Διερεύνηση του μηχανισμού ανθεκτικότητας του δάκου της ελιάς, Bactrocera oleae, στο εντομοκτόνο spinosad και εναλλακτικές μέθοδοι αντιμετώπισης με βάση τα μικροβιακά βιοεντομοκτόνα

Ονοματεπώνυμο: Στέφανος Μαστής
Τμήμα: Βιολογίας
Μεταπτυχιακό: Μοριακή & Εφαρμοσμένη Βιολογία Φυτών - Πράσινη Βιοτεχνολογία
ΑΜ:1038
Υπεύθυνος Καθηγητής: Ιωάννης Βόντας
Τριμελής Επιτροπή: Ιωάννης Βόντας, Παναγιώτης Σαρρής, Γεώργιος Χαλεπάκης

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

UNIVERSITY OF CRETE

Περιεχόμενα

Περίληψη 4
Abstract 4
Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή 5
1.1 *Bactrocera oleae* 6
1.2 *Helicoverpa armigera* 8
1.3 *Culex pipiens molestus* 10
1.4 Ανθεκτικότητα 13
1.4.1 Μειωμένη εισχώρηση 14
1.4.2 Συμπεριφορική αποφυγή 14
1.4.3 Ανθεκτικότητα μεταβολισμού 15
1.4.4 Ανθεκτικότητα θέσης στόχου 16
1.4.5 Διαχείριση ανθεκτικότητας 16
1.5 Spinosad και α6 υπομονάδα του nAChR 17
1.5.1 Spinosyns 17
1.5.2 Νικοτινικοί υποδοχείς ακετυλοχολίνης εντόμων 17
1.5.3 Δομή και λειτουργία των υποδοχέων 18
1.5.4 Υπομονάδες σε διαφορετικά είδη 19
1.5.5 Ποικιλομορφία μεταγράφων 20
1.5.6 Spinosad 21
1.6 Βιοεντομοκτόνα 23
1.6.1 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα βιοεντομοκτόνων 23
1.6.2 Βιοχημικά εντομοκτόνα 24
1.6.3 Προϊόντα γενετικά τροποποιημένων φυτών 24
1.6.4 Μικροβιακά εντομοπαθογόνα 25
1.6.4.1 Μύκητες 25
1.6.4.2 Ιοί 25
1.6.4.3 Νηματώδεις 26
1.6.4.4 Βακτήρια 27
Κεφάλαιο 2: Διερεύνηση του μηχανισμού ανθεκτικότητας του δάκου της ελιάς, Bactrocera oleae, στο εντομοκτόνο spinosad 28
2.1 Εισαγωγή 28
2.2 Υλικά και Μέθοδοι 30
2.2.1 Ανθεκτικά στελέχη *B.oleae* 30
2.2.2 Σχεδιασμός εκκινητών 30
2.2.3 Εξαγωγή RNA από ενήλικο δάκο με TRIzol (πρωτόκολλο εργαστηρίου) 31
2.2.4 Επεξεργασία με DNαση I 32
2.2.5 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης- Αντίστροφης Μεταγραφής 32
2.2.6 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης 33
2.2.7 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 33

2.2.8 Εξαγωγή πηκτώματος 34
2.2.9 Αλληλούχιση cDNA μορίων 34
2.2.10 Ανάλυση αποτελεσμάτων αλληλούχισης 34
2.2.11 Αλληλούχιση ολικού μεταγραφώματος 34
2.3 Αποτελέσματα 35
2.3.1 Γονοτύπηση της υπομονάδας α6 του nAChR 35
2.3.2 Αλληλούχιση ολικού μεταγραφώματος 38
2.4 Συζήτηση 38
Κεφάλαιο 3: Εναλλακτικές μέθοδοι αντιμετώπισης με βάση τα μικροβιακά βιοεντομοκτόνα 39
3.1 Εισαγωγή 39
3.2 Υλικά και Μέθοδοι 40
3.2.1 Εκτροφή Culex pipiens molestus 40
3.2.2 Εκτροφή Helicoverpa armigera 40
3.2.3 Βακτηριακά βιοεντομοκτόνα 41
3.2.3.1 Κύτταρα και υπερκείμενα βακτηρίων 41
3.2.3.2 Εκχυλίσματα στρεπτομυκήτων 42
3.2.4 Βιοδοκιμές σε Helicoverpa armigera 43
3.2.5 Βιοδοκιμές σε Culex pipiens molestus 43
3.2.6 Ανάλυση βιοδοκιμών 45
3.3 Αποτελέσματα 45
3.3.1 Προνύμφες *Culex pipiens molestus* -Υπερκείμενο 368 45
3.3.2 Προνύμφες *Culex pipiens molestus* - Εκχύλισμα CA31 45
3.4 Συζήτηση 46
Ευχαριστίες 48
Βιβλιογραφία 48

Περίληψη

Ο κόσμος των μικροοργανισμών παραμένει ακόμη ανεξερεύνητος, με μια πληθώρα μεταβολιτών, με μοναδικούς μηχανισμούς δράσης, οι οποίοι θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν, για να λύσουν προβλήματα σε διαφόρους τομείς. Ένας από αυτούς τους τομείς, είναι και αυτός των εντομοκτόνων, με ένα τρανταχτό παράδειγμα να είναι αυτό του Spinosad, το οποίο είναι μείγμα δύο ουσιών που παράγονται φυσικά από ένα είδος στρεπτομύκητα, και χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση εντόμων εχθρών, από διαφορετικές οικογένειες.

Όπως με όλα τα εντομοκτόνα, έτσι και στο Spinosad, παρατηρήθηκε η ανάπτυξη ανθεκτικότητας προς αυτό, σε διάφορα είδη, συμπεριλαμβανομένου και του δάκου της ελιάς. Τελευταίες έρευνες συσχετίζουν αυτήν την ανάπτυξη ανθεκτικότητας, σε είδη συγγενικά με τον δάκο, με μεταλλαγές στο γονίδιο της α6 υπομονάδας του nAChR, κύριο στόχου του Spinosad, οι οποίες οδηγούν σε μετάγραφα μικρότερου μήκους από εκείνα του φυσιολογικού. Σε αυτήν την μελέτη, λοιπόν, γίνεται προσπάθεια σύνδεσης της ανθεκτικότητας στο Spinosad, με την πιθανή ύπαρξη μικρότερων σε μέγεθος μεταγράφων της α6 υπομονάδας, σε άτομα δάκου που έχουν συλλεχθεί από διάφορες περιοχές ανά την Ελλάδα.

Όμως, θέμα αυτής της μελέτης δεν αποτελεί μόνο η ανακάλυψη του μηχανισμού ανθεκτικότητας πίσω από μια βακτηριακή εντομοκτόνο ουσία, αλλά και η εύρεση νέων πιθανών βιοεντομοκτόνων.

Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν, βακτηριακά κύτταρα, βακτηριακά υπερκείμενα και εκχυλίσματα στρεπτομυκήτων, που προέρχονταν από βακτήρια τα οποία είτε είχαν ανασταλτική δράση για άλλους μικροοργανισμούς, είτε αναπτύσσονταν σε περιοχές με ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες, ή και τα δύο, σε βιοδοκιμές για τα είδη *Culex pipiens molestus* και *Helicoverpa armigera*, τα οποία είναι έντομα υγειονομικού και αγρονομικού ενδιαφέροντος αντίστοιχα. Αυτές οι βιοδοκιμές θα επέτρεπαν σε πρώτο στάδιο, τον εντοπισμό πιθανών θνησιγόνων δραστηριοτήτων, αλλά και δραστηριοτήτων που μπορεί να επηρέαζαν μορφολογικά, συμπεριφορικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά.

Σε αυτήν την μελέτη εντοπίστηκε ένα βακτηριακό υπερκείμενο βακίλου, καθώς και ένα εκχύλισμα οξικού αιθυλεστέρα στρεπτομύκητα, τα οποία παρουσίαζαν εντομοκτόνο δράση κατά των προνυμφών του είδους *Culex pipiens molestus*. Αυτό το εύρημα, δίνει έναυσμα για μελλοντικές μελέτες οι οποίες θα μπορέσουν να ρίξουν φως στο ποια ή ποιες ουσίες και με ποιον μηχανισμό δράσης οδηγούν σε αυτόν τον φαινότυπο.

Abstract

The world of microorganisms still remains unexplored, with a plethora of metabolites with unique mechanisms of action, which could be used to solve a lot of problems in various fields. One of these, is the field of insecticide science,

with an obvious example being that of Spinosad, which is a mixture of two substances produced naturally by a species of streptomyces, and it is used to control populations of insects of medical or agricultural importance.

Just like other insecticides, in recent years a rise in Spinosad resistance has been observed, in many species of insects, one of which is *B.oleae*. Recent studies associate the resistance, in species closely related to *B.oleae*, with mutations in the gene of the a6 subunit of the nAChR, which is the main target of Spinosad, that lead to truncated transcripts. In this study, an attempt was also made to connect the truncated transcripts of the a6 subunit, with the resistant phenotype of *B.oleae* individuals collected from different parts of Greece.

Discovering the resistance mechanism behind this bacterial insecticidal substance, is not the only topic of this study, but finding new possible bioinsecticides is also one of its goals. More specifically, bacterial cells, bacterial supernatants, and streptomyces extracts, originating from bacteria that were able to inhibit the growth of other microorganisms, or proliferate in environments with harsh conditions, or both, were used in bioassays for the *Culex pipiens molestus* and *Helicoverpa armigera* species. These bioassays would allow, in preliminary testings, the discovery of possible insecticidal activities, but also activities that could affect the morphology, the physiology and the behavior of the insects.

A bacterial supernatant originating from a *Bacillus* species, and an ethyl acetate streptomyces extract, were actually found to have an insecticidal activity against the larvae of *Culex pipiens molestus* species. These findings, blaze a trail for future studies, to shed their light on which substance or substances, and with what mechanism, lead to this phenotype.

Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή

Τα έντομα αποτελούν την μεγαλύτερη ομοταξία της συνομοταξίας των αρθροπόδων, που από μόνη της είναι η μεγαλύτερη συνομοταξία στο βασίλειο των ζώων, με τα έντομα να αποτελούν περίπου τα ¾ των συνολικών οργανισμών πάνω στον πλανήτη [1] και από τα 5.57-9.8 εκατομμύρια ζώα που εκτιμώνται πως υπάρχουν στον κόσμο, τα 4-8 εκατομμύρια από αυτά είναι έντομα [2].

Η οικολογική τους σημαντικότητα, αλλά και η προσφορά τους στο ανθρώπινο είδος είναι ευρέως γνωστή. Συμμετέχουν στην τροφική αλυσίδα ως θηράματα αλλά και ως θηρευτές, βοηθούν βακτήρια αλλά και μύκητες στην αποσύνθεση οργανικής ύλης, και αποτελούν τους κύριους επικονιαστές των αγγειόσπερμων φυτών, με τα οποία έχουν εξελιχθεί μαζί.

Η αξία τους είναι εξίσου σημαντική και για τους ανθρώπους, σε βιομηχανικό επίπεδο, όπως στην παραγωγή μεταξιού και του μελιού, σε διατροφικό επίπεδο, καθώς πλέον γίνονται όλο και περισσότερες προσπάθειες να χρησιμοποιηθούν σαν πηγές πρωτεΐνης, σε φαρμακευτικό επίπεδο, καθώς μερικά δηλητήρια τους μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως θεραπευτικές ουσίες,

σε επίπεδο φυτοπροστασίας, καθώς είτε τα ίδια είτε ουσίες παραγόμενες από αυτά μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την αντιμετώπιση εχθρών οικονομικά σημαντικών καλλιεργειών κλπ. [3].

Πέρα όμως από τα ωφέλιμα χαρακτηριστικά τους μερικά έντομα προκαλούν πολύ συχνά προβλήματα για τους ανθρώπους, αγρονομικού και υγειονομικού χαρακτήρα. Κάποια από αυτά, όπως για παράδειγμα τα κουνούπια, είναι φορείς σοβαρών παθογόνων και ασθενειών, όπως η ελονοσία, ο κίτρινος πυρετός, ο DHF, η νόσος του δυτικού Νείλου, η λεϊσμανίαση, κλπ. [4], οδηγώντας σε πάνω από 700.000 θανάτους ετησίως [5]. Επιπλέον, τα έντομα αποτελούν τον κύριο βιολογικό παράγοντα για ζημιές σε σημαντικές καλλιέργειες παγκοσμίως (καταστρέφουν το 18-26% της παγκόσμιας αγροτικής παραγωγής ετησίως [6]), τις οποίες συνήθως επιλέγουν για την διατροφική τους αξία αλλά και για αναπαραγωγικούς λόγους, καταστρέφοντας όμως έτσι, μεγάλες εκτάσεις σόγιας, σιταριού, βαμβακιού, ρυζιού, πατατών κτλ., προκαλώντας και αντίστοιχες οικονομικές ζημιές [7].

1.1 *Bactrocera oleae*

Τα προϊόντα της ελιάς είναι τρόφιμα υψηλής ποιότητας, με την έμφυτη χημική σύνθεση τους να τα καθιστά πολύ σπουδαία παγκοσμίως. Η ποιότητα και η σύνθεση όμως, αυτών των ελαιοκομικών προϊόντων υπονομεύεται σοβαρά από διάφορους γεωργικούς και τεχνολογικούς παράγοντες, μεταξύ των οποίων και οι επιβλαβείς οργανισμοί της ελιάς.

Σε αυτήν την κατηγορία, και διαδραματίζοντας καίριο ρόλο, ανήκει ο δάκος της ελιάς (*Bactrocera oleae*) (Εικ 1), ο οποίος προκαλεί μια πληθώρα σοβαρών οικονομικών ζημιών, ετησίως, οδηγώντας σε απώλειες στο χωράφι και κατ' επέκταση στο τραπέζι του καταναλωτή [8].

Αυτό το καρποφάγο δίπτερο, τρέφεται αποκλειστικά από τα είδη του γένους *Olea,* με τα *Olea verrucosa, Olea chrysophylla, Olea ferruginea* και *Olea europaea* που αποτελούν τους συνηθέστερους στόχους αυτού του εντόμου [9].

Ένα ενήλικο θηλυκό, σε εργαστηριακές συνθήκες, μπορεί να γεννήσει 10 με 40 αυγά ημερησίως και μεταξύ 200 με 500 αυγά κατά την διάρκεια της ζωής του [10], ενώ στην φύση οι αριθμοί μειώνονται σε 12 αυγά ημερησίως και 200 με 250 αυγά κατά την διάρκεια της ζωής του [11].

Τα ενήλικα θηλυκά γεννούν τα αυγά τους κάτω από το επικάρπιο της ελιάς, παρέχοντας έτσι άμεση τροφή στην προνύμφη μόλις εκκολαφθεί από το αυγό, δημιουργώντας καφέ στίγματα στις θέσεις ωοτοκίας, τα οποία είναι ιδιαίτερα εμφανή στους πράσινους καρπούς (Εικ 2). Για την ανάπτυξη των αυγών, θερμοκρασίες άνω των 10ºC και κάτω των 32ºC είναι αναγκαίες, και σε βέλτιστες συνθήκες η ανάπτυξη τους μπορεί να ολοκληρωθεί μέσα σε 24 ώρες, οδηγώντας σε προνύμφες που τρέφονται με το μεσοκάρπιο της ελιάς, δημιουργώντας κανάλια καθώς κινούνται μέσα στον καρπό. Ανάλογα το αναπτυξιακό τους στάδιο οι προνύμφες μπορούν να διαχωριστούν σε L1, L2 και L3, για την ανάπτυξη τους. Θερμοκρασίες άνω των 12ºC και κάτω των 30ºC είναι αναγκαίες [12], και σε βέλτιστες συνθήκες η ανάπτυξη τους μπορεί να

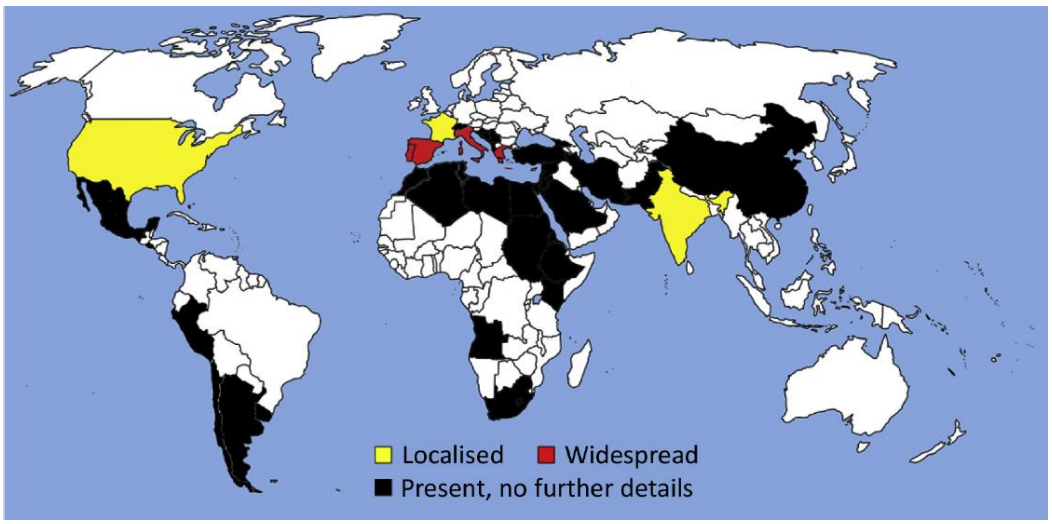
ολοκληρωθεί μέσα σε 8 ημέρες, καταναλώνοντας παράλληλα 45 με 150 mg πολτού ελιάς [13,14].

Εικόνα 1. Ενήλικος θηλυκός δάκος κατά την διάρκεια της ωοτοκίας (Ricardo Malheiro et al.,2015)

Εικόνα 2. Θέση ωοτοκίας δάκου (Ricardo Malheiro et al.,2015)

Όταν έρθει η ώρα να νυμφωθούν, ένα στάδιο το οποίο μπορεί να ολοκληρωθεί, αν οι συνθήκες είναι βέλτιστες, σε 9 ημέρες, οι προνύμφες είτε ανοίγουν μια πύλη εξόδου στο επικάρπιο της ελιάς ώστε να γίνουν νύμφες στο έδαφος, είτε μεταβαίνουν στο νυμφικό στάδιο μέσα στον καρπό και αποδρούν ως ενήλικα από την πύλη εξόδου που είχαν ήδη δημιουργήσει [12,14]. Αυτές οι πύλες εξόδου μαζί με τις θέσεις ωοτοκίας και τα κανάλια εσωτερικά του καρπού, που δημιουργούν οι ενήλικοι δάκοι και οι προνύμφες του αντίστοιχα, αποτελούν εστίες επιμόλυνσης για διάφορους φυτοπαθογόνους παράγοντες, που θα οδηγήσουν στην σήψη του καρπού [15].

Αυτό το έντομο λοιπόν, που είναι άρρηκτα συνδεδεμένο με την ελιά, είναι ευρέως διαδεδομένο σε περιοχές όπου δέντρα ελιάς καλλιεργούνται για εμπορικούς σκοπούς (Εικ 3). Παρατηρείται ιδιαίτερα σε περιοχές του Μεσογειακού λεκανοπεδίου, όπως Ελλάδα, Ιταλία και Ισπανία [16], αλλά και σε περιοχές της Βόρειας και Κεντρικής Αφρικής [17], σε περιοχές της Μέσης Ανατολής, Κίνας και Ινδίας [18], και σε περιοχές της Βόρειας [19] και Νότιας Αμερικής [20].



Εικόνα 3. Παγκόσμια κατανομή του δάκου (Ricardo Malheiro et al.,2015)

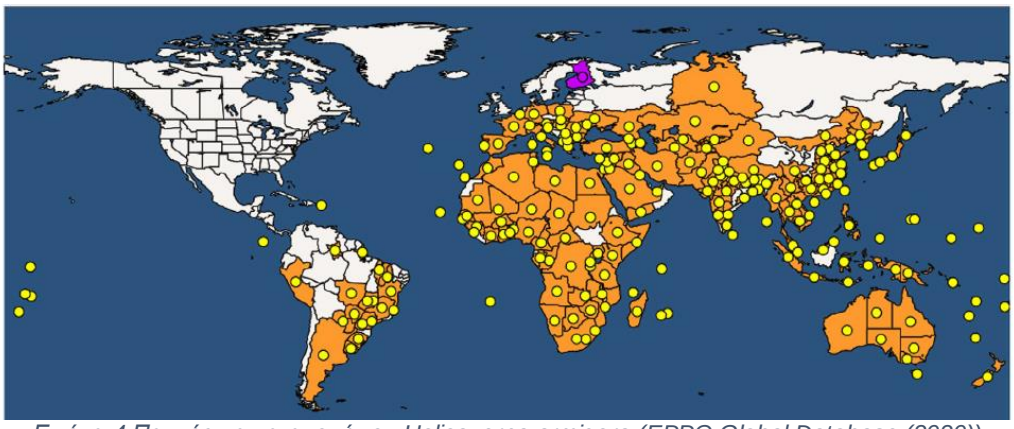
Η παγκόσμια κατανομή σε συνδυασμό με το μέγεθος των οικονομικών ζημιών στα ελαιοκομικά προϊόντα (με απώλειες που μπορούν να φτάσουν έως το 80% στο ελαιόλαδο και έως το 100% στις επιτραπέζιες ελιές [21]), χρήζει ανάγκης εφαρμογής μέτρων αντιμετώπισης. Για την αντιμετώπιση του δάκου μπορούν να εφαρμοστούν τεχνικές όπως μαζική παγίδευση με συσκευές προσέλκυσης (τροφής, χρώματος, ορμονών) και θανάτωσης [22], η τεχνική του στείρου εντόμου [23], χρήση των φυσικών εχθρών και των παρασιτοειδών του δάκου [24,25], καθώς και η χρήση φυτικών ουσιών, όπως για παράδειγμα το πύρεθρο και η ροτενόνη [26].

Αυτές οι μέθοδοι όμως, καταπολέμησης, αποτελούν δευτερεύοντα τρόπο ελέγχου του δάκου, με την χημική καταπολέμηση να αποτελεί την κύρια μέθοδο αντιμετώπισης του. Ειδικά στην Ελλάδα, τα τελευταία χρόνια, τα εντομοκτόνα που χρησιμοποιούνται εκτενώς ανήκουν στις χημικές ομάδες των πυρεθροειδών, νεονικοτινοειδών και στις βακτηριακής προέλευσης σπινοσίνες [27]. Η συνεχής χρήση αυτών των χημικών ουσιών, όμως, έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη, υψηλών επιπέδων ανθεκτικότητας, σε διάφορους πληθυσμούς ανά την Ελλάδα [28]. Ακόμα και για ένα εντομοκτόνο, όπως το Spinosad (σπινοσίνη), του οποίου χρησιμοποιούνται μεγάλες ποσότητες ετησίως, καθώς είναι από τις ελάχιστες ουσίες που έχουν απομείνει για την καταπολέμηση του δάκου, την τελευταία δεκαετία έχει παρατηρηθεί μια ελαφριά αύξηση στα επίπεδα ανθεκτικότητας, σε διάφορους πληθυσμούς στην πολιτεία της Καλιφόρνια, το οποίο κρούει τον κώδωνα κινδύνου και για τους πληθυσμούς δάκου στην Ελλάδα [29]. Συνεπώς, μέτρα αντιμετώπισης τα οποία ενσωματώνουν νέες εντομοκτόνες ουσίες και τεχνικές, καθώς και συνδυασμό αυτών με τις συμβατικές, μπορούν να οδηγήσουν στον επιτυχή έλεγχο του πιο καταστροφικού για τις καλλιέργειες ελιάς έντομο.

1.2 *Helicoverpa armigera*

Αυτό το λεπιδόπτερο, γνωστό και ως σκώληκας του βαμβακιού, σκώληκας του καλαμποκιού ή ως σκώληκας του παλαιού κόσμου, θεωρείται ένα από τα πιο καταστροφικά έντομα παγκοσμίως, προκαλώντας ζημιές που ανέρχονται σε 3 δισεκατομμύρια δολάρια ετησίως [30]. Λόγω της δυνατής αποδημητικής ικανότητας των ενήλικων (>2000 χιλιόμετρα), αυτό το είδος είναι διανεμημένο σχεδόν σε κάθε πλευρά του κόσμου (Εικ 4), από την κεντρική και νοτιοανατολική Ασία, στην Μέση Ανατολή, Αφρική, Νότια Ευρώπη, Νέα Ζηλανδία, και πρόσφατα στην Νότια Αμερική [31,32].

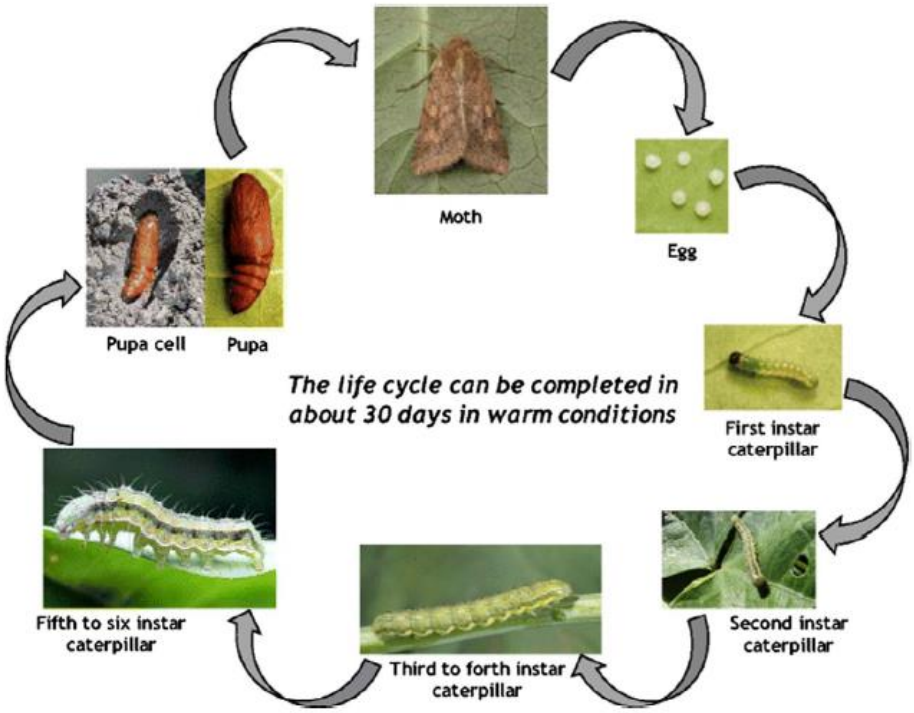
Ο κύκλος ζωής αυτού του αγρονομικά σημαντικού εντόμου (Εικ 5) μπορεί να ολοκληρωθεί σε εύρος θερμοκρασιών 17ºC με 33ºC, με τους 25ºC να είναι η βέλτιστη θερμοκρασία για την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό του [33], και διαρκεί 4 με 6 εβδομάδες το καλοκαίρι, ενώ αυξάνεται σε 8 με 12 εβδομάδες το φθινόπωρο [34].



Εικόνα 4.Παγκόσμια κατανομή του Helicoverpa armigera (EPPO Global Database (2020))

Ένα ενήλικο θηλυκό, σε βέλτιστες συνθήκες, κατά την διάρκεια της ζωής του μπορεί να γεννήσει κατά μέσο όρο 413 αυγά. Τα αυγά είναι σφαιρικά σε σχήμα, άσπρα σε χρώμα και η περίοδος επώασης τους κρατάει περίπου 3.5 μέρες, στις οποίες σταδιακά αποκτούν πιο σκούρο χρώμα [34].

Μετά την εκκόλαψη περνάει στο πιο καταστροφικό στάδιο της ζωής του, στο στάδιο της προνύμφης, το οποίο αποτελείται από 6 προνυμφικά αναπτυξιακά στάδια, με τα πρώτα δύο να τρέφονται κυρίως με φυλλώματα των φυτών, ενώ στα επόμενα, στα οποία προκαλεί και την μεγαλύτερη ζημιά, τρέφεται κυρίως με τις δομές αναπαραγωγής, προκαλώντας προβλήματα στην άνθηση και σάπισμα στα φρούτα [35]. Η διατροφή του απαρτίζεται από περισσότερα από 200 διαφορετικά είδη φυτών, που ανήκουν σε δεκάδες διαφορετικές οικογένειες, καθιστώντας το ένα από τα έντομα με τα μεγαλύτερα εύρη ξενιστών [36].



