

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών

«Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας Φυτών»

Εργαστήριο Μοριακής Εντομολογίας

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ
ΤΟΥ ΠΡΑΣΙΝΟΥ ΣΚΩΛΗΚΑ *Helicoverpa armigera*
ΣΤΑ ΠΥΡΕΘΡΙΝΟΕΙΔΗ ΕΝΤΟΜΟΚΤΟΝΑ**

Υπεύθυνος: Αν. Καθηγητής ΙΩΑΝΝΗΣ ΒΟΝΤΑΣ

Μέλη: Επ. Καθηγητής ΚΡΙΤΩΝ ΚΑΛΑΝΤΙΔΗΣ

Αν. Ερευνήτρια ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ ΤΣΑΓΚΑΡΑΚΟΥ

ΚΑΠΑΝΤΑΪΔΑΚΗ ΔΕΣΠΟΙΝΑ

Ηράκλειο, 2010

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	6
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	7
1. Το Έντομο <i>Helicoverpa armigera</i> (Lepidoptera : Noctuidae)	7
1.1. Κατάταξη.....	7
1.2. Μορφολογικά χαρακτηριστικά.....	7
1.3. Γεωγραφική κατανομή.....	9
1.4. Ξενιστές.....	9
1.5. Δυναμική του πληθυσμού.....	10
2. Καταπολέμηση του <i>Helicoverpa armigera</i>	10
3. Χημική Καταπολέμηση.....	11
3.1. Οργανοφωσφορικά.....	11
3.2. Βενζουλουρίες ή ακυλουρίες.....	12
3.3. Σπινουσίνες.....	12
3.4. Καρβαμιδικά.....	12
3.5. Κυκλοδιένια.....	13
3.6. Πυρεθρινοειδή.....	13
4. Η Ανθεκτικότητα Εντόμων στα Εντομοκτόνα.....	15
5. Μηχανισμοί Ανθεκτικότητας στα Εντομοκτόνα.....	16
5.1. Γενικά στοιχεία.....	16
5.2. Μηχανισμοί ανθεκτικότητας στα πυρεθρινοειδή.....	18
5.2.1. Αυξημένη αποτοξικοποίηση στα πυρεθρινοειδή.....	18
5.2.2. Ανθεκτικότητα στόχου στα πυρεθρινοειδή.....	19
6. Ανθεκτικότητα του <i>Helicoverpa armigera</i>	20
6.1. Ανθεκτικότητα του <i>Helicoverpa armigera</i> σε διάφορες κατηγορίες εντομοκτόνων.....	20
6.2. Ανθεκτικότητα του <i>Helicoverpa armigera</i> στα πυρεθρινοειδή εντομοκτόνα.....	22
6.2.1. Παγκόσμιες αναφορές.....	22
6.2.2. Αναφορές από τον ελληνικό χώρο.....	27
7. Αντικείμενο της εργασίας.....	29

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

Διερεύνηση των επιπέδων ανθεκτικότητας σε διάφορες δραστικές ουσίες φυσικών πληθυσμών *Helicoverpa armigera* στην Ελλάδα με κλασικές μεθόδους βιοδοκιμών

A. Επιλογή και Χαρακτηρισμός Ανθεκτικότητας με Κλασικές Μεθόδους Βιοδοκιμών.....	30
A.1. Εισαγωγή.....	30
A.2. Υλικά και Μέθοδοι.....	30
A.2.1. Πληθυσμοί <i>H. armigera</i>	30
A.2.2. Εκτροφή πληθυσμών του <i>H. armigera</i>	31
A.2.3. Επιλογή πληθυσμού με κλασικές βιοδοκιμές.....	32
A.2.4. Προσδιορισμός επιπέδων ανθεκτικότητας επιλεγμένου πληθυσμού στο γ -cyhalothrin με κλασικές βιοδοκιμές.....	33
A.2.5. Επίπεδο ανθεκτικότητας επιλεγμένου πληθυσμού σε τρία επιπλέον φυτοπροστατευτικά σκευάσματα.....	35
A.2.6. Βιοδοκιμές με συνεργιστές.....	36
A.2.7. Υπολογισμός των επιπέδων ανθεκτικότητας.....	38
A.3. Αποτελέσματα.....	38
A.3.1. Επίπεδα ανθεκτικότητας του επιλεγμένου πληθυσμού.....	38
A.3.2. Έλεγχος έμμεσης ή/και πολλαπλής ανθεκτικότητας.....	49
A.3.3. Επίδραση των συνεργιστών στην ανθεκτικότητα.....	41
A.4. Συζήτηση.....	42
B. Προσδιορισμός Ενεργότητας Ενζύμων Αποτοξικοποίησης - εν δυνάμει Βιοχημικής Ανθεκτικότητας στο γ-cyhalothrin	44
B.1. Εισαγωγή	44
B.2. Υλικά και Μέθοδοι	44
B.2.1. Ενζυμικά υποστρώματα και υλικά.....	44
B.2.2. Πληθυσμοί <i>H. armigera</i>	44
B.2.3. Προετοιμασία δειγμάτων	45
B.2.4. Μέτρηση της συγκέντρωσης πρωτεΐνης.....	Error! Bookmark not defined.
B.2.5. Μέτρηση ενεργότητας ενζυμικών συστημάτων	47
B.2.5.1. Εστεράσες	Error! Bookmark not defined.
B.2.5.2. Μεταφοράσες ή τρανσφεράσες της γλουταθειόνης.....	49
B.2.5.3. Μικτής λειτουργίας P450 οξειδάσες ή μονοοξυγενάσες	50
B.3. Αποτελέσματα.....	51
B.3.1. Ενεργότητα εστερασών.....	51
B.3.2. Ενεργότητα τρανσφερασών της γλουταθειόνης	53
B.3.3. Ενεργότητα μικτής λειτουργίας P450 οξειδασών ή μονοοξυγενασών	54

B.4. Συζήτηση	55
---------------------	----

Γ. Έλεγχος Ενεργότητας Εστερασών με μη Αποδιατακτικό Πήκτωμα Ακρυλαμίδης (εγγενής ηλεκτροφόρηση, NATIVE-PAGE)	56
--	-----------

Γ.1. Εισαγωγή	56
---------------------	----

Γ.2. Υλικά και Μέθοδοι.....	56
-----------------------------	----

Γ.3. Αποτελέσματα	57
-------------------------	----

Γ.4. Συζήτηση	58
---------------------	----

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

Μοριακή ανάλυση ανθεκτικότητας στόχου

3.1. Εισαγωγή	59
---------------------	----

3.2. Υλικά και Μέθοδοι	59
------------------------------	----

3.2.1. Πληθυσμοί <i>H. armigera</i>	59
---	----

3.2.2. Απομόνωση ολικού RNA και σύνθεση μονόκλωνου cDNA	59
---	----

3.2.2.1. Απομόνωση ολικού RNA	59
-------------------------------------	----

3.2.2.2. Σύνθεση μονόκλωνου συμπληρωματικού DNA.....	61
--	----

3.2.3. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) για την ανάκτηση και ενίσχυση τμήματος του γονιδίου στόχου.....	62
--	----

3.2.4. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης (1.0%).....	Error! Bookmark not defined.
--	-------------------------------------

3.2.5. Εξαγωγή DNA από πήκτωμα αγαρόζης με εμπορικό kit	66
---	----

3.2.6. Αντίδραση σύνδεσης οχήματος κλωνοποίησης και ενθέματος που καταλύεται από το ένζυμο DNA λιγάση του βακτηριοφάγου T4	67
--	----

3.2.7. Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων	68
--	----

3.2.8. Έλεγχος με μαζικό τρόπο (σάρωση) μονών αποικιών για τον εντοπισμό κλώνων που φέρουν το ένθεμα με τη μέθοδο αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR-screening of single colonies)	69
--	----

3.2.9. Απομόνωση και καθαρισμός πλασμιδιακού DNA από υγρή βακτηριακή καλλιέργεια με εμπορικό kit (QIAPREP Spin Miniprep Kit Protocol).....	70
--	----

3.2.10. Πέψη πλασμιδιακού DNA με τη χρήση ενζύμων περιορισμού	71
---	----

3.2.11. Ανάλυση νουκλεοτιδικής αλληλουχίας για την αναγνώριση της ταυτότητας του γονιδίου που κλωνοποιήθηκε	72
---	----

3.3. Αποτελέσματα.....	72
3.4. Συζήτηση.....	76
ΓΕΝΙΚΗ ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	77

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Μελετήθηκε η ανθεκτικότητα του *Helicoverpa armigera* στο πυρεθρινοειδές σκεύασμα γ-cyhalothrin. Χρησιμοποιήθηκε πληθυσμός στον οποίο είχε παρατηρηθεί κάποιο δυναμικό ανάπτυξης ανθεκτικότητας στο συγκεκριμένο εντομοκτόνο. Η εργαστηριακή επιλογή του συνεχίστηκε για δύο επιπλέον γενεές, ώστε να διερευνηθούν καλύτερα οι μηχανισμοί ανθεκτικότητας. Διερευνήθηκαν τα επίπεδα ανθεκτικότητας που αυτός παρουσίαζε στο εντομοκτόνο επιλογής με τη χρήση κλασικών βιοδοκιμών, τα αποτελέσματα των οποίων έδειξαν μια σημαντική αύξηση των επιπέδων ανθεκτικότητας (RR: 44).

Η εφαρμογή των συνεργιστικών ουσιών που ακολούθησε, ναι μεν επέδρασε στον πληθυσμό που μελετήθηκε, όμως η επίδραση αυτή δε φάνηκε να είναι καθολική. Εν συνεχεία ελέχθησαν με βιοχημικές μεθόδους τα ενζυμικά συστήματα που προκαλούν αποτοξικοποίηση των εντομοκτόνων (εστεράσες, P450 οξειδάσες και μεταφοράσες της γλουταθειόνης). Δε βρέθηκαν σημαντικές διαφορές στην ενεργότητα των ενζύμων αποτοξικοποίησης μεταξύ ανθεκτικού και ευαίσθητου στελέχους.

Τέλος, αναλύθηκε η αλληλουχία του υπομοριακού στόχου των πυρεθρινοειδών που είναι το κανάλι μεταφοράς ιόντων νατρίου, προκειμένου να εντοπισθούν διαφοροποιήσεις (μεταλλαγές) που να σχετίζονται με το φαινότυπο της ανθεκτικότητας. Ωστόσο, δε βρέθηκαν τέτοιες μεταλλαγές.

Τα αποτελέσματα της μελέτης μας δείχνουν ότι η ανθεκτικότητα του στελέχους που μελετήθηκε, δεν εξηγείται ούτε από τα ένζυμα αποτοξικοποίησης, ούτε από αλλαγή του στόχου. Φυσιολογικές διαφοροποιήσεις του εντόμου που μπορεί να μειώνουν την είσοδο είτε να αυξάνουν την απέκκριση του εντομοκτόνου, είναι πιθανόν να ευθύνονται για την ανθεκτικότητα.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Το Έντομο *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae)

1.1. Κατάταξη

Το έντομο *Helicoverpa armigera* (Hübner) ανήκει στην υποοικογένεια Heliiothinae της οικογένειας Noctuidae των Λεπιδοπτέρων. Η υποοικογένεια Heliiothinae περιλαμβάνει 400 είδη μερικά εκ των οποίων θεωρούνται από τα πιο βλαβερά έντομα των καλλιεργούμενων φυτών ανά τον κόσμο. Τα είδη του *Helicoverpa* και *Heliiothis* είναι τα πιο σημαντικά. Η γενική ονομασία *Helicoverpa* έχει πρόσφατα γίνει αποδεκτή στην επιστήμη της συστηματικής (Mitter et al. 1993). Από τα κύρια είδη εντόμων εχθρών μόνο το *Helicoverpa virescens* παραμένει στο γένος *Heliiothis*. Ωστόσο, για την ευκολία της περιγραφής στη διεθνή βιβλιογραφία, χρησιμοποιείται το όνομα *Heliiothis* που αναφέρεται και στα δύο γένη. Περισσότερα από 80 είδη έχουν αναγνωρισθεί διεθνώς στο γένος *Heliiothis* από τα οποία τέσσερα, το *H. armigera*, το *H. zea*, το *H. punctigera* και το *H. virescens* είναι τα πιο σημαντικά σε σχέση με τις ζημιές που προκαλούν στις καλλιέργειες (Fitt 1989).

1.2. Μορφολογικά χαρακτηριστικά

Το ενήλικο του *H. armigera* έχει μήκος σώματος 14-18 mm, άνοιγμα πτερύγων 35-40 mm και μορφή τυπική των ειδών της οικογένειας Noctuidae (Εικόνα 1). Το χρώμα του σώματος γενικά ποικίλει από κίτρινο μέχρι κιτρινοπράσινο. Οι πρόσθιες πτέρυγες είναι καστανοκίτρινες με μία φαρδιά κυματοειδή ταινία σκοτεινότερου χρώματος, εγκάρσια και προς το κορυφαίο μέρος τους Όλα τα ενήλικα του εντόμου παρουσιάζουν φυλετικό διμορφισμό, ο οποίος εκδηλώνεται με τον διαφορετικό χρωματισμό των πτερύγων μεταξύ των αρσενικών (τεφροπράσινα) και θηλυκών (καστανά ή καστανοκίτρινα) ατόμων.



Εικόνα 1. Ενήλικο *H. armigera*

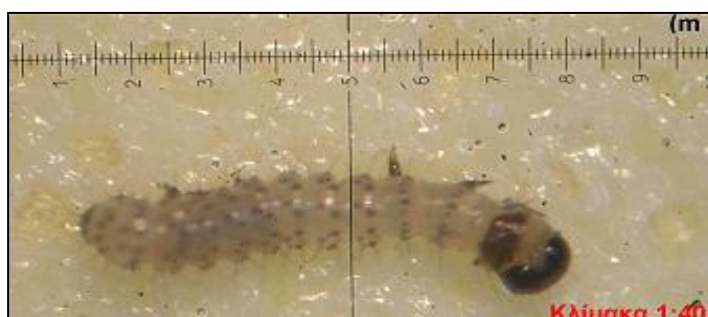
Το αυγό είναι ημισφαιρικό, έχει διάμετρο 0,5 mm περίπου και χρώμα κιτρινόλευκο λαμπερό στην αρχή και σκούρο καστανό λίγο πριν την εκκόλαψη (Εικόνα 2) (Toguebaye and Couilloud 1982, King 1994, Σταμόπουλος 1999).



