ίσως οδηγεί στο συμπέρασμα ότι ίσως η μεταλλαγή στο πρώτο κανάλι χλωρίου να είναι επικρατής. Από τον έλεγχο χ^2 (Πίνακας 4) συμπεραίνεται ότι ίσως η μεταλλαγή που εμφανίζεται στο 1^ο κανάλι

χλωρίου να μην παίζει ιδιαίτερο ρόλο στην ανθεκτικότητα του τετρανύχου σε τόσο υψηλές συγκεντρώσεις της αβερμεκτίνης, αλλά να κατέχει σημαντικό ρόλο σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Επίσης, συλλέχθηκαν «νεκρά» άτομα τα οποία καταγράφηκαν ως νεκρά στη δόση 30 ppm. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης έδειξαν ότι το μεγαλύτερο ποσοστό των νεκρών ατόμων είναι ετερόζυγα και για τις δύο μεταλλαγές, κάτι που σημαίνει πως αν η μεταλλαγή που αφορά το τρίτο κανάλι χλωρίου δεν είναι σε ομοζυγωτία τότε τα άτομα φαίνεται να είναι πιο ευαίσθητα.

ΕΝΟΤΗΤΑ 2: ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΠΑΡΕΜΒΟΛΗΣ RNA

Στην παρούσα ενότητα θα περιγραφεί η προσπάθεια ανάπτυξης της μεθόδου παρεμβολής RNA στον τετράνυχο έχοντας ως σκοπό να χρησιμοποιηθεί για την αξιολόγηση του πιθανού ρόλου γονιδίων που σχετίζονται με το φαινόμενο από την ανάλυση των μικροσυστοιχιών στην ανθεκτικότητα.

2.1 ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ

2.1.1 Δίκλωνο RNA (dsRNA)

Για τη δημιουργία dsRNA ακολουθήθηκε το εξής πρωτόκολλο:

Θηλυκοί τετράνυχοι συλλέγονταν από την καλλιέργεια, περίπου 200 άτομα και τοποθετούνταν σε 1,5 ml erpendorf tubes. Έπειτα, γινόταν εξαγωγή ολικού RNA με τη χρήση του kit RNeasy Mini kit (Cat. No 74104 – Qiagen) σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρείας. Εν συνεχεία πραγματοποιήθηκε σύνθεση cDNA σύμφωνα με το παρακάτω πρωτόκολλο:

RNA 1 - 2 µg	x µl
oligodT	1 µl
H ₂ O	x µl
Συνολικός όγκος	11 µl

- Επώαση δείγματος στους 65 °C για 10 λεπτά σε μικροκυκλοποιητή (PCR).
- Επώαση δείγματος στον πάγο για 2 λεπτά
- Προσθήκη 8 µl από το παρακάτω Master Mix:

5x FSB	4 µl
0,1M DTT	2 µl
10mM dNTPs	1 µl
RNasin	1 µl

- Επώαση δείγματος στους 50°C για 10 λεπτά
- Προσθήκη 1 µl SSIII στο δείγμα
- Επώαση στους 50 °C για 50 λεπτά και 70 °C για 15 λεπτά.

Έπειτα, το cDNA χρησιμοποιήθηκε σαν template για την παραγωγή προϊόντος στην PCR με εκκινητές που στα άκρα τους φέρουν τον T7 promoter.

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στη συγκεκριμένη περίπτωση ήταν για το γονίδιο της ακετυλοχολινεστεράσης (AChE) και GFP (**Πίνακας 5**). Για την

παραγωγή του γονιδίου της GFP χρησιμοποιήθηκε φορέας κλωνοποίησης που έφερε αυτό το γονίδιο.

Πίνακας 5: Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή προϊόντος από PCR και τη μετέπειτα δημιουργία dsRNA. Η αλληλουχία αναγράφεται με την κατεύθυνση 5' → 3'.

Εκκινητής	Αλληλουχία
T7 GFP F	TAATACGACTCACTATAGGGAGAACGTA AACGGCCACAAGTTC
T7 GFP R	TAATACGACTCACTATAGGGAGACTTGTACAGCTCGTCCATGCC
T7 AChE F	TAATACGACTCACTATAGGGAGATGTTTACCATTCACCGCACA
T7 AChE R	TAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGCTCCAATTTGATGATCC

Από τη στιγμή που λαμβανόταν το επιθυμητό προϊόν, μεγέθους 800 περίπου βάσεων, καθαριζόταν με τη χρήση του kit QIAquick Gel Extraction kit (Cat No. 28706 - Qiagen).

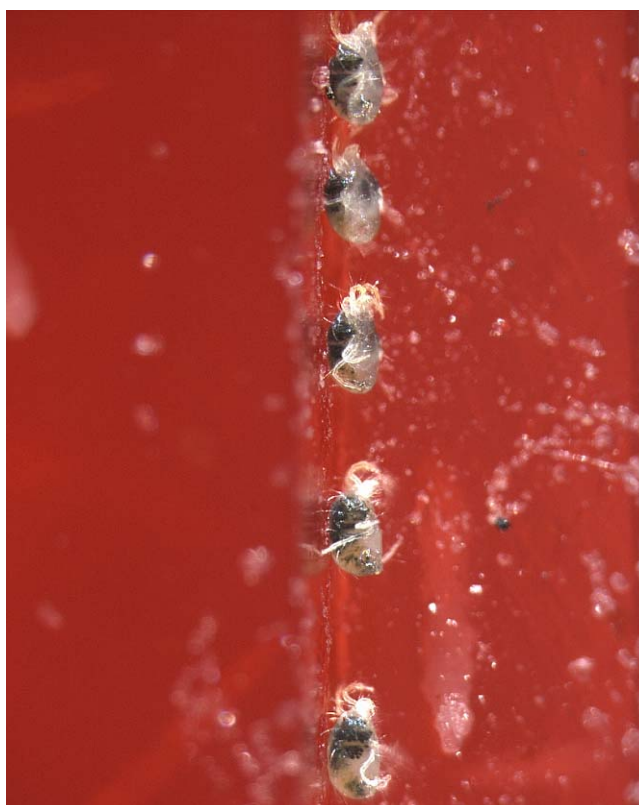
Εν συνεχεία το καθαρό αυτό προϊόν χρησιμοποιείτο για τη μεταγραφή του σε dsRNA με τη χρήση του kit MEGAscript (Ambion). Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε περιγράφεται στο εγχειρίδιο που παρέχει η κατασκευασθείσα εταιρεία. Από τη στιγμή που έχει δημιουργηθεί το dsRNA, υποβάλλεται σε καθαρισμό με τη χρήση του kit MEGAclean (Ambion), όπου και ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Έπειτα, φορτώθηκε το δείγμα σε gel αгарόζης 1% έτσι ώστε να εξακριβωθεί αν έχει το σωστό μέγεθος και μετρήθηκε η συγκέντρωσή του στο nanodrop. Η συνήθης συγκέντρωση dsRNA τόσο της AChE όσο και της GFP είναι 2-3 $\mu\text{g} / \mu\text{l}$.

2.1.2 Απομόνωση τετρανύχων

Για τη διεξαγωγή των μικροενέσεων απομονώθηκαν αρχικά θηλυκοί ενήλικοι τετρανύχοι, περίπου 800 άτομα, από την καλλιέργεια. Οι τετρανύχοι αυτοί τοποθετούνταν σε τριβλία με φύλλο φασολιού πάνω σε υγρό βαμβάκι. Σε κάθε τριβλίο τοποθετούνταν 200 τετρανύχοι, συνεπώς δημιουργήθηκαν 4 τριβλία. Σε δεύτερη φάση πραγματοποιήθηκε η μέθοδος των μικροενέσεων σε συγχρονισμένα, δηλαδή ίδιας ηλικίας, ενήλικα θηλυκά άτομα. Για να επιτευχθεί ο συγχρονισμός των ατόμων, σε 3 τριβλία με φύλλο φασολιού, απομονώθηκαν ενήλικα θηλυκά άτομα, περίπου 100 – 150 στο καθένα, έτσι ώστε να γεννήσουν μεγάλο αριθμό αυγών. Τα άτομα αφήνονταν να αποθέσουν αυγά για 6 – 8 ώρες και μεταφέρονταν σε νέο φύλλο φασολιού για την ίδια διαδικασία. Αυτό πραγματοποιήθηκε για 3 ημέρες.