Εικόνα 5. Κύκλος ζωής του Helicoverpa armigera (https://helicoverp aaspe sts.weebly.com/life-cycles. htmlwileyonlinelibrary.com)

Μέσα σε αυτά τα φυτά συμπεριλαμβάνονται και αρκετές οικονομικά σημαντικές καλλιέργειες, όπως το βαμβάκι, το καλαμπόκι, η σόγια, το ρεβίθι, ο ηλιόσπορος, και η ντομάτα, προκαλώντας ζημιές της τάξης των δισεκατομμυρίων [37]. Στην συνέχεια ακολουθεί ένα στάδιο πριν νυμφωθεί, όπου σταματάει να κινείται και να τρέφεται για περίπου 2 ημέρες [34], το οποίο διαδέχεται το στάδιο της προνύμφης, ένα στάδιο που εμφανίζει διαφορά σε αρσενικά και θηλυκά ως προς την διάρκεια του, με 13 μέρες για τα θηλυκά και 15 για τα αρσενικά.

Μετά το πέρας αυτών των ημερών προκύπτουν ενήλικα άτομα [38]. Οι νύμφες αυτού του εντόμου διαθέτουν την ικανότητα να εισέρχονται σε διάπαυση κατά την διάρκεια μη ευνοϊκών συνθηκών [39], όπου σε συνδυασμό με το μεγάλο εύρος ξενιστών, τον μεγάλο αριθμό απογόνων και την ικανότητα των ενηλικών να καλύπτουν μεγάλες αποστάσεις, γίνεται κατανοητό γιατί αυτό το λεπιδόπτερο έχει αποκτήσει τέτοια κακοφημία [40]. Σημαντικές προσπάθειες έχουν γίνει για τον έλεγχο του πράσινου σκουληκιού, με τα συνθετικά-χημικά εντομοκτόνα να είναι παραδοσιακά στην πρώτη γραμμή καταπολέμησης.

Κάποια από τα κύρια εντομοκτόνα που χρησιμοποιούνται για την χημική καταπολέμηση αυτού του εντόμου ανήκουν στην ομάδα των πυρεθροειδών και σε αυτήν των σπινοσινών, ομάδες εναντίων των οποίων έχει συνεχώς παρατηρηθεί η ανάπτυξη ανθεκτικότητας, είτε λόγω μεταλλαγών σε πρωτεΐνες μεταφορείς, είτε σε πρωτεΐνες υποδοχείς, είτε λόγω υπερέκφρασης ενζύμων αποτοξικοποίησης. Βιολογικής προέλευσης εντομοκτόνα χρησιμοποιούνται επίσης για την καταπολέμηση του πράσινου σκουληκιού [41]. Τα βιοεντομοκτόνα αυτά μπορεί να είναι είτε εκχυλίσματα φυτών, είτε να προέρχονται από μικροοργανισμούς όπως ιούς, μύκητες αλλά και βακτήρια, με το σημαντικότερο να είναι το *Bacillus thuringiensis*, του οποίου οι Cry πρωτεΐνες έχουν αντικαταστήσει την χρήση αρκετών συνθετικών εντομοκτόνων παγκοσμίως. Οι διαφορετικοί τύποι αυτών των ενδοτοξινών, που ποικίλλουν σε δομή και σε δράση, είτε ψεκάζονται κατευθείαν στις καλλιεργήσιμες εκτάσεις, είτε παράγονται από γενετικά τροποποιημένα φυτά καλλιεργειών (π.χ. Bt βαμβάκι) [41].

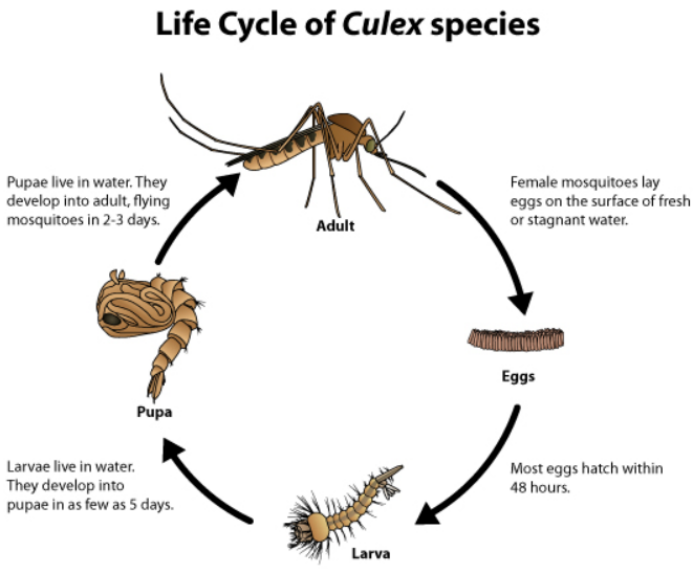
Η γεωργική βιομηχανία παγκοσμίως όμως, συνεχίζει να αντιμετωπίζει πρόβλημα με τον έλεγχο αυτού του εντόμου, καθώς έχει αναπτύξει ανθεκτικότητα και σε αυτές τις πρωτεΐνες, μέσω μεταλλαγών που έχουν προκύψει σε γονίδια πρωτεϊνών μεταφορέων, και σε γονίδια πρωτεϊνών υποδοχέων [41]. Συνεπώς, το ενδιαφέρον έχει στραφεί στην εύρεση νέων εντομοκτόνων από πηγές απεριόριστων, ανεξερεύνητων ουσιών, όπως είναι οι μικροβιακές, και στον συνδυασμό χημικών, βιολογικών και φυσικών μεθόδων για τον αποτελεσματικό έλεγχο αυτού του εντόμου [41].

1.3 *Culex pipiens molestus*

Στο ‘σύμπλεγμα’ του Culex pipiens περιλαμβάνονται τα *Culex pipiens pallens, Culex quinquefasciatus, Culex australicus, Culex globocoxitus* και *Culex pipiens pipiens* με δύο μορφές,τις *pipiens* και *molestus*, η οποίες έχουν γενετικές και οικολογικές διαφορές, με αυτές να επηρεάζουν τις συνήθειες τους αλλά και την γεωγραφική κατανομή τους, με αυτά του Culex pipiens pipiens να εντοπίζονται σε αστικές και προαστιακές εύκρατες και τροπικές περιοχές

παγκοσμίως [42]. Ο κύκλος ζωής ενός *Culex pipiens molestus* κουνουπιού από αυγό να αναπτυχθεί σε ενήλικο διαρκεί περίπου 7 με 10 μέρες (Εικ 6). Τα ενήλικα θηλυκά κουνούπια γεννούν τα αυγά τους σε επιφάνειες στάσιμων νερών, τα οποία μπορεί να βρίσκονται σε βαλτώδεις περιοχές, λακκούβες, ρυάκια, χαντάκια κλπ., ένα την φορά, με τα αυγά να κολλάνε μεταξύ τους και να δημιουργούν σχεδίες των 100 με 300 αυγών που πλέουν.

Οι προνύμφες που εκκολάπτονται από τα αυγά, συνήθως μέσα σε 48 ώρες, ζουν στο νερό, τρέφονται με υπολείμματα που πλέουν σε αυτό, και περνούν από 4 αναπτυξιακά προνυμφικά στάδια, μέσω της διαδικασίας της έκδυσης. Μετά από 5 μέρες θα περάσουν στο στάδιο της νύμφης, όπου υπολείπονται κάποιο εξωτερικό σωματικό μόριο, καθώς δεν τρέφονται κατά την διάρκεια αυτού του σταδίου, και μετά από 2 με 3 ημέρες, θα περάσουν στο στάδιο του ενήλικου κουνουπιού, με τα θηλυκά ενήλικα να ψάχνουν να εντοπίσουν σε ακτίνα τριών χιλιομέτρων, ανθρώπους ή άλλα ζώα (όπως για παράδειγμα πτηνά), ώστε να τραφούν με αίμα, καθώς και να εντοπίσουν στάσιμα νερά, για να γεννήσουν τα αυγά τους [43].

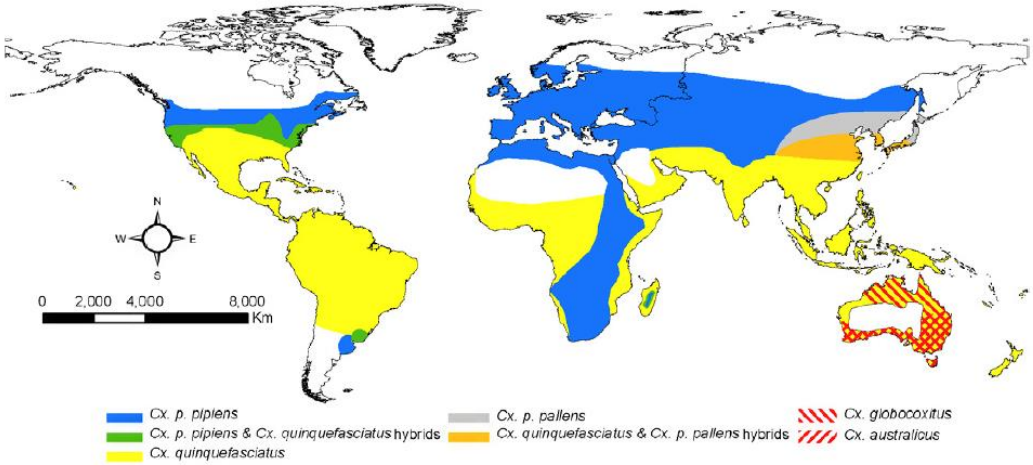


Εικόνα 6. Κύκλος ζωής κουνουπιών γένους Culex (U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention)

Σε αντίθεση με άλλα είδη που ανήκουν στο γένος Culex, το *Culex pipiens molestus,* σε χαμηλές θερμοκρασίες δεν εισέρχεται σε κατάσταση διάπαυσης, παρόλο που οι μεταβολικοί ρυθμοί του πέφτουν [44] και επιπλέον, κάτι το οποίο το κάνει να ξεχωρίζει είναι η ικανότητα του να γεννάει αυγά, χωρίς να έχει τραφεί προηγουμένως με αίμα από κάποιο σπονδυλωτό, σε περίπτωση για παράδειγμα που η διαθεσιμότητα γευμάτων αίματος είναι περιορισμένη [45].

Αυτά τα χαρακτηριστικά εξηγούν γιατί σε κλίματα με χαμηλή θερμοκρασία, αυτό το δίπτερο επιλέγει να ζει σε υπόγειους χώρους, όπως σε υπόγειους σιδηρόδρομους ή σε αποχετευτικά συστήματα [46]. Όπως προαναφέρθηκε, αυτό το έντομο μπορεί να εντοπιστεί σε πολλές χώρες πάνω στον χάρτη (Εικ

7), από χώρες της Νότιας Αφρικής, της Ευρώπης, το Ηνωμένο Βασίλειο, την Βόρεια Αμερική, ως και την Ιαπωνία, την Νότια Κορέα και την Αυστραλία [47].



Εικόνα 7. Παγκόσμια κατανομή του συμπλέγματος κουνουπιών Cx.pipiens (Ary Farajollahi et al.,2011)

Η παγκόσμια αυτή, όμως, κατανομή του μαζί με ένα ακόμα χαρακτηριστικό του δημιουργούν ένα μεγάλο πρόβλημα για το ανθρώπινο είδος. Το χαρακτηριστικό αυτό είναι η τάση του να τρέφεται με αίμα θηλαστικών αλλά και με αίμα πτηνών, με προτίμηση προς το πρώτο [48], κάνοντας το έτσι φορέα διάφορων παθογόνων που προέρχονται από τα πτηνά. Τα παθογόνα αυτά περιλαμβάνουν τον ιό του Δυτικού Νείλου, τον SLEV, νηματώδη της φιλαρίασης, μαλάρια των πτηνών κλπ [49].

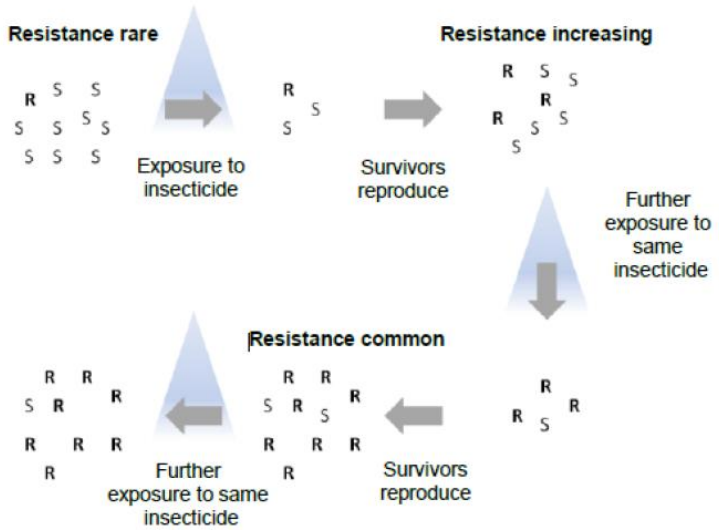
Αξίζει να σημειωθεί πως για κάποια από αυτά τα ζωονόσα παθογόνα ο άνθρωπος αποτελεί τον τελικό ξενιστή, περιορίζοντας τον πολλαπλασιασμό τους στον ανθρώπινο οργανισμό, αποτρέποντας τα να εισέλθουν ξανά στον κύκλο μετάδοσης, με την μόλυνση φορέων όταν ξανά τραφούν με ανθρώπινο αίμα, δημιουργώντας έτσι ένα παράδοξο για τις σημαντικές αυτές ανθρώπινες ασθένειες [42]. Αυτά τα μεικτά μοτίβα διατροφής, λοιπόν, σε συνδυασμό με την ικανότητα τους να περάσουν μερικούς από τους ιούς στους απογόνους τους και την αφθονία τους σε αστικά περιβάλλοντα καθιστούν αυτά τα ορνιθόφιλα κουνούπια τεράστια απειλή [50]. Γίνονται συνεχώς υπεράνθρωπες προσπάθειες ώστε να περιοριστεί αυτός ο παγκόσμια διαδεδομένος ‘δολοφόνος’.

Για την καταπολέμηση του μπορούν να χρησιμοποιηθούν οι φυσικοί του εχθροί, όπως ψάρια, αμφίβια, κωπήποδα [51,52], ουσίες φυτικής προέλευσης [53], καθώς και οι τοξίνες του βακτηρίου *Bacillus thuringiensis israelensis* [54]. Ο χημικός έλεγχος όμως, εξακολουθεί να είναι ο κύριος τρόπος καταπολέμησης, με εντομοκτόνα που ανήκουν στις ομάδες των πυρεθροειδών, των σπινοσινών και των νεονικοτινοειδών να χρησιμοποιούνται [55]. Η εκτεταμένη χρήση τους όμως, έχει οδηγήσει αναπόφευκτα στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας, ακόμα και για τα εντομοκτόνα βιολογικής προέλευσης, όπως για τις τοξίνες του *Bacillus thuringiensis israelensis*, που χρησιμοποιούνται ως προνυμφοκτόνα [54].

Συνεπώς, η χρήση νέων εντομοκτόνων βιολογικής προέλευσης, και ο συνδυασμός τους με ήδη υπάρχοντα συμβατικά μέσα, θα μπορέσει να δώσει λύσεις στην καταπολέμηση αυτών των φορέων.

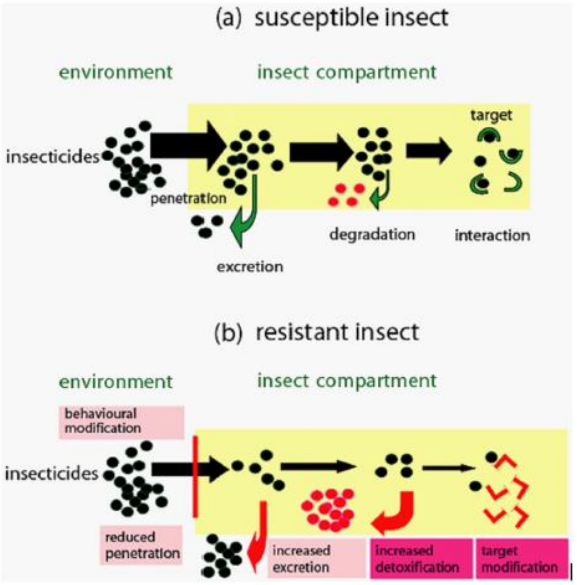
1.4 Ανθεκτικότητα

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO), ανθεκτικότητα ορίζεται η ικανότητα ενός εντόμου να αντιστέκεται στην δράση ενός εντομοκτόνου, με το να γίνεται ανθεκτικό στην τοξική του επίδραση, μέσω φυσικής επιλογής και μεταλλαγών [56]. Είναι ένας κληρονομήσιμος χαρακτήρας που έχει γενετική βάση, έχει παρατηρηθεί σε πάνω από 500 είδη εντόμων παγκοσμίως [57] και είναι αποτέλεσμα επιλογής κάποιας γενετικής μετατροπής σε ένα ή σε περισσότερα γονίδια, η οποία έχει προκύψει είτε από κάποια μεταλλαγή, είτε ήταν αποτέλεσμα κάποιας μετανάστευσης. Για παράδειγμα (Εικ 8), όταν ένας πληθυσμός εντόμων εκτίθεται σε ένα εντομοκτόνο, τα άτομα τα οποία έχουν γονίδια ανθεκτικότητας σε αυτό, καταφέρνουν να επιζήσουν και να αναπαραχθούν, μέχρι το αλληλόμορφο που σχετίζεται με την ανθεκτικότητα να εδραιωθεί στον πληθυσμό [58].



Εικόνα 8. Πιθανή αναπαράσταση ανάπτυξης ανθεκτικότητας σε έναν πληθυσμό εντόμων (Prevention and Management of Insecticide Resistance in Vectors of Public Health Importance In: Resistance Management for Sustainable Agriculture and Improved Public Health, 2010)

Η ανθεκτικότητα μπορεί να συμπεριλαμβάνει διάφορους φυσιολογικούς ή/και συμπεριφορικούς μηχανισμούς. Αυτοί οι μηχανισμοί ανθεκτικότητας μπορούν να ομαδοποιηθούν σε τέσσερις ευδιάκριτες κατηγορίες (Εικ 9), στις οποίες περιλαμβάνονται η ανθεκτικότητα μεταβολισμού, η ανθεκτικότητα θέσης στόχου, η μειωμένη εισχώρηση, και η συμπεριφορική αποφυγή [60], με την ανθεκτικότητα μεταβολισμού και την ανθεκτικότητα θέσης, να είναι ευρέως αποδεκτό πλέον, πως είναι υπεύθυνες για τα υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας σε έντομα υγειονομικού και αγρονομικού ενδιαφέροντος.



Εικόνα 9. Σχεδιάγραμμα των πιθανών συμπεριφορικών και φυσιολογικών αλλαγών που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα σε εντομοκτόνα, με το α) να αναπαριστά τα ευαίσθητα έντομα και με το β) να αναπαριστά τα ανθεκτικά έντομα (Lapied B et al.,2009)

1.4.1 Μειωμένη εισχώρηση

Τροποποιήσεις στον εξωσκελετό ή στο πεπτικό σύστημα των εντόμων που αποτρέπουν ή καθυστερούν την απορρόφηση ή την διείσδυση των εντομοκτόνων, μπορούν να εντοπιστούν σε κάποια ανθεκτικά έντομα. Αυτός ο μηχανισμός ανθεκτικότητας δεν έχει κάποια εξειδίκευση, και μπορεί να επηρεάσει ένα μεγάλο εύρος εντομοκτόνων, αν και συνήθως στην βιβλιογραφία αναφέρεται ως δευτερεύων μηχανισμός ανθεκτικότητας [60]. Υπάρχουν αρκετά παραδείγματα αυτού του μηχανισμού, όπως μηχανισμοί μειωμένης εισχώρησης σχετιζόμενοι με τον εξωσκελετό που έχουν παρατηρηθεί στην *Musca domestica* [62], στον φορέα της λυμφατικής φιλαρίασης *Culex quinquefasciatus* [63], και σε φορείς της ελονοσίας, όπου αύξηση πάχους του εξωσκελετού στα πόδια, για μείωση εισχώρησης λιποφιλικών εντομοκτόνων έχει παρατηρηθεί [60].

Τέλος, σε κουνούπια του γένους Anopheles, μελέτες έχουν οδηγήσει στην εύρεση γονιδίων που σχετίζονται με την παραγωγή πρωτεϊνών του εξωσκελετού, οι οποίες υπερεκφράζονται, σε άτομα τα οποία είναι ανθεκτικά σε πυρεθροειδή εντομοκτόνα [64].

1.4.2 Συμπεριφορική αποφυγή

Η ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα δεν έχει πάντα σχέση με βιοχημικούς μηχανισμούς, όπως την μεταβολική αποτοξικοποίηση ή μεταλλαγές σε θέσεις στόχους, αλλά μπορεί να αποδοθεί σε συμπεριφορικές αλλαγές, οι οποίες είναι συνέπεια παρατεταμένης έκθεσης σε αυτά. Τα παραδείγματα της συμπεριφορικής αποφυγής είναι ελάχιστα, και μπορεί να μην είναι όσο ‘σημαντική’ όσο την ανθεκτικότητα που βασίζεται στην φυσιολογία, αλλά μπορεί να θεωρηθεί ως παράγοντας που συνεισφέρει στην αποφυγή θανατηφόρων δόσεων του εντομοκτόνου [65,66]. Η απόκριση αυτή μπορεί να διαιρεθεί σε

άμεση διέγερση εξ επαφής, ή αλλιώς γνωστός σαν ‘ερεθισμός’, και σε χωρική απώθηση πρότερο της επαφής, όταν ένα έντομο απομακρύνεται από μία περιοχή στην οποία έχει χρησιμοποιηθεί εντομοκτόνο, πριν έρθει σε άμεση επαφή με αυτό [65,67].

1.4.3 Ανθεκτικότητα μεταβολισμού

Η ανθεκτικότητα μεταβολισμού είναι ο πιο κοινός μηχανισμός ανθεκτικότητας που μπορεί να βρεθεί στα έντομα, καθώς βασίζεται σε ενζυμικά συστήματα τα οποία έχουν όλα τα έντομα, ώστε να αποτοξικοποιούν φυσικά ξενοβιοτικά που προκύπτουν φυσικά. Πλέον, είναι γνωστό πως αυτά τα συστήματα αποτοξικοποίησης προέρχονται από την συνεξέλιξη φυτών και εντόμων, εξηγώντας έτσι πως μερικά από τα ένζυμα αποτοξικοποίησης μπορούν να μεταβολίζουν φυτοτοξίνες αλλά, και άλλου είδους χημικές ουσίες, στις οποίες περιλαμβάνονται και τα εντομοκτόνα [68].

Τα υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας λοιπόν, είναι αποτέλεσμα της υπερέκφρασης των ενζύμων που είναι ικανά να αποτοξικοποιήσουν τα εντομοκτόνα, ή της αντικατάστασης αμινοξέων αυτών των ενζύμων, οι οποίες τροποποιούν την συγγένεια τους ως προς το εντομοκτόνο [69]. Η υπερέκφραση αυτών των ενζύμων μπορεί να προκύψει ως αποτέλεσμα ενίσχυσης του αντίστοιχου γονιδίου, για παράδειγμα με διπλασιασμό αυτού, ή ως αποτέλεσμα αλλαγών στον υποκινητή του γονιδίου ή σε trans ρυθμιστικά στοιχεία του [70]. Αυτά τα ένζυμα λοιπόν, που μεταβολίζουν και αποικοδομούν τα εντομοκτόνα μπορούν να χωριστούν σε 3 κατηγορίες: τις εστεράσες, τις P450s και τις τρανσφεράσες-S-γλουταθειόνης [60].

Οι εστεράσες, όπως υποδεικνύει και το όνομα, είναι ένζυμα που υδρολύουν τους εστερικούς δεσμούς, των οποίων τα αυξημένα επίπεδα και κατά συνέπεια η αυξημένη δράση τους αποτελεί τον πιο συνήθη μηχανισμό στην ανθεκτικότητα μεταβολισμού.

Ένα τρανταχτό παράδειγμα θα μπορούσε να είναι τα πολλαπλά αντίγραφα των γονιδίων τους σε είδη του γένους *Culex*, επιτρέποντάς τους να αντέχουν ένα εύρος οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων [71].

Οι τρανσφεράσες-S-γλουταθειόνης είναι πολυλειτουργικά ένζυμα τα οποία συμμετέχουν στην αποτοξικοποίηση πολλών ενδογενών και ξενοβιοτικών ουσιών, αυξάνοντας την διαλυτότητα αυτών των οργανικών μορίων, οδηγώντας τα έτσι σε σίγουρη καταστροφή [72]. Τέλος, οι P450s, είναι μονοοξυγενάσες, εξαρτώμενες από το κυτόχρωμα P450, οι οποίες έχουν μεγάλη ποικιλομορφία και είναι σημαντικές για τον μεταβολισμό ενδογενών και εξωγενών ουσιών. Ανήκουν σε 6 οικογένειες, και η αυξημένη έκφραση των γονιδίων που ανήκουν στις CYP4, CYP6 και CYP9 οικογένειες μπορεί να παρατηρηθεί σε διάφορα είδη από διαφορετικές ταξινομικές βαθμίδες, τα οποία έχουν αποκτήσει ανθεκτικότητα [73].

1.4.4 Ανθεκτικότητα θέσης στόχου

Η ανθεκτικότητα θέσης στόχου είναι ο δεύτερος πιο συχνός μηχανισμός ανθεκτικότητας που συναντιέται στα έντομα. Τα εντομοκτόνα γενικά, δρουν σε μια συγκεκριμένη θέση μέσα στο έντομο, που συνήθως είναι μέρος του νευρικού συστήματος, όπως για παράδειγμα στην περίπτωση των οργανοφωσφορικών, του DDT, των πυρεθροειδών κλπ.

Η θέση δράσης του εντομοκτόνου μπορεί να τροποποιηθεί σε ανθεκτικά άτομα, μέσω της επίδρασης μη σιωπηλών σημειακών μεταλλαγών στο γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη, ώστε πλέον να μην μπορεί να προσδεθεί αποτελεσματικά [60]. Για παράδειγμα, σε αρκετούς φορείς της ελονοσίας, έχει παρατηρηθεί η μειωμένη αναστολή των ενζύμων της ακετυλοχολινεστεράσης, στις νευρικές συνάψεις, από οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα, λόγω συγκεκριμένων μεταλλαγών στο γονίδιο που κωδικοποιεί την ακετυλοχολινεστεράση [74,75,76].

Επιπρόσθετα, σε είδη του γένους *Anopheles,* μεταλλαγές στην αμινοξική αλληλουχία τασοελεγχόμενων καναλιών νατρίου, στις μεμβράνες νευρικών κυττάρων, έχουν οδηγήσει σε μείωση της ευαισθησίας των καναλιών στην πρόσδεση του DDT και των πυρεθροειδών εντομοκτόνων [77].

1.4.5 Διαχείριση ανθεκτικότητας

Η ανάπτυξη ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα, έχει σοβαρό αντίκτυπο σε διάφορους τομείς, όπως στον οικολογικό, στον υγειονομικό, καθώς και στον οικονομικό τομέα [78].

Η αύξηση στην ποσότητα των εντομοκτόνων, σε υψηλά επίπεδα, οδηγεί συνήθως, σε υψηλότερα επίπεδα ανθεκτικότητας, σε αύξηση του κόστους καταπολέμησης ακόμα και σε μόλυνση του περιβάλλοντος [79].

Προφανώς, η ανακάλυψη νέων ουσιών μπορεί να δώσει λύσεις στα παραπάνω προβλήματα, όμως ο ρυθμός με τον οποίο νέα εντομοκτόνα προϊόντα κυκλοφορούν στην αγορά, και το μέγεθος των πόρων και των χρημάτων που δίνονται στην έρευνα αυτών, καθιστά δύσκολη την ανακάλυψη νέων εντομοκτόνων σαν τη μόνη στρατηγική διαχείρισης της ανθεκτικότητας [80]. Για αυτό το λόγο χρησιμοποιείται μια πληθώρα αρχών και στρατηγικών, στις οποίες περιλαμβάνονται, προγράμματα που συνδυάζουν διάφορες μεθόδους καταπολέμησης, η παρακολούθηση της εξέλιξης της ανθεκτικότητας στους πληθυσμούς των εντόμων, η ανάπτυξη νέων ουσιών και μεθόδων καταπολέμησης, καθώς και η διερεύνηση των μηχανισμών που υποβόσκουν πίσω από τους διάφορους φαινοτύπους ανθεκτικότητας [79].