Εικόνα 2. Αυγά *H. armigera*

Η νεοεκκολαφθείσα προνύμφη είναι κιτρινόλευκη προς καστανέρυθη. Η κεφαλική κάψα και τα θωρακικά πόδια είναι σκούρα καστανά προς μαύρα όπως επίσης και τα αναπνευστικά τρήματα (Εικόνα 3).

Φέρει 5 ζεύγη ψευδοπόδων στην κοιλιακή επιφάνεια των 3^{ου}-6^{ου} και 10^{ου} κοιλιακού τμήματος. Καθώς μεγαλώνει, προοδευτικά αλλάζει το χρώμα της. Κατά μήκος



Εικόνα 3. Προνύμφη *H. armigera*

του σώματός της υπάρχει στη ράχη μια σκοτεινόχρωμη ταινία.

(Toguebaye and Couilloud 1982, Sannino et al. 1995). Γενικά ο χρωματισμός της παρουσιάζει πολύ μεγάλη ποικιλία, από το ανοιχτό πρασινοκίτρινο μέχρι το υποκαστανό ή ακόμη και το ανοιχτό μαύρο (Parsons 1939, Toguebaye and Couilloud 1982). Ο τελικός της χρωματισμός φαίνεται να εξαρτάται από το είδος της τροφής που καταναλίσκει (Εικόνα 4) (King 1994, Σταμόπουλος 1999). Η πλήρως ανεπτυγμένη προνύμφη, μετά από συνήθως 5 με 6 εκδύσεις, φτάνει σε μήκος τα 35-42 mm.



Εικόνα 4. Προνύμφες *H. armigera*

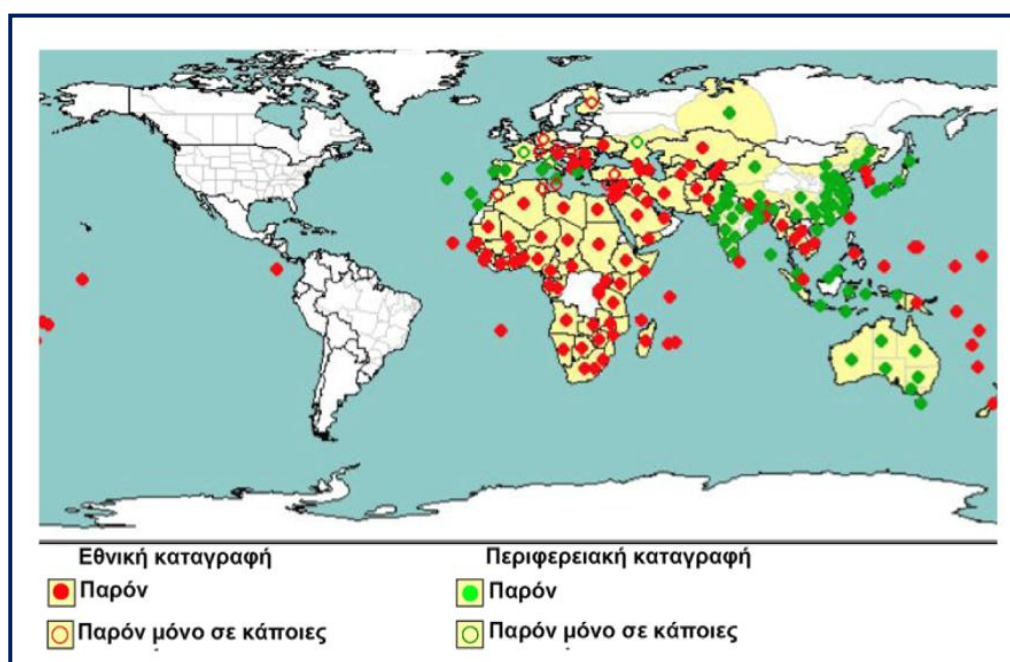
Η νύμφη είναι μαλακή και πρασινωπή κατά το σχηματισμό της, γρήγορα σκληρύνεται πλήρως και μέσα σε 24 ώρες γίνεται ερυθροκάστανη (Reed 1965). Έχει λεία επιφάνεια και το μήκος της είναι 14-20 mm (Parsons 1939) (Εικόνα 5).



Εικόνα 5. Νύμφη *H. armigera*

1.3. Γεωγραφική κατανομή

Η γεωγραφική κατανομή του *H. armigera* φαίνεται στην Εικόνα 6. Οι πληθυσμοί του εμφανίζουν ευρεία κατανομή σε τροπικές και υποτροπικές περιοχές του παλαιού κόσμου, στην Αφρική, στην Ασία, στην Αυστραλία, στα νησιά του Ειρηνικού και στην Νέα Ζηλανδία καθώς επίσης και σε περιοχές της Μεσογείου και της Μέσης Ανατολής (EPPO/CABI 1997). Συγκεκριμένα, στην ευρωπαϊκή ήπειρο το *H. armigera* εμφανίζει ευρείας μορφή κατανομή στην Ελλάδα, Βουλγαρία, Πορτογαλία, Ρουμανία και Ισπανία ενώ στην Κύπρο, Γαλλία, Ουγγαρία και Ιταλία οι πληθυσμοί του έχουν περιορισμένη κατανομή (EPPO 2006).



Εικόνα 6. Γεωγραφική κατανομή του *H. armigera* (πηγή: EPPO 2006)

1.4. Ξενιστές

Το *H. armigera* είναι ένα σημαντικό έντομο-εχθρός, καθώς οι προνύμφες του μπορούν να τραφούν πάνω σε μια μεγάλη ποικιλία οικονομικά σημαντικών καλλιεργειών (Pearson 1958, Zalucki et al. 1986, 1994, King 1994, Fitt 1989). Έχει καταγραφεί παγκοσμίως ότι προσβάλλει 60 διαφορετικές καλλιέργειες και 67 διαφορετικά είδη αυτοφυών φυτών, ενώ θεωρείται ένας από τους πιο σημαντικούς εχθρούς του βαμβακιού (Reed and Pawar 1982). Η σπουδαιότητα του *H. armigera* ως εντόμου-εχθρού προκύπτει από μια ομάδα τεσσάρων χαρακτηριστικών της φυσιολογίας, της συμπεριφοράς και

της οικολογίας του. Αυτά είναι η πολυφαγία, η μεγάλη κινητικότητα, η μεγάλη αναπαραγωγική ικανότητα και η είσοδος σε προαιρετική διάπαυση στο στάδιο της νύμφης (Fitt 1989).

1.5. Δυναμική του πληθυσμού

Ο αριθμός των γενεών του *H. armigera*, σε όλο το γεωγραφικό εύρος εξάπλωσής του δεν είναι συνήθως σταθερός, ποικίλει και επηρεάζεται άμεσα από τη θερμοκρασία, τη διαδοχή και την καταλληλότητα των φυτών ξενιστών του (Reed 1965, Roome 1975, Wardhaugh et al. 1980). Στα περισσότερα υποτροπικά και εύκρατα καλλιεργητικά συστήματα τρεις με πέντε γενεές είναι περισσότερο συνήθεις (Fitt 1989).

Στην Ελλάδα, τα ενήλικα της πρώτης γενεάς εμφανίζονται τέλη Απριλίου με αρχές Μαΐου από τα κελιά νύμφωσης του διαχειμάζοντα πληθυσμού και γεννούν τα αυγά τους σε άλλες εκτός βαμβακιού καλλιέργειες, όπως ο ηλίανθος, η τομάτα, το καλαμπόκι και το σόργο. Το βαμβάκι προσβάλλεται από τις προνύμφες της δεύτερης γενεάς γύρω στα μέσα Ιουνίου και η προσβολή συνεχίζεται σε όλη την καλλιεργητική περίοδο με την διαδοχή συνήθως άλλων δύο ή τριών γενεών (Τόλης 1986, EPPO/CABI 1997, Σταμόπουλος 1999).

2. Καταπολέμηση του *Helicoverpa armigera*

Το *Helicoverpa armigera* αντιμετωπίζεται σε μεγάλη έκταση με διάφορους τρόπους. Οι σπουδαιότεροι είναι η εφαρμογή καλλιεργητικών μέτρων, η καλλιέργεια ποικιλιών που αντέχουν τη προσβολή, οι γενετικοί μέθοδοι, η βιολογική και η χημική καταπολέμηση.

Σχετικά με τη χρησιμοποίηση φυτών-παγίδων, με τη μέθοδο αυτή, το έντομο γεννάει τα αυγά του σε καλλιέργειες που προτιμάει περισσότερο από το βαμβάκι, οι οποίες στη συνέχεια καταστρέφονται για να μειωθούν έτσι οι προνύμφες. Για να είναι όμως επιτυχημένη η συγκεκριμένη μέθοδος, θα πρέπει το στάδιο της ανταγωνιστικής καλλιέργειας που ελκύει τα ακμαία για ωοτοκία, να συμπίπτει με το στάδιο του βαμβακόφυτου (Τόλης 1986).

Οι φυσικοί εχθροί που υπάρχουν για τη βιολογική καταπολέμηση του εντόμου, πολλές φορές δεν επιφέρουν το

επιθυμητό αποτέλεσμα και ιδιαίτερα εκεί όπου χρησιμοποιούνται εντομοκτόνα τα οποία περιορίζουν πολύ τα παράσιτα και τα αρπακτικά.

Η χημική καταπολέμηση είναι αποτελεσματική κυρίως στα νεαρά στάδια. Για αυτό το λόγο η συχνή και συστηματική παρατήρηση έτσι ώστε να μη ξεπεράσει το έντομο τα αρχικά στάδια του κύκλου ζωής του, αποτελεί τη βάση στην αντιμετώπισή του με χημικά μέσα. Αφού γίνουν οι επεμβάσεις με τα διάφορα εντομοκτόνα, θα πρέπει οπωσδήποτε να γίνεται παρατήρηση και να επαναλαμβάνεται η εφαρμογή του εκάστοτε εντομοκτόνου, εφόσον η προσβολή εξακολουθεί να βρίσκεται πάνω από το οικονομικό κόστος (Τόλης 1986).

3. Χημική Καταπολέμηση

Για την καταπολέμηση του εντόμου χρησιμοποιούνται εντομοκτόνα όπως τα οργανοφωσφορικά, οι βενζουλουρίες ή ακουλουρίες, οι σπινοσίνες, τα καρβαμιδικά, τα κυκλοδιένια και τα πυρεθρινοειδή που χρησιμοποιούνται για την προστασία των καλλιεργειών από το έντομο. Η δράση των περισσότερων εντομοκτόνων εντοπίζεται στο νευρικό σύστημα.

3.1. Οργανοφωσφορικά

Τα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα χαρακτηρίζονται από υψηλή εντομοκτόνο δράση, έχουν ευρύ φάσμα δράσης και μικρή υπολειμματική διάρκεια. Ο βιοχημικός μηχανισμός δράσης τους είναι η μη αναστρέψιμη παρεμπόδιση του ενζύμου ακετυλοχολινεστεράση (AChE, acetylcholine esterase inhibitors), το οποίο είναι το βασικό ένζυμο του κεντρικού νευρικού συστήματος των αρθροπόδων εντόμων. Τα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα δεσμεύονται στο ενεργό κέντρο της ακετυλοχολινεστεράσης αναστέλλοντας έτσι τη λειτουργία της. Η ακετυλοχολινεστεράση καταλύει τη μετατροπή της ακετυλοχολίνης σε χολίνη, οπότε διακόπτεται η μεταφορά μηνυμάτων, προκαλείται υπέρμετρη συσσώρευση ακετυλοχολίνης, προκαλώντας έτσι πληθώρα νευρομεταδόσεων στους νευρώνες του κεντρικού νευρικού συστήματος, με συνέπεια το διαρκή νευρικό ερεθισμό, εν συνεχεία την παράλυση του νευρικού συστήματος και τέλος το θάνατο των εντόμων (Ζιώγας και Μάρκογλου 2007).

3.2. Βενζουλουρίες ή ακυλουρίες

Οι βενζουλουρίες ή ακυλουρίες παρεμβαίνουν ανασταλτικά στη βιοσύνθεση της χιτίνης με αποτέλεσμα την παρεμπόδιση σχηματισμού νέου δερματοσκελετού κατά την έκδυση και μετάβαση του εντόμου από το ένα στάδιο στο άλλο. Η δράση αυτή έχει ως αποτέλεσμα τη διακοπή της εξέλιξης των προνυμφικών σταδίων ή της μετάβασης στο στάδιο της νύμφης και της μεταμόρφωσης σε ακμαία και τελικά το θάνατο των εντόμων (Ζιώγας και Μάρκογλου 2007).

3.3. Σπινουσίνες

Οι σπινουσίνες είναι δευτερογενείς μεταβολίτες του ακτινομύκητα *Saccharopolyspora spinosa*. Ως προς τον βιοχημικό μηχανισμό δράσης, έχει βρεθεί ότι οι σπινουσίνες προσκολλώνται σε πρωτεϊνικές υπομονάδες των υποδοχέων της ακετυλοχολίνης και δευτερευόντως στους υποδοχείς του γ-αμινοβουτυρικού οξέος (GABA). Αποτέλεσμα της δράσης αυτής είναι η διατάραξη της κανονικής μετάδοσης των νευρικών σημάτων (Ζιώγας και Μάρκογλου 2007).

3.4. Καρβαμιδικά

Τα καρβαμιδικά εντομοκτόνα, είναι παράγωγα της φυσοστιγμίνης ή εσερίνης, ενός αλκαλοειδούς με ισχυρή αντιχολινεστερασική δράση, που βρίσκεται στους καρπούς του φυτού *Physostigma venenosum*. Παρουσιάζουν υψηλή δραστικότητα δρώντας κατά κανόνα ως εντομοκτόνα επαφής και στομάχου, ενώ τα περισσότερα έχουν διασυστηματική κίνηση. Παρουσιάζουν άμεση δράση στο νευρικό σύστημα και προκαλούν ταχεία και απότομη πτώση των εντόμων (knock down effect). Ο βιοχημικός μηχανισμός δράσης τους, είναι ανάλογος των οργανοφωσφορικών, με δράση στην ακετυλοχολινεστεράση. Η διαφορά έγκειται στο ότι η παρεμπόδιση της χολινεστεράσης από τα καρβαμιδικά είναι αναστρέψιμη (Ζιώγας και Μάρκογλου 2007).