2.1.3. Μέθοδος Μικροενέσεων

Για να πραγματοποιηθούν οι μικροενέσεις, φτιάχνονταν τριβλία Petri άγαρ με κερασόζουμο. Στον πάτο του τριβλίου τοποθετούνταν αντικειμενοφόροι πλάκες έτσι ώστε να δημιουργείται κάτι σαν «σκαλοπάτι». Από το υπόστρωμα (κερασόζουμο με άγαρ) χρησιμοποιείται το μισό, στο οποίο τοποθετούνταν οι τετράνυχτοι ένας προς ένας με πινέλο με τέτοιο τρόπο ώστε οι μικροενέσεις να γίνονται στην κοιλιακή χώρα του οργανισμού (**Εικόνα 6**).



Εικόνα 6: Τρόπος τοποθέτησης τετράνυχτων στο υπόστρωμα από κερασόζουμο ώστε να γίνουν οι μικροενέσεις.

Από εκεί και πέρα, η μικροβελόνα τοποθετήθηκε σε χειροκίνητο μηχανισμό (Joystick Manipulator - **Εικόνα 7**) ο οποίος συνδεόταν σε microinjector που καθορίζει την πίεση έγχυσης του dsRNA στον οργανισμό (NARISHIGE Motor Drive Microinjector IM – 300) και βοηθάει στην έγχυση υγρού μικρού όγκου με πολύ μεγάλη ακρίβεια. Οι συγκεντρώσεις dsRNA τόσο για την καταστολή του γονιδίου της AChE όσο και του γονιδίου της GFP ήταν 1 μg / μl για τις μικροενέσεις σε ασυγχρόνιστα ενήλικα θηλυκά και 2 μg / μl για τις μικροενέσεις σε συγχρονισμένα ενήλικα θηλυκά. Το dsRNA που στοχεύει το γονίδιο της GFP χρησιμεύει σαν

μάρτυρας. Εδώ πρέπει να αναφερθεί ότι τα ασυγχρόνιστα ενήλικα θηλυκά ενύονταν μία φορά μόνο, ενώ τα συγχρονισμένα ενήλικα θηλυκά ενύονταν 2 φορές, αφήνοντας κενό διάστημα 24 ωρών μεταξύ των δύο μικροενέσεων. Κάθε φορά ενύονταν περίπου 300 – 350 άτομα με dsRNA GFP και 300 – 350 άτομα με dsRNA AChE.



Εικόνα 7: Χειροκίνητος μηχανισμός που στην άκρη του τοποθετείται η μικροβελόνα (Joystick Manipulator).

2.1.4 PCR σε πραγματικό χρόνο - Real Time PCR

Για να πραγματοποιηθεί Real Time PCR, δημιουργήθηκαν 3 επαναλήψεις τυχαίων 80 ενεμένων ατόμων, όπως περιγράφηκε στην ενότητα 2.4.

Για να πραγματοποιηθεί Real Time PCR στα ασυγχρόνιστα άτομα, συλλέχθηκαν 50 – 70 άτομα από τις τρεις βιολογικές επαναλήψεις μετά από 24, 48 και 72 ώρες μετά την ένεση και ακολούθησε εξαγωγή ολικού RNA και σύνθεση cDNA όπως περιγράφηκε στην ενότητα 2.1.

Για την πραγματοποίηση Real Time PCR στα συγχρονισμένα και διπλά ενεμένα ενήλικα θηλυκά έγινε συλλογή 50 – 70 τετρανύχων των τριών βιολογικών επαναλήψεων μετά από 120 ώρες από την εφαρμογή της πρώτης ένεσης και ακολούθησε εξαγωγή ολικού RNA και σύνθεση cDNA όπως περιγράφηκε στην ενότητα 2.1.

Έπειτα ακολούθησε η διαδικασία της Real Time PCR που περιγράφεται παρακάτω:

- Αρχικά, από κάθε βιολογική επανάληψη (3 με θηλυκούς τετρανύχους ενεμένους με dsRNA GFP και 3 με θηλυκούς τετρανύχους ενεμένους με dsRNA

AChE) λαμβανόταν 1 μl και γινόταν ένα pool των cDNA. Από εκεί και έπειτα, το pooled cDNA χρησιμοποιήθηκε για τη δημιουργία της καμπύλης αναφοράς (standard curve) με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων. Οι αραιώσεις που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 1/5, 1/25, 1/125 και 1/625. Επίσης, υπάρχει ένα αρνητικό δείγμα (negative control) έτσι ώστε να παρατηρηθεί αν υπάρχει μόλυνση. Τέλος, χρησιμοποιήθηκαν 2 μl από κάθε βιολογική επανάληψη (θηλυκοί τετράνυχοι ενεμένοι με dsRNA GFP και θηλυκοί τετράνυχοι ενεμένοι με dsRNA AChE), με δύο τεχνικές επαναλήψεις για κάθε βιολογική επανάληψη και να ελεγχθεί αν υπάρχει καταστολή του γονιδίου της ακετυλοχολινεστεράσης (AChE) στα άτομα που είχαν ενεθεί με dsRNA που στοχεύει κατά του γονιδίου αυτού.

• Για τη δημιουργία των μειγμάτων των αντιδράσεων χρησιμοποιήθηκε το Kara SYBR FAST qPCR Kit (2x).

• Αφού ετοιμάστηκαν τα μείγματα των αντιδράσεων (**Πίνακας 6**), τόσο για το γονίδιο της AChE όσο και για το γονίδιο αναφοράς, (Ribosomal Protein - RP), χρησιμοποιήθηκαν οι κατάλληλοι εκκινητές – (**Πίνακας 7**). Και για τα δύο γονίδια (αναφοράς και στόχου) χρησιμοποιήθηκαν οι ίδιες συνθήκες.

Πίνακας 6: Μείγμα αντιδράσεων για ένα δείγμα.

Μείγμα αντιδράσεων	(x1)
Kara SYBR FAST qPCR Master Mix (2x)	12,5 μl
Εμπρόσθιος εκκινητής (15μM)	0,5 μl
Οπίσθιος εκκινητής (15μM)	0,5 μl
cDNA	2 μl
PCR H ₂ O	9,5 μl

Πίνακας 7: Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τη Real Time PCR. Η αλληλουχία του κάθε εκκινητή αναγράφεται με προσανατολισμό 5' → 3'.

Εκκινητές	Αλληλουχία
Rp49 qPCR F	AAATTAAGAGGAACTGGCGAAAA
Rp49 qPCR R	GCATGTGTCTGGTGGCTTT
AChE qPCR UTR3end F	TTGCCATTTTCATTGATTTTCAT
AChE qPCR UTR3end R	CGTCATCTTGTTCATCGGTTTT

Οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση τόσο του γονιδίου αναφοράς όσο και του γονιδίου στόχου ήταν αρχική επώαση στους 95 °C για 3 λεπτά, 35 κύκλοι στους 95 °C για 15 δευτερόλεπτα, 58 °C για 30 δευτερόλεπτα, 72 °C για 30

δευτερόλεπτα. Για τη δημιουργία των καμπυλών αποδιάταξης από τους 65°C – 95°C γινόταν ανίχνευση κάθε 1°C ανά 2 δευτερόλεπτα.