Η παρακολούθηση της εξέλιξης της ανθεκτικότητας, πραγματοποιείται κυρίως με τη χρήση βιοδοκιμών, όπου εκτιμάται ο φαινότυπος την ανθεκτικότητας ανεξάρτητα από τους μοριακούς μηχανισμούς, ή με την χρήση μοριακών μεθόδων, οι οποίες στην πλειοψηφία τους βασίζονται στην στοχευμένη

διερεύνηση νουκλεϊκών οξέων, για πιθανές γνωστές ή νέες μεταλλαγές, ή και για διαφοροποιήσεις στην έκφραση γονιδίων [81].

Το πρώτο βήμα για την διερεύνηση των μηχανισμών ανθεκτικότητας, είναι η αναγνώριση του ανθεκτικού φαινοτύπου, η οποία συνήθως διαπιστώνεται με την μέθοδο των βιοδοκιμών. Στην συνέχεια, όσον αφορά τις μοριακές αναλύσεις, πραγματοποιούνται αλληλουχίσεις γονιδίων-στόχων εντομοκτόνων για εύρεση μεταλλαγών και αναλύσεις μεταγραφωμάτων και γονιδιωμάτων για την μελέτη του γενετικού προφίλ, καθώς και για τον έλεγχο για διαφοροποιήσεις στη γενετική έκφραση, ώστε να αναγνωριστούν υποψήφια γονίδια που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα [82].

Όσον αφορά τις βιοχημικές αναλύσεις, πραγματοποιείται μέτρηση δραστικότητας συγκεκριμένων ομάδων ενζύμων, που μπορεί να εμπλέκονται στον αυξημένο μεταβολισμό εντομοκτόνων. Για να διαλευκανθεί ο ρόλος αυτών των υποψήφιων γονιδίων και ενζύμων, χρησιμοποιούνται διάφορες μέθοδοι και τεχνικές, όπως in vitro ετερόλογη έκφραση γονιδίων αποτοξικοποίησης ή in vivo τεχνικές, όπως RNAi ή το σύστημα CRISPR/Cas9, για να αναλυθούν μεταλλαγές ανθεκτικότητας και ο ρόλος των γονιδίων αποτοξικοποίησης [82].

1.5 Spinosad και α6 υπομονάδα του nAChR

1.5.1 Spinosyns

Οι σπινοσίνες (spinosyns) είναι μια μοναδική τάξη φυσικών προϊόντων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως εντομοκτόνα [83]. Στην αγορά αυτήν την στιγμή, υπάρχουν δύο τέτοιες ουσίες, το Spinosad, το οποίο είναι ένα φυσικό μείγμα των spinosyn A (κύριο συστατικό) και spinosyn D, και το Spinetoram, το οποίο είναι μείγμα δύο ημι-συνθετικών σπινοσινών [84,85]. Αυτά τα προϊόντα δρουν στο νευρικό σύστημα των εντόμων, με τρόπο ο οποίος ξεχωρίζει από αυτόν άλλων εντομοκτόνων, όπως των πυρεθροειδών, των νεονικοτινοειδών, των οργανοφωσφορικών κλπ., καθώς δρουν κατά κύριο λόγο μέσω μιας αλληλεπίδρασης με τον νικοτινικό υποδοχέα ακετυλοχολίνης (nAChR) των εντόμων, σε περιοχή διαφορετική από αυτήν που συνδέονται για παράδειγμα τα νεονικοτινοειδή [85,86].

Συγκεκριμένα, αυτός ο στόχος, για το Spinosad, είναι η α6 υπομονάδα (α7 like) του συγκεκριμένου υποδοχέα, και η μοναδική αλληλεπίδραση με αυτόν, δίνει το πλεονέκτημα να ελαχιστοποιούνται τα γεγονότα διασταυρούμενης ανθεκτικότητας με άλλα εντομοκτόνα [87]. Αν προστεθεί και η μειωμένη επίδραση στους περισσότερους πληθυσμούς ωφέλιμων εντόμων, τότε αυτή η τάξη ουσιών μπορεί να κάνει μεγάλη διαφορά σε προγράμματα καταπολέμησης επιβλαβών εντόμων [88].

1.5.2 Νικοτινικοί υποδοχείς ακετυλοχολίνης εντόμων

Οι νικοτινικοί υποδοχείς ακετυλοχολίνης (nAChRs), ανήκουν σε μία υπεροικογένεια συνδετοελεγχόμενων καναλιών ιόντων, μπορούν να εντοπιστούν σε είδη τόσο διαφορετικά όπως τα βακτήρια με τους ανθρώπους,

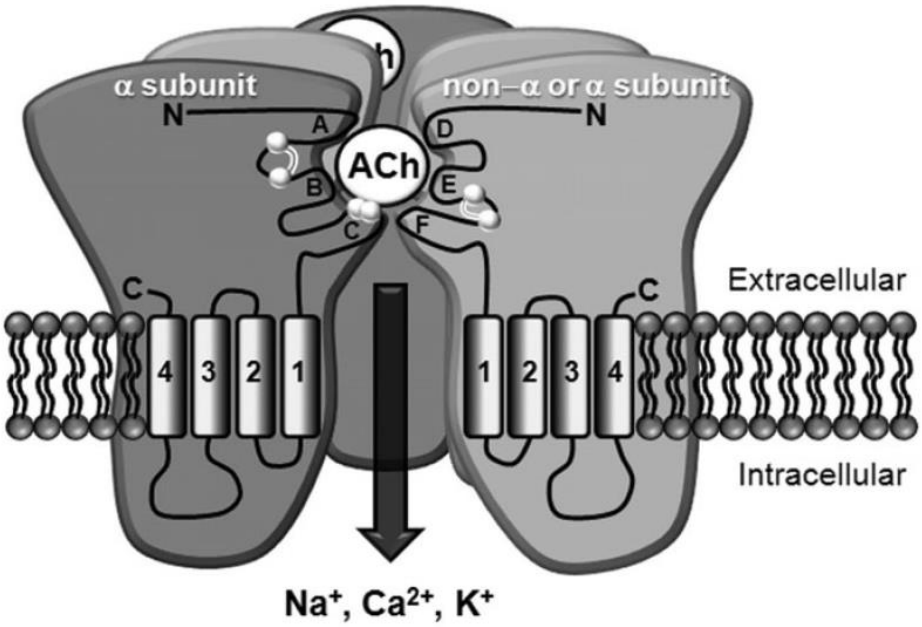
και είναι γνωστοί για τον ρόλο τους στην γρήγορη μοριακή σηματοδότηση, σε νευρικά συστήματα και σε νευρομυικές συνάψεις. Στα έντομα αυτοί οι υποδοχείς είναι παρόντες μόνο στο κεντρικό νευρικό σύστημα, καθιστώντας το ένα από τα πιο πλούσια νευρικά συστήματα σε nAChRs υποδοχείς, και ένα πολύ ενδιαφέρον αντικείμενο μελέτης, όχι μόνο για τα σηματοδοτικά μόρια αλλά και για τους πιθανούς στόχους σημαντικών εντομοκτόνων διαφορετικών κλάσεων [89].

1.5.3 Δομή και λειτουργία των υποδοχέων

Οι νικοτινικοί υποδοχείς της ακετυλοχολίνης (nAChRs), όπως προαναφέρθηκε, είναι μέλη της υπεροικογένειας των προσδετο-εξαρτώμενων καναλιών ιόντων που χρησιμοποιούν την γρήγορη δράση της ακετυλοχολίνης για να μεταβιβάσουν σήματα στο κεντρικό νευρικό σύστημα [90,91]. Απαρτίζονται από πέντε ομόλογες υπομονάδες, οι οποίες σχηματίζουν ένα κεντρικό κανάλι ιόντων (Εικ 10), και ουσιαστικά λειτουργούν σαν μοριακοί διακόπτες, αλλάζοντας την διάταξή τους κατά την πρόσδεση του αγωνιστή (ακετυλοχολίνη), ώστε να επιτρέψουν έναν καταρράκτη ιόντων να εισέλθει μέσα στο κύτταρο [92].

Κάθε υπομονάδα έχει τέσσερις διαμεμβρανικές περιοχές (TM 1-4),με την TM2 να συμμετέχει στο σχηματισμό του καναλιού ιόντων, και διαθέτει μια αμινοτελική εξωκυττάρια επικράτεια, με τον χαρακτηριστικό βρόχο κυστεΐνης (Cys-loop), ο οποίος αποτελείται από δύο κυστεΐνες, που απέχουν δεκατρία αμινοξέα μεταξύ τους, και σχηματίζουν δισουλφιδικούς δεσμούς. Λειτουργικά, ο βρόχος, συμμετέχει στον σχηματισμό του υποδοχέα και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στα κινητικά χαρακτηριστικά του καναλιού ιόντων [93,94]. Η θέση πρόσδεσης της ακετυλοχολίνης εντοπίζεται στην επιφάνεια ανάμεσα σε δύο υπομονάδες, και σχηματίζεται από έξι ξεχωριστούς βρόχους (A-F), στην αμινοτελική εξωκυττάρια επικράτεια, με τους βρόχους A,B και C να ανήκουν σε κάποια α υπομονάδα και με τους D,E και F βρόχους να ανήκουν είτε σε κάποια άλλη α υπομονάδα, είτε σε μια μη-α υπομονάδα [95]. Οι α υπομονάδες είναι σημαντικές για την πρόσδεση της ακετυλοχολίνης, καθώς περιέχουν τα εξίσου σημαντικά, γειτονικά κατάλοιπα κυστεΐνης στο βρόχο C, ενώ οι υπομονάδες που δεν περιέχουν αυτά τα διπλανά κατάλοιπα κυστείνης ονομάζονται μη-α ή έχουν ονόματα όπως, β,γ,δ ή ε [96].

Ένας υποδοχέας μπορεί να αποτελείται είτε μόνο από τις ίδιες α υπομονάδες, είτε από διαφορετικές α υπομονάδες, είτε από διάφορους συνδυασμούς α και μη-α υπομονάδων, το οποίο είναι και το πιο σύνηθες [97]. Ωστόσο, η ύπαρξη τουλάχιστον δύο α υπομονάδων είναι απαραίτητη.

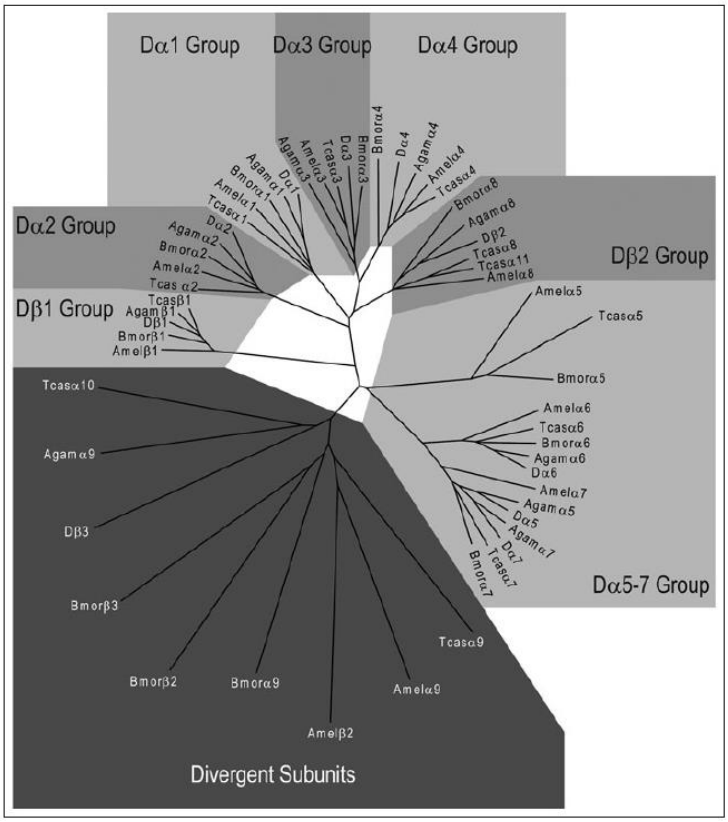


Εικόνα 10. Αναπαράσταση δομής νικοτινικού υποδοχέα ακετυλοχολίνης, ο οποίος αποτελείται από δύο α (σκούρο γκρι) και τρείς μη-α (ανοιχτό γκρι) υπομονάδες. Σε δύο από αυτές τις υπομονάδες φαίνονται οι Cys-loops, σαν δύο άσπροι κύκλοι οι οποίοι ενώνονται με μια άσπρη διπλή γραμμή, οι δύο κυστείνες στην λούπα C, οι οποίες καθορίζουν τις α υπομονάδες, οι τέσσερις διαμεμβρανικές περιοχές (TM1-4) και οι έξι λούπες (A-F), οι οποίες συμμετέχουν στην πρόσδεση της ακετυλοχολίνης [89]

Η σύσταση των υπομονάδων είναι αυτή που θα καθορίσει τα δομικά και φαρμακολογικά χαρακτηριστικά ενός υποδοχέα, συνεπώς η ποικιλομορφία των υποδοχέων σε έναν οργανισμό, είναι αποτέλεσμα των πολλαπλών γονιδίων των υπομονάδων [89].

1.5.4 Υπομονάδες σε διαφορετικά είδη

Αυτοί οι νικοτινικοί υποδοχείς μπορεί να μην έχουν μελετηθεί στα έντομα όσο και στα σπονδυλωτά, αλλά λόγω της αφθονίας της ακετυλοχολίνης σαν νευροδιαβιβαστή, σε πολλά είδη εντόμων [98], αρκετές από τις υπομονάδες (Dα1-7,β1,β2) του υποδοχέα, του γένους *Drosophila* έχουν μελετηθεί για την αλληλεπικαλυπτόμενη κατανομή τους σε διάφορες περιοχές του νευρικού συστήματος [99], αλλά και η οικογένεια τους έχει συγκριθεί με αυτές άλλων εντόμων, για το πόσο συντηρημένες είναι οι κύριες υπομονάδες αυτών των οικογενειών. Για παράδειγμα, μια μελέτη [100] σύγκρινε τις υπομονάδες ανάμεσα στα είδη *Drosophila melanogaster, Anopheles gambiae, Apis mellifera, Tribolium castaneum,* και *Bombyx mori* (Εικ 11).



Εικόνα 11. Δέντρο που αναπαριστά τις οικογένειες γονιδίων του nAChR,, για τα είδη A. gambiae, A. mellifera, B mori, D. Melanogaster και T. Castaneum. Με βάση την αμινοξική ομολογία τους, χωρίζονται σε ομάδες, με κάθε έντομο να έχει μια υπομονάδα που δεν ανήκει σε καμία ομάδα υψηλής ομολογίας (Andrew K. Jones et al.,2010)

Κάθε μια από αυτές τις 5 οικογένειες έχει 7 κύριες ομάδες, στις οποίες ανήκουν οι υπομονάδες των ειδών, που έχουν υψηλά επίπεδα ομοιότητας μεταξύ τους (υπάρχει και μια ομάδα που εμπεριέχει υπομονάδες που δεν έχουν υψηλή ομοιότητα με άλλες). Το αξιοσημείωτο ήταν πως οι υπομονάδες είχαν μεγαλύτερο επίπεδο αλληλοεπικάλυψης με αυτές των άλλων ειδών που ανήκαν στην ίδια ομάδα (άνω του 60%), παρά με αυτές που ανήκαν στο ίδιο είδος [89].

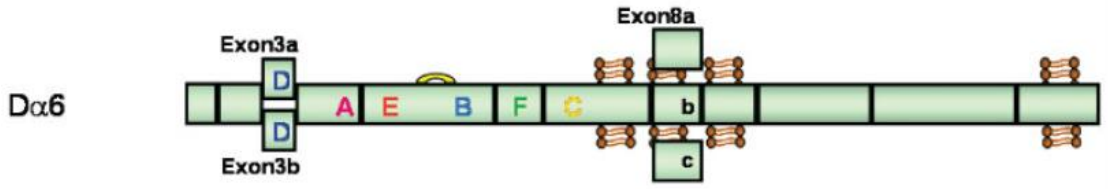
Συνεπώς, λόγω της αφθονίας τους στο κεντρικό νευρικό σύστημα, και λόγω των συντηρημένων τους αλληλουχιών σε διαφορετικά είδη εντόμων, θα μπορούσε να πει κάποιος, πως αποτελούν αποτελεσματικούς στόχους εντομοκτόνων, για την καταπολέμηση εντόμων υγειονομικού και αγρονομικού ενδιαφέροντος.

1.5.5 Ποικιλομορφία μεταγράφων

Αν και ο αριθμός των γονιδίων, αυτού του υποδοχέα, είναι σχετικά μικρός στα έντομα, για παράδειγμα στη *D.melanogaster* αριθμούνται στα 10, τα προϊόντα τους είναι αρκετά περισσότερα σε σύγκριση με αυτά, δημιουργώντας ένα πρωτέωμα υποδοχέα με μεγάλη ποικιλομορφία [89]. Οι λόγοι αυτού του φαινομένου, που οδηγούν σε υποδοχείς με πιθανά ευδιάκριτα λειτουργικά χαρακτηριστικά, είναι το εναλλακτικό μάτισμα και η επεξεργασία (editing) των μεταγράφων, αυτών των γονιδίων.

Για παράδειγμα αυτές οι μεταμεταγραφικές τροποποιήσεις, για την α6 υπομονάδα της D.melanogaster, θεωρητικά μπορούν να δημιουργήσουν έως και 30.000 ισομορφές του γονιδίου [101]. Το εναλλακτικό μάτισμα γενικότερα έχει σημαντικό ρόλο στην διεύρυνση της ποικιλότητας των πρωτεϊνών στην Drosophila. Η Dα6 υπομονάδα συγκεκριμένα έχει δύο παραλλαγές για το εξώνιο 3 και τρεις παραλλαγές για το εξώνιο 8 (Εικ 12) [101], δημιουργώντας πρωτεΐνες με διαφορές στην λειτουργία τους [103]. Το εξώνιο 3 εμπεριέχει την λούπα D, και το εξώνιο 8 εμπεριέχει την διαμεμβρανική περιοχή 2, δημιουργώντας έτσι την πιθανότητα, με το μάτισμα σε αυτά τα εξώνια, να τροποποιούνται τα χαρακτηριστικά πρόσδεσης της ακετυλοχολίνης, αλλά και αυτά του καναλιού ιόντων [101].

Έχουν παρατηρηθεί και άλλες περιπτώσεις ματίσματος, για άλλες υπομονάδες, που αφορούν την αφαίρεση εξωνίων, αλλαγή στο πλαίσιο διαβάσματος, δημιουργία πρόωρων κωδικονίων λήξης, και περιπτώσεις που δεν έχει πραγματοποιηθεί το προγραμματισμένο μάτισμα ιντρονίων, οδηγώντας όλες αυτές σε ελαττωμένα (κομμένα) μετάγραφα, τα οποία μπορεί να έχουν χάσει την λειτουργικότητα τους [101,104].



Εικόνα 12. Εναλλακτικό μάτισμα στην υπομονάδα α6 του nAChR της Δροσόφιλας. Οι 6 επικράτειες πρόσδεσης της ακετυλοχολίνης αναπαρίστανται με τα γράμματα A-F, η cys loop σαν κίτρινη μπάρα και φαίνονται οι 4 περιοχές που διαπερνούν την μεμβράνη (D.B. Sattelle et al.,2005)

Όσον αφορά το RNA editing, αυτός ο μεταμεταγραφικός μηχανισμός, χρησιμοποιεί απαμινάσες της αδενοσίνης για να τροποποιήσει χημικά κατάλοιπα αδενοσίης στα RNAs, σε κατάλοιπα ινοσίνης, τα οποία αναγνωρίζονται ως γουανίνες από τις μοριακές μηχανές μετάφρασης, αλλάζοντας έτσι κατά κάποιο τρόπο, τον κώδικα του γονιδιώματος [105]. Στην α6 υπομονάδα για παράδειγμα, έχουν βρεθεί 7 θέσεις στο αμινοτελικό άκρο, όπου τροποποιούνται οι αδενοσίνες, επηρεάζοντας έτσι την λούπα E που αλληλοεπιδρά με την ακετυλοχολίνη, και κάποιες συντηρημένες θέσεις γλυκοζυλίωσης [106].

Σε γενικές γραμμές, το RNA editing μπορεί να τροποποιήσει την λειτουργικότητα των υποδοχέων, επηρεάζοντας περιοχές γλυκοζυλίωσης, περιοχές απαραίτητες για την σύνδεση με την ακετυλοχολίνη, διαμεμβρανικές περιοχές, καθώς και περιοχές που αποτελούν μέρος του καναλιού ιόντων [107,108].

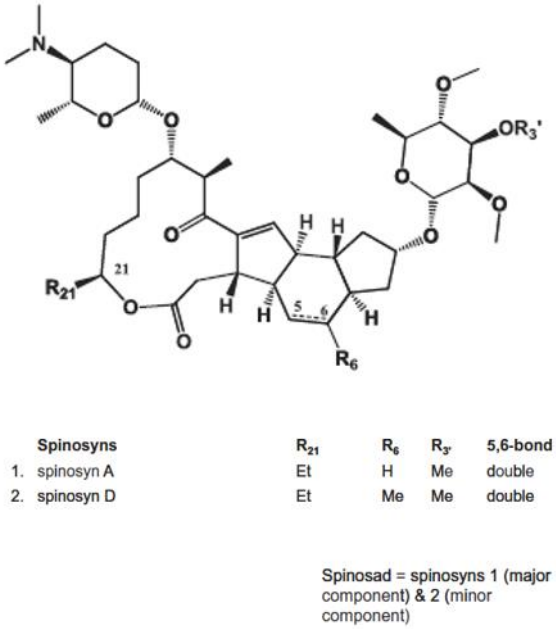
1.5.6 Spinosad

Το Spinosad (Εικ 13), όπως αναφέρθηκε, είναι μείγμα δύο ενώσεων, των spinosyn A και spinosyn D, οι οποίες παράγονται από το είδος *Saccharopolyspora spinosa*, και κυκλοφορεί ως εντομοκτόνο από το 1997 [109]. Λειτουργεί, κατά κύριο λόγο, ως αλλοστερικός αγωνιστής της

ακετυλοχολίνης, με το να προσδένεται στην α6 υπομονάδα του nAChR των εντόμων, προκαλώντας ακούσια νευρική διέγερση, και κατά συνέπεια μυϊκή συστολή, τρέμουλο, παράλυση και τελικά θάνατο [110,111]. Σαν εντομοκτόνο είναι εξαιρετικά αποτελεσματικό ενάντια σε ένα ευρύ φάσμα λεπιδόπτερων (*Helicoverpa armigeria, Plutella xylostella*), δίπτερων (*Bactrocera dorsalis, Bactrocera oleae, Drosophila melanogaster*), και άλλων εντόμων εχθρών [112], αλλά μερικά από αυτά τα είδη εντόμων έχουν μια μακρά ιστορία στο να αναπτύσσουν ανθεκτικότητα σε εντομοκτόνα, παλιά και νέα, που χρησιμοποιούνται εκτεταμένα εναντίον τους [113].

Μελέτες έχουν δείξει, πως σε εργαστηριακούς πληθυσμούς εντόμων το resistance ratio (RR) στα spinosyns, έχει εύρος από 13 έως και μεγαλύτερο από 1000, ενώ σε πληθυσμούς πεδίου αυτός ο λόγος έχει εύρος από 4 μέχρι και 20.000, με τα περισσότερα (γύρω στο 50%) από αυτά τα είδη που έχουν μελετηθεί να ανήκουν στα λεπιδόπτερα [88].

Η βιοχημική βάση αυτής της ανθεκτικότητας έχει δειχθεί, πως τις περισσότερες (67%) φορές σχετίζεται με ανθεκτικότητα στόχου, αλλά δεν είναι και λίγες οι φορές που η ανθεκτικότητα μεταβολισμού αποτελούσε τον κύριο παράγοντα [88]. Για το Spinosad για παράδειγμα, πρόσφατες μελέτες στα είδη *S.exigua* [114] και *H.armigera* [115], έχουν προτείνει την ύπαρξη ακόμα και ειδικών μονοοξυγενασών, στο πλαίσιο της ανθεκτικότητας μεταβολισμού, για αυτό το εντομοκτόνο.



Εικόνα 13. Δομή του Spinosad (Thomas C. Sparks et al.,2011)

Όμως, ο πιο κοινός μηχανισμός για τα spinosyns, παραμένει η ανθεκτικότητα θέσης στόχου. Ειδικότερα, για το Spinosad, έχει βρεθεί πως η ανθεκτικότητα σε αυτό σχετίζεται με την υπομονάδα α6 του nAChR, με την οποία και αλληλοεπιδρά, σε διάφορα είδη εντόμων, όπως στην *D. melanogaster,* στην *P.xylostella,* στην *M.domestica,* στο *B.dorsalis και* στη *C.capitata* [116,117,118,119]. Τα αλληλόμορφα της α6 υπομονάδας που προσδίδουν στα διάφορα έντομα ανθεκτικότητα στο Spinosad, μερικές φορές προσδίδουν

φαινότυπο χαμηλού επιπέδου ανθεκτικότητας και σε άλλες ουσίες που ανήκουν στα spinosyns, αλλά ελάχιστη έως και καθόλου ανθεκτικότητα σε άλλης κλάσης εντομοκτόνα, όπως για παράδειγμα τα νεονικοτινοειδή που στοχεύουν και αυτά τον nAChR, λόγω της μοναδικής δράσης του Spinosad [88]. Βέβαια, συνήθως αυτά τα αλληλόμορφα προκαλούν κάποιο κόστος στην φυσική κατάσταση των ανθεκτικών ατόμων, ειδικά σε μεγάλα επίπεδα ανθεκτικότητας, όπως αυξημένους χρόνους σε κάθε αναπτυξιακό στάδιο, μειωμένο βάρος στο στάδιο της νύμφης, μειωμένος αριθμός αυγών που γεννιούνται και μειωμένος αριθμός που εκκολάπτονται [120].

Συνεπώς, το Spinosad λόγω της μοναδικής δράσης του, της ελάχιστης επίδρασης του στα περισσότερα ωφέλιμα έντομα και της μειωμένης πιθανότητας να οδηγήσει σε ανθεκτικότητα σε κάποιας άλλης κλάσης εντομοκτόνο, μπορεί να αποτελέσει έναν σημαντικό σύμμαχο στα προγράμματα καταπολέμησης επιβλαβών εντόμων [88].

1.6 Βιοεντομοκτόνα

Τα βιοεντομοκτόνα είναι ζώντες οργανισμοί και φυσικές, βιολογικής προέλευσης ουσίες οι οποίες χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο της ανάπτυξης και του πολλαπλασιασμού εντόμων αγρονομικής και υγειονομικής σημασίας [121]. Περιλαμβάνονται σε αυτά, ουσίες που παράγονται από ζώα, φυτά, μικροοργανισμούς, μερικές φορές και οι ίδιοι οι μικροοργανισμοί (βακτήρια, μύκητες, ιοί), ακόμα και μερικές RNAi τεχνολογίες [122].
Με βάση τον τεχνικό ορισμό που δίνει το United States Environmental Protection Agency (EPA), τα βιοεντομοκτόνα μπορούν να ταξινομηθούν σε τρεις διαφορετικές κλάσεις: στις βιοχημικές ουσίες φυσικής προελεύσεως που δρουν μέσω μη τοξικών μηχανισμών, στα μικροβιακά εντομοπαθογόνα, και στις προστατευτικές ουσίες που παράγονται από γενετικά τροποποιημένα φυτά [123].

1.6.1 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα βιοεντομοκτόνων

Αναφορές, συνεχώς, τονίζουν την αύξηση της αξίας των βιοεντομοκτόνων στην αγορά [124]. Αυτό δεν πρέπει να προκαλεί απορία, καθώς έχουν προσόντα τα οποία επισκιάζουν τα συμβατικά χημικά βιοεντομοκτόνα [125] : αποτελούνται από ουσίες φυσικής προέλευσης που προέρχονται από ζωντανούς οργανισμούς, δεν προκαλούν μολύνσεις στο περιβάλλον, όπως ρύπανση των υδάτων, δεν επηρεάζουν ωφέλιμα έντομα, η παραγωγή τους είναι φθηνότερη τις περισσότερες φορές, τα έντομα στόχοι δεν αναπτύσσουν ανθεκτικότητα λόγω του ότι τα βιοεντομοκτόνα μπορεί να είναι και μείγμα ουσιών, και δεν οδηγούν σε βιοσυσσώρευση, επειδή διασπώνται ευκολότερα λόγω της οργανικής τους φύσης.