3.5. Κυκλοδιένια

Τα κυκλοδιένια αποτελούν υποομάδα των οργανοχλωριωμένων εντομοκτόνων, σε αντίθεση όμως με αυτά προσκολλώνται σε πρωτεϊνικές υπομονάδες του μετασυναπτικού υποδοχέα του νευροδιαβιβαστή GABA (GABA-gated chloride channel antagonists), ο οποίος ελέγχει το άνοιγμα των συζευγμένων διαύλων ιόντων χλωρίου (Cl^-) στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Αποτέλεσμα της δράσης αυτής, είναι η μη προσκόλληση του νευροδιαβιβαστή GABA και η παρεμπόδιση της εισόδου ιόντων Cl^- στους μετασυναπτικούς νευράξονες (Ζιώγας και Μάρκογλου 2007).

3.6. Πυρεθρινοειδή

Τα πυρεθρινοειδή ή συνθετικές πυρεθρίνες αποτελούν την τέταρτη γενιά συνθετικών οργανικών εντομοκτόνων. Πρόκειται για ενώσεις παράγωγα της φυσικής πυρεθρίνης I που περιλαμβάνεται από τις ταξιανθίες του φυτού *Tanacetum* (*Chrysanthemum*, *Pyrethrum*) *cinerariaefolium*, γνωστό ως πύρεθρο.

Η ώθηση στην ανακάλυψη των χημικών αυτών ουσιών προήλθε από τις καλές φυσικές, χημικές, βιολογικές και τοξικολογικές ιδιότητες των φυσικών πυρεθρινών κατά τη χρησιμοποίησή τους ως εντομοκτόνα οικιακής χρήσης.

Τα πυρεθρινοειδή εντομοκτόνα χαρακτηρίζονται από τις καλές ιδιότητες των φυσικών πυρεθρινών και επιπλέον παρουσιάζουν μεγαλύτερη φωτοσταθερότητα, ιδιότητα που τους προσδίδει ικανή υπολειμματική διάρκεια. Έχουν πολύ μεγάλη εντομοτοξική δράση, ιδιότητα που τους επιτρέπει τη μείωση των δόσεων και του αριθμού των επεμβάσεων. Στον άνθρωπο διασπώνται πολύ σύντομα προς μη τοξικά παράγωγα και έτσι είναι πρακτικά ακίνδυνα. Παρόλο που διακρίνονται από μεγάλη λιποδιαλυτότητα και είναι σχεδόν αδιάλυτα στο νερό, δεν παρουσιάζουν το πρόβλημα της βιοσυσσώρευσης. Όμως, παρά τα πολλά πλεονεκτήματα των πυρεθρινοειδών, οι χημικές αυτές ουσίες είναι επικίνδυνες για τα ψάρια, είναι ισχυρώς μελισσοτοξικές και οι περισσότερες από αυτές επηρεάζουν την ωφέλιμη εντομοπανίδα (Ζιώγας και Μάρκογλου 2007).

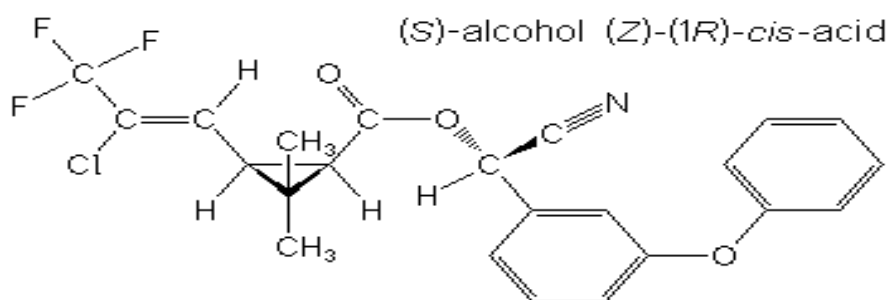
Κατατάσσονται ανάμεσα στα εντομοκτόνα επαφής και στομάχου, ενώ μερικά από αυτά δρουν και ως ασφυκτικά. Χαρακτηρίζονται από ευρύ φάσμα δράσης εναντίον πολλών ειδών εντόμων. Από άποψη

χημικής δομής πρόκειται για εστέρες του χρυσανθεμικού οξέος, κύριου συστατικού των φυσικών πυρεθρινών I και II, ή παραγώγων του με διάφορες αλκοόλες (Ζιώγας και Μάρκογλου 2007).

Η εντομοτοξική δράση των συνθετικών πυρεθρινών είναι ακαριαία (knockdown effect). Η δράση τους εντοπίζεται στο νευρικό σύστημα των εντόμων. Ο βιοχημικός μηχανισμός δράσης των πυρεθρινοειδών έγγειται στην παρεμπόδιση της μετάδοσης των νευρικών σημάτων προσυναπτικά. Συγκεκριμένα, προσκολλώνται στις υπομονάδες των διαύλων ιόντων νατρίου (Na^+), στις μεμβράνες των τελικών κλώνων του νευράξονα προκαλώντας παρατεταμένο άνοιγμα των διαύλων, με αποτέλεσμα την απώλεια ιόντων και την διατάραξη της ευαίσθητης ισορροπίας μεταξύ των ιόντων Na^+ και K^+ στο περιβάλλον των νευρικών κυττάρων (Ζιώγας και Μάρκογλου 2007).

Φαίνεται όμως, ότι τα πυρεθρινοειδή επηρεάζουν και άλλους διαύλους ιόντων, όπως του χλωρίου (Cl^-), που ενεργοποιούνται από τον νευροδιαβιβαστή GABA, και του ασβεστίου (Ca^{+2}). Η γρήγορη κατάρριψη των ατόμων οφείλεται στη γρήγορη μυϊκή τους παράλυση. Αυτή η ιδιότητα των πυρεθρινοειδών εξαρτάται από την πολικότητα των μορίων τους. Μεγαλύτερη πολικότητα συνεπάγεται ισχυρότερη ικανότητα κατάρριψης, που πιθανόν να οφείλεται στην ταχύτερη διεισδυτική ικανότητα των πολικών πυρεθρινοειδών διαμέσου της εφυμενίδας (cuticula) στην αιμολέμφο, με συνέπεια ταχύτερη άφιξη στους νευρικούς ιστούς (Ζιώγας και Μάρκογλου 2007).

Το γ -cyhalothrin είναι μη διασυστηματικό εντομοκτόνο επαφής και στομάχου και παρουσιάζει απωθητικές ιδιότητες. Χαρακτηρίζεται από ταχεία (knockdown) δράση και μεγάλη υπολειμματική διάρκεια. Χρησιμοποιείται στη φυτοπροστασία για την καταπολέμηση μασσητικών και μυζητικών εντόμων, όπως αφίδων, θριπών, προνυμφών λεπιδοπτέρων, κολεοπτέρων σε πολλές καλλιέργειες (Ζιώγας και Μάρκογλου 2007).



Εικόνα 7. Χημικός τύπος γ -cyhalothrin

4. Η Ανθεκτικότητα Εντόμων στα Εντομοκτόνα

Η ανθεκτικότητα είναι ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα στην προσπάθεια ελέγχου των επιβλαβών για τη γεωργία φυτοπαρασίτων. Είναι κληρονομούμενη ιδιότητα και ορίζεται ως η ικανότητα ενός πληθυσμού να επιβιώνει μετά από έκθεση σε δόσεις δραστικής ουσίας που κανονικά θα ήταν θανατηφόρες. Πριν την εφαρμογή ενός φυτοπροστατευτικού προϊόντος σε μια περιοχή, ο πληθυσμός του στοχευόμενου φυτοπαρασίτου είναι ετερογενής, δηλαδή στο σύνολο του πληθυσμού απαντούν ευαίσθητα και ανθεκτικά άτομα. Με την πίεση της επιλογής επιλέγονται τα ανθεκτικά γονίδια ενώ τα ευαίσθητα θανατώνονται, με αποτέλεσμα η συχνότητα των γονοτύπων που δεν επηρεάζονται από την έκθεση στο φυτοπροστατευτικό προϊόν να αυξάνει και να αλλάζει η κατανομή του πληθυσμού. Με αυτόν τον τρόπο, με την πάροδο των γενεών, παρατηρείται η μετατροπή αρχικά ευπαθών πληθυσμών σε ανθεκτικούς (Βόντας κ.α. 2007).

Στοιχεία που την ευνοούν είναι το υψηλό αναπαραγωγικό δυναμικό των εντόμων, ο σύντομος βιολογικός τους κύκλος, ο μεγάλος αριθμός γενεών ανά έτος και η εγγενής αναπαραγωγή που επιτρέπει τους ανασυνδυασμούς του γενετικού υλικού (Ζιώγας και Μάρκογλου 2007).

Για την αντιμετώπιση της ανθεκτικότητας χρειάζεται λεπτομερής επιστημονική προσέγγιση. Απαιτούνται μελέτες τόσο στο εργαστήριο όσο και στον αγρό για την κατανόηση της ανθεκτικότητας, των τρόπων αντιμετώπισής της και την αξιολόγηση του μεγέθους του κινδύνου εμφάνισής της. Απαιτείται προσδιορισμός των παραμέτρων της, όπως του επιπέδου ανθεκτικότητας, της κατανομής του πληθυσμού, της ύπαρξης διασταυρωτής ανθεκτικότητας, των βιοχημικών μηχανισμών ανθεκτικότητας, του γενετικού ελέγχου της ανθεκτικότητας και της προσαρμοστικότητας των ανθεκτικών ατόμων σε σύγκριση με τα αρχικά ευαίσθητα άτομα του πληθυσμού. Απαραίτητη προϋπόθεση για την αντιμετώπισή της είναι η έγκαιρη διάγνωσή της και η παρακολούθηση των πληθυσμών για τον έλεγχο της κατανομής των ανθεκτικών γονιδίων (Ζιώγας και Μάρκογλου 2007).

Η διαπίστωση και η μέτρησή της γίνεται αρχικά με βιοδοκιμές που όμως απαιτούν πολύ χρόνο και συχνά αποτυγχάνουν να αποκαλύψουν με ασφάλεια το πρόβλημα. Στις περιπτώσεις που οι μηχανισμοί ανθεκτικότητας έχουν χαρακτηρισθεί σε βιοχημικό ή

μοριακό επίπεδο, αναπτύσσονται απλές τεχνικές (διαγνωστικά τεστ ενζυμικής ενεργότητας ή διαγνωστική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης - PCR), που αναγνωρίζουν με ταχύτητα και ασφάλεια τις μεταλλαγές ανθεκτικότητας ακόμη και αν αυτές είναι σε πολύ μικρές συχνότητες, με αποτέλεσμα τη δυνατότητα εφαρμογής διορθωτικών κινήσεων στη στρατηγική της φυτοπροστασίας για την αποφυγή απωλειών στη γεωργική παραγωγή και τη διατήρηση της αποτελεσματικότητας των φυτοπροστατευτικών προϊόντων (Βόντας κ.α 2007).

Η αντιμετώπιση της ανθεκτικότητας εστιάζεται στον περιορισμό της επιλεκτικής πίεσης των εντομοκτόνων. Για να επιτευχθεί αυτό απαιτείται ρύθμιση της εφαρμοζόμενης δόσης των εντομοκτόνων και του αριθμού των επεμβάσεων, χρησιμοποίηση εντομοκτόνων χαμηλής υπολειμματικής διάρκειας, χρησιμοποίηση συνεργιστικών ουσιών, εφαρμογή τοπικών επεμβάσεων, διατήρηση καταφυγίων καθώς και ορθή με επιστημονική βάση, εναλλαγή εντομοκτόνων.

5. Μηχανισμοί Ανθεκτικότητας στα Εντομοκτόνα

5.1. Γενικά στοιχεία

Τα έντομα έχουν εξελίξει διάφορους φυσικούς και χημικούς μηχανισμούς που τους επιτρέπουν να εμφανίζουν διάφορους τύπους ανθεκτικότητας στην επίδραση των εντομοκτόνων.

Αναφορικά με τα παραπάνω, τα έντομα έχουν αναπτύξει έναν πρώτο τύπο ανθεκτικότητας ο οποίος καλείται φυσιολογική ή ηθολογική ανθεκτικότητα και περιλαμβάνει επιδερμικές διαφοροποιήσεις ή/και αλλαγές στην συμπεριφορά του εντόμου. Η ανάπτυξη αυτής της μορφής ανθεκτικότητας έχει διπλό ρόλο και στοχεύει είτε στον παρεμπόδισμό της εισόδου της εντομοκτόνου ουσίας, είτε στην αύξηση του ρυθμού απέκκρισής της.

Ένας δεύτερος μηχανισμός ανθεκτικότητας και ο οποίος αποτελεί τη δεύτερη γραμμή άμυνας, είναι η βιοχημική ανθεκτικότητα, η οποία συνίσταται από ένζυμα που μεταβολίζουν τα εντομοκτόνα προτού αυτά φτάσουν στους στόχους τους. Ποσοτικές αλλαγές μελών της οικογένειας και σπανιότερα ποιοτικές διαφοροποιήσεις, ευθύνονται για τη μειωμένη ευαισθησία των

εντόμων (Scott 1999, Van Leeuwen et al. 2005). Βασικά ένζυμα της βιοχημικής ανθεκτικότητας είναι οι εστεράσες – καρβοξυλεστεράσες (Esterases), οι μικτής λειτουργίας P450 οξειδάσες (Cytochrome P450s) και οι μεταφοράσες της γλουταθειόνης (Glutathione-S-transferases) (Βόντας κ. α. 2007).

Οι εστεράσες (καρβοξυλεστεράσες) είναι μια μεγάλη οικογένεια πρωτεϊνών, μέλη της οποίας δεσμεύουν και κατακρατούν εντομοκτόνα μόρια στον εξωκυττάριο χώρο υδρολύοντας εστερικούς δεσμούς (Hemingway and Karunaratne 1998). Οι εστεράσες προκαλούν ανθεκτικότητα σε όλες σχεδόν τις ομάδες εντομοκτόνων, συνηθέστερα όμως στα οργανοφωσφορικά και τα καρβαμιδικά. Υπάρχουν περιπτώσεις όπου η ανθεκτικότητα δημιουργείται εξαιτίας ποιοτικής διαφοροποίησης εστερασών, ως αποτέλεσμα επιλογής ενζύμων με αυξημένη καταλυτική ικανότητα για τα εντομοκτόνα μόρια. Συνήθως όμως η ανθεκτικότητα οφείλεται σε επιλογή ατόμων που διαθέτουν μεγάλες ποσότητες της πρωτεΐνης (Vontas et al. 2000, Kim et al. 2004).