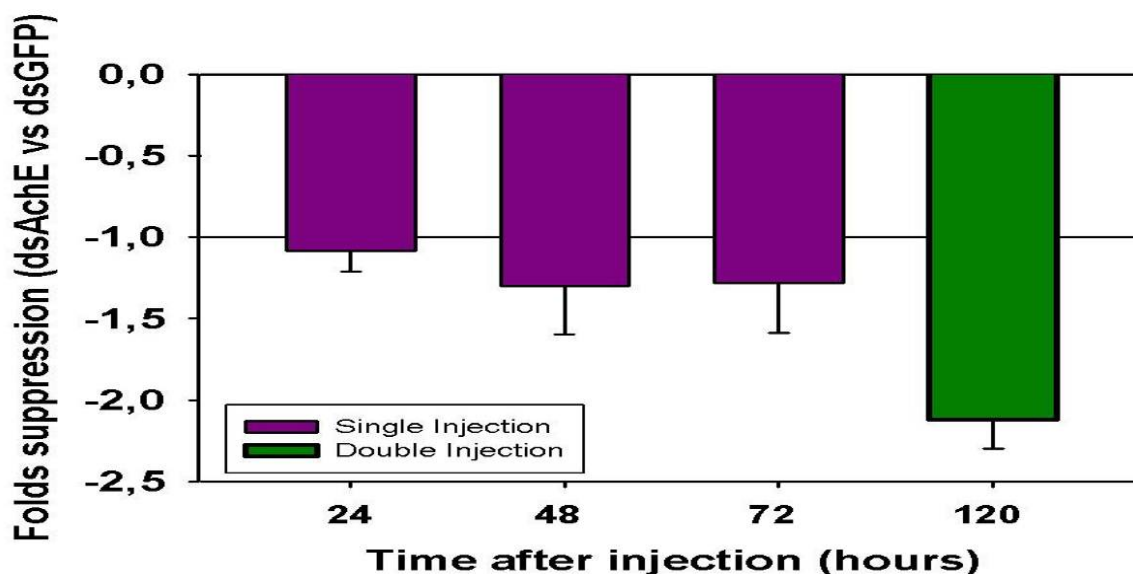
2.1.5 Φαινοτυπικός έλεγχος

Ύστερα από την εφαρμογή των μικροενέσεων και για να λάβει χώρα το φαινοτυπικό τεστ 50 ενήλικα ενεμένα θηλυκά μεταφέρονταν σε τριβλίο Petri σε απομονωμένο φύλλο φασολιού πάνω σε υγρό βαμβάκι. Για τη διεξαγωγή αυτής της δοκιμής δημιουργήθηκαν 3 βιολογικές επαναλήψεις, κάθε μία αποτελείτο από 50 ενεμένα θηλυκά με dsRNA που στοχεύει τη GFP και άλλες 3 επαναλήψεις που αποτελείτο από 50 ενεμένα θηλυκά άτομα η κάθε μια με dsRNA που στοχεύει το γονίδιο της AChE. Έπειτα, ελεγχόταν η θνησιμότητα των ατόμων 5 ώρες μετά την εφαρμογή των μικροενέσεων, 24 ώρες, 48 ώρες και 72 ώρες, στην περίπτωση των ασυγχρόνιστων ενήλικων θηλυκών, και ως 48 ώρες στην περίπτωση των συγχρονισμένων θηλυκών. Τα ενεμένα ενήλικα θηλυκά με dsRNA που στοχεύει τη GFP χρησιμεύει σαν μάρτυρας των ενέσεων. Έτσι, αν στα ενεμένα θηλυκά με dsRNA που στοχεύει το γονίδιο της AChE εμφανίζεται μεγαλύτερη θνησιμότητα σε σχέση με το μάρτυρα (dsRNA που στοχεύει τη GFP) αυτό σημαίνει πως δεν οφείλεται σε κακό χειρισμό ενέσεων.

2.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

2.2.1 Αποτελέσματα Real Time PCR για την καταστολή του γονιδίου της ακετυλοχολινεστεράσης (AChE)

Στο Διάγραμμα 4 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τις μικροενέσεις. Στο συγκεκριμένο πείραμα πραγματοποιήθηκαν μονές μικροενέσεις σε ασυγχρόνιστα ενήλικα θηλυκά (μοβ ράβδοι) και διπλές μικροενέσεις σε συγχρονισμένα ενήλικα θηλυκά (πράσινη ράβδος). Όσον αφορά τις μονές ενέσεις στα ασυγχρόνιστα θηλυκά πρέπει να παρατηρηθεί ότι έγινε συλλογή ενεμένων ατόμων σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα μετά την εφαρμογή των μικροενέσεων (24, 48 και 72 ώρες). Η συλλογή των συγχρονισμένων ατόμων που ενέθηκαν δύο φορές έγινε μετά από 120 ώρες από την εφαρμογή της πρώτης ένεσης. Έτσι, στο διάγραμμα παρουσιάζεται η καταστολή του γονιδίου της AChE σε άτομα που έχουν ενεθεί με dsRNA που στοχεύει το γονίδιο της AChE και σε άτομα που έχουν ενεθεί με dsRNA που στοχεύει το γονίδιο GFP. Τα αποτελέσματα δείχνουν πως με τη μέθοδο των μονών μικροενέσεων δεν παρουσιάστηκε στατιστικά σημαντική καταστολή της έκφρασης του γονιδίου της AChE ($P\text{-value} > 0,05$), ενώ με την εφαρμογή των διπλών ενέσεων φαίνεται να υπάρχει στατιστικά σημαντική μείωση της έκφρασης ($P\text{-value} = 0,046$) του γονιδίου της AChE στα άτομα που έχουν ενεθεί με dsRNA που στοχεύει το γονίδιο της AChE σε σχέση με άτομα που έχουν ενεθεί με dsRNA που στοχεύει το γονίδιο GFP. Η έκφραση του γονιδίου της ακετυλοχολινεστεράσης φαίνεται να έχει μειωθεί κατά 40-50 %.

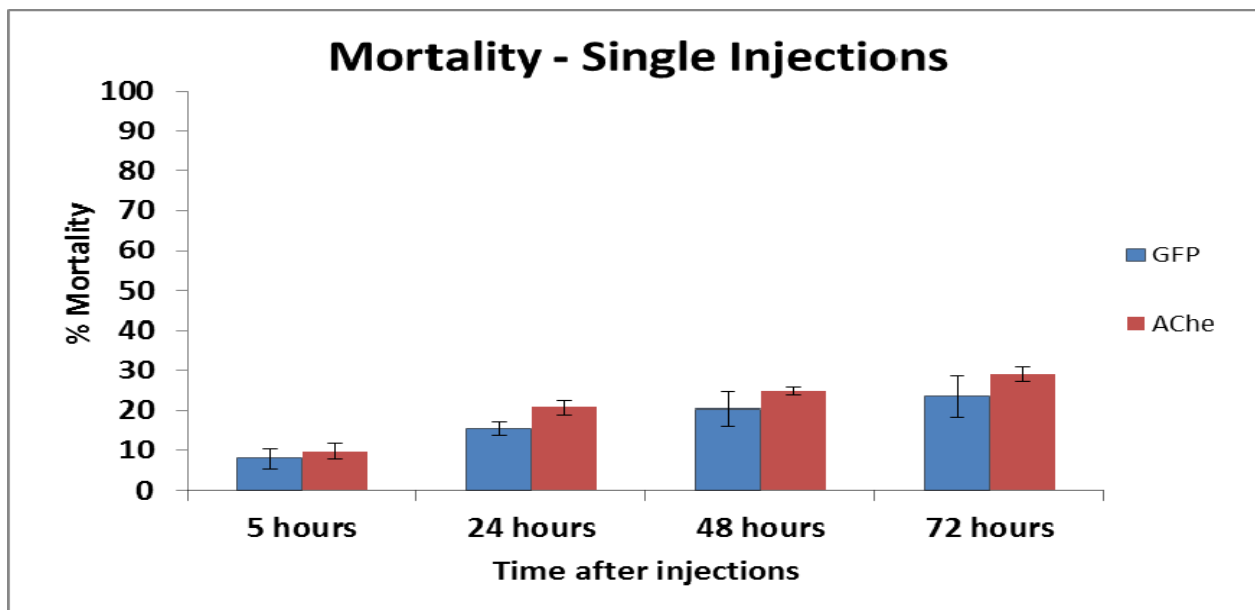


Διάγραμμα 4: Αποτελέσματα έκφρασης γονιδίου ακετυλοχολινεστεράσης (AChE) σε άτομα που έχουν ενεθεί με dsRNA που στοχεύει το γονίδιο της AChE και σε άτομα που έχουν ενεθεί με dsRNA που στοχεύει το γονίδιο GFP. Στον άξονα ψ φαίνεται πόσες φορές έχει μειωθεί η έκφραση του γονιδίου και στον άξονα χ φαίνεται ο χρόνος που μειώθηκε η έκφραση του γονιδίου. Οι μοβ ράβδοι υποδεικνύουν την καταστολή της έκφρασης του γονιδίου μετά την εφαρμογή μονών μικροενέσεων ενώ η πράσινη ράβδος δείχνει την καταστολή της έκφρασης του γονιδίου μετά την εφαρμογή διπλών μικροενέσεων.