Βέβαια, παρά τα πλεονεκτήματα τους, η χρήση τους δεν είναι τόσο εκτεταμένη όσο θα περίμενε κανείς, για τους παρακάτω λόγους: μικρός χρόνος ζωής, λόγω της ευαισθησίας τους σε αλλαγές στην θερμοκρασία και στην υγρασία, περιορισμός εφαρμογής ανάλογα με τις κλιματικές συνθήκες κάθε περιοχής (θερμοκρασία, υγρασία, έδαφος κλπ.), και λόγω της αρκετά υψηλής τους εξειδίκευσης εναντίον συγκεκριμένων εντόμων, οι αγρότες τα αποφεύγουν

ώστε να μην χρειάζεται να χρησιμοποιούν διαφορετικά κοστοβόρα εντομοκτόνα [126].

Για αυτούς τους λόγους, συνεχώς προτείνεται ο συνδυασμός και η εναλλαγή βιοεντομοκτόνων με τα κλασσικά συμβατικά εντομοκτόνα, ώστε να υπάρξει η μεγαλύτερη δυνατή απόδοση [126].

1.6.2 Βιοχημικά εντομοκτόνα

Τα βιοχημικά εντομοκτόνα είναι φυσικής προελεύσεως προϊόντα που χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο εντόμων μέσω μη τοξικών μηχανισμών. Συνήθως, κατηγοριοποιούνται σε τρεις τύπους, στις φερομόνες, στα εκχυλίσματα και έλαια φυτών, και στους ρυθμιστές ανάπτυξης εντόμων [126].
Οι φερομόνες εντόμων είναι, συγκεκριμένες για κάθε είδος [127], χημικές ουσίες, αποτελεσματικές στο να διαταράσσουν το ζευγάρωμα των εντόμων, καθώς τα έντομα μπερδεύονται με την αυξημένη τους συγκέντρωση στο περιβάλλον, μειώνοντας έτσι τον αριθμό των απογόνων τους [128]. Τα εκχυλίσματα και αιθέρια έλαια φυτικής προέλευσης, εμπεριέχουν μια ποικιλία βιοενεργών χημικών ουσιών [129].

Ανάλογα με την φυσιολογία των εντόμων αλλά και των φυτών, αυτά τα εκχυλίσματα και έλαια έχουν μία πληθώρα δράσεων, καθώς μπορούν να δράσουν ως απωθητικά, προσελκυστικά, αντιτροφικά, μπορούν να περιορίσουν την αναπνοή, την ωοτοκία, και την αύξηση των ενηλίκων, καθώς μπορεί να περιέχουν ουσίες που προκαλούν θάνατο σε αυγά και προνύμφες [130].

Τέλος, οι ρυθμιστές ανάπτυξης, είναι επιλεκτικές ουσίες που καταστέλλουν κάποιες συγκεκριμένες διαδικασίες που είναι απαραίτητες για την επιβίωση των εντόμων, σκοτώνοντας τα [131]. Ανάλογα με την δράση τους, κατηγοριοποιούνται σε καταστολείς σύνθεσης χιτίνης, και σε ουσίες που παρεμβαίνουν στην δράση των ορμονών των εντόμων [132].

1.6.3 Προϊόντα γενετικά τροποποιημένων φυτών

Τα προϊόντα των GMOs, είναι ουσίες που παράγονται μέσω γενετικά τροποποιημένων οργανισμών. Το γενετικό υλικό αυτών των ενώσεων, είναι ενσωματωμένο σε αυτό των φυτών, με αυτά να χρησιμοποιούνται ως πηγή παραγωγής αυτών των προϊόντων. Οι Cry πρωτεΐνες, του βακτηρίου *Bacillus thuringiensis*, είναι από τα πρώτα και πιο δημοφιλή εντομοκτόνα που έχουν εντεθεί σε οικονομικά σημαντικές καλλιέργειες, όπως καλαμποκιού και βαμβακιού [133].

Έχουν γίνει όμως προσπάθειες εφαρμογής και της RNAi τεχνολογίας, στην φυτοπροστασία, μέσω γενετικά τροποποιημένων καλλιεργειών, όπως του βαμβακιού, της σόγιας και του καλαμποκιού [134]. Ένα παράδειγμα αποτελεί η έκφραση dsRNAs σε βαμβάκι, ειδικών για συγκεκριμένες P450s του είδους *Helicoverpa armigera*, με σκοπό την μείωση της μεταβολικής ανθεκτικότητας τους [135].

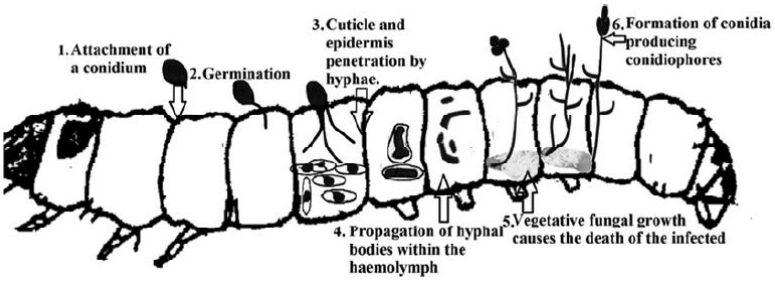
1.6.4 Μικροβιακά εντομοπαθογόνα

Στα μικροβιακά βιοεντομοκτόνα εμπεριέχονται αρκετοί μικροοργανισμοί όπως, βακτήρια, μύκητες, ιούς, βακτήρια που σχετίζονται με νηματώδεις, καθώς και διάφορες εντομοκτόνες ουσίες που παράγονται από αυτούς. Ο τομέας αυτής της κλάσης βιοεντομοκτόνων βιώνει μια σημαντική αύξηση τα τελευταία χρόνια, μετά την επιτυχή χρήση του εντομοπαθογόνου βακτηρίου *Bacillus thuringiensis,* ωθώντας έρευνα και βιομηχανία στην ανακάλυψη νέων μικροβιακών ειδών και παραγόντων, που μπορούν να ενσωματωθούν σε προγράμματα ελέγχου βλαβερών εντόμων [136].

1.6.4.1 Μύκητες

Στους εντομοπαθογόνους μύκητες (Εικ 14) ανήκουν διάφορα είδη, με διαφορετικές γεωγραφικές προελεύσεις, με γενικευμένη αλλά και με εξειδικευμένη δράση. Η διαδικασία της μόλυνσης συνήθως ξεκινάει με την επαφή των σπορίων ή των κονιδίων με τον εξωσκελετό των ξενιστών. Με τον συνδυασμό ενζυμικών και μηχανικών δράσεων, διαπερνούν το σώμα του εντόμου, δημιουργούν μυκήλια εσωτερικά τους, και συνήθως παράγουν διαφορετικούς τύπους κονιδίων και σπορίων [136].

Κατά την ανάπτυξη τους, οι μύκητες παράγουν τοξίνες και μεταβολίτες που ευνοούν τον πολλαπλασιασμό τους, και για να εξασφαλίσουν την διασπορά τους στο περιβάλλον, κονίδια και σπορία παράγονται έξω από τον μολυσμένο ξενιστή, όταν αυτός πεθάνει [136]. Μερικά παραδείγματα εντομοπαθογόνων μυκήτων, είναι ο *Beauveria bassiana*, από τους πρώτους μύκητες που χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο πληθυσμών εντόμων στα τέλη του δέκατου ένατου αιώνα, και ο *Metarhizium anisopliae*, ο οποίος επηρεάζει ένα μεγάλο εύρος ξενιστών, και χρησιμοποιείται για την παραγωγή εντομοκτόνων τοξινών και μεταβολιτών [137,138].



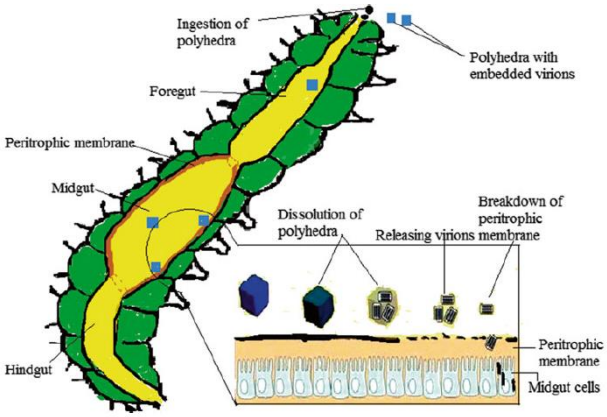
Εικόνα 14. Μηχανισμός δράσης εντομοπαθογόνων μυκήτων εναντίον προνυμφών λεπιδοπτέρων (Sengottayan Senthil-Nathan, 2015)

1.6.4.2 Ιοί

Οι DNA ιοί που ανήκουν στην οικογένεια *Baculoviridae* (Εικ 15), έχουν εγκαθιδρύσει μια σταθερή σχέση παθογόνου-ξενιστή με διάφορα είδη αρθροπόδων, κυρίως εντόμων, δείχνοντας έτσι την δυνατότητα τους ως πιθανά μέσα ελέγχου πληθυσμών εντόμων [140].

Βέβαια, η εφαρμογή τους στο πεδίο είναι ακόμα περιορισμένη, με τους κύριους στόχους τους να είναι λεπιδόπτερα που τρέφονται με σόγια και καλαμπόκι [141]. Προκαλούν θνησιμότητα μόνο στο προνυμφικό στάδιο, οπότε για να

αρχίσει η μόλυνση των εντόμων, πρέπει να φαγωθούν πρώτα. Στο μεσέντερο τους, απελευθερώνονται ιικά σωμάτια, τα οποία αλληλοεπιδρούν με τα επιθηλιακά κύτταρα, εισέρχονται σε αυτά, και στην συνέχεια στον πυρήνα τους. Τέλος, πολλαπλασιάζονται στους πυρήνες και εξαπλώνονται σε όλο το σώμα του ξενιστή. Μετά τον θάνατο των προνυμφών, το σώμα τους υγροποιείται, ώστε να διευκολυνθεί η διασπορά των ιών στο περιβάλλον [142].

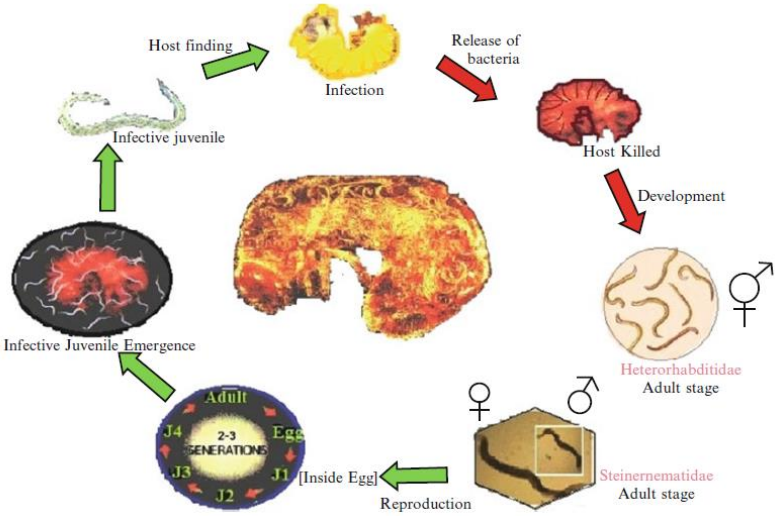


Εικόνα 15. Μηχανισμός δράσης baculoviruses εναντίον προνυμφών λεπιδοπτέρων (Sengottayan Senthil-Nathan 2015)

1.6.4.3 Νηματώδεις

Τα είδη των εντομοπαθογόνων νηματωδών (Εικ 16) που ανήκουν στα γένη *Heterorhabditis* και *Steinernema*, λειτουργούν ως υποχρεωτικά παράσιτα και λόγω της συμβίωσης τους με βακτήρια, που ανήκουν στα γένη *Photorhabdus* και *Xenorhabdus* αντίστοιχα, τα οποία είναι παθογόνα για τα έντομα, έχουν μία αξιόλογη ικανότητα να δρουν ως δυνητικά εντομοκτόνα [143]. Αυτά τα νηματώδη, συνήθως εισέρχονται στους ξενιστές μέσω του στόματος, της έδρας ή των διαφόρων κοιλοτήτων τους και απελευθερώνουν τα συμβιωτικά τους βακτήρια στην αιμόλεμφο των εντόμων.

Τα βακτήρια κατά την διάρκεια του πολλαπλασιασμού τους, απελευθερώνουν τοξίνες και μολυσματικούς παράγοντες, οι οποίοι αποδυναμώνουν τον ξενιστή, αλλά παράγουν και μεταβολίτες που ευνοούν τον πολλαπλασιασμό των νηματωδών, καθώς δημιουργούν κατάλληλο κλίμα για αυτούς. Προϊόντα, βασισμένα σε αυτές τις ουσίες, παράγονται παγκοσμίως και είναι κατασκευασμένα ώστε να στοχεύουν συγκεκριμένα επιβλαβή έντομα [144].



Εικόνα 16. Μηχανισμός δράσης εντομοπαθογόνων νηματωδών εναντίον λεπιδόπτερων (Sengottayan Senthil-Nathan 2015)

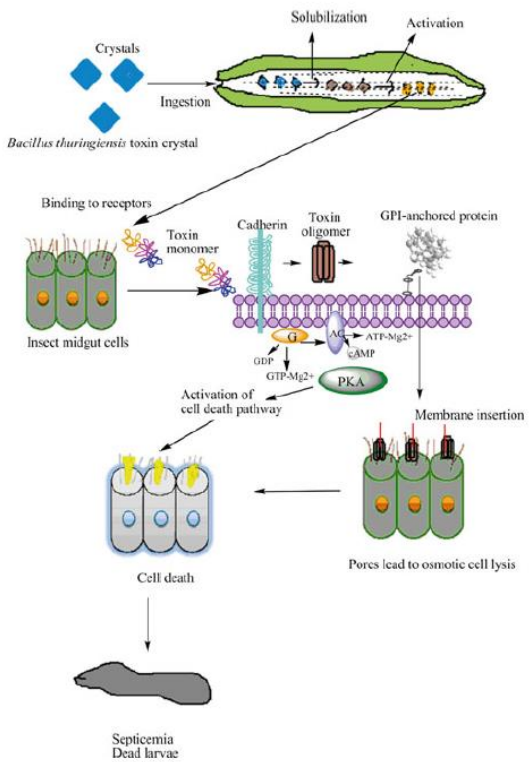
1.6.4.4 Βακτήρια

Τα βακτήρια που χρησιμοποιούνται ως βιοεντομοκτόνα μπορούν να χωριστούν σε τέσσερις κατηγορίες: σε αυτά που σχηματίζουν σπορία που φέρουν κρυστάλλους (όπως το *Bacillus thuringiensis*), στα υποχρεωτικά παθογόνα (όπως το *Bacillus popilliae*), στα δυνητικά παθογόνα (όπως το *Serratia marcescens*) και στα κατά περίπτωση παθογόνα (όπως το *Pseudomonas aeruginosa*). Από αυτές τις κατηγορίες, τα βακτήρια που σχηματίζουν σπορία είναι τα πλέον δημοφιλή, με τα *B.thuringiensis* (Εικ 17) και *B.sphaericus* να είναι τα πιο ευρέως χρησιμοποιημένα, λόγω της υψηλής εξειδίκευσης τους, της ασφάλειας τους, και της αποτελεσματικότητας τους στην καταπολέμηση εντόμων [145].

Γενικότερα, τα διαφορετικά βακτηριακά είδη που ανήκουν στην οικογένεια *Bacillaceae*, αποτελούν αντικείμενα προς μελέτη εδώ και πολλά χρόνια, για την κατανόηση των παθογονικών σχέσεων τους με τα έντομα [146].

Μια άλλη κλάση με μεγάλες προοπτικές στην καταπολέμηση εντόμων, είναι τα *Betaproteobacteria*. Μεταβολίτες από δύο είδη αυτής της κλάσης, τα *Burkholderia rinojensis* και *Chromobacterium subtsugae,* έχουν δείξει ισχυρές εντομοκτόνες δράσεις, σε μασητικά και μυζητικά έντομα, και σε ένα μεγάλο εύρος διαφορετικών ειδών (λεπιδόπτερα, υμενόπτερα, κολεόπτερα, δίπτερα), αντίστοιχα [147,148].

Τέλος, υπάρχουν και τα ακτινοβακτήρια, στα οποία περιλαμβάνονται διαφορετικά είδη *Streptomyces,* τα οποία παράγουν μια πληθώρα εντομοκτόνων τοξινών, όπως παράγωγα μακροκυκλικής λακτόνης, τα οποία επηρεάζουν το περιφερειακό νευρικό σύστημα των εντόμων [149]. Μέσα στο ίδιο φύλο, ανήκει και το *Saccharopolyspora spinosa*, το οποίο παράγει τις spinosins, εντομοκτόνες τοξίνες (φυσικές και ημισυνθετικές) με ισχυρή και μεγάλου εύρους δράση, που έχουν συναντήσει μεγάλη εμπορική επιτυχία [150].



Εικόνα 17. Μηχανισμός δράσης της Bt τοξίνης εναντίον προνυμφών λεπιδοπτέρων (Sengottayan Senthil-Nathan 2015)

Κεφάλαιο 2: Διερεύνηση του μηχανισμού ανθεκτικότητας του δάκου της ελιάς, Bactrocera oleae, στο εντομοκτόνο spinosad

2.1 Εισαγωγή

Η εύρεση και η ανάλυση των μοριακών μηχανισμών που προσδίδουν ανθεκτικότητα στα διάφορα έντομα αγρονομικού και υγειονομικού ενδιαφέροντος, σε εντομοκτόνα διαφορετικών κλάσεων, είναι απολύτως σημαντική, όχι μόνο για να απαντηθούν επιστημονικά ερωτήματα και να προστεθεί νέα γνώση, αλλά και για την εύρεση νέων μεθόδων και τρόπων προστασίας και καταπολέμησης εντόμων που προκαλούν γιγαντιαία επίπεδα καταστροφών σε καλλιεργήσιμες εκτάσεις αλλά και αυτών που θεωρούνται επιβλαβή για την ανθρώπινη υγεία. Αυτή η ανάγκη γίνεται ακόμα μεγαλύτερη σε εντομοκτόνα όπως το Spinosad, καθώς αποτελεί σύμμαχο λόγω της μοναδικής του δράσης.

Χαμηλά επίπεδα ανθεκτικότητας στο Spinosad έχουν αναφερθεί σε πληθυσμούς δάκου από την Καλιφόρνια [151], όμως δεν έχει ανιχνευτεί ανθεκτικότητα στην Ελλάδα [29] ή σε άλλες χώρες της Μεσογείου. Όμως, η χρήση του Spinosad για τον έλεγχο των πληθυσμών του δάκου στην Ελλάδα είναι αρκετά εκτεταμένη τα τελευταία χρόνια, εφόσον είναι μία από τις ελάχιστες διαθέσιμες ουσίες, δεδομένου ότι η χρήση πολλών δραστικών ουσιών είτε έχει απαγορευτεί βάσει των ευρωπαϊκών κανονισμών [152], είτε έχει μειωθεί λόγω της εμφάνισης ανθεκτικότητας, όπως για το lambda-cyhalothrin για παράδειγμα [153].

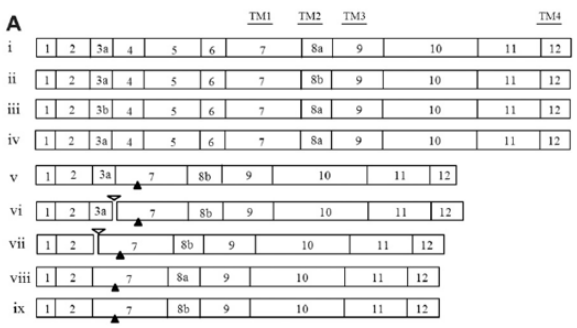
Στην βιβλιογραφία η απόκριση στο Spinosad, στο δάκο της ελιάς, έχει συσχετιστεί με αλλαγές σε μονοπάτια ενεργειακού μεταβολισμού, ανοσοποιητικής απόκρισης και αποτοξικοποίησης [154], όμως δεν έχει εντοπιστεί κάποιος συγκεκριμένος μηχανισμός ανθεκτικότητας. Σε άλλα είδη της οικογένειας *Tephritidae*, η μοριακή βάση της ανθεκτικότητας στο Spinosad, έχει συσχετιστεί με αλλαγές στο γονίδιο της υπομονάδας α6 του nAChR, που αποτελεί στόχο του Spinosad.

Πιο συγκεκριμένα, δύο μελέτες των Hsu et al. [118] και Urena et al. [119] στα είδη *Bactrocera dorsalis* και *Ceratitis capitata* αντίστοιχα, συσχέτισαν τον φαινότυπο ανθεκτικότητας στο εντομοκτόνο αυτό, με τις ελαττωμένες σε έκταση αλληλουχίας, ισομορφές mRNA, του γονιδίου της υπομονάδας α6 του nAChR (Εικ 18). Παρατήρησαν πως διαγραφές εξωνίων και σημειακές μεταλλαγές που οδηγούσαν σε πρόωρη λήξη την πρωτεινοσύνθεσης, στο *B.dorsalis*, και σημειακές μεταλλαγές που προκαλούσαν πρόωρη λήξη της πρωτεϊνοσύνθεσης και επηρέαζαν το μάτισμα εξωνίων στο *C.capitata*, επηρέαζαν και την αλληλοεπίδραση του Spinosad με την α6 υπομονάδα, οδηγώντας έτσι σε πληθυσμούς που είχαν αναπτύξει ανθεκτικότητα. Παρόμοιος μηχανισμός ανθεκτικότητας έχει βρεθεί και σε άλλα είδη εντόμων, όπως το λεπιδόπτερο *Plutella xylostella* [155].

Επιπλέον, σε άλλα είδη εντόμων, η ανθεκτικότητα στο Spinosad έχει συσχετιστεί με την αντικατάσταση μίας γλυκίνης σε γλουταμινικό οξύ στη θέση 275 (G275E) της α6 υπομονάδας [156,157,158].

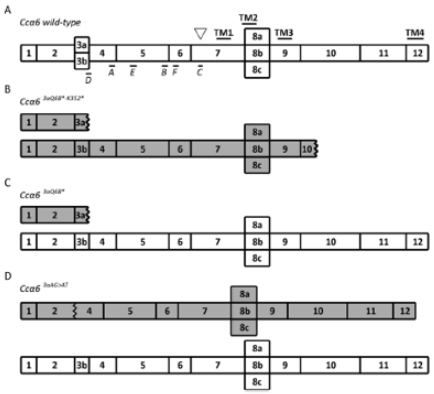
Ο σκοπός αυτής της μελέτης, λοιπόν, είναι η διερεύνηση του μηχανισμού ανθεκτικότητας του δάκου της ελιάς, στο εντομοκτόνο Spinosad σε άγρια άτομα που επιβίωσαν από ακραίες συγκεντρώσεις του εντομοκτόνου. Η διαλεύκανση του μηχανισμού ανθεκτικότητας στο Spinosad, θα μπορέσει να αποτελέσει σημαντική γνώση για την δημιουργία μοριακών διαγνωστικών εργαλείων και μεθόδων, για την έγκαιρη ανίχνευση αλλά και για την παρακολούθηση της ανθεκτικότητας στο Spinosad, στο πεδίο, σε άγριους πληθυσμούς του *B.oleae*.

Bactrocera dorsalis



Ju-Chun Hsu et al., 2012

Ceratitis capitata



Ureña et al., 2019

Εικόνα 18. Μετάγραφα, μη ελαττωμένα και ελαττωμένα, της υπομονάδας α6 του nAChR, στα είδη B.dorsalis και C.capitata. Αριστερά, οι πρώτες 4 αλληλουχίες (i-iv) υποδεικνύουν τις ισομορφές μεταγράφων ευάλωτων πληθυσμών, ενώ οι υπόλοιπες (v-ix) υποδεικνύουν ισομορφές ανθεκτικών πληθυσμών B.dorsalis, με μερικά εξώνια να λείπουν και τα μαύρα τρίγωνα να δηλώνουν την παρουσία κωδικονίων λήξης (Ju-Chun Hsu et al., 2012). Στα δεξιά οι αλληλουχίες με άσπρο χρώμα υποδηλώνουν ισομορφές μεταγράφων που δεν έχουν υποστεί κάποια ελάττωση, ενώ αυτές με το γκρι χρώμα υποδηλώνουν ισομορφές μεταγράφων με ελαττωμένη αλληλουχία, στο είδος C.capitata (Urena et al., 2019).

2.2 Υλικά και Μέθοδοι

2.2.1 Ανθεκτικά στελέχη *B.oleae*

Ενήλικα άτομα δάκου (Πίνακας 1) συλλέχθηκαν από διαφορετικές περιοχές της Ελλάδας, ώστε μέσω βιοδοκιμών στο εντομοκτόνο Spinosad, να γίνει έλεγχος και επιλογή εκείνων που εμφανίζουν φαινότυπο ανθεκτικότητας σε δόσεις του εντομοκτόνου που ξεπερνούν την συνιστώμενη. Κάποια από τα ανθεκτικά δείγματα ήταν αποθηκευμένα σε RNAlater, ενώ κάποια χρησιμοποιήθηκαν και φρέσκα, μετά από κάποιο χρονικό διάστημα, έπειτα από τις βιοδοκιμές.

Οι περιοχές από τις οποίες έγινε η συλλογή των δάκων ήταν, οι Άνω Ασίτες στην Κρήτη, ο νομός Αχαΐας, ο νομός Αργολίδας, η περιοχή Μάλεμε στην Κρήτη, η περιοχή Αβραμίου στον νομό Μεσσηνίας, η περιοχή Μακρυλιά Λασιθίου στην Κρήτη, η περιοχή Σίσες στον νομό Ρεθύμνης της Κρήτης, η περιοχή Αγγελιανά στον νομό Ρεθύμνης της Κρήτης, η περιοχή Αχλαδιά Λασιθίου της Κρήτης, η περιοχή Σκαλάνι στον νομό Ηρακλείου της Κρήτης και η περιοχή Λίμνες Λασιθίου στην Κρήτη. Τα στελέχη που επιλέχθηκαν ήταν επιζώντες (survivors) σε δόσεις Spinosad 60, 62 και 90 ppm.

Αριθμός ατόμων	**Περιοχή**	**Δόση Spinosad που επιβίωσαν**
5	Άνω Ασίτες Κρήτης	60 ppm, 90 ppm
1	Νομός Αχαΐας	62 ppm
1	Νομός Αργολίδας	62 ppm
1	Μάλεμε Κρήτης	90 ppm
1	Αβραμίου Μεσσηνίας	62 ppm
2	Μακρυλιά Λασιθίου	62 ppm, 90 ppm
5	Σίσες Ρεθύμνου	60 ppm, 62 ppm, 90 ppm
1	Αγγελιανά Ρεθύμνου	62 ppm
1	Αχλαδιά Λασιθίου	90 ppm
2	Σκαλάνι Ηρακλείου	90 ppm
1	Λίμνες Λασιθίου	62 ppm

Πίνακας 1. Αριθμός ενήλικων ατόμων δάκου, ανά περιοχή συλλογής και δόση Spinosad που επιβίωσαν

2.2.2 Σχεδιασμός εκκινητών

Σύγκριση νουκλεοτιδικών αλληλουχιών (contigs) της α6 υπομονάδας του nAChR, από RNA sequencing το οποίο είχε πραγματοποιηθεί σε πληθυσμό ενήλικων δάκων από την περιοχή Κουνουπιδιανά του νομού Χανίων στην Κρήτη, με την νουκλεοτιδική αλληλουχία της α6 υπομονάδας του nAChR του είδους B.dorsalis, η οποία δημοσιεύτηκε από τους Hsu et al., οδήγησε στην δημιουργία των παρακάτω ζευγών εκκινητών για την α6 υπομονάδα του δάκου (Πίνακας 2):

Όνομα εκκινητή	Forward (5'->3')	Reverse (5'->3')
Bo_a61	ACGTGTGTTTATTGCTCGGT	ACGCAATTTCCATATGTCTATCCTA
Bo_a62	TACATACTTGTACCCACCCGC	GCTTATGCTTAAACCTCGTATGAA
Bo_a6Ins1	AAGAAAGCTGCCAAGGACCA	TGTATATCCGCCGTGCGATG
Bo_a6Ins2	CGACCCGTAGCAAACGAATC	TTGAGCACAACAACCGTCAG

Πίνακας 2. Εκκινητές α6 υπομονάδας του nAChR που δημιουργήθηκαν με την βοήθεια του NCBI primer design tool

Ο σχεδιασμός αυτών των ζευγών πραγματοποιήθηκε με την βοήθεια του primer design tool του NCBI, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/ . Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκαν και τα παρακάτω ζεύγη εκκινητών, τα οποία έχουν δημοσιευθεί από τους Hsu et al. και τους Sagri et al. [154] (Πίνακας 3).