Μια άλλη σημαντική οικογένεια γονιδίων που προκαλεί βιοχημική ανθεκτικότητα είναι οι μικτής λειτουργίας P450 οξειδάσες ή μονοοξυγενάσες. Πρόκειται για μικροσωμικές αιμοπρωτεΐνες που καταλύουν την οξειδωτική διάσπαση των εντομοκτόνων (Scott 1999). Ανθεκτικότητα αναφέρεται σε όλες σχεδόν τις ομάδες εντομοκτόνων και συχνά έχουν ευρύ χαρακτήρα (έμμεση-πολλαπλή ανθεκτικότητα), αφού ορισμένες P450 οξειδάσες έχουν την ικανότητα να αναγνωρίζουν ως υπόστρωμα και να μεταβολίζουν πολύ διαφορετικά τοξικά μόρια (Daborn et al. 2002).

Η τρίτη ομάδα ενζύμων που εμπλέκονται στην βιοχημική ανθεκτικότητα είναι οι μεταφοράσες ή τρανσφεράσες της γλουταθειόνης. Τα ένζυμα αυτά καταλύουν την προσθήκη γλουταθειόνης στο λιπόφιλο μόριο των εντομοκτόνων, αυξάνοντας την λιποδιαλυτότητά τους και κατ' αυτόν τον τρόπο διευκολύνουν την αποβολή τους από τον οργανισμό. Οι τρανσφεράσες της γλουταθειόνης προκαλούν σχετικά ήπια επίπεδα ανθεκτικότητας σε όλες σχεδόν τις κατηγορίες εντομοκτόνων (Fournier et al. 1987, Vontas et al. 2001a, Vontas et al. 2002a, Stumpf and Nauen 2002).

Οι προαναφερθέντες μηχανισμοί ανθεκτικότητας (φυσιολογική και βιοχημική) συντελούν στη μείωση της ποσότητας του εντομοκτόνου που φτάνει τελικά στο στόχο.

Τέλος, η ανθεκτικότητα στόχου (target site resistance), που αποτελεί την τελευταία γραμμή άμυνας των εντόμων, συχνά προκαλεί και τα πιο εντυπωσιακά επίπεδα ανθεκτικότητας. Αφορά σε διαφοροποιήσεις στη μοριακή δομή των πρωτεϊνών στόχων που τις κάνουν λιγότερο ευαίσθητες στα τοξικά μόρια, με αποτέλεσμα τη μείωση ή την απώλεια της αποτελεσματικότητας των εντομοκτόνων (Βόντας κ. α. 2007).

Πρώτος ο Smissaert το 1964 απέδειξε ότι η μη ευαισθησία του ενζύμου στόχου ακετυλοχολινεστεράση ήταν ο κύριος μηχανισμός ανθεκτικότητας του *Tetranychus urticae* στα οργανοφωσφορικά. Έκτοτε ο μηχανισμός αυτός ταυτοποιήθηκε σε πολλά έντομα.

Μελέτες που αφορούν αλλαγές στους στόχους διάφορων κατηγοριών φυτοπροστατευτικών ουσιών, έχουν γίνει σε διάφορα έντομα. Οι μεταλλαγές αυτές παρουσιάζονται ιδιαίτερα συντηρημένες και προσδίδουν υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας σε εντομοκτόνα που στοχεύουν στα πρωτεϊνικά κανάλια, όπως τα πυρεθρινοειδή και τα οργανοχλωριώμενα (Ffrench-Constant et al. 1998).

5.2. Μηχανισμοί ανθεκτικότητας στα πυρεθρινοειδή

Υπάρχουν δυο κύριοι μηχανισμοί που προκαλούν μείωση ευαισθησίας των εντόμων στα πυρεθρινοειδή. Αυτοί είναι η αυξημένη αποτοξικοποίηση και η ανθεκτικότητα στόχου.

5.2.1. Αυξημένη αποτοξικοποίηση στα πυρεθρινοειδή

Η αποτοξικοποίηση των πυρεθρινοειδών στα έντομα πραγματοποιείται είτε μέσω αποεστερεοποίησης η οποία καταλύεται από τις εστεράσες και τις P450s οξειδάσες, είτε μέσω υδροξυλίωσης του αρωματικού δακτυλίου ή της μεθυλομάδας από οξείδωση του κυτοχρώματος P450 (Khambay and Jewess 2005). Το ενδιαφέρον στις P450s εντοπίζεται στο ρόλο που διαδραματίζουν στον οξειδωτικό μεταβολισμό των εντομοκτόνων.

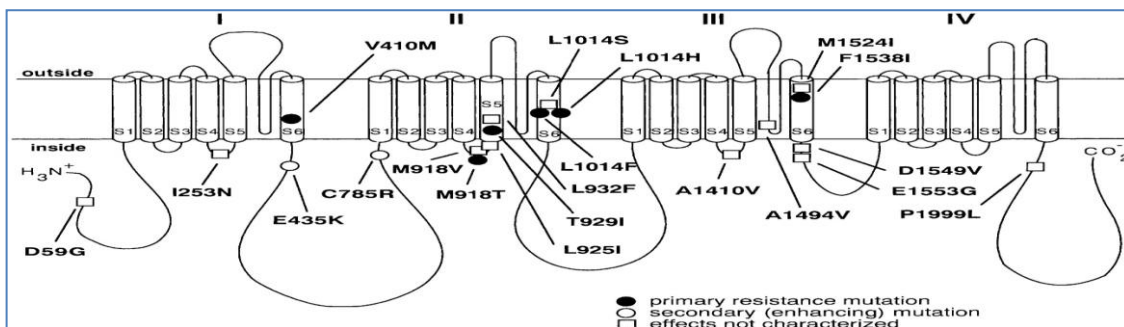
Για τη διερεύνηση της πιθανής συμμετοχής των ενζυμικών συστημάτων στην ανθεκτικότητα χρησιμοποιούνται συνήθως οι συνεργιστές. Είναι σχετικά μη τοξικές εκλεκτικές ουσίες οι οποίες συνδυαζόμενες με δραστικές ουσίες μπορούν να προκαλέσουν αύξηση της βιοκτόνου δράσης, παρεμποδίζοντας ενζυμικά συστήματα στις περιπτώσεις πληθυσμών εντόμων που αυτά συμμετέχουν.

5.2.2. Ανθεκτικότητα στόχου στα πυρεθρινοειδή

Ο σημαντικότερος μηχανισμός ανθεκτικότητας στα πυρεθρινοειδή προκαλείται από διαφοροποιήσεις σε σημειακές μεταλλαγές στα διαμεμβρανικά κανάλια μεταφοράς ιόντων νατρίου (KMIN), που είναι και ο στόχος των πυρεθρινοειδών.

Τα KMIN είναι σύνθετες διαμεμβρανικές πρωτεΐνες υπεύθυνες για τη μεταφορά των ενεργειακών πληροφοριών μέσω του νευρικού συστήματος. Η ολική έκταση του γονιδίου είναι περίπου 6.500 βάσεις. Το κανάλι νατρίου είναι μια πολυπεπτιδική αλυσίδα που αποτελείται από τέσσερα μεμβρανικά τμήματα (Domains I-IV). Κάθε μεμβρανικό τμήμα θεωρείται ότι αναδιπλώνεται σε έξι διαμεμβρανικές έλικες που διατρέχουν εγκάρσιως την μεμβράνη (S1-S6).

Στην Εικόνα 8 απεικονίζεται το κανάλι νατρίου με εντοπισμένες τις μεταλλαγές που προκαλούν ανθεκτικότητα.



Εικόνα 8. Το γονίδιο των KMIN με τις θέσεις των μεταλλαγών διαφόρων εντόμων και ακάρεων (D.M. Soderlund, 2003)

Η ύπαρξη σημειακών μεταλλαγών έχει σαν αποτέλεσμα τη μείωση της συνάφειας των εντομοκτόνων με τις πρωτεΐνες αυτές. Η ανθεκτικότητα που προκαλείται είναι γνωστή ως knock down resistance, και οι μεταλλαγές ως kdr μεταλλαγές.

Στη βιβλιογραφία έχει αναφερθεί ένας περιορισμένος αριθμός μεταλλαγών στα διαμεμβρανικά κανάλια μεταφοράς ιόντων νατρίου, που ευθύνονται για την ανθεκτικότητα στα πυρεθρινοειδή. Οι πιο συνηθισμένες μεταλλαγές απαντώνται στην περιοχή II (Domain II) και αφορούν αντικαταστάσεις στην πρωτεϊνική αλληλουχία στη θέση 1014 (Williamson et al. 1996; Martinez-Torres et al. 1999a; Ranson et al. 2000).

Στην ίδια περιοχή (domain II), η αντικατάσταση της μεθειονίνης από θρεονίνη (M918T ή M918V) συνδυαζόμενη με τη

μεταλλαγή L1014F, προσδίδει ακόμα υψηλότερα επίπεδα ανθεκτικότητας (super kdr) (Morin et al. 2002). Σε ανθεκτικά στελέχη του *Plutella xylostella* έχει εντοπιστεί η L1014F σε συνδυασμό με τη μεταλλαγή της θρεονίνης από ισολευκίνη (T929I) (Schuler et al. 1998).

Μεταλλαγές ανθεκτικότητας έχουν εντοπιστεί και εκτός επικράτειας ΙΙ. Πληθυσμοί του *Boophilus microplus* με υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας στα πυρεθρινοειδή περιείχαν τη μεταλλαγή φαινυλαλανίνης από ισολευκίνη (F1538I) (He et al. 1999). Σε στελέχη του είδους *B. germanica* με εξαιρετικά υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας στα πυρεθρινοειδή, έχουν βρεθεί τέσσερις δευτερεύουσες μεταλλαγές (D59G, E435K, C785R και P1999L) σε συνδυασμό με την L1014F (Liu et al. 2000).

6. Ανθεκτικότητα του *Helicoverpa armigera*

Έχουν γίνει αρκετές μελέτες σε διάφορες χώρες, τα αποτελέσματα των οποίων μας δείχνουν ότι το συγκεκριμένο έντομο έχει αναπτύξει ανθεκτικότητα σε όλα σχεδόν τα εντομοκτόνα που έχουν χρησιμοποιηθεί εναντίον του (McCaffery 1998).

6.1. Ανθεκτικότητα του *Helicoverpa armigera* σε διάφορες κατηγορίες εντομοκτόνων

Πειράματα σε διάφορα ενδαιπήματα του *Helicoverpa armigera* ανέδειξαν τα επίπεδα ανθεκτικότητας του εντόμου στις διάφορες ομάδες εντομοκτόνων ουσιών.

Όσον αφορά στα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα, μελέτη στην Αυστραλία έδειξε ότι το έντομο εμφανίζει σχετική ευαισθησία. Δεν έχει βρεθεί ανθεκτικότητα στο methyl parathion (Gunning and Easton 1993), ενώ χαμηλά επίπεδα έχουν βρεθεί στα profenofos και chlorpyrifos. Αντίθετα, σε πληθυσμούς του εντόμου από το Πακιστάν, έχουν αναφερθεί υψηλά επίπεδα στο monocrotofos, και χαμηλά επίπεδα στα chlorpyrifos και profenofos, παρόλο που τα επίπεδα ανθεκτικότητας στο τελευταίο έχουν αρχίσει να αυξάνονται καθώς υπάρχει προτίμηση των καλλιεργητών στα οργανοφωσφορικά έναντι των πυρεθρινοειδών όπου και υπάρχει πρόβλημα ανθεκτικότητας (Ahmad et al. 1995). Τέλος, στην εντομοκτόνο

ουσία quinafos έχουν αναφερθεί μέτρια επίπεδα ανθεκτικότητας σε πληθυσμούς του εντόμου από την Ινδία και το Πακιστάν, αλλά δεν υπάρχουν στοιχεία για το monocrotofos (Armes et al. 1996). Στην Κίνα, ύστερα από βιοδοκιμές που έγιναν το 1994 και 1995, σε έντομα από διάφορες περιοχές, αποδείχτηκε ότι οι εκεί πληθυσμοί είχαν αναπτύξει μεγάλα επίπεδα ανθεκτικότητας στο οργανοφωσφορικό phoxim. Αυτό δικαιολογείται από την εφαρμογή του συγκεκριμένου εντομοκτόνου στην καταπολέμηση του εντόμου από το 1980 κατά κόρον. Τα έτη 1992 και 1993 δεν παρατηρήθηκε ανθεκτικότητα στο monocrotophos, σε αντίθεση με το 1995 όπου τα επίπεδά της ήταν αυξημένα (Wu et al. 1997). Τέλος, στην Ταϊλάνδη μέχρι και το 1988 δεν είχε αναφερθεί ανθεκτικότητα στα οργανοφωσφορικά (Ahmad and McCaffery 1988).

Στην περίπτωση των καρβαμιδικών εντομοκτόνων που χρησιμοποιούνται για την καταπολέμηση του εντόμου στην Αυστραλία, ανθεκτικότητα έχει παρατηρηθεί στο καρβαμιδικό methomyl ύστερα από μελέτες του 1986, σε αντίθεση με το εντομοκτόνο thiodicarb στο οποίο το έντομο παρέμεινε ευαίσθητο για κάποια χρόνια παραπάνω (Gunning et al. 1992). Στη νότια Νέα Ουαλία, η ανθεκτικότητα στο thiodicarb είχε ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη διασταυρωτής ανθεκτικότητας στο methomyl και έκτοτε το φαινόμενο της ανθεκτικότητας στα καρβαμιδικά στην περιοχή αυτή είναι συχνό. Στην Κίνα (Wu et al. 1995, 1996) και στην Ινδία (Armes et al. 1992, 1996) έχουν διαπιστωθεί σημαντικά επίπεδα ανθεκτικότητας στο methomyl, ενώ χαμηλά επίπεδα στο thiodicarb σε πληθυσμούς του εντόμου από το Πακιστάν (Ahmad et al. 1995). Από μελέτες σε άλλες περιοχές όπως το Νεπάλ, τα επίπεδα ανθεκτικότητας παραμένουν χαμηλά (Armes et al. 1992, 1996).