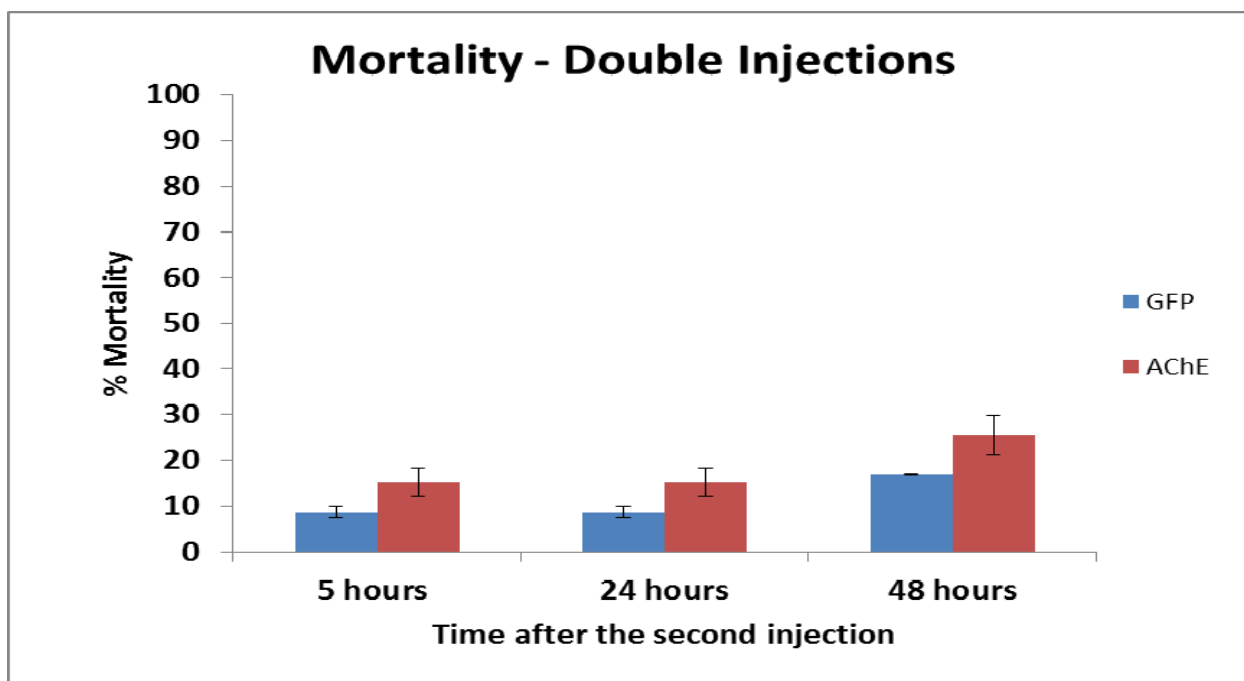
2.2.2 Φαινοτυπικός έλεγχος

Από τη στιγμή που εφαρμόστηκαν οι μικροενέσεις ελέγχθηκε αν υπάρχει επίδραση του dsRNA που στοχεύει το γονίδιο της AChE στο φαινότυπο καταγράφοντας το ποσοστό θνησιμότητας. Το Διάγραμμα 5 δείχνει το ποσοστό θνησιμότητας σε άτομα που ενέθηκαν μία φορά με dsRNA που στοχεύει το γονίδιο της AChE και άτομα που έχουν ενεθεί με dsRNA που στοχεύει το γονίδιο GFP. Η θνησιμότητα καταγραφόταν 5 ώρες μετά την πρώτη ένεση και έπειτα κάθε 24 ώρες, όπως δείχνει ο άξονας χ. Παρατηρείται πως το ποσοστό θνησιμότητας μεταξύ των ατόμων που έχουν ενεθεί με dsRNA που στοχεύει το γονίδιο της AChE και των ατόμων που έχουν ενεθεί με dsRNA που στοχεύει το γονίδιο GFP δεν είναι στατιστικά σημαντικό ($P\text{-value} > 0,05$, t-test for independent samples).

Το Διάγραμμα 6 δείχνει το ποσοστό θνησιμότητας σε άτομα που ενέθηκαν δύο φορές με dsRNA που στοχεύει το γονίδιο της AChE και άτομα που έχουν ενεθεί με dsRNA που στοχεύει το γονίδιο GFP. Η θνησιμότητα καταγραφόταν 5 ώρες μετά την εφαρμογή της δεύτερης ένεσης και έπειτα κάθε 24 ώρες, όπως δείχνει ο άξονας χ. Παρατηρείται πως το ποσοστό θνησιμότητας μεταξύ των ατόμων που έχουν ενεθεί με dsRNA που στοχεύει το γονίδιο της AChE και των ατόμων που έχουν ενεθεί με dsRNA που στοχεύει το γονίδιο GFP δεν είναι στατιστικά σημαντικό ($P\text{-value} > 0,05$, t-test for independent samples). Ωστόσο υπάρχει μια τάση αυξημένης θνησιμότητας στα ακάρεα που ενέθηκαν με dsRNA που στοχεύει την AChE, για την επιβεβαίωση της οποίας απαιτούνται επιπρόσθετα πειράματα.



Διάγραμμα 5: Μέσος όρος θνησιμότητας ατόμων που έχουν ενεθεί με dsRNA που στοχεύει το γονίδιο της AChE και άτομα που έχουν ενεθεί με dsRNA που στοχεύει το γονίδιο GFP (μονές ενέσεις). Ο άξονας ψ δείχνει το ποσοστό θνησιμότητας και ο άξονας χ δείχνει το χρόνο καταγραφής της θνησιμότητας μετά την εφαρμογή των μονών ενέσεων.



Διάγραμμα 6: Μέσος όρος θνησιμότητας ατόμων που έχουν ενεθεί με dsRNA που στοχεύει το γονίδιο της AChE και άτομα που έχουν ενεθεί με dsRNA που στοχεύει το γονίδιο GFP. Ο άξονας ψ δείχνει το ποσοστό θνησιμότητας και ο άξονας χ δείχνει το χρόνο καταγραφής της θνησιμότητας μετά την εφαρμογή της διπλής ένεσης.

2.3 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στη συγκεκριμένη εργασία έγινε προσπάθεια ανάπτυξης μεθόδου σίγησης γονιδίου που συμβάλλει στην ανθεκτικότητα. Για τα συγκεκριμένα πειράματα επιλέχθηκε το γονίδιο της ακετυλοχολινεστεράσης (AChE) κυρίως γιατί μπορεί να ελεγχθεί και βιοχημικά η καταστολή της έκφρασης του γονιδίου και ο φαινότυπος (με τις βιοδοκιμές).