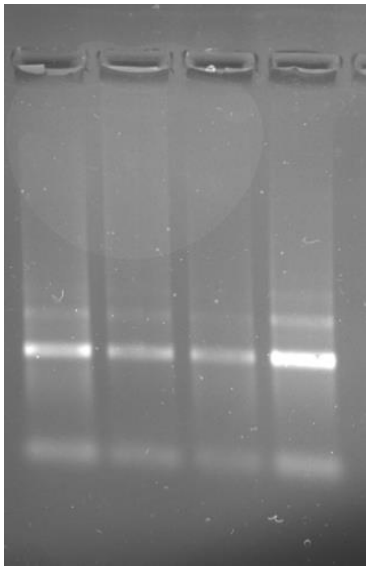
Όνομα εκκινητή	Forward (5'->3')	Reverse (5'->3')	Προέλευση
Bd6UTR(F/R)1	GCTCACTCGTTCGCTTCCATTGTA	TTATGCTTAAACCTCGTATGCATTTAGG	Hsu et al.
Boa6(F/R)1	ATGAATCGGAATATGGAG	AACGGATTTAATCCAAGG	Sagri et al.
Boa6-(F/R)	AGATTAGTGACAGCATAACCG	TCTATCCACAACCATTGCCGC	Sagri et al.

Πίνακας 3. Εκκινητές α6 υπομονάδας του nAChR που δημιουργήθηκαν με βάση την υπάρχουσα βιβλιογραφία

2.2.3 Εξαγωγή RNA από ενήλικο δάκο με TRIzol (πρωτόκολλο εργαστηρίου)

Κάθε ένας ενήλικος δάκος ομογενοποιήθηκε με 100 ul διαλύματος TRIzol, με την βοήθεια γουδοχεριού, σε tube των 1,5 ml. Στην συνέχεια προστέθηκαν ακόμα 400 ul διαλύματος TRIzol, και το μείγμα φυγοκεντρήθηκε για 10 λεπτά, στα 12.000 g, στους 4ºC. Ύστερα, το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέο tube, όπου αφέθηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά. 100 ul χλωροφόρμιου προστέθηκαν στο υπερκείμενο, και το μείγμα ανακινήθηκε για 15 δευτερόλεπτα. Μετά από επώαση 10 λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου, το μείγμα φυγοκεντρήθηκε για 15 λεπτά, στα 12.000 g, στους 4ºC. Η υψηλότερη υδατική φάση που δημιουργήθηκε, μεταφέρθηκε σε νέο tube, όπου προστέθηκε ίσος όγκος ισοπροπανόλης. Μετά από ανακίνηση 15 δευτερολέπτων, και επώαση 10 λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου, το μείγμα φυγοκεντρήθηκε στους 4ºC, στα 12.000 g, για 10 λεπτά. Αφότου αφαιρέθηκε η ισοπροπανόλη, πραγματοποιήθηκε πλύση με 1ml 75% αιθανόλης. Στην συνέχεια, το μείγμα ανακινήθηκε και φυγοκεντρήθηκε στους 4ºC, στα 7500 g, για 5 λεπτά. Αφού αφαιρέθηκε η αιθανόλη, η πελέτα που δημιουργήθηκε αφέθηκε να στεγνώσει για 10 λεπτά στον αέρα, και επαναδιαλύθηκε τελικά σε 15 ul DEPC-επεξεργασμένου νερού.

Ο προσδιορισμός της ποσότητας και της καθαρότητας του ολικού RNA που απομονώθηκε έγινε σε φασματοφωτόμετρο μικρού όγκου. Ο λόγος των απορροφήσεων A260nm/A280nm που προσδιορίζει την καθαρότητα του δείγματος, σε όλα τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 1,8-2,2. Ο έλεγχος της ποιότητας του ολικού RNA που απομονώθηκε έγινε με ανάλυση σε πήκτωμα αγαρόζης 1% w/v (Εικ 19).



Εικόνα 19. Ενδεικτική εικόνα από ανάλυση RNAs σε πήκτωμα αγαρόζης

2.2.4 Επεξεργασία με DNαση I

Μετά από την εξαγωγή RNA από ενήλικους δάκους, ακολούθησε η επεξεργασία των δειγμάτων με DNαση I, με βάση το παρακάτω πρωτόκολλο: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0012000_DNase_I_RNasefree_1UuL_UG.pdf
Αναλυτικότερα, σε κάθε 1 μg RNA που εξήχθη, προστέθηκε 1 μl Dnασης I, 1 μl 10x reaction buffer και DEPC-επεξεργασμένο νερό μέχρι ο τελικός όγκος της αντίδρασης να φτάσει τα 10μl. Στην συνέχεια, η αντίδραση επωάσθηκε για 30 λεπτά στους 37oC, μετά το πέρας των οποίων προστέθηκαν 50mM EDTA ποσότητας 1 μl, και η αντίδραση επωάστηκε στους 65oC για 10 λεπτά.
Η διαδικασία αυτή είναι απαραίτητη για να μειωθεί όσο το δυνατόν ο αριθμός των DNA μορίων, ώστε τα RNA μόρια να χρησιμοποιηθούν για την δημιουργία cDNA.

2.2.5 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης- Αντίστροφης Μεταγραφής

Για την δημιουργία cDNA από το συνολικό μεταγράφωμα που απομονώθηκε από ενήλικους δάκους, χρησιμοποιήθηκε το παρακάτω πρωτόκολλο, της αντίστοιχης αντίστροφης μεταγραφάσης, της εταιρίας Minotech: https://minotech.gr/index.php/products/minotech-rt . Αναλυτικότερα, σε κάθε 1 μg ολικού RNA, προστέθηκε 1μl oligodt$_{(20)}$, 1μl dNTP mix (10 mM για το κάθε ένα) και DEPC-επεξεργασμένο νερό μέχρι ο τελικός όγκος της αντίδρασης να φτάσει τα 13μl. Η αντίδραση επωάστηκε στους 65oC για 5 λεπτά, και στην συνέχεια τα tubes της αντίδρασης τοποθετήθηκαν στον πάγο για 1 λεπτό. Στην συνέχεια, σε κάθε tube, προστέθηκαν 7μl από το RT mix, το οποίο περιείχε 4μl από First-strand Buffer 5X, 1μl από DTT (0.1 M), 1μl από RNase Out (40u/μl) και 1μl από την Minotech RT. Έπειτα, τα δείγματα επωάστηκαν στους 50oC για 60 λεπτά, και τέλος στους 70oC για 15 λεπτά. Τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -20oC, για μελλοντική χρήση των cDNAs.

2.2.6 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης

Για την επιλογή μέρους ή ολόκληρης της αλληλουχίας της α6 υπομονάδας, από τα cDNA των ενήλικων δάκων, χρησιμοποιήθηκαν διάφοροι συνδυασμοί ζευγών των παραπάνω εκκινητών. Για την ενίσχυση αυτών των αλληλουχιών μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικά πρωτόκολλα που αφορούσαν πολυμεράσες με διαφορετικά επίπεδα πιστότητας. Ένα πρωτόκολλο για την Kapa Taq DNA πολυμεράση: http://www.polgen.com.pl/uploads/files/KAPA_Taq_TDS.pdf, και ένα για την Phusion High-Fidelity DNA Πολυμεράση: https://international.neb.com/protocols/0001/01/01/pcr-protocol-m0530.
Συγκεκριμένα, όσον αφορά το πήκτωμα της Εικόνας 20 Α: Για κάθε ένα από τα δείγματα των δάκων, φορτώθηκαν 100μl αντίδρασης, η οποία είναι συνδυασμός δύο αντιδράσεων PCR των 50μl. Η αντίδραση της PCR, αποτελούνταν από τα εξής αντιδρώντα: 1μl από cDna, 1,5μl από 100% DMSO, 10μl από 5x GC Buffer, 1μl από 10mM dNTPs, 2,5μl από 10μM forward εκκινητή, 2,5μl από 10μM reverse εκκινητή και 0,5 μl από Phusion Polymerase. Το πρόγραμμα της συγκεκριμένης αντίδρασης, ήταν το εξής: 98oC για 30 δευτερόλεπτα, 98oC για 10 δευτερόλεπτα, 59oC για 30 δευτερόλεπτα, 72oC για 30 δευτερόλεπτα, 72oC για 10 λεπτά και 10oC μέχρι να φορτωθεί η αντίδραση στο πήκτωμα (τα βήματα 2-4 υποβλήθηκαν σε 35 κύκλους).
Όσον αφορά το πήκτωμα της Εικόνας 20 Β: Για κάθε ένα από τα δείγματα των δάκων, φορτώθηκαν 25μl αντίδρασης. Η αντίδραση της PCR, αποτελούνταν από τα εξής αντιδρώντα: 1μl από cDna, 0,75μl από 100% DMSO, 5μl από 5x GC Buffer, 0,5μl από 10mM dNTPs, 1,25μl από 10μM forward εκκινητή, 1,25μl από 10μM reverse εκκινητή και 0,25 μl από Phusion Polymerase. Το πρόγραμμα της συγκεκριμένης αντίδρασης, ήταν το εξής: 98oC για 30 δευτερόλεπτα, 98oC για 10 δευτερόλεπτα, 59oC για 30 δευτερόλεπτα, 72oC για 40 δευτερόλεπτα, 72oC για 10 λεπτά και 10oC μέχρι να φορτωθεί η αντίδραση στο πήκτωμα (τα βήματα 2-4 υποβλήθηκαν σε 35 κύκλους).
Τέλος, όσον αφορά το πήκτωμα της Εικόνας 20 Γ: Για το δείγμα του δάκου, φορτώθηκαν 25μl αντίδρασης. Η αντίδραση της PCR, αποτελούνταν από τα εξής αντιδρώντα: 1μl από cDna, 0,75μl από 100% DMSO, 5μl από 5x GC Buffer, 0,5μl από 10mM dNTPs, 1,25μl από 10μM forward εκκινητή, 1,25μl από 10μM reverse εκκινητή και 0,25 μl από Phusion Polymerase. Το πρόγραμμα της συγκεκριμένης αντίδρασης, ήταν το εξής: 98oC για 30 δευτερόλεπτα, 98oC για 10 δευτερόλεπτα, 58oC για 30 δευτερόλεπτα, 72oC για 57 δευτερόλεπτα, 72oC για 10 λεπτά και 10oC μέχρι να φορτωθεί η αντίδραση στο πήκτωμα (τα βήματα 2-4 υποβλήθηκαν σε 35 κύκλους).

2.2.7 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Πηκτώματα αγαρόζης χρησιμοποιήθηκαν ώστε μέσω ηλεκτροφόρησης, να παρατηρηθεί αν τα πρότυπα των ζωνών που σχηματίζονται από τις αλληλουχίες που ενισχυθήκαν με PCR, αντιστοιχούν στο μέγεθος των αλληλουχιών που αναμένονται. Χρησιμοποιήθηκε σαν μάρτυρας ένας Lambda DNA/Pst I Digest Ladder (247-11501bp) της αντίστοιχης εταιρίας : https://enzyquest.com/product/lambda-dna-pst-i-digest-ladder/ . Για το πήκτωμα χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα TAE, αγαρόζη σε τελική συγκέντρωση 1% και Midori Green Advance για το staining των μορίων DNA

(https://www.nippongenetics.eu/en/products/electrophoresis-dna-rna/nucleic-acid-stains/midori-green-advance/). Πριν φορτωθούν τα δείγματα, τους προστέθηκε μείγμα χρωστικών Xylene cyanol FF και Orange G. Η ηλεκτροφόρηση έγινε στα 100volts και οι ζώνες παρατηρήθηκαν κάτω από ακτινοβολία UV.

2.2.8 Εξαγωγή πηκτώματος

Η εξαγωγή των ζωνών του πηκτώματος που πληρούσαν τα κριτήρια μεγέθους για να χρησιμοποιηθούν για περαιτέρω ανάλυση, πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το πρωτόκολλο της παρακάτω εταιρίας : https://www.mn-net.com/nucleospin-gel-and-pcr-clean-up-mini-kit-for-gel-extraction-and-pcr-clean-up-740609.50. Αναλυτικότερα, κάθε ζώνη που εξήχθη, ζυγίστηκε και τοποθετήθηκε σε άδειο tube. Για κάθε 100mg μπάντας, προστέθηκαν στα tubes 200μl NTI buffer, και στην συνέχεια επωάστηκαν στους 50oC για 10 λεπτά. Έπειτα, τα διαλύματα από κάθε tube μεταφέρθηκε σε ξεχωριστές κολώνες και φυγοκεντρήθηκαν σε 11.000g για 30 δευτερόλεπτα. Τα flowthrough απορρίφθηκαν και προστέθηκαν 700 μl NT3 buffer σε κάθε κολώνα, και φυγοκεντρήθηκαν και πάλι σε 11.000g για 30 δευτερόλεπτα. Τα flowthrough απορρίφθηκαν και το παραπάνω βήμα με τον NT3 buffer επαναλήφθηκε. Πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση σε 11.000g για 1 λεπτό, ώστε να απορριφθεί ότι ποσότητα NT3 buffer είχε απομείνει και στην συνέχεια οι κολώνες τοποθετήθηκαν σε tubes των 1,5ml. Τέλος, προστέθηκαν 15μl Elution buffer στο κέντρο της κάθε κολώνας, και μετά από 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου, φυγοκεντρήθηκαν σε 11.000g για 1 λεπτό. Το flowthrough αποθηκεύτηκε για μελλοντική χρήση.

2.2.9 Αλληλούχιση cDNA μορίων

Οι αλληλουχίες των προϊόντων PCR που εξήχθησαν από τα πηκτώματα αγαρόζης, στάλθηκαν για αλληλούχιση κατά Sanger, στην εταιρία Genewiz (https://www.genewiz.com/en-GB/), αφού πρώτα προετοιμάστηκαν κατάλληλα ακολουθώντας τις οδηγίες της : https://www.genewiz.com/en-GB/Public/Resources/Sample-Submission-Guidelines/Sanger-Sequencing-Sample-Submission-Guidelines/Sample-Preparation#sanger-sequence

2.2.10 Ανάλυση αποτελεσμάτων αλληλούχισης

Η οπτικοποίηση και η ανάλυση των αποτελεσμάτων της αλληλούχισης, καθώς και η σύγκριση των αλληλουχιών που προέκυψαν, πραγματοποιήθηκε με την βοήθεια του προγράμματος BioEdit : https://bioedit.software.informer.com/7.2/

2.2.11 Αλληλούχιση ολικού μεταγραφώματος

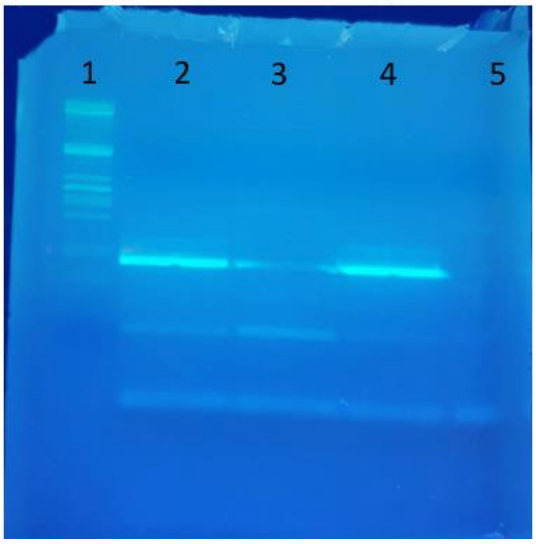
Στάλθηκε το ολικό RNA, που εξήχθη, από τρεις ενήλικους δάκους, για αλληλούχιση. Τα δείγματα προετοιμάστηκαν με βάση τις οδηγίες της εταιρίας Macrogen, https://www.macrogen-europe.com/services/next-generation-sequencing/rna-sequencing στην οποία και στάλθηκαν για την ανάλυση. Η de novo συναρμολόγηση πραγματοποιήθηκε με το πακέτο Trinity από τον Δρ. Ιωαννίδη Παναγιώτη.

2.3 Αποτελέσματα

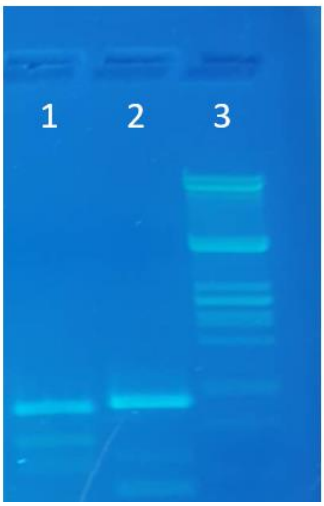
2.3.1 Γονοτύπηση της υπομονάδας α6 του nAChR

21 άτομα δάκου (Πίνακας 1) που είχαν επιβιώσει μετά από έκθεση σε ακραίες συγκεντρώσεις εντομοκτόνου Spinosad, χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση ολικού RNA. Μετά τον έλεγχο της ποιότητας του, με ανάλυση σε πήκτωμα αγαρόζης (Εικ 19), πραγματοποιήθηκε σύνθεση cDNA, το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα σε αντιδράσεις PCR με τα διαφορετικά ζεύγη εκκινητών που είχαν σχεδιαστεί, για την ενίσχυση της αλληλουχίας της α6 υπομονάδας του nAChR.

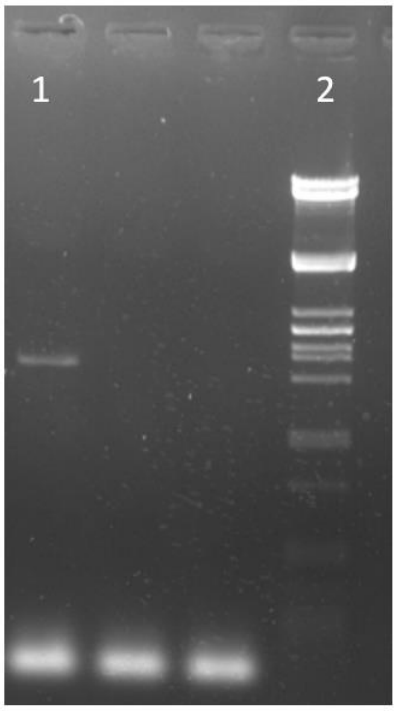
Από όλους τους συνδυασμούς εκκινητών που δοκιμάστηκαν, οι συνδυασμοί Bo_a62F-Bo_a6Ins1R, Bo_a61F-Bo_a6Ins2R, Bo_a61F-Bo_a6Ins1R και Bd6UTRF1-Bd6UTRR1 έδωσαν προϊόντα στα αναμενόμενα μεγέθη (1056, 986, 1013 και 1841 bp αντίστοιχα). Στην Εικόνα 20 παρουσιάζονται ενδεικτικά κάποια από τα προϊόντα που πάρθηκαν σε κάθε περίπτωση.



20 Α) Ο αριθμός 1, αντιστοιχεί στον Pst1 μάρτυρα, ο 2 αντιστοιχεί σε DNA ατόμου που συλλέχθηκε στην περιοχή της Αργολίδας και επέζησε σε δόση Spinosad των 62 ppm, ο 3 αντιστοιχεί σε DNA ατόμου που συλλέχθηκε στην περιοχή των Άνω Ασιτών και επέζησε σε δόση Spinosad των 60 ppm, ο 4 αντιστοιχεί σε DNA ατόμου που συλλέχθηκε στην περιοχή των Σισών και επέζησε σε δόση Spinosad των 62 ppm, και ο 5 αντιστοιχεί στον αρνητικό μάρτυρα



20 Β) Ο αριθμός 1 αντιστοιχεί σε DNA ατόμου που συλλέχθηκε στην περιοχή των Άνω Ασιτών και επέζησε σε δόση Spinosad των 90 ppm, ο 2 αντιστοιχεί σε DNA ατόμου που συλλέχθηκε στην περιοχή των Άνω Ασιτών και επέζησε σε δόση Spinosad των 60 ppm, και ο 3 αντιστοιχεί στον Pst1 μάρτυρα.



20 Γ) Ο αριθμός 1 αντιστοιχεί σε DNA ατόμου που συλλέχθηκε στην περιοχή των Σισών και επέζησε σε δόση Spinosad των 62 ppm, και ο 2 αντιστοιχεί στον Pst1 μάρτυρα.

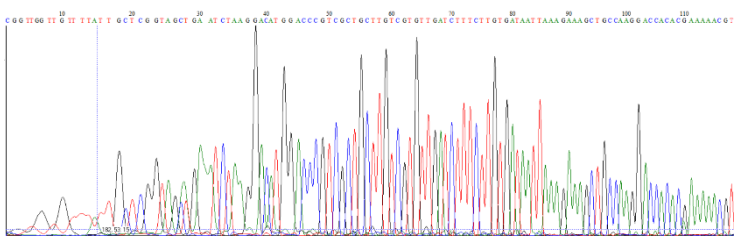
Εικόνα 20. Α) Πήκτωμα αγαρόζης στο οποίο φορτώθηκαν δείγματα cDNA, τα οποία ενισχύθηκαν με PCR, με το ζεύγος εκκινητών Bo_a62F-Bo_a6Ins1R Β) Πήκτωμα αγαρόζης στο οποίο φορτώθηκαν δείγματα cDNA, τα οποία ενισχύθηκαν με PCR, με τα ζεύγη εκκινητών Bo_a61F-Bo_a6Ins2R για το δείγμα 1 και Bo_a61F-Bo_a6Ins1R για το δείγμα 2 Γ) Πήκτωμα αγαρόζης στο οποίο φορτώθηκε δείγμα cDNA, το οποίο ενισχύθηκε με PCR, με το ζεύγος εκκινητών Bd6UTRF1-Bd6UTRR1

Στην συνέχεια, από τα παραπάνω πηκτώματα (Εικ 20), εξήχθησαν οι ζώνες με το αναμενόμενο μήκος, και στάλθηκαν για αλληλούχιση, με τους αντίστοιχους εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν και για την αντίδραση ενίσχυσής τους. Συγκεκριμένα, για τις αναμενόμενες ζώνες του πηκτώματος της Εικόνας 20 Α, χρησιμοποιήθηκαν για την αλληλούχιση τους, οι εκκινητές Bo_a62F και Bo_a6Ins1R, για αυτές της Εικόνας 20 Β, οι Bo_a61F και Bo_a6Ins2R για το δείγμα με αριθμό 1 και οι Bo_a61F και Bo_a6Ins1R για το δείγμα με αριθμό 2, και για αυτές της Εικόνας 20 Γ, οι Bd6UTRF1 και Bd6UTRR1. Στην Εικόνα 21

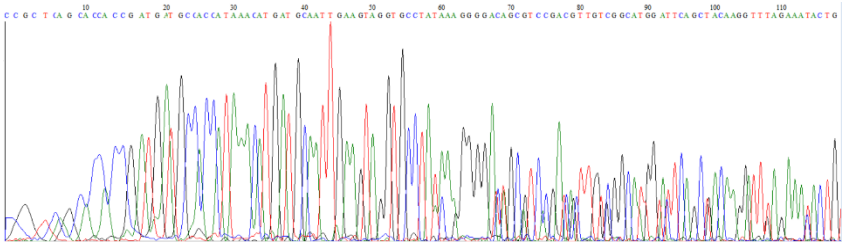
παρουσιάζονται ενδεικτικά κάποια από τα χρωματογραφήματα που πάρθηκαν, μετά από αλληλούχιση αυτών των ζωνών.

Στις παρακάτω εικόνες χρωματογραφημάτων αλληλούχισης (Εικ 21 Α-Ε), παρατηρείται ένα κοινό μοτίβο. Τα χρωματογραφήματα αρχίζουν με σχετικά καθαρές και ευδιάκριτες κορυφές και στην συνέχεια, μέχρι τις 100-150 βάσεις περίπου, πέφτει δραματικά αυτή η καθαρότητα των κορυφών, και συνεχίζει ένα πρότυπο με πολύ θόρυβο μέχρι τις 300 βάσεις περίπου. Λόγω αυτού, δεν είναι δυνατόν να οδηγηθεί κάποιος σε συμπέρασμα για την αλληλουχία αυτών των cDNA της α6 υπομονάδας, και να τα συγκρίνει ώστε να βρει πιθανές μεταλλαγές, σε σχέση με αυτά των ευαίσθητων πληθυσμών.

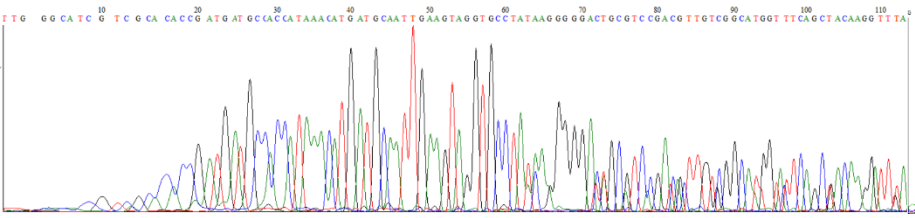
Όσον αφορά το χρωματογράφημα αλληλούχισης της Εικόνας 21 Ζ, αποτελεί ένα από τα παραδείγματα που προέκυψαν από την αλληλούχιση cDNA για τα οποία χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές, με στόχο την ενίσχυση ολόκληρου του μορίου και όχι ενός μέρος του. Σε αυτό, από την αρχή της αλληλούχισης παρατηρούνται μη καθαρές κορυφές, με πολύ θόρυβο, το πρότυπο του οποίου συνεχίζει μέχρι και τις 150 βάσεις περίπου. Λόγω αυτού, ούτε για αυτό το χρωματογράφημα, δεν είναι δυνατόν να οδηγηθεί κάποιος σε συμπέρασμα για την αλληλουχία αυτού του cDNA της α6 υπομονάδας, και να τη συγκρίνει ώστε να βρει πιθανές μεταλλαγές, σε σχέση με αυτές των ευαίσθητων πληθυσμών.



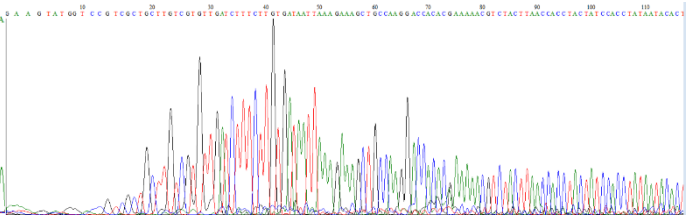
Α



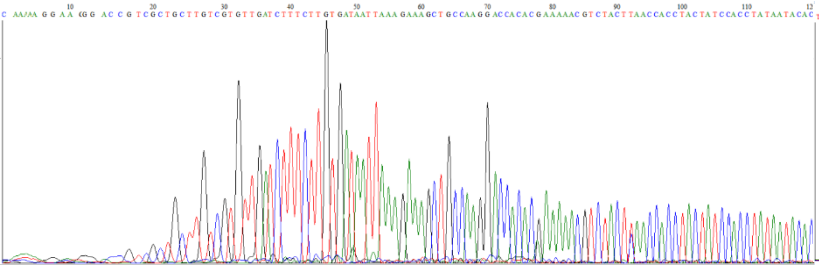
Β

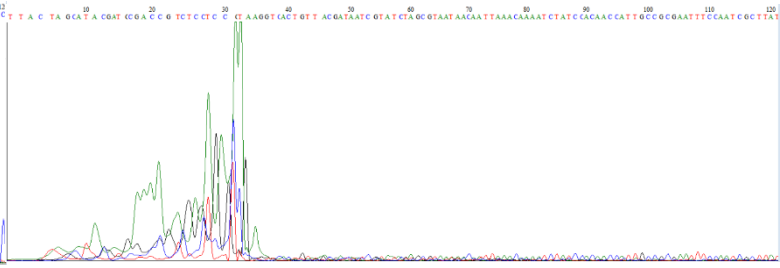


Γ



Δ





E Z

Εικόνα 21. Α) Χρωματογράφημα αλληλούχισης για την αναμενόμενη μπάντα του πηκτώματος της εικόνας 20Α, για το άτομο που του αντιστοιχεί ο αριθμός 2, για τον εκκινητή Bo_α62F, Β) Χρωματογράφημα αλληλούχισης για την αναμενόμενη μπάντα του πηκτώματος της εικόνας 20Α, για το άτομο που του αντιστοιχεί ο αριθμός 3, για τον εκκινητή Bo_α6Ins1R, Γ) Χρωματογράφημα αλληλούχισης για την αναμενόμενη μπάντα του πηκτώματος της εικόνας 20Α, για το άτομο που του αντιστοιχεί ο αριθμός 4, για τον εκκινητή Bo_α6Ins1R, Δ) Χρωματογράφημα αλληλούχισης για την αναμενόμενη μπάντα του πηκτώματος της εικόνας 20Β, για το άτομο που του αντιστοιχεί ο αριθμός 1, για τον εκκινητή Bo_α61F, Ε) Χρωματογράφημα αλληλούχισης για την αναμενόμενη μπάντα του πηκτώματος της εικόνας 20Β, για το άτομο που του αντιστοιχεί ο αριθμός 2, για τον εκκινητή Bo_α61F, Ζ) Χρωματογράφημα αλληλούχισης για την αναμενόμενη μπάντα μεγέθους 1800 bp του πηκτώματος της εικόνας 20Γ, για το άτομο που του αντιστοιχεί ο αριθμός 1, για τον εκκινητή Bd6UTRR1

2.3.2 Αλληλούχιση ολικού μεταγραφώματος

Η αλληλουχιση του ολικού μεταγραφώματος πραγματοποιήθηκε σε τρία άτομα δάκου τα οποία προερχόταν από την περιοχή Μάλεμε των Χανίων Κρήτης και οι άλλοι δύο προέρχονταν από την περιοχή Σίσες του Ρεθύμνου Κρήτης, και τα οποία είχαν επιβιώσει από δόση Spinosad των 90 ppm, 90 ppm και 60 ppm αντίστοιχα.