Αναφορικά με την ανθεκτικότητα του εντόμου στα κυκλοδιένια, σε πληθυσμούς του εντόμου από την Αυστραλία έχει αναφερθεί ανθεκτικότητα στο εντομοκτόνο endosulfan από τις αρχές της δεκαετίας του '70 και έκτοτε ένας μεγάλος αριθμός από μελέτες δείχνουν την σοβαρότητα του προβλήματος. Πρόσφατες έρευνες δείχνουν μέτρια επίπεδα ανθεκτικότητας στο συγκεκριμένο εντομοκτόνο στη συγκεκριμένη περιοχή (Kay 1977, Forrester et al. 1993, Gunning and Easton 1994). Σχετικά χαμηλά επίπεδα ανθεκτικότητας φαίνεται να χαρακτηρίζουν το εν λόγω έντομο σε διάφορες περιοχές της Ινδίας από το 1988 έως το 1992 (McCaffery et al. 1989, Armes et al. 1992), γεγονός όμως που άλλαξε τα επόμενα χρόνια όχι μόνο στην Ινδία αλλά και στο Νεπάλ (Armes et

al. 1996). Στο Πακιστάν, παρόλο που η ανθεκτικότητα το έτος 1995 ήταν υψηλή, τα επίπεδα της μειώθηκαν τα επόμενα έτη (Ahmad et al. 1995, 1998).

6.2. Ανθεκτικότητα του *Helicoverpa armigera* στα πυρεθρινοειδή εντομοκτόνα

6.2.1. Παγκόσμιες αναφορές

Ανθεκτικότητα στα πυρεθρινοειδή εμφανίστηκε το 1983 για πρώτη φορά στην Αυστραλία (Gunning et al. 1984), αλλά η εφαρμογή ενός προγράμματος το οποίο επέβαλλε τον περιορισμό της χρήσης τους, είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση των επιπέδων ανθεκτικότητας στη συγκεκριμένη κατηγορία εντομοκτόνων (Forrester 1990, Forrester et al. 1993). Παρόλα αυτά, τα τελευταία χρόνια, παρατηρείται μια σταδιακή αύξησή της (Forrester et al 1993), πράγμα το οποίο επιβεβαιώνεται από μελέτες που έχουν γίνει σε πληθυσμούς από την εκεί περιοχή και οι οποίες παρουσιάζουν ανθεκτικότητα των πληθυσμών αυτών στο πυρεθρινοειδές fenvalerate. Τα επίπεδά της κυμαίνονται γύρω στα 50 folds και φαίνεται να οφείλεται στη δράση των ενζύμων αποτοξικοποίησης (εστεράσες και P450 οξειδάσες) (Gunning et al. 1995, Ranasinghe et al. 1998, Grubor V. and Heckel D. 2007). Επίσης, σε πληθυσμούς από την ίδια περιοχή, έχει βρεθεί ανθεκτικότητα στο εντομοκτόνο esfenvalerate, με συντελεστή 20, η οποία όμως φαίνεται να οφείλεται σε μειωμένη διείσδυσή του διαμέσου της επιδερμίδας του εντόμου (Gunning et al. 2002).

Στη Νέα Ζηλανδία, ένα πρόγραμμα παρακολούθησης της ανθεκτικότητας του εντόμου στο fenvalerate που ξεκίνησε το 1991 σε φυτά τομάτας, αραβόσιτου και μαρουλιού, έδειξε μειωμένη θνησιμότητα του εντόμου που συνεπάγεται αύξηση της ανθεκτικότητας στα πυρεθρινοειδή, με συντελεστές 47 και 69 folds αντίστοιχα σε δύο πληθυσμούς που εξετάστηκαν (Cameron et al. 1995, Suckling 1996).

Στην Ταϊλάνδη, πρώτη φορά το 1981, αναφέρθηκε ανεπαρκής έλεγχος του εντόμου αμέσως μετά την εισαγωγή των πυρεθρινοειδών cypermethrin και fenvalerate για την καταπολέμησή του (Ahmad and McCaffery 1988), ενώ στην Ινδονησία, ανιχνεύτηκαν σημαντικά επίπεδα ανθεκτικότητας στα ίδια

εντομοκτόνα (RR:86, RR:20 αντίστοιχα) την περίοδο 1987-1988 (McCaffery et al. 1991a).

Στην Κίνα, πάρα πολλά από τα εντομοκτόνα της κατηγορίας των πυρεθρινοειδών έχουν χρησιμοποιηθεί για την αντιμετώπιση του εντόμου. Παρόλα αυτά μέχρι το 1989 δεν είχαν παρατηρηθεί αλλαγές όσον αφορά στην ευαισθησία του εντόμου, αλλά τα επόμενα χρόνια ανιχνεύτηκε ανθεκτικότητα σε ένα μεγάλο αριθμό περιοχών της (Tan et al. 1987, Shen et al. 1991, 1992, 1993, Wu et al. 1996, 1997b). Συγκεκριμένα, οι συντελεστές ανθεκτικότητας στα πυρεθρινοειδή cypermethrin, fenvalerate και deltamethrin ήταν 540, 1690 και 73 folds αντίστοιχα και η αιτία για τα υψηλά αυτά επίπεδα ανθεκτικότητας φάνηκε ότι ήταν η αυξημένη ενεργότητα των P450 οξειδασών (Yang et al. 2004, 2006). Η αυξημένη ανθεκτικότητα όμως που έχουν αναπτύξει τα έντομα στο cypermethrin στη συγκεκριμένη περιοχή, φαίνεται να οφείλεται και σε δύο σημειακές μεταλλαγές στο γονίδιο του καναλιού του νατρίου, τις D1561V και E1565G (Head et al. 1998).

Στην κεντρική Ασία και συγκεκριμένα στο Αζερμπαϊτζάν (Sukhoruchenko 1996), στη Ρωσία (Leonova and Slynko 1996), και στην Τουρκία (Anon 1986), επίσης έχουν παρατηρηθεί αυξημένα επίπεδα ανθεκτικότητας στα διάφορα εντομοκτόνα της ομάδας των πυρεθρινοειδών.

Στο Ισραήλ, από το 1987, η ανθεκτικότητα παραμένει χαμηλή, εξαιτίας της αυστηρής εφαρμογής ενός προγράμματος διατήρησης της ευαισθησίας του εντόμου στα πυρεθρινοειδή εντομοκτόνα (Horowitz et al. 1993, 1995).

Στην Ινδία, διαπιστώθηκε βιοχημική ανθεκτικότητα στις εντομοκτόνες ουσίες της ομάδας των πυρεθρινοειδών fenvalerate, cyhalothrin και cypermethrin (>1000 folds) λόγω της αυξημένης ενεργότητας των εστερασών και των P450 οξειδασών (Kranthi et al. 2001).

Στη δυτική Αφρική, η αυξημένη ενεργότητα των P450 οξειδασών, είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της ανθεκτικότητας στα πυρεθρινοειδή deltamethrin, fenvalerate και disenthrin στα οποία οι πληθυσμοί που εξετάστηκαν παρουσίαζαν συντελεστές ανθεκτικότητας 313, και 15 αντίστοιχα (Martin et al. 2000, Brun-Barale et al. 2010).

Τέλος, στο Πακιστάν, η ανθεκτικότητα διαπιστώθηκε να είναι μειωμένη ύστερα από έρευνες που έγιναν το 1997, σε σχέση με τα προηγούμενα χρόνια λόγω του ότι οι καλλιεργητές άρχισαν να χρησιμοποιούν διαφορετικές ομάδες εντομοκτόνων για την καταπολέμηση του εντόμου (Ahmad 1998). Τα τελευταία χρόνια όμως, ύστερα από μελέτες σε πληθυσμούς στα πυρεθρινοειδή cypermethrin, fenvalerate και deltamethrin, διαπιστώθηκε μια σημαντικότερη αύξησή της, με συντελεστές ανθεκτικότητας 4100, 2320 και 223 folds αντίστοιχα. Τα παραπάνω υψηλά επίπεδα φαίνεται να οφείλονται στη δράση των P450 οξειδασών και πιο συγκεκριμένα στα γονίδια CYP9A12 και CYP4G8 της οικογένειας των P450s (Yang et al. 2004, 2006). Η ανθεκτικότητα που παρουσιάστηκε από μία άλλη έρευνα για πληθυσμό της ίδιας περιοχής, στο deltamethrin, με συντελεστή 670, φαίνεται να οφείλεται στη μειωμένη διείσδυση του εντομοκτόνου από την επιδερμίδα του εντόμου (Ahmad et al.2006).

Πίνακας 1. Συγκεντρωτικά οι πληθυσμοί που εξετάστηκαν ανά χώρα, το πυρεθρινοειδές που χρησιμοποιήθηκε, ο μηχανισμός ανθεκτικότητας που εμπλέκεται και η βιβλιογραφική αναφορά.

Προέλευση	Εντομοκτόνο (δραστική ουσία)	RR	Είσοδος εντομοκτόνου	Βιοχημική ανθεκτικότητα	Ανθεκτικότητα στόχου (μεταλλαγές)	Αναφορές
Δελχί	deltamethrin	6108		COEs		Ashraf et al. 2009
Αυστραλία	fenvalerate	>50		COEs		Gunning et al.1995
Ινδία	deltamethrin	27160		P450, COEs		Kranthi et al. 2001
		13570				
	fenvalerate	>1000				
	cyhalothrin					
	cypermethrin					
Δυτική Αφρική	deltamethrin	313		P450		Brun-Barale et al. 2010
Δυτική Αφρική	deltamethrin	189		P450		Martin et al. 2000
	fenvalerate	163				
	disenthrin	15				
Κίνα	cypermethrin				D1561V	Head et al. 1998
					E1565G	

Προέλευση	Εντομοκτόνο (δραστική ουσία)	RR	Είσοδος εντομοκτόνου	Βιοχημική ανθεκτικότητα	Ανθεκτικότητα στόχου (μεταλλαγές)	Αναφορές
Γαλλία	deltamethrin	59.7		P450		Bues et al. 2005
Αυστραλία	fenvalerate	50		P450 (Cyt b,CYP6B7)		Grubor V. and Heckel D. 2006, Ranasinghe et al. 1998
Κίνα	cypermethrin	540		P450 (CYP9A12, CYP4G8)		Yang et al. 2004, 2006
	fenvalerate	1690				
	deltamethrin	73				
Πακιστάν	cypermethrin	4100				
	fenvalerate	2320				
	deltamethrin	223				
Αγγλία	fenvalerate			P450 (CYP6B2)		Pittendrigh et al. 1997
Αυστραλία	esfenvalerate	20	✓			Gunning et al. 2002
Νέα Ζηλανδία	fenvalerate	69				Cameron et al. 1995, Suckling 1996
		47				
Ταϊλάνδη	cypermethrin	102				Ahmad and Mc Caffery, 1988
	fenvalerate	51				
Ινδονησία	cypermethrin	86				Mc Caffery et al., 1991a
		65				
	fenvalerate	20				
Κίνα- Πακιστάν	deltamethrin	330- 670	✓			Ahmad et al. 2006

Στον Πίνακα 1 παρουσιάζονται συνοπτικά τα αποτελέσματα μελετών σε πληθυσμούς *Helicoverpa armigera* από διάφορες περιοχές του κόσμου, αναφορικά με τα επίπεδα ανθεκτικότητας που εμφανίζουν στα πυρεθρινοειδή (RR) και το μηχανισμό στον οποίο αυτή οφείλεται.

6.2.2. Αναφορές από τον ελληνικό χώρο

Στην Ελλάδα, παρά τις διάφορες ενδείξεις που υπάρχουν όσον αφορά στην πιθανή αύξηση στα επίπεδα ανθεκτικότητας του εντόμου, λόγω προβλημάτων στην καταπολέμηση και τη διαχείρισή του στον αγρό, δεν είχε γίνει καμία μελέτη σε ελληνικούς πληθυσμούς για να διερευνηθεί η ύπαρξη ανθεκτικότητας.

Μια πρώτη προσέγγιση του φαινομένου έγινε το 2007, μελετώντας ένα φυσικό ελληνικό πληθυσμό *Helicoverpa armigera*, ο οποίος συλλέχθηκε από την περιοχή των Σερρών για να διερευνηθούν τα επίπεδα ανθεκτικότητας που αυτός παρουσίαζε σε διάφορες δραστικές ουσίες χρησιμοποιώντας κλασικές μεθόδους βιοδοκιμών. Σαν σύγκριση, χρησιμοποιήθηκε ένας ευαίσθητος πληθυσμός αναφοράς (XXX), ο οποίος δεν είχε έρθει σε επαφή με φυτοπροστατευτικές ουσίες τα τελευταία 15 χρόνια.

Τα αποτελέσματα των βιοδοκιμών εμφανίζονται στον Πίνακα 2. Παρατηρήθηκε ότι ο άγριος πληθυσμός εμφάνιζε σχετικά υψηλό παράγοντα ανθεκτικότητας (RF: 6.082), όσον αφορά στο εντομοκτόνο σκεύασμα γ-cyhalothrin. Η προϋπάρχουσα αυτή ύπαρξη δυναμικού ανάπτυξης ανθεκτικότητας, σε συνδυασμό με την εκτεταμένη χρήση των πυρεθροειδών ήταν η αιτία για την οποία έγινε στη συνέχεια επιλογή σε διαδοχικές γενεές, του αγρίου πληθυσμού με πυρεθροειδή.