Αρχικά πραγματοποιήθηκαν μονές μικροενέσεις στην κοιλιακή περιοχή του τετρανύχου. Τα άτομα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ενήλικα θηλυκά. Δεν είχαν την ίδια ηλικία, δηλαδή ήταν ασυγχρόνιστα και συλλέχθηκαν από την καλλιέργεια. Για να ελεγχθεί αν η εισαγωγή του dsRNA προκαλεί θνησιμότητα πραγματοποιήθηκε φαινοτυπικός έλεγχος καταγράφοντας το ποσοστό θνησιμότητας των ατόμων κάθε 24 ώρες μετά την εφαρμογή της ένεσης για 3 ημέρες. Τα αποτελέσματα δεν ήταν στατιστικά σημαντικά. Στο ίδιο συμπέρασμα καταλήγουμε με την ανάλυση των δεδομένων από τη Real time PCR. Η μείωση των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου της ακετυλοχολινεστεράσης δεν ήταν στατιστικά σημαντική.

Σε μια επόμενη προσπάθεια ανάπτυξης της μεθόδου, συγχρονισμένα θηλυκά ενήλικα άτομα συλλέχθηκαν και εφαρμόστηκαν διπλές μικροενέσεις. Οι ενέσεις αυτές πραγματοποιήθηκαν με διάστημα 24 ωρών. Και σε αυτή την περίπτωση πραγματοποιήθηκε φαινοτυπικός έλεγχος και ελέγχθηκαν τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου με Real Time PCR. Στο φαινοτυπικό έλεγχο, κυρίως μελετώντας μόνο τη θνησιμότητα, παρατηρήθηκε πως συγκρίνοντας τα άτομα που έχουν ενεθεί με dsGFP και dsAChE για την ίδια χρονική στιγμή δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά. Αντίθετα, εξετάζοντας τα επίπεδα έκφρασης της ακετυλοχολινεστεράσης με Real Time PCR παρατηρήθηκε μείωση της έκφρασης του γονιδίου κατά 40 – 50%. Παρόλα αυτά φαίνεται πως η καταστολή του γονιδίου σε τέτοιο μεγάλο ποσοστό δεν είναι ικανό να επηρεάσει τη θνησιμότητα, όμως στους τετρανύχους φάνηκε ότι προκάλεσε αταξία και αποπροσανατολισμό (προσωπικές παρατηρήσεις).

Οι Liu et al. (2010) σε μελέτη τους προσπάθησαν να βελτιστοποιήσουν και να «σταντάρουν» τη μέθοδο των μικροενέσεων χρησιμοποιώντας προνύμφες 3ου σταδίου του είδους *Nilaparvata lugens*. Παρατήρησαν πως πραγματοποιώντας διπλές μικροενέσεις η έκφραση του γονιδίου που είναι υπεύθυνο για τη β2 υπομονάδα του νικοτινοειδούς (nicotinic acetylcholine) υποδοχέα μειωνόταν κατά 54% σε σχέση με τη μονή μικροένεση όπου η καταστολή της έκφρασης του γονιδίου ήταν η μισή.

Παρόμοια αποτελέσματα είχαν και οι Araujo et al. (2006) οι οποίοι μελέτησαν τη μείωση της έκφρασης νιτροφορίνης στο είδος *Rhodnius prolixus*. Κάνοντας διπλές μικροενέσεις στο συγκεκριμένο οργανισμό βρήκαν πως τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου μειώθηκαν στο διπλάσιο με τις διπλές μικροενέσεις σε σχέση με τις μονές. Οι Khila και Gbric (2007) με την εφαρμογή μικροενέσεων προσπάθησαν να καταστείλουν την έκφραση του γονιδίου που είναι υπεύθυνο για τη δημιουργία του 4ου ζεύγους ποδιών. Από τα 199 άτομα που εξετάστηκαν στα 6 από αυτά τα άκρα ήταν συγκολλημένα και σε 2 από αυτά δεν είχαν αναπτυχθεί καθόλου.

Σε πολλούς οργανισμούς, κυρίως σε έντομα, έχει επιτευχθεί καταστολή ή/και σίγηση γονιδίων είτε μέσω τεχνητής τροφής είτε μέσω διαγονιδιακών φυτών. Για παράδειγμα οι Mao et al. (2007) κατάφεραν να καταστείλουν γονίδιο μονοοξυγενάσης στο έντομο *Helicoverpa armigera* με τη δημιουργία διαγονιδιακών φυτών. Οι Zha et al. (2011) σίγησαν γονίδια του στομάχου με τη χρήση διαγονιδιακών φυτών στο ημίπτερο *Nilaparvata lugens*. Τέλος, οι Bautista et al. (2009) μέσω τεχνητής διαίτας που περιείχε υψηλή ποσότητα dsRNA κατάφεραν να σιγήσουν ένα γονίδιο μονοοξυγενάσης το οποίο παίζει σημαντικό ρόλο στην ανθεκτικότητα του εντόμου *Plutella xylostella* στο πυρεθροειδές pyrimethrin. Όταν επιτεύχθηκε η καταστολή του γονιδίου παρατηρήθηκε μειωμένη ανθεκτικότητα των προνυμφών στο συγκεκριμένο εντομοκτόνο.

Από τα παραπάνω φαίνεται ότι η σίγηση γονιδίων εμφανίζει μεγάλο ποσοστό επιτυχίας μέσω τεχνητής διαίτας ή/και μέσω διαγονιδιακών φυτών. Βέβαια για τον τετράνυχο η τεχνητή διαίτα δεν έδειξε τα επιθυμητά αποτελέσματα (Ηλίας, προσωπική επικοινωνία) μιας και οργανισμός αυτός τρέφεται πάνω σε φυτά και η ανάπτυξη τεχνητής διαίτας είναι δύσκολη. Η μέθοδος των διπλών μικροενέσεων φαίνεται να είναι η πιο επιτυχημένη μέχρι τώρα όσον αφορά τον τετράνυχο, παρόλα αυτά είναι δύσκολη και χρονοβόρα.

3. ΓΕΝΙΚΗ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε ένα ελληνικό στέλεχος τετρανύχου το οποίο συλλέχθηκε από θερμοκηπιακή καλλιέργεια τριανταφυλλιάς στο Μαραθώνα Αττικής. Το στέλεχος αυτό ψεκαζόταν με αβερμεκτίνες αλλά και πολλά άλλα εντομοκτόνα. Από βιοδοκιμές είναι γνωστό ότι το στέλεχος αυτό είναι 2000 φορές πιο ανθεκτικό από έναν κανονικό πληθυσμό.

Με διασταυρώσεις θελήσαμε να ελέγξουμε αν ο φαινότυπος της ανθεκτικότητας του τετρανύχου στις αβερμεκτίνες είναι κυρίαρχος, υπολειπόμενος ή ενδιάμεσος. Επίσης, ελέγχθηκε αν η ανθεκτικότητα του τετρανύχου οφείλεται στη δράση πολλών ή ενός και μόνο γονιδίου. Τέλος, μέσω γονοτύπισης έγινε προσπάθεια ανίχνευσης δύο σημειακών μεταλλαγών, μιας γνωστής και μιας νέας με σκοπό να κατανοήσουμε κυρίως αν η δεύτερη / νέα σημειακή μεταλλαγή παίζει ρόλο στην ανθεκτικότητα.