Οι αλληλουχίες που προέκυψαν ελέγχθηκαν για την παρουσία της G275E μεταλλαγής ανθεκτικότητας στόχου. Σε κανένα από αυτά δε βρέθηκε η συγκεκριμένη μεταλλαγή στόχου.

Ο έλεγχος για παρουσία διαφορετικών ισομορφών κατέστη αρκετά δύσκολος λόγω της πολύ χαμηλής έκφρασης του γονιδίου και βρίσκεται ακόμα σε εξέλιξη.

2.4 Συζήτηση

Το Spinosad, είναι ένα εντομοκτόνο βακτηριακής προέλευσης, του οποίου ο μοναδικός μοριακός μηχανισμός δράσης, το καθιστά αρκετά ελκυστικό στον τομέα καταπολέμησης εντόμων. Τα τελευταία χρόνια όμως, παρατηρείται μια συνεχής αύξηση σε περιστατικά ανάπτυξης ανθεκτικότητας σε αυτό, από έντομα τα οποία ανήκουν σε διαφορετικές οικογένειες. Καθώς παρατηρείται μια συνεχής αύξηση της χρήσης του Spinosad για την καταπολέμηση του δάκου, σε πολλές περιοχές της Ελλάδας, λόγω της περιορισμένης διαθεσιμότητας σκευασμάτων, κρίνεται πολύ σημαντική η έγκαιρη διάγνωσή της ή/και η παρακολούθησή της. Στο πλαίσιο αυτό η διαλεύκανση των μοριακών μηχανισμών που υποβόσκουν είναι ένα πολύ σημαντικό εργαλείο για την πρόληψη και τη διαχείριση της ανθεκτικότητας.

Στην κατεύθυνση αυτή, και στο πλαίσιο της διερεύνησης του μηχανισμού ανθεκτικότητας του δάκου στο Spinosad, στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε σχεδιασμός εκκινητών για την υπομονάδα α6 του nAChR, με τέτοιο τρόπο, ώστε να μην αλληλοεπιδρούν με περιοχές του RNA, στις οποίες υπάρχουν εξώνια στα οποία έχουν παρατηρηθεί (σε άλλα *Tephritidae*) θέσεις μεταλλαγής που οδηγούν σε μετάγραφα μικρότερου μήκους. Πραγματοποιήθηκε προσπάθεια ενίσχυσης της περιοχής ενδιαφέροντος με διάφορα ζεύγη και συνδυασμούς εκκινητών, βάσει της οποίας επιλέχθηκαν

τέσσερα διαφορετικά ζευγάρια τα οποία οδηγούσαν σε καλή ενίσχυση του αναμενόμενου προϊόντος. Στη συνέχεια, τα προϊόντα της ενίσχυσης αλληλουχήθηκαν κατά Sanger, όμως τα αποτελέσματα δεν ήταν πολύ ενθαρρυντικά σε καμία από όλες τις περιπτώσεις.
Επιπλέον, κάποια δείγματα στάλθηκαν για αλληλούχιση μεταγραφώματος, από την οποία μπόρεσαν να παρθούν κάποιες αλληλουχίες οι οποίες ελέγχθηκαν για μεταλλαγές ανθεκτικότητας. Εκκρεμεί η διερεύνηση της παρουσίας διαφορετικών ισομορφών, δεδομένου ότι κατέστη δύσκολη, πιθανόν επειδή το γονίδιο της α6 υπομονάδας παρουσιάζει πολύ χαμηλά επίπεδα έκφρασης.

Προκειμένου να προχωρήσει περαιτέρω η διαλεύκανση του μηχανισμού ανθεκτικότητας στο Spinosad το επόμενο βήμα, είναι να σταλούν περισσότερα άτομα για αλληλούχιση μεταγραφώματος, στοχευμένη αυτή τη φορά, και παράλληλα να συνεχιστεί η προσπάθεια της γονοτύπησης, με ιστοειδική εξαγωγή RNA, από το κεφάλι του εντόμου, όπου και εδράζεται το νευρικό σύστημα.

Κεφάλαιο 3: Εναλλακτικές μέθοδοι αντιμετώπισης με βάση τα μικροβιακά βιοεντομοκτόνα

3.1 Εισαγωγή

Το είδος *Bacillus thuringiensis*, όπως αναφέρθηκε, έχει μελετηθεί και χρησιμοποιηθεί περισσότερο από κάθε άλλο βακτηριακό είδος, στον κλάδο των εντομοπαθογόνων. Όμως, οι κρυσταλλικές (Cry) τοξίνες του, που προκαλούν γαστρορραγία και οδηγούν στον θάνατο των εντόμων, έχουν αρκετά περιορισμένο εύρος λειτουργικής δράσης, όσον αναφορά τους στόχους τους.

Για αυτόν τον λόγο, συνεχώς γίνονται προσπάθειες για την ανακάλυψη νέων στελεχών και εντομοκτόνων τοξινών, στον επιστημονικό και βιομηχανικό τομέα. Αυτό μπορεί να γίνει εμφανές με την χρήση των υποειδών του Bt., όπως των Bt. *kurstaki* και *aizawai*, τα οποία έχουν εξειδικευμένη και υψηλή δράση κατά των λεπιδόπτερων, το Bt. *israelensis* με δράση κατά των δίπτερων (κουνουπιών, μαύρων μυγών), το Bt. *tenebrionis*, με δράση κατά των κολεοπτέρων, ακόμα και διαφορετικών ειδών, όπως το *Bacillus sphaericus*, με τις συμπληρωματικές κρυσταλλικές πρωτεΐνες BinA και BinB, με δράση εναντίων των κουνουπιών και των μαύρων μυγών [136,139]. Ακριβώς το ίδιο συμβαίνει και με τα είδη του γένους *Streptomyces*, το οποίο είναι το μεγαλύτερο γένος στο φύλο *Actinomycetota*, απαριθμώντας πάνω από 1109 είδη [159].

Ανάμεσα στα gram θετικά βακτήρια, το γένος των στρεπτομυκήτων, αποτελεί την πιο σημαντική πηγή φυσικών βιοενεργών ουσιών και δευτερογενών μεταβολιτών, που μπορούν να εφαρμοστούν στον φαρμακευτικό, κλινικό, κτηνιατρικό και αγρονομικό τομέα [160]. Κάποιοι από αυτούς τους μεταβολίτες, έχουν αναγνωριστεί για την εντομοκτόνο και ακαρεοκτόνο δράση τους. Πιο συγκεκριμένα, υπάρχει η ομάδα ουσιών avermectins, με ουσίες θανατηφόρες για αρθρόποδα και νηματώδεις, με κάποιες από αυτές να επηρεάζουν υποδοχείς που δεν υπάρχουν στα θηλαστικά (κανάλια χλωρίου που αλληλοεπιδρούν με γλουταμικό οξύ), η ομάδα ουσιών milbemycin, η ομάδα piericidins κλπ. Πλέον, ουσίες του δευτερογενούς μεταβολισμού

στρεπτομυκήτων, αρχίζουν να θεωρούνται χρήσιμες για τον έλεγχο εντόμων-φορέων ασθενειών. Ένα τέτοιο παράδειγμα αποτελεί η ivermectin, όπου σε χαμηλές συγκεντρώσεις επηρέαζε την επιβίωση προνυμφών (μέσω των καναλιών χλωρίου που αλληλοεπιδρούν με γλουταμικό οξύ), των ειδών An.gambiae και Cx.quinquefasciatus, και ο συνδυασμός της με τις τοξίνες Bti και Bs θεωρείται ως μελλοντική στρατηγική καταπολέμησης φορέων της ελονοσίας [161]. Συνεπώς, ένας από τους στόχους αυτής της μελέτης ήταν η δοκιμή διάφορων ειδών βακτηρίων αλλά και μεταβολιτών τους, στα είδη Culex pipiens molestus και Helicoverpa armigera, τα οποία είναι σημαντικά έντομα υγειονομικού και αγρονομικού ενδιαφέροντος αντίστοιχα.

Μέσω βιοδοκιμών βακτηρίων και βακτηριακών μεταβολιτών, στις προνύμφες αυτών των επιβλαβών εντόμων, έγινε προσπάθεια εύρεσης πιθανής εντομοκτόνου δράσης, με την προοπτική, μελλοντικά να αναλυθεί περαιτέρω η δράση των ουσιών που οδηγούν σε θανάτωση των προνυμφών, ώστε να μπορέσουν να χρησιμοποιηθούν ως εντομοκτόνα, που πληρούν όλες τις απαραίτητες προδιαγραφές, στην αγορά.

3.2 Υλικά και Μέθοδοι

3.2.1 Εκτροφή Culex pipiens molestus

Η εκτροφή των ενήλικων κουνουπιών πραγματοποιήθηκε σε ειδικά κλουβιά, τα οποία εμπεριείχαν ένα πλαστικό ποτήρι με 10% ζαχαρόνερο, το οποίο αποτελεί την μοναδική πηγή τροφής των ενήλικων κουνουπιών, ένα πλαστικό δοχείο με νερό που περιέχει νύμφες κουνουπιών, οι οποίες συλλέχθηκαν από τα μεγάλα δοχεία εκτροφής προνυμφών, και ένα πλαστικό δοχείο με νερό το οποίο τα ενήλικα κουνούπια χρησιμοποιούσαν για να γεννήσουν τις συστάδες των αυγών τους. Τα αυγά μετά την συλλογή τους μεταφέρθηκαν σε μεγάλα δοχεία, γεμάτα με νερό, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν και για την εκτροφή των προνυμφών, μετά την εκκόλαψη των αυγών. Για τροφή προνυμφών, χρησιμοποιήθηκε ψαροτροφή εμπορίου. Μετά την ανάπτυξη των προνυμφών σε νύμφες, οι τελευταίες απομακρύνθηκαν από τα δοχεία εκτροφής, και μεταφέρθηκαν στο ειδικό δοχείο νυμφών, ώστε να γίνουν ενήλικα κουνούπια μέσα στο κλουβί.
Σημείωση: το νερό που χρησιμοποιήθηκε για την εκτροφή των κουνουπιών ήταν αποσκληρυμένο νερό περασμένο από ειδικό φίλτρο. Η εκτροφή των κουνουπιών σε όλα τα αναπτυξιακά τους στάδια, έγινε σε ελεγχόμενες συνθήκες θερμοκρασίας και υγρασίας.

3.2.2 Εκτροφή Helicoverpa armigera

Η εκτροφή των ενήλικων πεταλούδων πραγματοποιήθηκε σε ειδικά κλουβιά, τα οποία εμπεριείχαν ένα πλαστικό τρυβλίο με βαμβάκι εμποτισμένο με 10% ζαχαρόνερο, το οποίο αποτελεί την μοναδική πηγή τροφής των ενήλικων πεταλούδων. Όλες οι πλευρές του κλουβιού ήταν καλυμμένες με χαρτί, ώστε τα ενήλικα να γεννούν τα αυγά τους πάνω σε αυτό, και αυτά να συλλέγονται μετά εύκολα από το κλουβί. Τα αυγά στην συνέχεια τοποθετήθηκαν σε πλαστικά δοχεία. Όταν εκκολάφθηκαν οι προνύμφες από τα αυγά, προστέθηκε στα δοχεία τροφή, ώστε να τραφούν οι προνύμφες μέχρι να φτάσουν το τρίτο

αναπτυξιακό προνυμφικό στάδιο. Ύστερα, οι προνύμφες συλλέχθηκαν και τοποθετήθηκαν η κάθε μία ξεχωριστά σε μικρά πλαστικά τρυβλία, με συγκεκριμένη ποσότητα τροφής. Όταν έφτασαν στο στάδιο των νυμφών, συλλέχθηκαν από τα τρυβλία και τοποθετήθηκαν σε νέο κλουβί, όπου θα περάσουν στο στάδιο των ενήλικων.
Σημείωση: το νερό που χρησιμοποιήθηκε για την εκτροφή των πεταλούδων ήταν αποσκληρυμένο νερό περασμένο από ειδικό φίλτρο. Η εκτροφή των πεταλούδων σε όλα τα αναπτυξιακά τους στάδια, έγινε σε ελεγχόμενες συνθήκες θερμοκρασίας και υγρασίας.
Συστατικά τροφής προνυμφών: Για 2L τροφής χρησιμοποιήθηκαν, 1900ml νερό, 40gr άγαρ, 12gr ασκορβικού οξέος, 6gr σορβικό κάλιο, 8gr νιπαγίνη, 15gr μείγμα αλάτων, 1ml φορμαλδεΰδη, 400gr καλαμποκάλευρο, 100gr φύτρο και 100gr μαγιά.

3.2.3 Βακτηριακά βιοεντομοκτόνα

3.2.3.1 Κύτταρα και υπερκείμενα βακτηρίων

Στο πλαίσιο δοκιμών βακτηρίων και βακτηριακών μεταβολιτών, για τον εντοπισμό της ύπαρξης κάποιας εντομοκτόνου δραστηριότητας, χρησιμοποιήθηκαν ζωντανά κύτταρα βακτηρίων, καθώς και τα υπερκείμενα από τις καλλιέργειες ανάπτυξης τους. Τα στελέχη βακτηρίων επιλέχθηκαν καθώς εμφάνιζαν είτε ανθεκτικότητα στην αλατότητα, είτε/και εμφάνιζαν ιδιότητες αναστολής αύξησης φυτοπαθογόνων, είτε/και δημιουργούσαν σπόρια (ανήκουν στο γένος *Bacillus* δηλαδή).

Το θρεπτικό που χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη αυτών των βακτηρίων ήταν το Nutrient Agar (NB) το οποίο περιέχει : πεπτόνη 5g, εκχύλισμα από ζυμομύκητα 3g, NaCl 5g, (άγαρ 15g), dH_2O 1L, με το pH να ισούται με 7.4.
Τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν (κύτταρα και υπερκείμενα) ήταν τα εξής: A03, το οποίο είναι ένα νέο Gram + είδος του γένους *Bacillus,* που απομονώθηκε από τις ρίζες του είδους *Olea europaeae* (ποικιλία Κορωνέικη) και οδηγεί σε ήπια αναστολή, in vitro, στο φυτοπαθογόνο *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis*. A09, το οποίο είναι ένα νέο Gram + υποείδος του γένους *Bacillus,* που απομονώθηκε από τις ρίζες του είδους *Olea europaeae* (ποικιλία Κορωνέικη) και δεν οδηγεί σε αναστολή, in vitro, στο φυτοπαθογόνο *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis*. A10, το οποίο είναι ένα νέο Gram + υποείδος του γένους *Bacillus,* που απομονώθηκε από τις ρίζες του είδους *Olea europaeae* (ποικιλία Κορωνέικη) και οδηγεί σε ισχυρή αναστολή, in vitro, στο φυτοπαθογόνο *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis*. 353, το οποίο είναι ένα νέο Gram - είδος του γένους *Pseudomonas,* που απομονώθηκε από τις ρίζες του είδους *Thymus capitatus* και οδηγεί σε ισχυρή αναστολή, in vitro, στα φυτοπαθογόνα *Verticillium dahliae, Botrytis cinerea, Fusarium sp*. 357, το οποίο είναι ένα νέο Gram - είδος του γένους *Pseudomonas,* που απομονώθηκε από τις ρίζες του είδους *Tetraena alba* και οδηγεί σε ισχυρή αναστολή, in vitro, στα φυτοπαθογόνα *Verticillium dahliae, Botrytis cinerea, Fusarium sp*. 368, το οποίο είναι ένα νέο Gram + είδος του γένους *Bacillus,* που απομονώθηκε από τα φύλλα του είδους *Frankenia sp.* και οδηγεί σε ισχυρή αναστολή, in vitro και in planta, στα φυτοπαθογόνα *Botrytis cinerea, Fusarium sp*. 374, το οποίο είναι ένα νέο Gram + είδος του

γένους *Bacillus,* που απομονώθηκε από τα φύλλα του είδους *Atriplex halimus* και οδηγεί σε ισχυρή αναστολή, in vitro και in planta, στα φυτοπαθογόνα *Verticillium dahliae, Botrytis cinerea, Fusarium sp., Alternaria sp*. 379, το οποίο είναι ένα νέο Gram + είδος του γένους *Bacillus,* που απομονώθηκε από τα φύλλα του είδους *Tetraena alba* και οδηγεί σε ισχυρή αναστολή, in vitro, στα φυτοπαθογόνα *Verticillium dahliae, Botrytis cinerea, Fusarium sp., Alternaria sp*.

Θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε θερμά το εργαστήριο του κύριου Σαρρή Παναγιώτη, για την παροχή αυτών των βακτηριακών στελεχών, καθώς και για την συνεχή καθοδήγηση τους.

3.2.3.2 Εκχυλίσματα στρεπτομυκήτων

Στο πλαίσιο δοκιμών βακτηρίων και βακτηριακών μεταβολιτών, για τον εντοπισμό της ύπαρξης κάποιας εντομοκτόνου δραστηριότητας, χρησιμοποιήθηκαν και εκχυλίσματα στρεπτομυκήτων. Τα στελέχη που επιλέχθηκαν, συλλέχθηκαν από διάφορες περιοχές ανά την Ελλάδα, που είτε οι συνθήκες ήταν ακραίες, όπως για παράδειγμα ακραία αλατότητα (κοντά σε αλμυρά νερά), ακραία θερμοκρασία (κοντά σε θερμές πηγές), είτε προέρχονταν από την ριζόσφαιρα συγκεκριμένων φυτών που εντοπίζονταν και διάφορα φυτοπαθογόνα. Τα διαφορετικά είδη στρεπτομύκητα, καλλιεργήθηκαν σε ISP4 θρεπτικό μέσο. Όταν οι καλλιέργειες έφτασαν την απαραίτητη συγκέντρωση βακτηρίων, προστέθηκε ακετόνη ώστε τα κύτταρα να οδηγηθούν σε λύση.

Μετά την θραύση τους αφαιρέθηκε η ακετόνη, και προστέθηκε ο πρώτος διαλύτης, ο οξικός αιθυλεστέρας, ο οποίος είναι αρκετά επιλεκτικός στις ουσίες που προσδένει. Στην συνέχεια αφαιρέθηκε ο διαλύτης με ότι ουσία είχε αλληλοεπιδράσει, και προστέθηκε ο δεύτερος διαλύτης ο οποίος είναι μεθανόλη με H_2O σε αναλογία 1:1, ο οποίος δεν είναι όσο επιλεκτικός όσο ο πρώτος. Στην συνέχεια αφαιρέθηκε και αυτός ο διαλύτης με όλες τις ουσίες με τις οποίες είχε αλληλοεπιδράσει. Τέλος, και οι δύο διαλύτες με τις ουσίες που έχουν προσδέσει, διαλύθηκαν σε 100% DMSO, και αυτά αποτέλεσαν τα εκχυλίσματα που χρησιμοποιήθηκαν στις βιοδοκιμές.

Χρησιμοποιήθηκαν εκχυλίσματα από 12 strains. Για τα 11 χρησιμοποιήθηκαν και τα δύο εκχυλίσματα, δηλαδή αυτό με τον οξικό αιθυλεστέρα για διαλύτη και αυτό με την μεθανόλη για διαλύτη, ενώ στο δωδέκατο strain χρησιμοποιήθηκε μόνο το εκχύλισμα με τον οξικό αιθυλεστέρα. Κάθε εκχύλισμα είχε συγκέντρωση 5 mg/ml, σε τελική ποσότητα των 150μl. Στο strain με κωδικό CA31, χρησιμοποιήθηκε και εκχύλισμα οξικού αιθυλεστέρα με συγκέντρωση 10 mg/ml, σε τελική ποσότητα των 500μl, ώστε να μπορέσουν να δημιουργηθούν αραιώσεις από αυτό το διάλυμα.

Θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε θερμά το εργαστήριο του κύριου Χατζηνικολάου Δημήτριου, για την παροχή αυτών των εκχυλισμάτων, καθώς και για την συνεχή καθοδήγηση τους.

3.2.4 Βιοδοκιμές σε Helicoverpa armigera

Για τις βιοδοκιμές στο είδος *Helicoverpa armigera*, χρησιμοποιήθηκαν νεαρές προνύμφες (πρώτου αναπτυξιακού σταδίου), όπου δόθηκε, σε κάθε μια ξεχωριστά, ένας κύβος τροφής 2,5 εκατοστών σε πλάτος και 1,2 εκατοστών σε ύψος (Εικ 22). Αυτός ο κύβος τροφής είχε προηγουμένως εμβαπτιστεί με 500 ul βακτηριακής καλλιέργειας (κύτταρα), πυκνότητας βακτηρίων της τάξης του 10^7, ή με 500-600 ul υπερκειμένου βακτηριακής καλλιέργειας. Τα βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής προαναφερθέντα: A03, A09, A10, 353, 357, 368, 374, 379. Ως αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν κύβοι οι οποίοι ήταν εμβαπτισμένοι σε 500 ul υγρού θρεπτικού βακτηρίων (NB). Για κάθε στέλεχος χρησιμοποιήθηκαν 5 επαναλήψεις (κύβοι) για την βιοδοκιμή με τα βακτηριακά κύτταρα, και 5 επαναλήψεις (κύβοι) για την βιοδοκιμή με το υπερκείμενο, εκτός από την βιοδοκιμή με το υπερκείμενο του στελέχους 368, όπου χρησιμοποιήθηκαν 20 επαναλήψεις.

Κατά την διάρκεια των βιοδοκιμών, οι προνύμφες ελέγχονταν συνεχώς, με την βοήθεια στερεοσκοπίου, είτε για πιθανές μορφολογικές, φυσιολογικές και αναπτυξιακές δυσμορφίες είτε για πιθανή θνησιμότητα που θα μπορούσε να προκύψει από την κατανάλωση των συγκεκριμένων βακτηρίων ή των βακτηριακών μεταβολιτών. Η παρακολούθηση τους συνεχίστηκε μέχρι και το ενήλικο στάδιο ανάπτυξης.

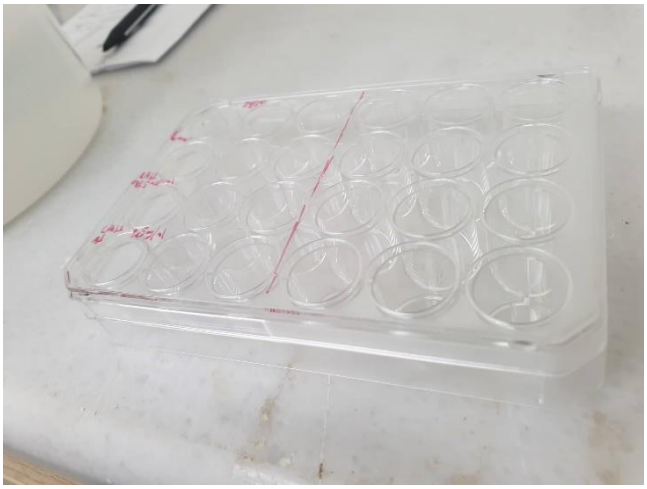
Εικόνα 22. Κύβος τροφής εμποτισμένος με βακτηριακά κύτταρα/ βακτηριακό υπερκείμενο, ο οποίος χρησιμοποιήθηκε στις βιοδοκιμές των νεαρών προνυμφών Helicoverpa armigera

3.2.5 Βιοδοκιμές σε Culex pipiens molestus

Για τις βιοδοκιμές στο είδος *Culex pipiens molestus*, χρησιμοποιήθηκαν προνύμφες τρίτου αναπτυξιακού σταδίου. Αξιοποιήθηκαν πλάκες πηγαδιών (Εικ 23), στις οποίες κάθε πηγάδι είχε ως κύριο διαλύτη αποσκληρυμένο και φιλτραρισμένο H_2O, με τον τελικό όγκο να είναι πάντα 1ml. Κάθε πηγάδι βιοδοκιμής, περιείχε 5 προνύμφες τρίτου σταδίου, και η παρακολούθηση για

την καταγραφή του ποσοστού θνησιμότητας αλλά και διαφόρων μορφολογικών και φυσιολογικών αλλαγών, πραγματοποιούνταν 24 ώρες μετά από την έναρξη της βιοδοκιμής. Ανάλογα με την διαθεσιμότητα των δειγμάτων, έγινε προσπάθεια ο ελάχιστος αριθμός πηγαδιών που χρησιμοποιούταν, ανά δείγμα, να μην είναι μικρότερος του 6, όπου το κάθε ένα από τα έξι πηγάδια αποτελούσε τεχνική επανάληψη της βιοδοκιμής, και η κάθε τριάδα πηγαδιών αποτελούσε βιολογική επανάληψη του πειράματος, καθώς οι προνύμφες προέρχονταν από διαφορετικά δοχεία εκτροφής. Αναλόγως του δείγματος που χρησιμοποιούνταν, οι ποσότητες που προστέθηκαν σε κάθε πηγάδι θα ήταν διαφορετικές. Δηλαδή, για τις βιοδοκιμές με τα βακτηριακά κύτταρα των στελεχών A03, A09, A10, 353, 357, 368, 374, 379, η τελική επιθυμητή συγκέντρωση των βακτηρίων ήταν 10^6 cfu, οπότε χρησιμοποιούνταν ποσότητα από ένα αρχικό βακτηριακό διάλυμα μεγαλύτερης συγκέντρωσης, ώστε μέσω αραίωσης, σε τελικό όγκο 1ml, η συγκέντρωση να έφτανε την επιθυμητή μέσα στο πηγάδι. Ο ίδιος όγκος προστέθηκε, σε υγρό θρεπτικό (NB), στα πηγάδια που λειτουργούσαν ως αρνητικοί μάρτυρες. Για τα υπερκείμενα αυτών των στελεχών, προστέθηκαν ποσότητες των 50,100 και 200 ul, σε κάθε πηγάδι, πάλι σε τελικό 1ml, αλλά στο στέλεχος 368, χρησιμοποιήθηκαν και ποσότητες των 5, 10, 20 και 75 ul. Στα πηγάδια που λειτούργησαν ως αρνητικοί μάρτυρες, προστέθηκαν ποσότητες υγρού θρεπτικού (NB), ίσες με αυτών των υπερκειμένων.

Τέλος, για τα εκχυλίσματα των στρεπτομυκήτων, χρησιμοποιήθηκε ποσότητα, τέτοια ώστε να καταλαμβάνει το 2% του τελικού όγκου στο κάθε πηγάδι (τελικός 1ml). Η αρχική συγκέντρωση του κάθε εκχυλίσματος ήταν 5 mg/ml. Για το εκχύλισμα με κωδικό CA31 (οξικός αιθυλεστέρας), δημιουργήθηκαν νέες αραιώσεις από αρχικό διάλυμα με συγκέντρωση 10 mg/ml, ώστε σε κάθε πηγάδι ο όγκος του εκχυλίσματος να ισούται με 1% του τελικού. Οι αραιώσεις αυτές ήταν 5, 2.5, 1.25 και 0.625 mg/ml.Τα πηγάδια που χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικοί μάρτυρες, για αυτές τις βιοδοκιμές, περιείχαν 100% DMSO, σε όγκο στο πηγάδι ίσο με 2% ή 1% του τελικού, ανάλογα με τον αντίστοιχο όγκο των εκχυλισμάτων.