Πίνακας 2. Αποτελέσματα ανάλυσης θνησιμότητας και επίπεδα ανθεκτικότητας στις διάφορες δραστικές ουσίες (Μυρωνίδης, αδημοσίευτα αποτελέσματα)

Πληθυσμός	Δραστική ουσία	n	Slope ± SE	LD50 µg/larva (95% CL)	LD90 µg/larva (95% CL)	χ ²	P	RF
LAB strain	chlorpyrifos	150	4.97±0.84	0.31608 (0,25912-0.38252)	0.57375 (0.48472 -0.73611)	4.333	0.228	1.875
XXX strain		140	7.97±1.46	0.16856 (0.13641-0.20834)	0.32940 (0.27278-0.44124)	8.439	0.077	
LAB strain	γ-cyhalothrin	180	45.25±7.65	0.01411 (0.00931-0.01903)	0.04243 (0.03420-0.05778)	4.362	0.359	6.082
XXX strain		220	586.94 ±83.08	0.00232 (0.00193-0.00286)	0.00451 (0.00377-0.00576)	0.711	0.982	
LAB strain	endosulfan	150	0.60 ± 0.11	1.71589 (1.27902-2.1657)	3.83803 (3.17304-5.10055)	4.861	0.182	9.477
XXX strain		140	5.11± 0.99	0.18106 (0.12894-0.25112)	0.43197 (0.33688-0.63045)	5.556	0.352	
LAB strain	methomyl	150	0.68±0.12	1.13564 (0.80034-1.49180)	3.02470 (2.44465-4.14614)	2.684	0.443	3.182
XXX strain		160	3.19±0.53	0.35691 (0.27842-0.46872)	0.75875 (0.60984-1.03651)	2.922	0.819	
LAB strain	diazinon	150	0.18±0.32	4.48255 (3.25475-5.81313)	11.37865 (9.25987-15.37904)	3.28	0.350	1.499
XXX strain		110	0.39±0.07	2.98889 (2.29768-3.92851)	6.25827 (5.02048-8.69682)	2.963	0.706	
LAB strain	α-cypermethrin	150	22.28±3.14	0.07108 (0.05986-0.08542)	0.12860 (0.10935-0.16047)	2.039	0.564	7.960
XXX strain		160	124.56±24.36	0.00893 (0.00676-0.01190)	0.01922 (0.01526-0.02751)	2.733	0.604	
LAB strain	cypermethrin	150	9.70±1.45	0.15463 (0.12920-0.18888)	0.28674 (0.24061-0.36666)	0.291	0.962	3.103
XXX strain		243	25.53±3.68	0.04984 (0.04137-0.06197)	0.10004 (0.08291-0.12956)	7.045	0.217	

(n: ο συνολικός αριθμός προνυμφών, LD₅₀ (Lethal dose for 50% mortality): συγκέντρωση που θανατώνει το 50% του πληθυσμού, RF(Resistance Factor): παράγοντας ανθεκτικότητας, Slope και SE: κλίση ευθείας και απόκλιση, χ² δοκιμής καλής αντιπροσώπευσης από ευθεία, 95% CL: όρια εμπιστοσύνης στο 95%, P: πιθανότητα

7. Αντικείμενο της Εργασίας

Αντικείμενο της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη της ανθεκτικότητας και της επικινδυνότητας ανάπτυξης ανθεκτικότητας ελληνικών πληθυσμών του *Helicoverpa armigera* στο πυρεθρινοειδές σκεύασμα γ -cyhalothrin. Η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε περιλαμβάνει τη διερεύνηση των επιπέδων ανθεκτικότητας με κλασικές μεθόδους βιοδοκιμών και το χαρακτηρισμό των μηχανισμών ανθεκτικότητας με βιοχημικές και μοριακές μεθόδους. Απώτερος στόχος της μελέτης είναι η παραγωγή διαγνωστικών για τη διαχείριση προγραμμάτων καταπολέμησης και τη βέλτιστη χρήση των φυτοπροστατευτικών προϊόντων και η παραγωγή βελτιωμένων σκευασμάτων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

Διερεύνηση των επιπέδων ανθεκτικότητας σε διάφορες δραστικές ουσίες φυσικών πληθυσμών *Helicoverpa armigera* στην Ελλάδα με κλασικές μεθόδους βιοδοκιμών

A. Επιλογή και Χαρακτηρισμός Ανθεκτικότητας με Κλασικές Μεθόδους Βιοδοκιμών

A.1. Εισαγωγή

Η επιλογή του αγρίου πληθυσμού με το πυρεθρινοειδές σκεύασμα γ-cyhalothrin, συνεχίστηκε για δύο επιπλέον διαδοχικές γενεές, όχι μόνο γιατί ο πληθυσμός παρουσίασε κάποιο δυναμικό ανάπτυξης ανθεκτικότητας, αλλά και για το ότι για να μπορέσει να γίνει μελέτη των μηχανισμών ανθεκτικότητας απαιτείται ομοιόμορφος και όσο το δυνατό περισσότερο ανθεκτικός πληθυσμός. Ακολούθησε προσδιορισμός των επιπέδων ανθεκτικότητας των πληθυσμών σε διάφορες δραστικές ουσίες με τη μέθοδο των κλασικών βιοδοκιμών.

A.2. Υλικά και Μέθοδοι

A.2.1. Πληθυσμοί *H. armigera*

Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν οι πληθυσμοί *H. armigera* (ευαίσθητος, εργαστηριακός και ανθεκτικός) που περιγράφονται παρακάτω.

Ο ευαίσθητος αναφοράς (susceptible - **XXX strain**) πληθυσμός αποτελεί ευαίσθητη στα εντομοκτόνα φυλή του *H. armigera* η οποία αποκτήθηκε από την εταιρεία Bayer Crop Science. Αυτή η φυλή

διατηρείτο σε εργαστηριακές συνθήκες, απαλλαγμένη από κάθε είδους επαφή με φυτοπροστατευτικές ουσίες, τα τελευταία 15 χρόνια.

Ο πατρικός-άγγριος (parental – **LAB strain**) πληθυσμός προήλθε από προνύμφες 3^{ου} – 6^{ου} σταδίου που συλλέχθηκαν, από τα μέσα Αυγούστου έως και το τρίτο δεκαήμερο του Σεπτεμβρίου του 2005, από βαμβακοφυτείες της ευρύτερης περιοχής των Δήμων Σκοτούσσης και Ηράκλειας του Ν. Σερρών. Οι αγροί στους οποίους έγιναν οι δειγματοληψίες (20 αγροί έκτασης άνω των 10 στρεμμάτων) επιλέχθηκαν τυχαία.

Ο ανθεκτικός (resistant-**GAMMA strain**) πληθυσμός προήλθε από τον πατρικό ύστερα από 21 διαδοχικές γενεές επιλογής (Μυρωνίδης 2005) με το πυρεθρινοειδές γ -cyhalothrin.

A.2.2. Εκτροφή πληθυσμών του *H. armigera*

Οι προνύμφες (\approx 400 / πληθυσμό-strain) τοποθετήθηκαν ατομικά σε τρυβλία Petri διαμέτρου 9 cm προκειμένου να αποφευχθεί ο κανιβαλισμός και μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο όπου και έγινε η έναρξη της εκτροφής τους. Οι αποικίες αναπτύχθηκαν σε τεχνητή τροφή στους 25°C με φωτοπερίοδο 16:8 ώρες (Φ:Σ). και 70 % Σ.Υ.

Τοποθετήθηκαν σε ομάδες των 50-100 ατόμων σε πλαστικά κύπελλα χωρητικότητας 200 ml όπου και τους παρείχεται τεχνητή τροφή με την μορφή μικρών κυβικών κομματιών. Μετά και την ολοκλήρωση της τρίτης προνυμφικής ηλικίας, τοποθετήθηκαν ατομικά σε τρυβλία Petri διαμέτρου 9 cm για να αποφευχθεί ο κανιβαλισμός μέσα στα οποία ολοκλήρωσαν την προνυμφική και νυμφική τους ανάπτυξη. Με την εμφάνιση των ενηλίκων, 15 ζεύγη τοποθετήθηκαν σε ξύλινο κλωβό διαστάσεων 30x30 cm με 3

πλευρές από συρμάτινο πλέγμα 30 mesh και μια πλευρά από γυαλί. Στα ενήλικα παρέχονταν υδατικό διάλυμα ζάχαρης 10% εμποτισμένο σε βαμβάκι. Μετά την εκκόλαψη των αυγών, οι προνύμφες συλλέχτηκαν από τις επιφάνειες των κλωβών με τη βοήθεια ενός πινέλου και μεταφέρθηκαν στα κύπελλα που περιείχαν τεχνητή τροφή τα συστατικά της οποίας περιγράφονται αναλυτικά στον Πίνακα 3 που ακολουθεί. Η παραπάνω διαδικασία εκτροφής ακολουθήθηκε με τον ίδιο τρόπο καθόλη τη διάρκεια των πειραμάτων.

Πίνακας 3. Συστατικά της τεχνητής τροφής του <i>H. armigera</i> (Smith 1966)	
Νερό	950 ml
Αγάρ αγάρ	37.5 gr
Καλαμποκάλευρο	200 gr
Μαγιά μπύρας	50 gr
Φύτρο σιταριού	50 gr
Ασκορβικό οξύ	7 gr
Βενζοϊκό οξύ	3 gr
Νιπαγίνη	2.3 gr
Μείγμα αλάτων (Wesson's salt mixture)	7.5 gr
Μείγμα βιταμινών (Vanderzant's vitamin mixture for insects)	0.1 gr

A.2.3. Επιλογή πληθυσμού με κλασικές βιοδοκιμές

Συνεχίστηκε η επιλογή του ανθεκτικού πληθυσμού Gamma strain με τη δραστική ουσία γ -cyhalothrin για δύο επιπλέον διαδοχικές γενεές χρησιμοποιώντας τη μέθοδο των τοξικολογικών βιοδοκιμών με τοπική εφαρμογή σε προνύμφες τρίτου σταδίου.

Αρχικά, ποσότητα τροφής τοποθετήθηκε ώστε να καλυφθεί πλήρως η κάτω επιφάνεια πλαστικών δοχείων χωρητικότητας 50 ml,

εντός των οποίων μεταφέρθηκαν με τη βοήθεια πινέλου προνύμφες *H. armigera* (1 προνύμφη / δοχείο), οι οποίες είχαν ολοκληρώσει το 2ο προνυμφικό στάδιο (βάρους μεταξύ 30-40 mg), με τη νωτιαία πλευρά προς τα επάνω. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε ήταν αυτή της «τοπικής εφαρμογής» (topical application) όπως προτείνεται από την Αμερικάνικη Εντομολογική Εταιρία (Anonymous, 1970) ακολουθώντας τις οδηγίες των Robertson and Preisler (1992). Στην ραχιαία (νωτιαία) θωρακική περιοχή της κάθε προνύμφης εφαρμόστηκε με μικροσύριγγα σταθερού όγκου (Hamilton CR700-20) 2 μl διαλύματος δραστικής ουσίας σε ακετόνη γνωστής συγκέντρωσης. Μετά την εφαρμογή του εντομοκτόνου, οι προνύμφες διατηρήθηκαν ατομικά εντός πλαστικών κυπέλλων κάτω από τις ίδιες συνθήκες εκτροφής ενώ η θνησιμότητα εκτιμήθηκε μετά 48 ώρες οπότε και τα επιβιώσαντα άτομα μεταφέρθηκαν σε τρυβλία Petri για την δημιουργία της νέας γενιάς. Μετά από 3 εβδομάδες περίπου, η νέα γενιά χρησιμοποιήθηκε για την επόμενη επιλογή. Οι συγκεντρώσεις του γ -cyhalothrin που χρησιμοποιήθηκαν για τις επιλογές ήταν της τάξεως των 0.064 και 0.128 $\mu\text{g}/\text{larva}$. Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε για κάθε γενιά επιλογής.

A.2.4. Προσδιορισμός επιπέδων ανθεκτικότητας επιλεγμένου πληθυσμού στο γ -cyhalothrin με κλασικές βιοδοκιμές

Μελετήθηκαν τα επίπεδα ανθεκτικότητας του επιλεγμένου πληθυσμού GAMMA strain σε σχέση με τον ευαίσθητο αναφοράς μετά από 23 γενιές επιλογής.

Έγιναν τοξικολογικές βιοδοκιμές πλήρους δόσης χρησιμοποιώντας τη δραστική ουσία γ -cyhalothrin σε διάλυμα ακετόνης στις συγκεντρώσεις που αναγράφονται στον Πίνακα 4. Οι δραστική ουσία ήταν τεχνικώς καθαρή από άλλες προσμίξεις (90-

100%, analytical grade). Για την προετοιμασία των διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκε ο τύπος της αραιώσης: $C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$ και ακολουθήθηκε η διαδικασία των διαδοχικών αραιώσεων σε ακετόνη.

Πίνακας 4. Συγκεντρώσεις εφαρμογής του γ -cyhalothrin

Συγκεντρώσεις γ -cyhalothrin (μg/larva)	1	2	3	4	5	6	7
Πληθυσμός <i>H. armigera</i>							
GAMMA strain	0.008	0.016	0.032	0.064	0.128	0.256	-
XXX strain	0.0005	0.001	0.002	0.004	0.008	0.016	0.032

Η μεθοδολογία είναι παρόμοια με αυτή που ακολουθήθηκε και στις βιοδοκιμές για την επιλογή του ανθεκτικού πληθυσμού.

Σε κάθε βιοδοκιμή χρησιμοποιήθηκαν 30 προνύμφες τρίτου σταδίου ανά συγκέντρωση, εντός ενός ορίου θνησιμότητας που κυμαίνονταν από 0 – 100%. Στο μάρτυρα έγινε εφαρμογή μόνο με ακετόνη. Μετά από διάστημα 30' από τον ψεκάσμο έγινε καταμέτρηση των νεκρών ατόμων (θνησιμότητα χειρισμών). Η μέτρηση χειρισμού δεν συνυπολογίζεται στην τελική μέτρηση θνησιμότητας. Νεκρές θεωρήθηκαν οι προνύμφες εκείνες στις οποίες παρατηρήθηκε αφυδάτωση με ένα γενικό μαύρισμα του εξωσκελετού τους και / ή αυτές που ήταν ανίκανες να μετακινηθούν συντονισμένα όταν ενοχλούνταν με ένα πινέλο. Η θνησιμότητα του μάρτυρα εκτιμήθηκε και αυτή μετά από 48 ώρες και ήταν μικρότερη του 1%.

Χρησιμοποιήθηκε Probit ανάλυση (Finney, 1971) για την εκτίμηση της δόσης έκθεσης σε εντομοκτόνο σκεύασμα εκφρασμένη σε μικρογραμμάρια δραστικής ουσίας ανά προνύμφη (μg/larva) που απαιτείται για την θνησιμότητα του 50% (LD₅₀) και του 90% (LD₉₀) του υπό εξέταση πληθυσμού του *H. armigera*. Η στατιστική

επεξεργασία έγινε με τη βοήθεια του στατιστικού προγράμματος SPSS NLN, 14 (SPSS Inc. 2006).

Γενικά, το λογισμικό αυτό παρέχει τη δυνατότητα να δοκιμάσουμε κατά πόσον η καμπύλη απόκρισης θνησιμότητας - συγκεντρώσεων αντιστοιχεί σε ευθεία γραμμή (δοκιμή 2x), την κλίση της ευθείας (slope), τις θανατηφόρες συγκεντρώσεις (lethal concentrations - LC), τα όρια εμπιστοσύνης κάθε μίας και τον παράγοντα ανθεκτικότητας (Resistance Factor - RF) για την κάθε εντομοκτόνο ουσία που δοκιμάστηκε, ο οποίος υπολογίστηκε στο επίπεδο της μέσης θανατηφόρου δόσης (LD₅₀) ως το πηλίκο της διαίρεσης του LD₅₀ του άγριου πληθυσμού με εκείνο του ευαίσθητου εργαστηριακού ($RF = LD_{50} \text{ άγριου πληθυσμού} / LD_{50} \text{ ευαίσθητου πληθυσμού}$).