Τα αποτελέσματα αυτής εργασίας δείχνουν ότι ο φαινότυπος της ανθεκτικότητας του τετρανύχου στις αβερμεκτίνες εμφανίζει ενδιάμεση κυριαρχία και οφείλεται στη δράση πολλών γονιδίων. Από τα αποτελέσματα της γονοτύπισης για τα δύο κανάλια χλωρίου που παίζουν ρόλο στην ανθεκτικότητα βρέθηκε πως οι απόγονοι της F2 γενιάς που προέρχονται από τη διασταύρωση RSxS και επιβιώνουν είναι κατά 90% ετερόζυγοι (G/D) για τη σημειακή μεταλλαγή που αφορά το 1^ο κανάλι χλωρίου και κατά 70% ετερόζυγοι (G/E) για τη σημειακή μεταλλαγή για το 3^ο κανάλι χλωρίου. Οι απόγονοι της γενιάς που προέρχονται από την ίδια διασταύρωση αλλά είναι νεκροί, φαίνεται πως είναι κατά 50% ομόζυγοι για τον άγριο τύπο (G/G) και 50% ετερόζυγοι για τη σημειακή μεταλλαγή (G/D) για το πρώτο κανάλι χλωρίου. Στα ίδια ποσοστά περίπου καταλήγει και η γονοτύπιση για το 3^ο κανάλι χλωρίου. Όσον αφορά τους απογόνους της F2 γενιάς που προέρχονται από τη διασταύρωση RSxR και πεθαίνουν είναι κατά 40% ομόζυγοι για τη σημειακή μεταλλαγή (D/D) και κατά 60% ετερόζυγοι για τη μεταλλαγή που αφορά το 1^ο κανάλι χλωρίου. Τα ίδια άτομα εμφανίζουν 30% ομοζυγωτία (E/E) για τη μεταλλαγή που αφορά το 3^ο κανάλι χλωρίου και κατά 70% ετεροζυγωτία (G/E). Τα άτομα της F2 γενιάς που προέρχονται από την ίδια διασταύρωση και επιζούν είναι 100% ομόζυγοι για τη μεταλλαγή που αφορά το 3^ο κανάλι χλωρίου και 40% ομόζυγοι για τη μεταλλαγή που αφορά το 1^ο κανάλι. Αν και τα άτομα που εξετάστηκαν είναι λίγα, κάποια αρχικά συμπεράσματα που θα μπορούσαν να εξαχθούν είναι πως τα γονίδια είναι σε διαφορετικά

χρωμοσώματα ή / και δεν είναι συνδεδεμένα και πως η μεταλλαγή που αφορά το 3^ο κανάλι γλωρίου (G323E) πρέπει να βρίσκεται σε ομοζυγωτία για να επιβιώσουν τα άτομα σε μεγάλη δόση εντομοκτόνου.

Η ανθεκτικότητα που οφείλεται στη δράση ενός και μόνο γονιδίου θεωρείται ότι είναι πιο πιθανό να εξαπλωθεί και να εγκαθιδρυθεί μέσα σε ένα πληθυσμό σε σχέση με την ανθεκτικότητα που οφείλεται στη δράση πολλών γονιδίων (Roush and McKenzie, 1987). Οι Croft και Van de Baan (1988) αναφέρουν πως η ανθεκτικότητα που οφείλεται στη δράση περισσότερων του ενός γονιδίου και είναι υπολειπόμενη τείνει να είναι λιγότερο σταθερή σε σχέση με τη μονογονιδιακή ανθεκτικότητα στο πεδίο. Συνεπώς ο υπολειπόμενος φαινότυπος της ανθεκτικότητας είναι πιο εύκολο να διαχειριστεί. Οι περισσότερες μελέτες που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα του τετρανύχου στις αβερμεκτίνες έχουν δείξει πως η ανθεκτικότητα χάνεται αν δεν ασκείται επιλεκτική πίεση (Stumph and Nauen, 2002, Sato et al., 2005, Pu et al., 2010). Στην παρούσα μελέτη βρέθηκε πως ο φαινότυπος της ανθεκτικότητας είναι ενδιάμεσος και οφείλεται στη δράση πολλών γονιδίων. Υπό αυτές τις συνθήκες η ανθεκτικότητα θα μπορούσε να μειωθεί σχετικά γρήγορα με την παρουσία ευαίσθητων ατόμων.

Επιπρόσθετα έγινε προσπάθεια ανάπτυξης της μεθόδου με παρεμβολή RNA, η οποία θα χρησιμοποιηθεί για την αξιολόγηση του πιθανού ρόλου γονιδίων που σχετίζονται με το φαινότυπο από την ανάλυση των μικροσυστοιχιών στην ανθεκτικότητα.

Τα αποτελέσματα της Real Time PCR έδειξαν ότι όταν χρησιμοποιούνται συγχρονισμένα ενήλικα θηλυκά άτομα και γίνονται διπλές μικροενέσεις παρατηρείται μείωση της έκφρασης του γονιδίου της ακετυλοχολινεστεράσης σε σχέση με άτομα που έχουν συλλεχθεί απ'ευθείας από την καλλιέργεια (μη συγχρονισμένα άτομα) και γίνονται μονές μικροενέσεις.

Όταν πραγματοποιήθηκε φαινοτυπικός έλεγχος που ουσιαστικά καταγραφόταν η θνησιμότητα των ατόμων, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το ποσοστό θνησιμότητας που παρατηρήθηκε στα άτομα τα οποία ενέθηκαν δύο φορές δεν είναι στατιστικά σημαντικό, άρα η μείωση της έκφρασης κατά 50% της ακετυλοχολινεστεράσης δεν είναι ικανή να προκαλέσει θνησιμότητα.

4. ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΑ ΣΧΕΔΙΑ

Πιστοποιήσαμε τη συσχέτιση μιας νέας μεταλλαγής στην ανθεκτικότητα. Η μεταλλαγή αυτή αποτελεί στόχο για την ανάπτυξη μοριακών διαγνωστικών που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την έγκαιρη διάγνωση της ανθεκτικότητας του τετρανύχου στις αβερμεκτίνες, και τη διαχείριση του φαινομένου εντός προγραμμάτων ολοκληρωμένης καταπολέμησης

Επίσης, θα μπορούσε να γίνει λειτουργική έκφραση των γονιδίων που φέρουν τις εκάστοτε μεταλλαγές στα κανάλια χλωρίου (αντικατάσταση ενός ουδέτερου αμινοξέος από ένα αρνητικά φορτισμένο αμινοξύ) και να μελετηθεί ο ρόλος αυτών σε σχέση με τη δράση των αβερμεκτινών.

Επιπλέον οι Konno και Scott (1991) μελέτησαν την ανθεκτικότητα της οικιακής μύγας (*Musca domestica*) στις αβερμεκτίνες και βρήκαν ότι υπήρχε μειωμένος αριθμός θέσεων πρόσδεσης για τις αβερμεκτίνες. Έτσι, μελλοντικά θα μπορούσε να γίνει Real Time PCR για τα κανάλια χλωρίου που φέρουν τις μεταλλαγές και να ελεγχθεί αν στο ανθεκτικό στις αβερμεκτίνες στέλεχος εμφανίζονται μειωμένα επίπεδα έκφρασης σε σχέση με ένα ευαίσθητο στέλεχος. Αυτό θα μπορούσε να σημαίνει ότι υπάρχει μειωμένη πυκνότητα των καναλιών, άρα θα μπορούσε να είναι ένας επιπλέον παράγοντας συνεισφέροντας στη μειωμένη πρόσδεση των αβερμεκτινών στο στόχο προσφέροντας έτσι ανθεκτικότητα.