Εικόνα 23. Πλάκα πηγαδιών, τα οποία περιέχουν βακτηριακά κύτταρα, βακτηριακά υπερκείμενα ή βακτηριακά εκχυλίσματα, για βιοδοκιμές σε προνύμφες τρίτου σταδίου Culex pipiens molestus

3.2.6 Ανάλυση βιοδοκιμών

Η ανάλυση των δεδομένων των βιοδοκιμών, πραγματοποιήθηκε με την βοήθεια του προγράμματος PoloPlus : https://leora-software.com/

3.3 Αποτελέσματα

3.3.1 Προνύμφες *Culex pipiens molestus* -Υπερκείμενο 368

Από τα διάφορα υπερκείμενα βακτηριακών καλλιεργειών που δοκιμάστηκαν για κάποια πιθανή επίδραση στις προνύμφες των *Culex pipiens molestus* και *Helicoverpa armigera*, το υπερκείμενο του βακτηρίου, γένους *Bacillus*, με κωδικό 368, παρατηρήθηκε πως οδήγησε σε θνητότητα προνύμφες τρίτου σταδίου του είδους *Culex pipiens molestus* (Πίνακας 4). Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκαν βιοδοκιμές με ένα εύρος δόσεων του υπερκειμένου, σε 90 προνύμφες. Δοκιμάστηκαν όγκοι υπερκειμένου, ξεκινώντας από 5 ul, ανεβαίνοντας σε 10, 20, 50, 75,100 μέχρι και 200 ul, σε τελικό όγκο 1ml για κάθε πηγάδι.

Με την εφαρμογή εύρους δόσεων, υπολογίστηκε η ποσότητα του υπερκειμένου που χρειάζεται ώστε να θανατωθεί το 50% (LC50) και το 99% (LC99) ενός πληθυσμού προνυμφών *Culex pipiens molestus* σε 24 ώρες, η οποία είναι 67.002 ul και 139.834 ul αντίστοιχα (Πίνακας 4). Αυτές οι τιμές είχαν στατιστική σημαντικότητα βάσει των στατιστικών παραμέτρων που προέκυψαν από το εύρος δόσεων. Παρόλα αυτά, βιοδοκιμές διαφορετικών δόσεων του υπερκειμένου, πρέπει να επαναληφθούν για προνύμφες από καινούργια δοχεία εκτροφής, ώστε να παραχθούν περισσότερα δεδομένα, τα οποία θα ενισχύσουν την στατιστική σημαντικότητα των τωρινών ευρημάτων.

Βακτηριακό Υπερκείμενο	**N[a]**	**LC50[b] (ul)**	**FL95%[c] (LC50)**	**LC99[b] (ul)**	**FL95%[c] (LC99)**	**Slope ± SE**	**x^2 ***	**df**
368	90	67.002	54.544-78.193	139.834	105.1-428.128	7.281 ±2.276	9.166*	16

Πίνακας 4. Αποτελέσματα βιοδοκιμών εύρους δόσεων, σε προνύμφες Culex pipiens molestus τρίτου σταδίου, στο υπερκείμενο καλλιέργειας βακτηρίου του γένους Bacillus, με κωδικό 368

a: Αριθμός ατόμων που χρησιμοποιήθηκαν στις βιοδοκιμές (δεν περιλαμβάνονται οι αρνητικοί μάρτυρες)
b: Θνησιγόνος συγκέντρωση (lethal concentration)
c: Διαστήματα εμπιστοσύνης (fiducial limits)
*: Με βάση την συγκεκριμένη τιμή του χ^2, τα δεδομένα της βιοδοκιμής έχουν στατιστική σημαντικότητα

3.3.2 Προνύμφες *Culex pipiens molestus* - Εκχύλισμα CA31

Από τα διάφορα εκχυλίσματα στρεπτομυκήτων που δοκιμάστηκαν για κάποια πιθανή επίδραση στις προνύμφες των *Culex pipiens molestus,* το εκχύλισμα οξικού αιθυλεστέρα του στρεπτομύκητα με κωδικό CA31, παρατηρήθηκε να έχει θνησιγόνο επίδραση στις προνύμφες τρίτου σταδίου, του είδους *Culex pipiens molestus* (Πίνακας 5). Συγκεκριμένα, οι βιοδοκιμές που πραγματοποιήθηκαν, αποτελούνταν από ένα εύρος δόσεων, με την τελική ποσότητα όγκου του εκχυλίσματος που προσθέτονταν, να είναι 20 ul αρχικά και μετά να γίνεται 10 ul στο 1ml βιοδοκιμής του κάθε πηγαδιού. Η αλλαγή αυτή

προέκυψε, καθώς αποκτήθηκαν μεγαλύτερες ποσότητες του εκχυλίσματος σε μεγαλύτερη συγκέντρωση, από την οποία προέκυψαν, μέσω αραιώσεων, διαφορετικές συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν στις βιοδοκιμές. 300 προνύμφες χρησιμοποιήθηκαν για αυτές τις βιοδοκιμές, με τις αρχικές συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων που χρησιμοποιήθηκαν, να ξεκινούν από 0.625 mg/ml και να αυξάνονται σε 1.25, 2.5, 5, μέχρι και 10 mg/ml. Με την βοήθεια του εύρους δόσεων, υπολογίστηκε η συγκέντρωση του αρχικού εκχυλίσματος, ώστε σε όγκο 10 ul, να θανατωθεί το 50% (LC50) και το 99% (LC99) ενός πληθυσμού προνυμφών *Culex pipiens molestus* σε 24 ώρες, η οποία είναι 2.088 mg/ml και 12.359 mg/ml αντίστοιχα.

Βέβαια, παρατηρείται μια μικρή στατιστική απόκλιση βάσει των στατιστικών παραμέτρων του εύρους δόσεων, όμως θα πραγματοποιηθούν επαναλήψεις για τις διάφορες αυτές δόσεις του εκχυλίσματος στρεπτομύκητα, ώστε να χρησιμοποιηθούν προνύμφες από νέα δοχεία εκτροφής, να αυξηθούν οι πληροφορίες που συσχετίζουν την αρχική συγκέντρωση με το ποσοστό θανάτου, και τελικά το εύρος δόσεων να αποκτήσει στατιστική σημαντικότητα που θα οδηγήσει στην ελάχιστη τροποποίηση των LC50 και LC99 τιμών.

Εκχύλισμα Στρεπτομύκητα	**N[a]**	**LC50[b] (mg ml^{-1})**	**FL95%[c] (LC50)**	**LC99[b] (mg ml^{-1})**	**FL95%[c] (LC99)**	**Slope ± SE**	**x^2**	**df**
CA31 (οξικός αιθυλεστέρας)	300	2.088	1.470-2.733	12.359	7.716-31.997	3.013 ±0.333	16.778	8

Πίνακας 5. Αποτελέσματα βιοδοκιμών εύρους δόσεων, σε προνύμφες Culex pipiens molestus τρίτου σταδίου, στο εκχύλισμα οξικού αιθυλεστέρα στρεπτομύκητα , με κωδικό CA31

a: Αριθμός ατόμων που χρησιμοποιήθηκαν στις βιοδοκιμές (δεν περιλαμβάνονται οι αρνητικοί μάρτυρες)
b: Θνησιγόνος συγκέντρωση (lethal concentration)
c: Διαστήματα εμπιστοσύνης (fiducial limits)

3.4 Συζήτηση

Τα βιοεντομοκτόνα κερδίζουν όλο και περισσότερο έδαφος στην αγορά, λόγω της μοναδικότητας και των πλεονεκτημάτων τους έναντι των συμβατικών εντομοκτόνων. Ειδικότερα τα μικροβιακής προέλευσης εντομοκτόνα, αποτελούν ανεξερεύνητες πηγές ουσιών με μοναδικούς μηχανισμούς δράσης ενάντια σε έντομα υγειονομικού και αγρονομικού ενδιαφέροντος, με το πιο τρανταχτό παράδειγμα να είναι αυτό του βακτηρίου *Bacillus thuringiensis*. Τα παραπάνω λοιπόν, αποτέλεσαν έναυσμα για αυτήν την μελέτη, και προσπάθεια καταβλήθηκε για την εύρεση πιθανής εντομοκτόνου δραστηριότητας σε διάφορα βακτηριακά στελέχη. Συγκεκριμένα, στις βιοδοκιμές που πραγματοποιήθηκαν, για την διαπίστωση τέτοιου είδους δραστηριότητας, χρησιμοποιήθηκαν βακτηριακά κύτταρα, υπερκείμενα από τις καλλιέργειες αυτών των βακτηρίων, καθώς και εκχυλίσματα στρεπτομύκητα.

Τα στελέχη αυτά επιλέχθηκαν είτε για ικανότητα τους να αναπτύσσονται σε περιβάλλοντα με ακραίες συνθήκες (αλατότητα, θερμοκρασία), είτε για την ικανότητα τους να αναστέλλουν την ανάπτυξη άλλων μικροοργανισμών. Οι βιοδοκιμές αυτών των βακτηρίων, αλλά και βακτηριακών μεταβολιτών, πραγματοποιήθηκαν σε προνύμφες του είδους *Culex pipiens molestus*, καθώς αποτελεί φορέα ανθρώπινων ασθενειών, με το πιο γνωστό παθογόνο που

μεταφέρει να είναι ο ιός του δυτικού Νείλου, και σε προνύμφες του είδους *Helicoverpa armigera*, καθώς είναι ένα έντομο που προκαλεί μεγάλες ζημιές σε οικονομικά σημαντικές καλλιέργειες. Τα βακτηριακά κύτταρα και υπερκείμενα, χρησιμοποιήθηκαν και στα δύο αυτά είδη, αλλά τα εκχυλίσματα στρεπτομύκητα χρησιμοποιήθηκαν μόνο στις προνύμφες των *Culex*. Μέσω της βιβλιογραφίας, αποφασίστηκε πως η αποτελεσματικότερη μέθοδος, όσον αφορά τις βιοδοκιμές για τις προνύμφες των *Helicoverpa*, ήταν ο εμποτισμός ενός κύβου τροφής, με βακτηριακά κύτταρα ή το αντίστοιχο υπερκείμενο τους, ο οποίος θα αντιστοιχούσε σε μια νεαρή προνύμφη (πρώτου σταδίου). Ο λόγος που επιλέχθηκαν νεαρές προνύμφες, ήταν διότι σαν είδος είναι γνωστό για τα υψηλά επίπεδα αντοχής του σε ξενοβιοτικά, όποτε θεωρήθηκε απαραίτητο να καταναλώσουν όσο περισσότερη τροφή, εμποτισμένη με βακτηριακό παράγοντα, γίνεται, ώστε με αυτόν τον τρόπο να παρατηρηθεί, η πιθανή εντομοκτόνος δράση, μέχρι να ολοκληρώσουν τον κύκλο ανάπτυξης τους.

Αυτές οι βιοδοκιμές οδήγησαν στο συμπέρασμα πως αυτά τα βακτήρια και τα υπερκείμενα τους δεν προκαλούσαν θάνατο ή δεν είχαν κάποια άλλη επίδραση πάνω στις προνύμφες. Βέβαια, κάποιες από αυτές τις βιοδοκιμές θα πρέπει να επαναληφθούν, καθώς σε μερικές ίσως υπάρχει η πιθανότητα στατιστικού λάθους, λόγω του ότι χρησιμοποιήθηκαν 5 επαναλήψεις για κάθε βακτήριο ή υπερκείμενο. Για το υπερκείμενο του Βακίλου με κωδικό 368, χρησιμοποιήθηκαν 20 επαναλήψεις, καθώς παρατηρήθηκε ισχυρή επίδραση στις προνύμφες των κουνουπιών, αλλά η θνησιμότητα που παρατηρήθηκε ήταν στατιστικά ασήμαντη.

Όσον αφορά τις βιοδοκιμές σε προνύμφες *Culex*, χρησιμοποιήθηκαν τρίτου σταδίου προνύμφες. Ο λόγος που επιλέχθηκαν προνύμφες τρίτου σταδίου, ήταν πως μέσω της βιβλιογραφίας θεωρήθηκε αποτελεσματικότερο να μην χρησιμοποιηθούν προνύμφες οι οποίες θα βρίσκονταν στο ευαίσθητο πρώτο στάδιο τους, αλλά ούτε και στο τέταρτο όπου θα άρχιζαν να γίνονται νύμφες και οι ρυθμοί με τους οποίους θα τρέφονταν θα έπεφταν. Για τις βιοδοκιμές με τα βακτηριακά κύτταρα, χρησιμοποιήθηκε η μέγιστη δυνατή τελική συγκέντρωση, σύμφωνα με την περιορισμένη βιβλιογραφία, η όποια ήταν 10^6 cfu, αλλά δεν παρατηρήθηκε κάποια επίδραση στις προνύμφες. Από τα υπερκείμενα αυτό με τον κωδικό 368, και από τα εκχυλίσματα αυτό του οξικού αιθυλεστέρα με κωδικό CA31, παρατηρήθηκε πως είχαν θνησιγόνο δράση στις προνύμφες των κουνουπιών.

Οι ποσότητες σε όγκους που χρησιμοποιήθηκαν για το υπερκείμενο ήταν υψηλότερες από αυτές που χρησιμοποιήθηκαν για το εκχύλισμα, καθώς το υπερκείμενο δεν ήταν τόσο πυκνό σε ουσίες όσο ήταν το εκχύλισμα. Όταν σε 24 ώρες παρατηρήθηκε ο στατιστικά σημαντικός θάνατος των προνυμφών, το επόμενο βήμα ήταν να πραγματοποιηθούν βιοδοκιμές για ένα εύρος δόσεων του υπερκειμένου και του εκχυλίσματος, ώστε να διαπιστωθεί αν υπήρχε ποσοτική συσχέτιση μεταξύ της ουσίας ή των ουσιών που βρίσκονταν μέσα σε αυτά τα διαλύματα και του ποσοστού θνησιμότητας των προνυμφών. Όντως, παρατηρήθηκε αυτή η συσχέτιση μεταξύ ποσότητας και ποσοστού θανάτου στις εικοσιτετράωρες βιοδοκιμές, με τις τιμές των LC50 και LC99 που βρέθηκαν να προσεγγίζουν αυτές που παρατηρούνται στην βιβλιογραφία και στο εμπόριο, αυξάνοντας έτσι τις πιθανότητες αξιοποίησης τους στο μέλλον.

Επιπλέον στις βιοδοκιμές του εκχυλίσματος, παρατηρήθηκε και συσχέτιση της ποσότητας με κάποιον άλλο φαινότυπο.

Όσο αυξανόταν η συγκέντρωση του εκχυλίσματος, τόσο αυξανόταν και ο φαινότυπος των νεκρών προνυμφών οι οποίες είχαν μαύρο χρώμα κατά μήκος του πεπτικού τους σωλήνα. Όμως, θα πρέπει να πραγματοποιηθούν περισσότερες επαναλήψεις στο μέλλον για τις βιοδοκιμές του εκχυλίσματος, ώστε να απαντηθεί το ερώτημα, αν αυτός ο σκουρόχρωμος φαινότυπος όντως σχετίζεται και αυξάνεται σε ποσοστό και ένταση ανάλογα με την συγκέντρωση του εκχυλίσματος. Γνωρίζοντας τα παραπάνω, η επόμενη μελέτη μπορεί να πάει ένα βήμα παραπέρα, με την ανάλυση των δειγμάτων, όπως για παράδειγμα δημιουργία εκχυλισμάτων από το υπερκείμενο 368, με παρόμοιο τρόπο με αυτόν του εκχυλίσματος CA31, ή με την βοήθεια υγρής χρωματογραφίας, για την απομόνωση συγκεκριμένων ουσιών από το εκχύλισμα CA31. Έτσι, θα μπορέσουν να πραγματοποιηθούν νέες βιοδοκιμές με νέες ουσίες, που θα δώσουν περισσότερες πληροφορίες για τον πιθανό μοριακό εντομοκτόνο μηχανισμό δράσης, καταλήγοντας, μετά από αρκετή διεργασία, στην δημιουργία ενός νέου αποτελεσματικού σκευάσματος βιοεντομοκτόνου.

Ευχαριστίες

Καταρχήν θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή μου, κύριο Ιωάννη Βόντα για την ευκαιρία που μου έδωσε να γίνω μέλος του εργαστηρίου του και να εργαστώ σε πρότζεκτ τα οποία κέντρισαν το ενδιαφέρον μου, και οδήγησαν στην ανάπτυξη της επιστημονικής μου σκέψης και των δεξιοτήτων μου. Επιπρόσθετα, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλη την ομάδα του εργαστηρίου του κύριου Βόντα, για την ένθερμη βοήθεια που παρείχε καθ΄ όλη την διάρκεια εκπόνησης της μεταπτυχιακής μου εργασίας. Ιδιαιτέρως, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους Κέλλυ Παπαποστόλου, Κώστα Μαυρίδη, Δήμητρα Τσακιρέλη, για την βοήθεια που μου προσέφεραν σε καθημερινή βάση, και ειδικότερα την επιβλέπουσα μου Νατάσα Καμπουράκη, για την συνεχή εργασιακή και ψυχολογική της υποστήριξη, και ιδιαίτερα για τις πολύτιμες συμβουλές που μου έδωσε, ώστε να ενστερνιστώ τον δικό μου τρόπο επιστημονικής σκέψης. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κύριο Χαλεπάκη Γεώργιο και Παναγιώτη Σαρρή, καθώς δέχτηκαν να αποτελέσουν μέλη της τριμελούς μου εξεταστικής επιτροπής, και επιπλέον, τους Χρήστο Χρηστάκη, από το εργαστήριο του κυρίου Σαρρή, και Σταυρούλα Καΐλη από το εργαστήριο του κυρίου Χατζηνικολάου, για την συνεχή καθοδήγηση τους περί των μικροβίων και των μικροβιακών σκευασμάτων.

Βιβλιογραφία

1. L. P. Pedigo (2002). Entomology and PestManagement, Prentice Hall, New York, NY, USA.
2. P.M. Hammond (1995). “The currentmagnitude of biodiversity,” in Global Biodiversity Assessment, V. H. Heywood, Ed., pp. 113–138, Cambridge University Press, Cambridge, UK.
3. R. K. Lokeshwari and T. Shantibala (2010). A Review on the Fascinating World of Insect Resources: Reason for Thoughts. Hindawi Publishing

Corporation Psyche Volume 2010, Article ID 207570, 11 pages doi:10.1155/2010/207570
4. Dwijendra Singh (2014). Advances in Plant Biopesticides. DOI 10.1007/978-81-322-2006-0
5. WHO (2020). Vector-borne diseases
6. Culliney, T.W. (2014). Crop Losses to Arthropods, in: Pimentel, D., Peshin, R. (Eds.), Integrated Pest Management: Pesticide Problems, Vol.3. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 201–225. https://doi.org/10.1007/978-94-007-7796-5_8
7. S Garcı´a-Lara and SO Serna Saldivar (2016). Insect Pests. Encyclopedia of Food and Health
8. Ricardo Malheiro, Susana Casal, Paula Baptista and Jose Alberto Pereira (2015). A review of Bactrocera oleae (Rossi) impact in olive products: From the tree to the table. Trends in Food Science & Technology Volume 44, Issue 2, August 2015, Pages 226-242
9.Daane, K. M., & Johnson, M. W. (2010). Olive fruit fly: managing an ancient pest in modern times.Annual Review of Entomology, 55,151-169.
10. Zalom, F. G., Van Steenwyk, R. A., Burrack, H. J., & Johnson, M. W. (2009). Olive fruit fly. Integrated pest management for home gardeners and landscape professionals. Pest Notes, Publication 74112.
11. Mavragani-Tsipidou, P. (2002). Genetic and cytogenetic analysis of the olive fruit fly Bactrocera oleae (Diptera: Tephritidae). Genetica, 116, 45-57.
12. Tsitsipis, J. A. (1977). Effect of constant temperatures on the eggs of the olive fruit fly, Dacus oleae (Diptera: Tephritidae). Annales de Zoologie Ecologie Animale, 9, 133-139.
13. Neuenschwander, P., & Michelakis, S. (1978). The infestation of Dacus oleae (Gmel.) (Diptera, Tephritidae) at harvest time and its influence on yield and quality of olive oil in Crete
14. Neuenschwander, P., & Michelakis, S. (1979). Determination of the lower thermal thresholds and day-degree requirements for eggs and larvae of Dacus oleae (Gmel.) (Dipt. Tephritidae) under field conditions in Crete, Greece. Zeitschrift fur Angewandte Entomologie, 86, 420-433.
15. Moral, J., Bouhmidi, K., & Trapero, A. (2008). Influence of fruit maturity, cultivar susceptibility, and inoculation method on infection of olive fruit by Colletotrichum acutatum. Plant Disease, 92, 1421-1426.
16. Ponti, L., Cossu, Q. A., & Gutierrez, A. P. (2009). Climate warming effects on the Olea europaea-Bactrocera oleae system in Mediterranean islands: Sardinia as an exemple. Global Change Biology, 15, 2874-2884.
17. CABI. (2014). Bactrocera oleae datasheet. Centre for Agriculture and Biosciences International. http://www.cabi.org/isc/datasheet/17689#20117202899 Accessed 04.01.15.
18. Nardi, F., Carapelli, A., Vontas, J. G., Dallai, R., Roderick, G. K., & Frati, F. (2006). Geographical distribution and evolutionary history of organophosphate-resistant Ace alleles in the olive fly (Bactrocera oleae). Insect Biochemistry and Molecular Biology, 36, 593-602.
19. Burrack, H. J., & Zalom, F. G. (2008). Olive fruit fly (Diptera:Tephritidae) ovipositional preference and larval performance in several commercial important olive varieties in California. Journal of Economic Entomology, 101, 750-758.

20. Augustinos, A. A., Stratikopoulos, E. E., Zacharopoulou, A., & Mathiopoulos, K. D. (2002). Polymorphic microsatellite markers in the olive fly, Bactrocera oleae. Molecular Ecology Notes, 2, 278-280.
21. Daane, K.M., Johnson, M.W. (2010). Olive fruit fly: managing an ancient pest in modern times. Annual Review of Entomology 55, 151–169. https://doi.org/10.1146/annurev.ento.54.110807.090553
22. Haniotakis, G.E., Kozyrakis, E., Bonatsos, C. (1986). Control of the olive fruit fly, Dacus oleae Gmel. (Dipt., Tephritidae) by mass trapping: Pilot scale feasibility study. Journal of Applied Entomology 101, 343–352. https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.1986.tb00868
23. Knipling, E.F. (1959). Sterile-Male Method of Population Control: Successful with some insects, the method may also be effective when applied to other noxious animals. Science 130, 902–904. https://doi.org/10.1126/science.130.3380.902
24. Albertini, A., Pizzolotto, R., Petacchi, R. (2017). Carabid patterns in olive orchards and woody semi-natural habitats: first implications for conservation biological control against Bactrocera oleae. BioControl 62, 71–83. https://doi.org/10.1007/s10526-016-9780
25. Hoelmer, K.A., Kirk, A.A., Pickett, C.H., Daane, K.M., Johnson, M.W. (2011). Prospects for improving biological control of olive fruit fly, Bactrocera oleae (Diptera: Tephritidae), with introduced parasitoids (Hymenoptera). Biocontrol Science and Technology 21, 1005–1025. https://doi.org/10.1080/09583157.2011.594951
26. Bueno, A.M., Jones, O. (2002). Alternative methods for controlling the olive fly, Bactrocera oleae, involving semiochemicals. [WWW Document]. https://www.cabi.org/ISC/abstract/20033044590
27. ΥΠΑΑΤ (2022). Κατάλογοι φυτοπροστατευτικών προϊόντων και βιοκτόνων [WWW Document]. Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων. https://1click.minagric.gr/oneClickUI/frmFytoPro.zul
28. Tabashnik, B.E., Mota-Sanchez, D., Whalon, M.E., Hollingworth, R.M., Carrière, Y. (2014). Defining Terms for Proactive Management of Resistance to Bt Crops and Pesticides. Journal of Economic Entomology 107, 496–507. https://doi.org/10.1603/EC13458
29. Anastasia Kampouraki, Marianna Stavrakaki, Aggeliki Karataraki, Georgios Katsikogiannis, Evanthia Pitika, Kiriaki Varikou, Antonia Vlachaki, Antonios Chrysargyris, Eleni Malandraki, Nikolaos Sidiropoulos, Antonios Paraskevopoulos, Dimitra Gkilpathi, Emmanouil Roditakis, John Vontas (2018). Recent evolution and operational impact of insecticide resistance in olive fruit fly Bactrocera oleae populations from Greece. Journal of Pest Science, 91: 1429, https://doi.org/10.1007/s10340-018-1007-8
30. Haile, F., Nowatzki, T., & Storer, N. (2021). Overview of pest status, potential risk, and management considerations of Helicoverpa armigera (Lepidoptera: Noctuidae) for U.S. Soybean Production. Journal of Integrated Pest Management, 12. https://acade mic.oup.com/jipm/artic le abstract/12/1/3/6066277, https://doi.org/10.1093/jipm/pmaa030
31. Tay, W. T., Walsh, T. K., Downes, S., Anderson, C., Jermiin, L. S., Wong, T. K. F., Piper, M. C., Chang, E. S., Macedo, I. B., Czepak, C., Behere, G. T., Silvie, P., Soria, M. F., Frayssinet, M., & Gordon, K. H. J. (2017). Mitochondrial DNA and trade data support multiple origins of Helicoverpa armigera

(Lepidoptera, Noctuidae) in Brazil. Scientific Reports, 7, 45302. https://doi.org/10.1038/srep4 5302
32. Sosa-Gómez, D. R., Specht, A., Paula-Moraes, S. V., Lopes-Lima, A., Yano, S. A. C., Micheli, A., Morais, E. G. F., Gallo, P., Pereira, P. R. V. S., Salvadori, J. R., Botton, M., Zenker, M. M., & Azevedo-Filho, W. S. (2016). Timeline and geographical distribution of Helicoverpa armigera (Hübner) (Lepidoptera, Noctuidae: Heliothinae) in Brazil. Revista Brasileira De Entomologia, 60, 101–104. https://doi.org/10.1016/j.rbe.2015.09.008
33. Mironidis, G. K., & Savopoulou-Soultani, M. (2014). Development, survivorship, and reproduction of Helicoverpa armigera (Lepidoptera: Noctuidae) under constant and alternating temperatures. Environmental Entomology, 37, 16–28. https://doi.org/10.1093/ee/37.1.16
34. Ali, A., Choudhury, R. A., Ahmad, Z., Rahman, F., Khan, F., & Ahmad, S. (2009). Some biological characteristics of Helicoverpa armigera on chickpea. Tunisian Journal of Plant Protection, 4, 99–106.
35. Tripathy, M., Kumar, R., & Singh, H. (1999). Host range and population dynamics of Helicoverpa armigera Hübn. in eastern Uttar Pradesh. Journal of Applied Zoological Research, 10, 22–24.
36. Pratissoli, D., Lima, V. L., Pirovani, V. D., & Lima, W. L. (2015). Occurrence of Helicoverpa armigera (Lepidoptera: Noctuidae) on tomato in the Espírito Santo state. Horticultura Brasileira, 33, 101–105. https://doi.org/10.1590/S0102 -0536201500 00100016
37. Cunningham, J. P., Zalucki, M. P., & West, S. A. (1999). Learning in Helicoverpa armigera (Lepidoptera: Noctuidae): A new look at the behaviour and control of a polyphagous pest. Bulletin of Entomological Research, 89, 201–207.
38. Nasreen, A., & Mustafa, G. (2000). Biology of Helicoverpa armigera (Hubner) reared in laboratory on natural diet. Pakistan Journal of Biological Sciences, 3, 1668–1669. https://doi.org/10.3923/pjbs.2000.1668.1669
39. Fitt, G. P. (1989). The ecology of Heliothis Species in relation to agroecosystems. Annual Review of Entomology, 34, 17–53. https://doi.org/10.1146/annur ev.en.34.010189.000313
40. Rahman, A. Z., Haque, M., Alam, S., Begum, K., & Sarker, D. (2016). Development of integrated pest management approaches against Helicoverpa armigera (Hubner) in tomato. Bangladesh Journal of Agricultural Research, 41, 287–296. https://doi.org/10.3329/bjar.v41i2.28231
41. Shahzab Riaz, Joel B. Johnson, Munir Ahmad, Gary P. Fitt, Mani Naiker (2021). A review on biological interactions and management of the cotton bollworm, Helicoverpa armigera (Lepidoptera: Noctuidae). Journal of applied entomology, Volume145, Issue 6, July 2021, Pages 467-498
42. Ary Farajollahi, Dina M. Fonseca, Laura D. Kramer, A. Marm Kilpatrick (2011). Infection, Genetics and Evolution 11 (2011) 1577–1585
43. U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention (2022). https://www.cdc.gov/mosquitoes/about/life-cycles/culex.html
44. Dobrotworsky, N.V (1967). The problem of the Culex pipiens complex in the South Pacific (including Australia). Bull. World Health Organ. 37, 251–255.
45. Spielman, A. (1971). Bionomics of autogenous mosquitoes. Annu. Rev. Entomol. 16, 231–248.