A.2.5. Επίπεδα ανθεκτικότητας επιλεγμένου πληθυσμού σε τρία επιπλέον φυτοπροστατευτικά σκευάσματα

Η ανθεκτικότητα μιας φυλής εντόμων σε ένα εντομοκτόνο την κάνει συχνά ανθεκτική, σε μικρότερο βαθμό και σε άλλα εντομοκτόνα της ίδιας χημικής ομάδας. Την ανθεκτικότητα αυτή τη λέμε **έμμεση** (cross resistance) αφού δημιουργείται έμμεσα χωρίς η συγκεκριμένη φυλή εντόμων να έχει προηγουμένως εκτεθεί στην ουσία ή τις ουσίες αυτές. Αυτό είναι φυσικό επακόλουθο, αφού συγγενείς τοξικές ουσίες αποδομούνται στο σώμα του εντόμου με τον ίδιο ή παραπλήσιους μηχανισμούς.

Πολλαπλή ανθεκτικότητα είναι αυτή που αφορά περισσότερες από μια τοξικές ουσίες, μη συγγενείς μεταξύ τους. Δημιουργείται με επιλογή κάτω από την επίδραση εντομοκτόνων που ανήκουν σε διαφορετικές κατηγορίες και οφείλεται σε περισσότερους από ένα μηχανισμούς ανθεκτικότητας (Τζανακάκης 1995).

Προκειμένου να διαπιστωθεί η ύπαρξη έμμεσης ή πολλαπλής ανθεκτικότητας στον ανθεκτικό πληθυσμό λόγω της πίεσης επιλογής, πραγματοποιήθηκαν βιοδοκιμές μεταξύ ευαίσθητου αναφοράς και ανθεκτικού πληθυσμού με διάφορα φυτοπροστατευτικά προϊόντα που ανήκουν σε διαφορετικές χημικές ομάδες. Όσον αφορά την έμμεση οι βιοδοκιμές έγιναν με τη δραστική ουσία *α-cypermethrin* (πυρεθρινοειδές), ενώ για την πολλαπλή με τις *chlorpyrifos* (οργανοφωσφορικό) και *endosulfan* (οργανοχλωριωμένο).

Πίνακας 5. Συγκεντρώσεις δραστικών ουσιών που χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο έμμεσης και πολλαπλής ανθεκτικότητας

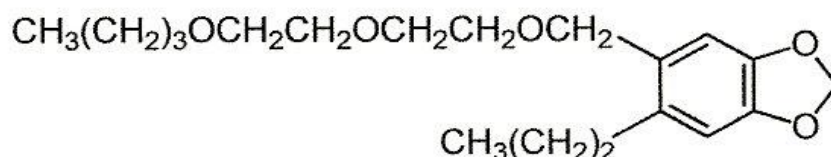
Δραστικές ουσίες (μg/larva) Πληθυσμοί <i>H. armigera</i>	<i>α-cypermethrin</i> (πυρεθρινοειδές)	<i>Chlorpyrifos</i> (οργανοφωσφορικό)	<i>endosulfan</i> (οργανοχλωριωμένο)
GAMMA strain	0.008, 0.016, 0.032, 0.064, 0.128, 0.256	0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2	0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16
XXX strain	0.002, 0.004, 0.008, 0.016, 0.032, 0.064,	0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6	0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2

A.2.6. Βιοδοκιμές με συνεργιστές

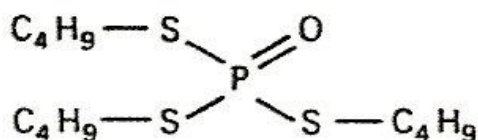
Για τη μελέτη των βιοχημικών μηχανισμών ανθεκτικότητας γίνεται χρήση συνεργιστών. Οι συνεργιστές είναι σχετικά μη τοξικές εκλεκτικές ουσίες οι οποίες συνδυαζόμενες με δραστικές ουσίες μπορούν να προκαλέσουν αύξηση της βιοκτόνου δράσης, παρεμποδίζοντας ενζυμικά συστήματα στις περιπτώσεις πληθυσμών εντόμων που αυτά συμμετέχουν. Για την διερεύνηση της πιθανής συμμετοχής των ενζυμικών συστημάτων στην ανθεκτικότητα χρησιμοποιήθηκαν οι συνεργιστικές ουσίες *S,S,S-tributyl phosphorotrithiate* (DEF) και *pireperonyl butoxide* (PB) (Εικόνα 9). Το DEF δρα παρεμποδίζοντας τις εστεράσες και τις τρανσφεράσες της

γλουταθειόνης ενώ το PB δρα ως παρεμποδιστής των μικτής λειτουργίας P450s οξειδασών. Η χρήση των συνεργιστών στην μελέτη των μηχανισμών ανθεκτικότητας έγκειται στο ότι εάν τα επίπεδα ανθεκτικότητας σε μία δραστική μειωθούν στην περίπτωση που έχει προηγηθεί επαφή με τον ένα ή τον άλλο συνεργιστή τότε αυτό σημαίνει ότι τα ένζυμα που αυτός παρεμποδίζει εμπλέκονται στην ανθεκτικότητα.

pipperonyl butoxide



DEF



Εικόνα 9. Ο συντακτικός τύπος των συνεργιστών PB και DEF

Η εύρεση των κατάλληλων συγκεντρώσεων για το ψεκασμό τόσο του επιλεγμένου με γ-cyhalothrin πληθυσμού όσο και του ευαίσθητου αναφοράς έγινε μετά από προκαταρκτικά πειράματα βιοδοκιμών. Προσδιορίστηκε η μέγιστη συγκέντρωση που δεν προκαλεί θνησιμότητα αλλά παρεμποδίζει τα ενζυμικά συστήματα. Η μεθοδολογία των βιοδοκιμών με συνεργιστές ήταν η ίδια με αυτή των βιοδοκιμών με φυτοπροστατευτικές ουσίες. Η εφαρμογή των συνεργιστικών ουσιών έγινε με ψεκασμό 2 ώρες πριν τον ψεκασμό

με τη δραστική ουσία γ -cyhalothrin και στο μάρτυρα αντί συνεργιστού εφαρμόστηκε διάλυμα ακετόνης. Έπειτα από μία ώρα έγινε η μέτρηση θνησιμότητας χειρισμού και μετά από 48 ώρες η τελική μέτρηση θνησιμότητας. Κατάλληλες συγκεντρώσεις συνεργιστικών ουσιών ήταν 10 $\mu\text{g}/\text{larva}$ για το DEF (98.1%) και 10 $\mu\text{g}/\text{larva}$ για το PB (92%).

A.2.7. Υπολογισμός των επιπέδων ανθεκτικότητας

Με τη μέθοδο των βιοδοκιμών μπορεί να γίνει η διαπίστωση και η μέτρηση της ανθεκτικότητας ενός πληθυσμού. Μπορεί δηλαδή να προσδιοριστεί ο βαθμός ανθεκτικότητας ενός πληθυσμού, υπολογίζοντας τη θνησιμότητα του συγκριτικά με τη θνησιμότητα ενός ευαίσθητου πληθυσμού αναφοράς. Στις βιοδοκιμές χρησιμοποιούνται άτομα ίδιας ηλικίας. Ως μέτρο σύγκρισης της τοξικότητας χρησιμοποιείται η τιμή LC_{50} που ορίζεται ως η συγκέντρωση της τοξικής ουσίας που θανατώνει το 50% ενός πληθυσμού. Για τον υπολογισμό των θανατηφόρων συγκεντρώσεων κατασκευάζεται καμπύλη συγκέντρωσης προς θνησιμότητα όπου η συγκέντρωση τοποθετείται στον άξονα x και η θνησιμότητα στον άξονα y .

A.3. Αποτελέσματα

A.3.1. Επίπεδα ανθεκτικότητας του επιλεγμένου πληθυσμού

Μελετήθηκε αν αυξήθηκε η ανθεκτικότητα μετά από διαδοχικές γενιές επιλογής του ανθεκτικού πληθυσμού (GAMMA strain). Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν στο Probit analysis για την εύρεση του

επιπέδου ανθεκτικότητας συγκριτικά με τον ευαίσθητο πληθυσμό αναφοράς (XXX strain) και απεικονίζονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 6. Αποτελέσματα ανάλυσης θνησιμότητας και επίπεδα ανθεκτικότητας στο γ -cyhalothrin

Πληθυσμός	Δραστική ουσία	N	Slope \pm SE	LD ₅₀ μ g/larva (95% CL)	LD ₉₀ μ g/larva (95% CL)	X ²	P	RF
GAMMA strain	γ -cyhalothrin	179	13.17 \pm 1.78	0.10221 (0.08467-0.12437)	0.19955 (0.16864-0.24974)	7.367	0.118	44.056
XXX strain		220	586.94 \pm 83.08	0.00232 (0.00193-0.00286)	0.00451 (0.00377-0.00576)	0.711	0.982	

(n: ο συνολικός αριθμός προνυμφών, LD₅₀ (Lethal dose for 50% mortality): συγκέντρωση που θανατώνει το 50% του πληθυσμού, RF(Resistance Factor): παράγοντας ανθεκτικότητας, Slope και SE: κλίση ευθείας και απόκλιση, X² δοκιμής καλής αντιπροσώπευσης από ευθεία, 95% CL: όρια εμπιστοσύνης στο 95%, P: πιθανότητα)

Παρατηρήθηκε ότι μετά από 23 γενιές επιλογής, ο ανθεκτικός πληθυσμός (GAMMA strain) παρουσίασε αύξηση του επιπέδου ανθεκτικότητας σε σχέση με τον πληθυσμό αναφοράς (XXX strain) κατά 44 φορές. Συγκεκριμένα, το GAMMA strain εμφάνισε τιμή LD₅₀ κατά 44 φορές. Συγκεκριμένα, το GAMMA strain εμφάνισε τιμή LD₅₀ ίση με 0.10221, ενώ το XXX strain 0.00232.

A.3.2. Έλεγχος έμμεσης ή/και πολλαπλής ανθεκτικότητας

Μελετήθηκε αν αυξήθηκε η ανθεκτικότητα μετά από διαδοχικές γενιές επιλογής του ανθεκτικού πληθυσμού (GAMMA strain) με το πυρεθρινοειδές γ -cyhalothrin, στην ίδια και σε άλλες χημικές ομάδες εντομοκτόνων ουσιών. Με τον τρόπο αυτό εξετάστηκαν τα επίπεδα ανθεκτικότητας του επιλεγμένου πληθυσμού για να διαπιστωθεί η ύπαρξη ή μη έμμεσης ανθεκτικότητας στο πυρεθρινοειδές σκεύασμα *a*-cypermethrin και η ύπαρξη ή μη πολλαπλής ανθεκτικότητας στο οργανοφωσφορικό εντομοκτόνο chlorpyrifos και στο οργανοχλωριωμένο endosulfan. Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν στο Probit analysis για την εύρεση του επιπέδου ανθεκτικότητας συγκριτικά με τον ευαίσθητο πληθυσμό αναφοράς (XXX strain) και

απεικονίζονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 7. Αποτελέσματα ανάλυσης θνησιμότητας και επίπεδα ανθεκτικότητας στις διάφορες δραστικές ουσίες								
Πληθυσμός	Δραστική ουσία	N	Slope \pm SE	LD ₅₀ μ g/larva (95% CL)	LD ₉₀ μ g/larva (95% CL)	X ²	P	RF
GAMMA strain	α-cypermethrin	180	8.16 \pm 1.53	0.15924 (0.12871-0.20004)	0.31637 (0.25887-0.43337)	6.19	0.103	17.832
XXX strain		160	124.56 \pm 24.36	0.00893 (0.00676-0.01190)	0.01922 (0.01526-0.02751)	2.733	0.604	
GAMMA strain	endosulfan	230	0.34 \pm 0.05	4.4415 (3.75516-5.33519)	8.12091 (6.91447-10.0548)	7.619	0.179	24.531
XXX strain		140	5.11 \pm 0.99	0.18106 (0.12894-0.25112)	0.43197 (0.33688-0.63045)	5.556	0.352	
GAMMA strain	chlorpyrifos	210	0.89 \pm 0.12	2.01557 (1.72334-2.39201)	3.44491 (2.95485-4.24647)	5.732	0.22	11.958
XXX strain		140	7.97 \pm 1.46	0.16856 (0.13641-0.20834)	0.32940 (0.27278-0.44124)	8.439	0.077	

(n: ο συνολικός αριθμός προνυμφών, LD₅₀ (Lethal dose for 50% mortality): συγκέντρωση που θανατώνει το 50% του πληθυσμού, RF(Resistance Factor): παράγοντας ανθεκτικότητας, Slope και SE: κλίση ευθείας και απόκλιση, X² δοκιμής καλής αντιπροσώπευσης από ευθεία, 95% CL: όρια εμπιστοσύνης στο 95%, P: πιθανότητα)

Από τα αποτελέσματα των βιοδοκιμών του πίνακα, παρατηρούμε ότι οι παράγοντες ανθεκτικότητας (RF) κυμαίνονται σε υψηλά επίπεδα και για τις τρεις διαφορετικές χημικές ομάδες εντομοκτόνων που εφαρμόστηκαν. Συγκεκριμένα, οι παράγοντες ανθεκτικότητας για τα α-cypermethrin, endosulfan και chlorpyrifos ήταν 17.832, 24.531 και 11,958 αντίστοιχα.

Στην ανάλυση της βιοδοκιμής για τη δραστική ουσία α-cypermethrin η τιμή LD₅₀ για τον ανθεκτικό πληθυσμό ήταν 0.15924, ενώ για τον ευαίσθητο 0.00893. Για τη δραστική ουσία endosulfan οι τιμές LD₅₀ για τον ανθεκτικό και τον ευαίσθητο ήταν 4.4415 και 0.18106 αντίστοιχα. Τέλος, οι τιμές LD₅₀ που

υπολογίστηκαν για το chlorpyrifos ήταν 2.01557 για τον ανθεκτικό και 0.16856 για τον ευαίσθητο πληθυσμό.