Η μέθοδος παρεμβολής RNA αναπτύχθηκε και δοκιμάστηκε με επιτυχία, όπως δείχνουν τα προκαταρκτικά πειράματα. Η μέθοδος αυτή θα πρέπει να επαναληφθεί και να βελτιστοποιηθεί όσον αφορά την ποσότητα δίκλωνου RNA που ενύεται στον οργανισμό. Παράλληλα, θα πρέπει να βρεθεί ο χρόνος που επιτυγχάνεται σίγηση μέσω τοξικολογικών μεθόδων και βιοχημικής ανάλυσης. Επιπρόσθετα, καλό θα ήταν να δοκιμαστεί η μέθοδος αυτή και σε άλλα αναπτυξιακά στάδια, τα οποία θα είναι εύκολου χειρισμού για να επτευχθεί η μικροένεση. Επίσης, θα μπορούσε να δοκιμαστεί η μέθοδος σίγησης γονιδίων και σε άλλους ιστούς του τετρανύχου. Όμως, επειδή αυτή η μέθοδος είναι δύσκολη και χρειάζονται πολλά άτομα, θα ήταν δυνατό να χρησιμοποιηθούν μικρότερου αναπτυξιακού σταδίου τετράνυχτοι (πρωτονύμφες, δευτερονύμφες, ίσως και προνύμφες) και να εμβαπτιστούν απ'ευθείας σε διάλυμα dsRNA.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Amdam, G. V., Z. L. P. Simões, K. R. Guidugli, K. Norberg, and S. W. Omholt. 2003. 'Disruption of vitellogenin gene function in adult honeybees by intra-abdominal injection of double-stranded RNA'. *BMC Biotechnology* 3: 1-1. doi:10.1186/1472-6750-3-1.
- Araujo, R. N., A. Santos, F. S. Pinto, N. F. Gontijo, M. J. Lehane, and M. H. Pereira. 2006. 'RNA Interference of the Salivary Gland Nitrophorin 2 in the Triatomine Bug *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) by dsRNA Ingestion or Injection'. *Insect biochemistry and molecular biology* 36 (9): 683-693. doi:10.1016/j.ibmb.2006.05.012.
- Bautista, M. A. M., T. Miyata, K. Miura, and T. Tanaka. 2009. 'RNA interference-mediated knockdown of a cytochrome P450, CYP6BG1, from the diamondback moth, *Plutella xylostella*, reduces larval resistance to permethrin'. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 39 (1): 38-46. doi:10.1016/j.ibmb.2008.09.005.
- 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): 352-360.
- Blandin, S., L. F. Moita, T. Köcher, M. Wilm, F. C. Kafatos, and E. A. Levashina. 2002. 'Reverse genetics in the mosquito *Anopheles gambiae*: targeted disruption of the Defensin gene'. *EMBO Reports* 3 (9): 852-856. doi:10.1093/embo-reports/kvf180.
- Βόντας, Γ., Ε. Ροδιτάκης, και Α. Τσαγκαράκου. 2007. 'Η μοριακή βάση της ανθεκτικότητας: παραδείγματα εντόμων και ακάρεων ελληνικού γεωπονικού ενδιαφέροντος'. *Γεωτεχνικά Επιστημονικά Θέματα* 18(1): 61-69.
- Campos F., R. A. Dybas, and D. A. Krupa. 1995. 'Susceptibility of Twospotted Spider Mite (Acari: Tetranychidae) Populations in California to Abamectin'. *Journal of Economic Entomology* 88 (2): 225-231.
- Campos F., D. A. Krupa, and R. 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.
- Clark, J. K., J. G. Scott, F. Campos, and J. R. Bloomquist. 1995. 'Resistance to Avermectins: Extent, Mechanisms, and Management Implications'. *Annual Review of Entomology* 40 (1): 1-30. doi:10.1146/annurev.en.40.010195.000245.

- Croft, B. A. and H. E. van de Baan. 1988. 'Ecological and genetic factors influencing evolution of pesticide resistance in tetranychid and phytoseiid mites. *Experimental and Applied Acarology* 4: 277–300.
- Crooker, A. 1985. Embryonic and juvenile development. In *Spider Mites: Their Biology, Natural Enemies and Control*, eds. W. Helle and M. W. Sabelis. Vol. 1A: 149–163. Elsevier, Amsterdam.
- Devine, G. J., M. Barber, and I. 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): 443-448. doi:10.1002/ps.307.
- Dzitoyeva, S., N. Dimitrijevic, and H. Manev. 2001. 'Intra-abdominal injection of double-stranded RNA into anesthetized adult *Drosophila* triggers RNA interference in the central nervous system'. *Molecular Psychiatry* 6 (6): 665-670. doi:10.1038/sj.mp.4000955.
- Georghiou, G. P. 1969. 'Parasitological review. Genetics of resistance to insecticides in houseflies and mosquitoes'. *Experimental Parasitology* 26 (2): 224-255.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95–98.
- He, L., X. Gao, J. Wang, Z. Zhao, and N. Liu. 2009. 'Genetic analysis of abamectin resistance in *Tetranychus cinnabarinus*'. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 95 (3): 147-151. doi:16/j.pestbp.2009.08.005.
- Helle, W., and W. P. J. Overmeer. 1973. 'Variability in tetranychid mites'. *Annual Review of Entomology* 18: 97-120.
- Helle, W., and W. P. J. Overmeer. 1985. Toxicological Methods. In *Spider Mites: Their Biology, Natural Enemies and Control*, eds. W. Helle and M. W. Sabelis. Vol. 1B: 183-188. Elsevier, Amsterdam.
- Herron, G. A., and J. Rophail. 1993. 'Genetics of hexythiazox resistance in two spotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch'. *Experimental and Applied Acarology* 17 (6): 423-431. doi:10.1007/BF00120500.
- Huvenne, H., and G. Smagghe. 2010. 'Mechanisms of dsRNA uptake in insects and potential of RNAi for pest control: A review'. *Journal of Insect Physiology* 56 (3): 227-235. doi:16/j.jinsphys.2009.10.004.

- Jaubert-Possamai, S., G. Le Trionnaire, J. Bonhomme, G. K. Christophides, C. Rispe, and D. Tagu. 2007. 'Gene knockdown by RNAi in the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*'. *BMC Biotechnology* 7: 63. doi:10.1186/1472-6750-7-63.
- Khajehali, J., T. Van Leeuwen, and L. 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 & Applied Acarology* 49 (3): 185-192. doi:10.1007/s10493-009-9261-3.
- Khila, A., and M. Grbić. 2007. 'Gene silencing in the spider mite *Tetranychus urticae*: dsRNA and siRNA parental silencing of the Distal-less gene'. *Development Genes and Evolution* 217 (3): 241-251. doi:10.1007/s00427-007-0132-9.
- Konno, Y., and J. G. Scott. 1991. 'Biochemistry and genetics of abamectin resistance in the house fly'. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 41 (1): 21-28. doi:16/0048-3575(91)90056-R.
- Kwon, D. H., G. M. Seong, T. J. Kang, and S. H. Lee. 2010a. 'Multiple resistance mechanisms to abamectin in the two-spotted spider mite'. *Journal of Asia-Pacific Entomology* 13 (3): 229-232. doi:16/j.aspen.2010.02.002.
- Kwon, D. H., K. S. Yoon, J. M. Clark, and S. H. Lee. 2010b. 'A point mutation in a glutamate-gated chloride channel confers abamectin resistance in the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch'. *Insect Molecular Biology* 19 (4) (Αύγουστος): 583-591. doi:10.1111/j.1365-2583.2010.01017.x.
- Liu, S., Z. Ding, C. Zhang, B. Yang, and Z. Liu. 2010. 'Gene knockdown by intro-thoracic injection of double-stranded RNA in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*'. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 40 (9): 666-671. doi:10.1016/j.ibmb.2010.06.007.
- Mao, Y. B., W. J. Cai, J. W. Wang, G. J. Hong, X. Y. Tao, L. J. Wang, Y. P. Huang, and X. Y. Chen. 2007. 'Silencing a cotton bollworm P450 monooxygenase gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol'. *Nat Biotech* 25 (11): 1307-1313. doi:10.1038/nbt1352.
- Μπιρουράκη, Α. 2008. «Επίπεδα ανθεκτικότητας του φυτοφάγου ακάρεος *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) από την Αττική και την Πελοπόννησο σε ακαρεοκτόνο σκευάσματα». Πτυχιακή Εργασία Τ.Ε.Ι. Κρήτης, Σχολή Τεχνολογίας Γεωπονίας Τμήμα Φυτικής Παραγωγής.