46. Fonseca, D.M., Keyghobadi, N., Malcolm, C.A., Mehmet, C., Schaffner, F., Mogi, M., Fleischer, R.C., Wilkerson, R.C. (2004). Emerging vectors in the Culex pipiens complex. Science 303, 1535–1538.
47. Vinogradova, E.B. (2000). Culex pipiens pipiens mosquitoes: taxonomy, distribution, ecology, physiology, genetics, applied importance and control. Pensoft, Sofia
48. Kilpatrick, A.M., Kramer, L.D., Jones, M.J., Marra, P.P., Daszak, P., Fonseca, D.M. (2007). Genetic influences on mosquito feeding behavior and the emergence of zoonotic pathogens. Am. J. Trop. Med. Hyg. 77, 667–671.
49. Bogh, C., Pedersen, E.M., Mukoko, D.A., Ouma, J.H. (1998). Permethrin-impregnated bednet effects on resting and feeding behaviour of lymphatic filariasis vector mosquitoes in Kenya. Med. Vet. Entomol. 12, 52–59
50. Apperson, C.S., Hassan, H.K., Harrison, B.A., Savage, H.M., Aspen, S.E., Farajollahi, A., Crans, W., Daniels, T.J., Falco, R.C., Benedict, M., Anderson, M., McMillen, L., Unnasch, T.R. (2004). Host feeding patterns of established and potential mosquito vectors of West Nile virus in the eastern United States. Vector-Borne Zoonotic Dis. 4, 71–82.
51. Chandra, G., Bhattacharjee, I., Chatterjee, S.N., Ghosh, A. (2008). Mosquito control by larvivorous fish. Indian J Med Res 127, 13–27.
52. Vu, S.N., Nguyen, T.Y., Tran, V.P., Truong, U.N., Le, Q.M., Le, V.L., Le, T.N., Bektas, A., Briscombe, A., Aaskov, J.G., Ryan, P.A., Kay, B.H. (2005). Elimination of dengue by community programs using Mesocyclops (Copepoda) against Aedes in central Vietnam. Am J Trop Med Hyg 72, 67–73.
53. Benelli, G. (2015). Research in mosquito control: current challenges for a brighter future. Parasitol Res 114, 2801–2805. https://doi.org/10.1007/s00436-015-4586-9
54. Melo, A.L. de A., Soccol, V.T., Soccol, C.R. (2016). Bacillus thuringiensis: mechanism of action, resistance, and new applications: a review. Critical Reviews in Biotechnology 36, 317–326. https://doi.org/10.3109/07388551.2014.960793
55. WHO (2018). WHO recommended insecticides for indoor residual spraying against malaria vectors. https://www.who.int/neglected_diseases/vector_ecology/vector-control/Insecticides_IRS_22_September_2018.pdf?ua=1
56. Davidson G: Insecticide resistance in Anopheles sundaicus. (1957) Nature, 180(4598):1333-1335.
57. Hemingway J, Ranson H (2000): Insecticide resistance in insect vectors of human disease. Annu Rev Entomol, 45:371-391.
58. Ranson H, N'Guessan R, Lines J, Moiroux N, Nkuni Z, Corbel V (2011): Pyrethroid resistance in African anopheline mosquitoes: what are the implications for malaria control?Trends Parasitol, 27(2):91-98.
59. IRAC: Prevention and Management of Insecticide Resistance in Vectors of Public Health Importance In: Resistance Management for Sustainable Agriculture and Improved Public Health: Second Edition 2010 Insecticide Resistance Action Commitee; 2010:72pp.
60. Vincent Corbel and Raphael N'Guessan (2013). Distribution, Mechanisms, Impact and Management of Insecticide Resistance in Malaria Vectors: A Pragmatic Review. FROM THE EDITED VOLUME Anopheles mosquitoes Edited by Sylvie Manguin

61. Lapied B, Pennetier C, Apaire-Marchais V, Licznar P, Corbel V (2009): Innovative applications for insect viruses: towards insecticide sensitization. Trends Biotechnol, 27(4):190-198.
62. Plapp FW, Jr. (1984): The genetic basis of insecticide resistance in the house fly: evidence that a single locus plays a major role in metabolic resistance to insecticides. Pesticide Biochemistry and Physiology, 22(2):194-201.
63. Georghiou GP, Ariaratnam V, Pasternak ME, Lin CS (1975): Organophosphorus multiresistance in Culex pipiens quinquefasciatus in California. Journal of Economic Entomology, 68(4):461-467.
64. Djouaka RF, Bakare AA, Coulibaly ON, Akogbeto MC, Ranson H, Hemingway J, Strode C (2008): Expression of the cytochrome P450s, CYP6P3 and CYP6M2 are significantly elevated in multiple pyrethroid resistant populations of Anopheles gambiae s.s. from Southern Benin and Nigeria. BMC Genomics, 9:538.
65. Roberts DR, Chareonviriyaphap T, Harlan HH, Hshieh P (1997): Methods of testing and analyzing excito-repellency responses of malaria vectors to insecticides. J Am Mosq Control Assoc, 13(1):13-17.
66. Chandre F, Darriet F, Duchon S, Finot L, Manguin S, Carnevale P, Guillet P (2000): Modifications of pyrethroid effects associated with kdr mutation in Anopheles gambiae. Medical and Veterinary Entomology, 14(1):81-88.
67. Chareonviriyaphap T, Roberts DR, Andre RG, Harlan HJ, Manguin S, Bangs MJ (1997): Pesticide avoidance behavior in Anopheles albimanus, a malaria vector in the Americas. J Am Mosq Control Assoc, 13(2):171-183.
68. Despres L, David JP, Gallet C (2007): The evolutionary ecology of insect resistance to plant chemicals. Trends Ecol Evol, 22(6):298-307.
69. Hemingway J, Hawkes NJ, McCarroll L, Ranson H (2004): The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. Insect Biochem Mol Biol, 34(7):653-665.
70. Guillemaud T, Makate N, Raymond M, Hirst B, Callaghan A (1997): Esterase gene amplification in Culex pipiens. Insect Molecular Biology, 6(4):319-327.
71. Vaughan A, Hawkes N, Hemingway J (1997): Co-amplification explains linkage disequilibrium of two mosquito esterase genes in insecticide-resistant Culex quinquefasciatus. Biochem J, 325 (Pt 2):359-365.
72. Ranson H, Cornel AJ, Fournier D, Vaughan A, Collins FH, Hemingway J (1997): Cloning and Localization of a Glutathione S-transferase Class I Gene from Anopheles gambiae. J Biol Chem, 272(9):5464-5967.
73. Feyereisen R, Lawrence IG, Kostas I, Sarjeet SG: Insect Cytochrome P450 (2005). In: Comprehensive Molecular Insect Science. Amsterdam: Elsevier: 1-77.
74. Fournier D (2005): Mutations of acetylcholinesterase which confer insecticide resistance in insect populations. Chem Biol Interact.
75. Weill M, Lutfalla G, Mogensen K, Chandre F, Berthomieu A, Berticat C, Pasteur N, Philips A, Fort P, Raymond M (2003): Comparative genomics: Insecticide resistance in mosquito vectors. Nature, 423(6936):136-137.
76. Alout H, Labbe P, Berthomieu A, Pasteur N, Weill M (2009): Multiple duplications of the rare ace-1 mutation F290V in Culex pipiens natural populations. Insect Biochem Mol Biol.

77. Davies TG, Field LM, Usherwood PN, Williamson MS (2007): DDT, pyrethrins, pyrethroids and insect sodium channels. IUBMB Life, 59(3):151-162.
78. Culliney, T.W., 2014. Crop Losses to Arthropods, in: Pimentel, D., Peshin, R. (Eds.), Integrated Pest Management: Pesticide Problems, Vol.3. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 201–225. https://doi.org/10.1007/978-94-007-7796-5_8
79. Sternberg, E.D., Thomas, M.B., 2017. Insights from agriculture for the management of insecticide resistance in disease vectors. Evol Appl 11, 404–414. https://doi.org/10.1111/eva.12501
80. Sparks, T.C., Nauen, R., 2015. IRAC: Mode of action classification and insecticide resistance management. Pestic Biochem Physiol 121, 122–128. https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2014.11.014
81. Van Leeuwen, T., Dermauw, W., Mavridis, K., Vontas, J., 2020. Significance and interpretation of molecular diagnostics for insecticide resistance management of agricultural pests. Curr Opin Insect Sci 39, 69–76. https://doi.org/10.1016/j.cois.2020.03.006
82. Homem, R.A., Davies, T.G.E., 2018. An overview of functional genomic tools in deciphering insecticide resistance. Current Opinion in Insect Science, Pests and resistance * Behavioural ecology 27, 103–110. https://doi.org/10.1016/j.cois.2018.04.004
83. T.C. Sparks, G.D. Thompson, H.A. Kirst, M.B. Hertlein, J.S. Mynderse, J.R. Turner, T.V. Worden (1999), Fermentation-derived insect control agents: the spinosyns, in: F.R. Hall, J.J. Menn (Eds.), Biopesticides: Use and Delivery, Humana Press, Totowa, NJ, pp. 171–188.
84. V.L. Salgado, T.C. Sparks (2005), The spinosyns: chemistry, biochemistry, mode of action, and resistance, in: L.I. Gilbert, K. Iatrou, S.S. Gill (Eds.), Comprehensive Insect Molecular Science, vol. 6, Control, Elsevier, New York, pp. 137–173.
85. G.D. Crouse, J.E. Dripps, N. Orr, T.C. Sparks, C. Waldron, in: W. Kramer, U.Schirmer (Eds.) (2007), Modern Crop Protection Compounds, vol. 3, Wiley-VCH, Weinheim, pp. 1013–1031.
86. N. Orr, A.J. Shaffner, K. Richey, G.D. Crouse (2009), Novel mode of action of spinosad: receptor binding studies demonstrating lack of interaction with known insecticidal targets, Pestic. Biochem. Physiol. 95 1–5.
87. G.B. Watson, S.W. Chouinard, K.R. Cook, C. Geng, J.M. Gifford, G.D. Gustafson, J.M. Hasler, I.M. Larrinua, T.J. Letherer, J.C. Mitchell, W.L. Pak, V.L. Salgado, T.C. Sparks, G.E. Stilwell (2010), A spinosyn-sensitive Drosophila melanogaster nicotinic acetylcholine receptor identified through chemical induced target site resistance, resistance gene identification, and heterologous expression, Insect Biochem. Mol. Biol. 40, 376–384.
88. Thomas C. Sparks, James E. Dripps, Gerald B. Watson, Doris Paroonagian (2011). Resistance and cross-resistance to the spinosyns – A review and analysis. Pesticide Biochemistry and Physiology 102, 1–10
89. Andrew K. Jones and David B. Sattelle (2010). Diversity of Insect Nicotinic Acetylcholine Receptor Subunits. Part of the Advances in Experimental Medicine and Biology book series (AEMB,volume 683)
90. Sine SM, Engel AG (2006). Recent advances in Cys-loop receptor structure and function. Nature; 440:448-455.

91. Connolly CN, Wafford KA (2004). The Cys-loop superfamily of ligand-gated ion channels: the impact of receptor structure on function. Biochem Soc Trans.; 32:529-534.
92. Changeux JP, Taly A (2008). Nicotinic receptors, allosteric proteins and medicine. Trends Mol Med.; 14:93-102.
93. Green WN, Wanamaker CP (1997). The role of the cystine loop in acetylcholine receptor assembly. J Biol Chem.; 272:20945-20953.
94. Grutter T, de Carvalho LP, Dufresne V et al (2005). Molecular tuning of fast gating in pentameric ligand-gated ion channels. Proc Natl Acad Sci. USA; 102:18207-18212.
95. Corringer PJ, Le Novere N, Changeux JP (2000). Nicotinic receptors at the amino acid level. Annu Rev Pharmacol Toxicol.; 40:431-458.
96. Kao PN, Karlin A (1986). Acetylcholine receptor binding site contains a disulfide cross-link between adjacent half-cystinyl residues. J Biol Chem.; 261:8085-8088.
97. Millar NS, Gotti C (2009). Diversity of vertebrate nicotinic acetylcholine receptors. Neuropharmacology.;56(1):237-46
98. Baylis HA, Sattelle DB, Lane NJ (1996). Genetic analysis of cholinergic nerve terminal function in invertebrates. J Neurocytol.; 25:747-762.
99. Sattelle DB, Jones AK, Sattelle BM et al. (2005) Edit, cut and paste in the nicotinic acetylcholine receptor gene family of Drosophila melanogaster. Bioessays.; 27:366-376.
100. Richards S, Gibbs RA, Weinstock GM et al (2008). The genome of the model beetle and pest Tribolium castaneum. Nature.; 452:949-955.
101. Grauso M, Reenan RA, Culetto E, Sattelle DB. (2002). Novel Putative Nicotinic Acetylcholine Receptor Subunit Genes, Da5, Da6 and Da7, in Drosophila melanogaster Identify a New and Highly Conserved Target of Adenosine Deaminase Acting on RNA-Mediated A-to-I Pre-mRNA Editing. Genetics 160:1519–1533.
102. D.B. Sattelle, A.K. Jones, B.M. Sattelle, K. Matsuda, R. Reenan,
and P.C. Biggin (2005). Edit, cut and paste in the nicotinic acetylcholine receptor gene family of Drosophilamelanogaster. BioEssays 27:366–376
103. Timpe LC, Jan YN, Jan LY. (1988). Four cDNA clones from the Shaker locus of Drosophila induce kinetically distinct A-type potassium currents in Xenopus oocytes. Neuron 1:659–667.
104. Lansdell SJ, Millar NS. (2000). Cloning and heterologous expression of Dalpha4, a Drosophila neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit: identification of an alternative exon influencing the efficiency of subunit assembly. Neuropharmacology 39:2604–2614.
105. Seeburg PH. (2002). A-to-I editing: new and old sites, functions and speculations. Neuron 35:17–20.
106. Hoopengardner B, Bhalla T, Staber C, Reenan R. (2003). Nervous system targets of RNA editing identified by comparative genomics. Science 301:832–836.
107. Chen D, Dang H, Patrick JW. (1998). Contributions of N-linked glycosylation to the expression of a functional alpha7-nicotinic receptor in Xenopus oocytes. J Neurochem 70:349–357.
108. Nishizaki T. (2003). N-glycosylation sites on the nicotinic ACh receptor subunits regulate receptor channel desensitization and conductance. Brain Res Mol Brain Res 114:172–176

109. Thompson, G. D., Dutton, R. & Sparks, T. C (2000). Spinosad - a case study: an example from a natural products discovery programme. Pest Manag. Sci. 56, 696–702.
110. Salgado, V. L (1998). Studies on the mode of action of spinosad: insect symptoms and physiological correlates. Pestic. Biochem. Physiol. 91–102.
111. Salgado, V. L. & Sparks, T. C (2005). 6.5 – The Spinosyns: Chemistry, Biochemistry, Mode of Action, and Resistance. in Comprehensive Molecular Insect Science 137–173.
112. J.E. Dripps, R.E. Boucher, A. Chloridis, C.B. Cleveland, C.V. DeAmicis, L.E. Gomez, D.L. Paroonagian, L.A. Pavan, T.C. Sparks, G.B. Watson, The spinosyn insecticides, in: O. Lopez, J.G. Fernandez-Bolanos (Eds.) (2011), Green Trends in Insect Control, Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, pp. 163–212.
113. M.E. Whalon, D. Mota-Sanchez, R.M. Hollingworth, Analysis of global pesticide resistance in arthropods, in: M.E. Whalon, D. Mota-Sanchez, R.M. Hollingworth (Eds.) (2008), Global Pesticide Resistance in Arthropods, CAB International, Wallingford, UK, pp. 5–31.
114. W. Wang, J. Mo, J. Cheng, P. Zhung, Z. Tang (2006), Selection and characterization of spinosad resistance in Spodoptera exigua (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae), Pest. Biochem. Physiol. 84, 180–187.
115. D. Wang, X. Qiu, X. Ren, F. Niu, K. Wang (2009), Resistance selection and biochemical characterization of spinosad resistance in Heliocverpa armigera (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae), Pest. Biochem. Physiol. 95, 90–94.
116. T. Perry, J.A. McKenzie, P. Batterham (2007), A Da6 knockout strain of Drosophila melanogaster confers a high level of resistance to spinosad, Insect Biochem. Mol. Biol. 37, 184–188.
117. J.-Z. Zhao, Y.-X. Li, H.L. Collins, L. Gusukuma-Minuto, R.F.L. Mau, G.D. Thompson, A.M. Shelton (2002), Monitoring and characterization of diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) resistance to spinosad, J. Econ. Entomol. 95, 430–436.
118. Ju-Chun Hsu, Hai-Tung Feng, Wen-Jer Wu, Scott M. Geib, Ching-hua Mao, John Vontas (2012). Truncated transcripts of nicotinic acetylcholine subunit gene Bda6 are associated with spinosad resistance in Bactrocera dorsalis. Insect Biochemistry and Molecular Biology 42 806-815
119. Enric Ureña, Ana Guillem-Amat, Francisco Couso-Ferrer, Beatriz Beroiz, Nathalia Perera, Elena López-Errasquín, Pedro Castañera, Félix Ortego & Pedro Hernández-Crespo (2019). Multiple mutations in the nicotinic acetylcholine receptor Ccα6 gene associated with resistance to spinosad in medfly. Scientific Reports, https://doi.org/10.1038/s41598-019-38681-w
120. A.H. Sayyed, M. Ahamad, N. Crickmore (2008), Fitness costs limit the development of resistance to indoxacarb and deltamethrin in Heliothis virescens (Lepidoptera: Noctuidae), J. Econ. Entomol. 101 1927–1933.
121. Tijjani, A., Bashir, K. A., Mohammed, I., Muhammad, A., Gambo, A., and Habu, M. (2016). Biopesticides for pests control: a review. J. Biopest. Agric. 3, 6–13.
122. Mazid S, Kalida JC, Rajkhowa RC (2011). A review on the use of biopesticides in insect pest management. Int J Sci Adv Technol 1:169–178
123. Biopesticides. Available online: www.epa.gov/pesticides/biopesticides (accessed on 30 August 2018).

124. Chen (2018), J. Biopesticides: Global Markets to 2022; Report Code CHM029G; BCC Research: Wellesley, MA, USA.
125. Saberi, F.; Marzban, R.; Ardjmand, M.; Pajoum, S.F.; Tavakoli, O. (2020) Optimization of culture media to enhance the ability of local Bacillus thuringiensis var. tenebrionis. J. Saudi Soc. Agric. Sci., 19, 468–475.
126. Jitendra Kumar, Ayyagari Ramlal, Dharmendra Mallick and Vachaspati Mishra (2021). An Overview of Some Biopesticides and Their Importance in Plant Protection for Commercial Acceptance. Plants 2021, 10, 1185. https://doi.org/10.3390/plants10061185
127. Copping LG, Menn JJ (2000). Biopesticides: a review of their action, applications and effi cacy. Pest Manag Sci 56:651–676
128. Gonzalez-Coloma, A.; Reina, M.; Diaz, C.E.; Fraga, B.M.; Santana Meridas, O (2013). Natural Product-Based Biopesticides for Insect Control. In Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering; Elsevier Inc.: Amsterdam, The Netherlands.
129. Magierowicz, K.; Górska-Drabik, E.; Golan, K. (2020) Effects of plant extracts and essential oils on the Inc.behavior of Acrobasis advenella (Zinck.) caterpillars and females. J. Plant Dis. Prot, 127, 63–71.
130. Ali, M.A.; Doaa, S.M.; El-Sayed, H.S.; Asmaa, M.E (2017). Antifeedant activity and some biochemical effects of garlic and lemon essential oils on Spodoptera littoralis (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae). J. Entomol. Zool, 5, 1476–1482.
131. Gurr, G.M.; Thwaite, W.G.; Nicol, H.I. (1999) Field evaluation of the effects of the insect growth regulator (tebufenozide) on entomophagous arthropods and pests of apples. Austr. J. Entomol, 38, 135–140.
132. Gwinn, K.D. Bioactive Natural Products in Plant Disease Control (2018). In Studies in Natural Products Chemistry; Attaur, R., Ed.; Elsevier Inc.: Amsterdam, The Netherlands; Volume 56, pp. 229–246.
133. Parween, T.; Jan, S. (2019) Pesticides and environmental ecology. In Ecophysiology of Pesticides; Parween, T., Jan, S., Eds.; Academic Press: Cambridge, MA, USA; pp. 1–38.
134. Parker, K.M.; Barragán, B.V.; van Leeuwen, D.M.; Lever, M.A.; Mateescu, B.; Sander, M. (2019) Environmental Fate of RNA Interference Pesticides: Adsorption and Degradation of Double-Stranded RNA Molecules in Agricultural Soils. Environ. Sci. Technol, 53, 3027–3036.
135. Mao, Y.B.; Cai, W.J.; Wang, J.W.; Hong, G.J.; Tao, X.Y.; Wang, L.J. (2007); Huang, Y.-P.; Chen, X.-Y. Silencing a cotton bollworm P450 monooxygenase gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol. Nat. Biotechnol, 25, 1307–1313.
136. Luca Ruiu, (2018). Microbial Biopesticides in Agroecosystems. Agronomy, 8, 235; doi:10.3390/agronomy8110235
137. Zimmermann, G. (2007) Review on safety of the entomopathogenic fungi Beauveria bassiana and Beauveria brongniartii. Biocontrol Sci. Technol, 17, 553–596.
138. Zimmermann, G (2007). Review on safety of the entomopathogenic fungus Metarhizium anisopliae. Biocontrol Sci. Technol, 17, 879–920.
139. Sengottayan Senthil-Nathan (2015). A Review of Biopesticides and Their Mode of Action Against Insect Pests. DOI: 10.1007/978-81-322-2056-5_3
140. Clem, R.J.; Passarelli, A.L. Baculoviruses (2013): Sophisticated Pathogens of Insects. PLoS Pathog, 9, e1003729.

141. Arthurs SP, Lacey LA, Fritts R Jr (2005). Optimizing use of codling moth granulovirus: effects of application rate and spraying frequency on control of codling moth larvae in Pacifi c Northwest apple orchards. J Econ Entomol 98:1459–1468
142. Williams, T.; Virto, C.; Murillo, R.; Caballero, P. Covert (2017). infection of insects by baculoviruses. Front. Microbiol, 8, 1337.
143. Lewis, E.E.; Clarke, D.J. (2012) Nematode Parasites and Entomopathogens. In Insect Pathology, 2nd ed.; Vega, F., Kaya, H., Eds.; Academic Press: London, UK; pp. 395–424.
144. Poinar, G.O. Biology and taxonomy of Steinernematidae and Heterorhabditidae (1990). In Entomopathogenic Nematodes in Biological Control; Gaugler, R., Kaya, H.K., Eds.; CRC Press: Boca Raton, FL, USA; pp. 23–62.
145. Roh, J.Y.; Choi, J.Y.; Li, M.S.; Jin, B.R.; Je, Y.H. (2007) Bacillus thuringiensis as a specific, safe, and effective tool for insect pest control. J. Microbiol. Biotechnol, 17, 547–549
146. Castagnola, A.; Stock, S.P (2014). Common virulence factors and tissue targets of entomopathogenic bacterial for biological control of Lepidopteran pests. Insects, 5, 139–166.
147. Cordova-Kreylos, A.L.; Fernandez, L.E.; Koivunen, M.; Yang, A.; Flor Weiler, L.; Marrone, P.G (2013). Isolation and characterization of Burkholderia rinojensis sp. nov., a non-Burkholderia cepacia complex soil bacterium with insecticidal and miticidal activities. Appl. Environ. Microbiol, 79, 7669–7678.
148. Martin, P.A.W.; Gundersen-Rindal, D.; Blackburn, M.; Buyer, J. (2007) Chromobacterium subtsugae sp. nov.,a betaproteobacterium toxic to Colorado potato beetle and other insect pests. Int. J. Syst. Evolut. Microbiol, 57, 993–999
149. Copping, G.L.; Menn, J.J. (2000) Biopesticides: A review of their action, applications and efficacy. Pest Manag. Sci, 56, 651–676.
150. Kirst, H.A. (2010) The spinosyn family of insecticides: Realizing the potential of natural products research. J. Antibiot, 63, 101–111.
151. Kakani, E.G., Zygouridis, N.E., Tsoumani, K.T., Seraphides, N., Zalom, F.G., Mathiopoulos, K.D. (2010). Spinosad resistance development in wild olive fruit fly Bactrocera oleae (Diptera: Tephritidae) populations in California. Pest Manag Sci 66, 447–453. https://doi.org/10.1002/ps.1921
152. Official site of the European Union: https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/active-substances/?event=search.as
153. Arouri, R., Le Goff, G., Hemden, H., Navarro-Llopis, V., M'saad, M., Castañera, P., Feyereisen, R., Hernández-Crespo, P., Ortego, F. (2015). Resistance to lambda-cyhalothrin in Spanish field populations of Ceratitis capitata and metabolic resistance mediated by P450 in a resistant strain. Pest Manag Sci 71, 1281–1291. https://doi.org/10.1002/ps.3924
154. Efthimia Sagri, Martin Reczko, Maria-Eleni Gregoriou, Konstantina T Tsoumani, Nikolaos E Zygouridis, Klelia D Salpea, Frank G Zalom, Jiannis Ragoussis, and Kostas D Mathiopoulos (2014). Olive fly transcriptomics analysis implicates energy metabolism genes in spinosad resistance. BMC Genomics 2014, 15:714 Page 2 of 20 http://www.biomedcentral.com/1471-2164/15/714
155. Simon W. Baxter, Mao Chen, Anna Dawson, Jian-Zhou Zhao, Heiko Vogel, Anthony M. Shelton, David G. Heckel, Chris D. Jiggins (2010). Mis-

Spliced Transcripts of Nicotinic Acetylcholine Receptor α6 Are Associated with Field Evolved Spinosad Resistance in Plutella xylostella (L.) https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000802
156. Alin M. Puinean, Stuart J. Lansdell, Toby Collins, Pablo Bielza, Neil S. Millar (2012). A nicotinic acetylcholine receptor transmembrane point mutation (G275E) associated with resistance to spinosad in Frankliniella occidentalis. https://doi.org/10.1111/jnc.12029
157. Wellington M. Silva, Madeleine Berger, Chris Bass, Martin Williamson, Danielle M.N. Moura, Lílian M.S. Ribeiro, Herbert A.A. Siqueira (2016). Mutation (G275E) of the nicotinic acetylcholine receptor α6 subunit is associated with high levels of resistance to spinosyns in Tuta absoluta (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2016.02.006
158. Christoph T. Zimmer, William T. Garrood, A. Mirel Puinean, Manuela Eckel-Zimmer, Martin S. Williamson, T.G. Emyr Davies, Chris Bass (2016). A CRISPR/Cas9 mediated point mutation in the alpha 6 subunit of the nicotinic acetylcholine receptor confers resistance to spinosad in Drosophila melanogaster. https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2016.04.007
159. Oren, A., Garrity, G.M., (2021). Valid publication of the names of forty-two phyla of prokaryotes. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 71, 005056 https://doi.org/10.1099/ijsem.0.005056.
160. Berdy, J., (2012). Thoughts and facts about antibiotics: where we are now and where we are heading. J. Antibiot. 65, 385–395. https://doi.org/10.1038/ja.2012.27.
161. Zheng Hua Amelia-Yap, Adzzie Shazleen Azman, Sazaly AbuBakar, Van Lun Low (2022). Streptomyces derivatives as an insecticide: Current perspectives, challenges and future research needs for mosquito control. Acta Tropica 229 106381