- Navajas, M., J. Lagnel, J. Gutierrez and P. Boursot. 1998 “Specieswide homogeneity of nuclear ribosomal ITS2 sequences in the spider mite *Tetranychus urticae* contrasts with extensive mitochondrial COI polymorphism”. *Heredity* 80, 742–752
- Ozoe, Y., M. Takeda, and K. Matsuda. 2009. γ -aminobutyric Acid Receptors: A Rationale for Developing Selective Insect Pest Control Chemicals. In *Biorational Control of Arthropod Pests*, eds. I. Ishaaya and A. R. Horowitz, 131-162. Dordrecht: Springer Netherlands.
- Pu, X., Y. Yang, S. Wu, and Y. Wu. 2010. ‘Characterisation of abamectin resistance in a field-evolved multiresistant population of *Plutella xylostella*’. *Pest Management Science* 66 (4): 371-378. doi:10.1002/ps.1885.
- Roush, T. R. and J. A. McKenzie. 1987. ‘Ecological Genetics of Insecticide and Acaricide Resistance’. *Annual Review of Entomology* 32:361-380.
- Sabelis, M. W. 1985. Reproductive Strategies. In *Spider Mites: Their Biology, Natural Enemies and Control*, eds. W. Helle and M. W. Sabelis. Vol. 1A: 265-273. Elsevier, Amsterdam.
- Sato, M., T. Miyata, M. Da Silva, A. Raga and M. De Souza Filho. 2004. ‘Selections for Fenpyroximate Resistance and Susceptibility, and Inheritance, Cross-Resistance and Stability of Fenpyroximate Resistance in *Tetranychus Urticae* Koch (Acari: Tetranychidae)’. *Appl Entomol Zool* 39 (2): 293-302.
- Sato, M. E., M. Z. da Silva, A. Raga, and M. F. de Souza Filho. 2005. ‘Abamectin resistance in *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae): selection, cross-resistance and stability of resistance’. *Neotropical Entomology* 34 (6): 991-998. doi:10.1590/S1519-566X2005000600016.
- Stone, B. F. 1968. ‘A formula for determining degree of dominance in cases of monofactorial inheritance of resistance to chemicals.’ *Bulletin of the World Health Organization* 38 (2): 325-326.
- Stumpf, N., and R. Nauen. 2002. ‘Biochemical Markers Linked to Abamectin Resistance in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae)’. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 72 (2): 111-121. doi:06/pest.2001.2583.
- Turner, C. T., M. W. Davy, R. M. MacDiarmid, K. M. Plummer, N. P. Birch, and R. D. Newcomb. 2006. ‘RNA interference in the light brown apple moth, *Epiphyas postvittana* (Walker) induced by double-stranded RNA feeding’. *Insect Molecular Biology* 15 (3): 383-391. doi:10.1111/j.1365-2583.2006.00656.x.

- Van Leeuwen, T., J. Vontas, A. Tsagkarakou, W. Dermauw, and L. 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): 563-572. doi:10.1016/j.ibmb.2010.05.008.
- Van Leeuwen, T., J. Vontas, A. Tsagkarakou, and L. Tirry. 2009. Mechanisms of Acaricide Resistance in the Two-Spotted Spider Mite *Tetranychus urticae*. In *Biorational Control of Arthropod Pests*, eds. I. Ishaaya and A. R. Horowitz, 347-393. Dordrecht: Springer Netherlands. <http://www.springerlink.com/content/x8k2612q05x72791/>.
- Van Pottelberge, S., T. Van Leeuwen, J. Khajehali, and L. Tirry. 2009. 'Genetic and biochemical analysis of a laboratory-selected spiroadiclofen-resistant strain of *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae)'. *Pest Management Science* 65 (4): 358-366. doi:10.1002/ps.1698.
- Wrensch, D. L. 1985. Reproductive Parameters. In *Spider Mites: Their Biology, Natural Enemies and Control*, eds. W. Helle and M. W. Sabelis. Vol. 1A: 165-170. Elsevier, Amsterdam.
- Yoon, K.S., J.P. Strycharz, J.H. Baek, W. Sun, J.H. Kim, J.S. Kang, B. R. Pittendrigh, S.H. Lee and J.M. Clark. 2011. 'Brief exposures of human body lice to sub-lethal amounts of ivermectin over transcribes detoxification genes involved in tolerance'. *Insect Molecular Biology*. In press.
- Yorulmaz, S., and R. Ay. 2009. 'Multiple resistance, detoxifying enzyme activity, and inheritance of abamectin resistance in *Tetranychus urticae* Koch (Acarina: Tetranychidae)'. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 33: 393-402.
- Zha, W., X. Peng, R. Chen, B. Du, L. Zhu, and G. He. 2011. 'Knockdown of midgut genes by dsRNA-transgenic plant-mediated RNA interference in the hemipteran insect *Nilaparvata lugens*'. *PloS One* 6 (5): e20504. doi:10.1371/journal.pone.0020504.
- Ζιώγας, Β. Ν. και Α. Ν. Μάρκογλου. 2007. Γεωργική φαρμακολογία eds. Ζιώγας, Β. Ν. και Α. Ν. Μάρκογλου. Ελληνικής Έκδοσης.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πίνακας κρίσιμων τιμών χ^2

df	$p = 0.05$	$p = 0.01$	$p = 0.001$	df	$p = 0.05$	$p = 0.01$	$p = 0.001$
1	3.84	6.64	10.83	53	70.99	79.84	90.57
2	5.99	9.21	13.82	54	72.15	81.07	91.88
3	7.82	11.35	16.27	55	73.31	82.29	93.17
4	9.49	13.28	18.47	56	74.47	83.52	94.47
5	11.07	15.09	20.52	57	75.62	84.73	95.75
6	12.59	16.81	22.46	58	76.78	85.95	97.03
7	14.07	18.48	24.32	59	77.93	87.17	98.34
8	15.51	20.09	26.13	60	79.08	88.38	99.62
9	16.92	21.67	27.88	61	80.23	89.59	100.88
10	18.31	23.21	29.59	62	81.38	90.8	102.15
11	19.68	24.73	31.26	63	82.53	92.01	103.46
12	21.03	26.22	32.91	64	83.68	93.22	104.72
13	22.36	27.69	34.53	65	84.82	94.42	105.97
14	23.69	29.14	36.12	66	85.97	95.63	107.26
15	25	30.58	37.7	67	87.11	96.83	108.54
16	26.3	32	39.25	68	88.25	98.03	109.79
17	27.59	33.41	40.79	69	89.39	99.23	111.06
18	28.87	34.81	42.31	70	90.53	100.42	112.31
19	30.14	36.19	43.82	71	91.67	101.62	113.56
20	31.41	37.57	45.32	72	92.81	102.82	114.84
21	32.67	38.93	46.8	73	93.95	104.01	116.08
22	33.92	40.29	48.27	74	95.08	105.2	117.35
23	35.17	41.64	49.73	75	96.22	106.39	118.6
24	36.42	42.98	51.18	76	97.35	107.58	119.85
25	37.65	44.31	52.62	77	98.49	108.77	121.11
26	38.89	45.64	54.05	78	99.62	109.96	122.36
27	40.11	46.96	55.48	79	100.75	111.15	123.6
28	41.34	48.28	56.89	80	101.88	112.33	124.84
29	42.56	49.59	58.3	81	103.01	113.51	126.09
30	43.77	50.89	59.7	82	104.14	114.7	127.33
31	44.99	52.19	61.1	83	105.27	115.88	128.57
32	46.19	53.49	62.49	84	106.4	117.06	129.8
33	47.4	54.78	63.87	85	107.52	118.24	131.04
34	48.6	56.06	65.25	86	108.65	119.41	132.28
35	49.8	57.34	66.62	87	109.77	120.59	133.51
36	51	58.62	67.99	88	110.9	121.77	134.74
37	52.19	59.89	69.35	89	112.02	122.94	135.96
38	53.38	61.16	70.71	90	113.15	124.12	137.19
39	54.57	62.43	72.06	91	114.27	125.29	138.45
40	55.76	63.69	73.41	92	115.39	126.46	139.66
41	56.94	64.95	74.75	93	116.51	127.63	140.9
42	58.12	66.21	76.09	94	117.63	128.8	142.12
43	59.3	67.46	77.42	95	118.75	129.97	143.32
44	60.48	68.71	78.75	96	119.87	131.14	144.55
45	61.66	69.96	80.08	97	120.99	132.31	145.78
46	62.83	71.2	81.4	98	122.11	133.47	146.99
47	64	72.44	82.72	99	123.23	134.64	148.21
48	65.17	73.68	84.03	100	124.34	135.81	149.48
49	66.34	74.92	85.35				
50	67.51	76.15	86.66				
51	68.67	77.39	87.97				
52	69.83	78.62	89.27				