A.3.3. Επίδραση των συνεργιστών στην ανθεκτικότητα

Μελετήθηκε η επίδραση των συνεργιστών PB και DEF στην ανθεκτικότητα του υπό μελέτη επιλεγμένου πληθυσμού (Πίνακας 9). Στο παρακάτω πίνακα φαίνεται ότι μετά την εφαρμογή των συνεργιστών επηρεάστηκε η θνησιμότητα του εξεταζόμενου πληθυσμού. Πιο συγκεκριμένα ο πληθυσμός GAMMA strain χωρίς την εφαρμογή συνεργιστών εμφάνισε RF 44 συγκρινόμενος με τον XXX strain, ενώ μετά τη χρήση των συνεργιστών τα RF ήταν 12.56 και 21.13 με PB και DEF αντίστοιχα.

Πίνακας 8. Αποτελέσματα βιοδοκιμών με συνεργιστές								
Πληθυσμός	Δραστική ουσία	N	Slope ± SE	LD ₅₀ μg/larva (95% CL)	LD ₉₀ μg/larva (95% CL)	χ ²	P	RF
GAMMA strain	γ-cyhalothrin	179	13.17± 1.78	0.10221 (0.08467-0.12437)	0.19955 (0.16864-0.24974)	7.367	0.118	44.056
GAMMA strain (+DEF)		180	35.72± 5.26	0.04902 (0.04138-0.06036)	0.08490 (0.07097-0.10905)	6.366	0.173	SF=2.09 RF=21.13
GAMMA strain (+PB)		178	34.8± 5.47	0.02914 (0.02309-0.03729)	0.06597 (0.05377-0.08798)	5.099	0.277	SF=3.51 RF=12.56
XXX strain		220	586.94 ± 83.08	0.00232 (0.00193-0.00286)	0.00451 (0.00377-0.00576)	0.711	0.982	

(n: ο συνολικός αριθμός προνυμφών, LD₅₀ (Lethal dose for 50% mortality): συγκέντρωση που θανατώνει το 50% του πληθυσμού, RF(Resistance Factor): παράγοντας ανθεκτικότητας, Slope και SE: κλίση ευθείας και απόκλιση, χ² δοκιμής καλής αντιπροσώπευσης από ευθεία, 95% CL: όρια εμπιστοσύνης στο 95%, P: πιθανότητα, SF:LD₅₀ μεταχειρίσεων με εντομοκτόνο/LD₅₀ μεταχειρίσεων με το εντομοκτόνο και το συνεργιστή)

A.4. Συζήτηση

Η διαπίστωση και η μέτρηση της ανθεκτικότητας πληθυσμών *H. armigera* έγινε με βιοδοκιμές στον επιλεγμένο με γ-cyhalothrin ανθεκτικό πληθυσμό GAMMA strain και τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με τον ευαίσθητο πληθυσμό αναφοράς XXX strain. Αναλύοντας τα αποτελέσματα των βιοδοκιμών αυτών διαπιστώθηκε σημαντικότερη αύξηση (44 folds) των επιπέδων ανθεκτικότητας του ανθεκτικού πληθυσμού στη δραστική ουσία με την οποία έγινε η επιλογή του.

Οι βιοδοκιμές με τους συνεργιστές έδειξαν ότι η εφαρμογή των συνεργιστικών ουσιών ναι μεν επέδρασε στον πληθυσμό που μελετήθηκε, όμως η επίδραση αυτή δε φαίνεται να είναι καθολική. Επομένως, ο φαινότυπος μου ενδεχομένως να οφείλεται κατά ένα μέρος σε αυξημένη δράση των ενζύμων αποτοξικοποίησης και σε ένα άλλο μέρος σε ανθεκτικότητα στόχου.

Τέλος, πραγματοποιήθηκαν βιοδοκιμές για να διαπιστωθεί η ύπαρξη έμμεσης ή πολλαπλής ανθεκτικότητας στον ανθεκτικό πληθυσμό που μπορεί να δημιουργήθηκε κάτω από την πίεση της επιλογής. Από τα αποτελέσματα των βιοδοκιμών αυτών και στις τρεις διαφορετικές ομάδες χημικών ουσιών (πυρεθρινοειδή, οργανοφωσφορικά και οργανοχλωριωμένα), διαπιστώθηκε ότι τα επίπεδα ανθεκτικότητας του ανθεκτικού πληθυσμού ήταν αυξημένα σε σχέση με αυτά του ευαίσθητου. Δηλαδή, ο ανθεκτικός πληθυσμός εμφάνισε όχι μόνο έμμεση, αλλά και πολλαπλή ανθεκτικότητα. Συνεπώς, σύμφωνα με αυτό υποδεικνύεται η πιθανή ανάπτυξη ανθεκτικότητας στόχου.

Οι ενδείξεις αυτές μας οδήγησαν στην πραγματοποίηση, από τη μια, βιοχημικών διαγνωστικών για τον προσδιορισμό της ενεργότητας των ενζύμων αποτοξικοποίησης των εντομοκτόνων του μηχανισμού ανθεκτικότητας και από την άλλη μοριακών

διαγνωστικῶν για να εξετασθεῖ το ενδεχόμενο η ανθεκτικότητα που παρατηρεῖται να αποτελεί ανθεκτικότητα στόχου.

B. Προσδιορισμός Ενεργότητας Ενζύμων Αποτοξικοποίησης - εν δυνάμει Βιοχημικής Ανθεκτικότητας στο γ -cyhalothrin

B1. Εισαγωγή

Όπως έχει αναφερθεί και σε προηγούμενο κεφάλαιο, η βιοχημική ανθεκτικότητα αποτελεί τη δεύτερη γραμμή άμυνας και συνίσταται από ένζυμα που μεταβολίζουν τα εντομοκτόνα προτού αυτά φτάσουν στους στόχους τους. Βασικά ένζυμα της βιοχημικής ανθεκτικότητας είναι οι εστεράσες – καρβοξυλεστεράσες (Esterases), οι μικτής λειτουργίας P450 οξειδάσες (Cytochrome P450s) και οι μεταφοράσες της γλουταθειόνης (Glutathione-S-transferases) (Βόντας κ. α. 2007).

Για να μελετηθούν τα ένζυμα που εμπλέκονται στη βιοχημική ανθεκτικότητα μορφοποιήθηκαν και τροποποιήθηκαν μέθοδοι και τεχνικές που χρησιμοποιούνται σε άλλα αρθρόποδα.

B.2. Υλικά και Μέθοδοι

B.2.1 Ενζυμικά υποστρώματα και υλικά

Για τη διενέργεια των βιοχημικών πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν τα ενζυμικά υποστρώματα: 7-Ethoxycoumarin, a και b Naphthyl acetate, και Monochlorobimane. Για κάθε ενζυμικό υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε πραγματοποιήθηκαν 3 επαναλήψεις. Οι ενεργότητες των ενζύμων αποτοξικοποίησης προσδιορίστηκαν με φασματοφωτόμετρο SpectraMax M2^e microplate reader (Molecular Devices). Όλα τα υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονται από την Sigma (Steinheim, Germany).

B.2.2. Πληθυσμοί *H. armigera*

Οι πληθυσμοί που χρησιμοποιήθηκαν για τη μέτρηση των ενεργοτήτων των ενζυμικών συστημάτων αποτοξικοποίησης ήταν ο πληθυσμός αναφοράς XXX strain, ο ανθεκτικός GAMMA strain και τέλος ο πατρικός από τον οποίο προήλθε ο ανθεκτικός, LAB strain.

B.2.3. Προετοιμασία δειγμάτων

Για τις βιοχημικές αναλύσεις τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα μεσέντερα προνυμφών 3ου σταδίου. Για την απομόνωσή τους ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:

- Εισαγωγή των προνυμφών για μερικά δευτερόλεπτα σε σωλήνες τύπου erpendorf χωρητικότητας 1.5 ml που περιείχαν νερό, προκειμένου να επιτευχθεί η αναισθητοποίησή τους.
- Μεταφορά τους με τη βοήθεια λαβίδας σε τρυβλίο με παραφίνη (στερεή).
- Σταθεροποίησή τους με τη βοήθεια καρφισών.
- Άνοιγμα της επιδερμίδας τους κατά μήκος με τη βοήθεια εντομολογικού ψαλιδιού και σταθεροποίηση αυτών με καρφίτσες.
- Αφαίρεση των πεπτικών σωλήνων και ξέπλυμα αυτών από τα υπολείμματα τροφής με κρύο διάλυμα SPB (Sodium Phosphate Buffer 0.1 M, pH: 7.0).
- Διατήρηση των μέσων εντέρων σε σωλήνες τύπου erpendorf χωρητικότητας 1.5 ml στους -80°C (5 μεσέντερα/erpendorf).

Η προετοιμασία των μεσεντέρων που απομονώθηκαν με τον παραπάνω τρόπο για τις βιοχημικές αναλύσεις που αφορούν τις εστεράσες και τις τρoσφεράσες της γλουταθειόνης, περιλαμβάνει τα εξής βήματα:

- ✓ Προσθήκη 400 μl διαλύματος SPB (0.1 M, pH:7.0) σε κάθε σωλήνα τύπου erpendorf ο οποίος περιείχε 5 μεσέντερα *H. armigera*. Η προσθήκη του SPB πραγματοποιήθηκε σε δύο δόσεις των 200 μl.
- ✓ Ομογενοποίηση δειγμάτων με τη βοήθεια ομογενοποιητή (pestle) που εφαρμόζει σε 1.5 ml σωλήνες τύπου erpendorf.
- ✓ Φυγοκέντρηση στις 10000 rpm (στροφές ανά λεπτό) για 10 λεπτά στους 4°C .

- ✓ Συλλογή και μεταφορά του υπερκειμένου που σχηματίστηκε σε καθαρό σωλήνα τύπου errendorf χωρητικότητας 1.5 ml.

Ενώ, προκειμένου να μετρηθεί η ενεργότητα των P450 οξειδασών έγινε απομόνωση μικροσωμάτων από τα μεσέντερα των εντόμων. Η διαδικασία της απομόνωσης ήταν η ακόλουθη:

- Παρασκευή 50 ml διαλύματος A: 49.65 ml 100 mM SPB pH:7.2, 100 μl 1 mM EDTA, 50 μl 1 mM DTT, 200 μl 0.4 mM PMSF και 3.423 g 200 mM sucrose.
- Προσθήκη 1 ml διαλύματος A σε κάθε σωλήνα τύπου errendorf ο οποίος περιείχε 5 μεσέντερα *H. armigera*. Η προσθήκη του διαλύματος A πραγματοποιήθηκε σταδιακά σε 4 δόσεις των 250 μl.
- Ομογενοποίηση δειγμάτων με τη βοήθεια ομογενοποιητή (pestle) που εφαρμόζει σε 1.5 ml σωλήνες τύπου errendorf.
- Φυγοκέντρηση στις 5000 rpm (στροφές ανά λεπτό) για 5 λεπτά στους 4°C.
- Συλλογή και μεταφορά του υπερκειμένου που σχηματίστηκε σε καθαρό σωλήνα τύπου errendorf χωρητικότητας 1.5 ml (a).
- Προσθήκη στην πελέττα 1 ml διαλύματος A.
- Ομογενοποίηση με τη βοήθεια ομογενοποιητή (pestle) που εφαρμόζει σε 1.5 ml σωλήνα τύπου errendorf.
- Φυγοκέντρηση στις 5000 rpm (στροφές ανά λεπτό) για 5 λεπτά στους 4°C.
- Συλλογή και μεταφορά του υπερκειμένου που σχηματίστηκε σε καθαρό σωλήνα τύπου errendorf χωρητικότητας 1.5 ml (b).
- Φυγοκέντρηση των a και b στις 12000 rpm (στροφές ανά λεπτό) για 15 λεπτά στους 4°C.
- Συλλογή και μεταφορά των υπερκειμένων (a και b) που σχηματίστηκαν στον ίδιο καθαρό σωλήνα τύπου corex.
- Προσθήκη ddH₂O στα παραπάνω δείγματα μέχρι τελικού όγκου ~9.5 ml.
- Φυγοκέντρηση στις 60000 rpm (στροφές ανά λεπτό) για 60 λεπτά στους 4°C (υπερφυγόκεντρος).

- Απόρριψη του υπερκειμένου.
- Επαναδιάλυση της πελέττας σε 300 μl διαλύματος A.
- Αραίωση των δειγμάτων με το διάλυμα A (5 μl δείγματος + 45 μl διαλύματος A).

B.2.4. Μέτρηση της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης

Η μέτρηση της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης γίνεται με τη χρήση του ενζύμου BSA (Bovine Serum Albumin) σε διαδοχικές αραιώσεις σε μικροπλάκα (96 - well plate).

Χρησιμοποιήθηκαν 5 και 10μl από το ομογενές διάλυμα κάθε αγνώστου δείγματος τα οποία και προστέθηκαν σε 300 μl διαλύματος Bradford (95% αιθανόλη, 88% φωσφορικό οξύ και 3.5 mg/ml SERVA blue G). Με τον τρόπο αυτό, η συγκέντρωση της πρωτεΐνης μετρήθηκε σύμφωνα με το αντιδραστήριο Bradford σε σπεκτροφωτόμετρο στα 595 nm σε end point assay.

Το ίδιο πραγματοποιήθηκε και για διαλύματα BSA γνωστής συγκέντρωσης, με σκοπό την κατασκευή πρότυπης καμπύλης. Από την πρότυπη καμπύλη προέκυψε η παρακάτω εξίσωση, βάσει της οποίας έγιναν οι υπολογισμοί συγκέντρωσης του εκάστοτε δείγματος.

$$Y=0.0739X + 0.1152, R^2=0.998$$

B.2.5. Μέτρηση ενεργότητας ενζυμικών συστημάτων

B.2.5.1. Εστεράσες

Για τον υπολογισμό της ενεργότητας των ESTs (Esterases) χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω ενζυμικά υποστρώματα:

❖ α- naphthyl acetate

Προετοιμάστηκαν τα εξής διαλύματα:

- Διάλυμα Α: 18.8 mg α-naphthyl acetate σε 1 ml acetonitrile.
- Διάλυμα Β: 4 ml acetone, 8 ml SPB (50 mM, pH: 6.5) και 0.5 ml Διάλυμα Α σε 34 ml ddH₂O.
- Διάλυμα αποχρωματισμού: 3 mg fast garnet και 35 mg SDS σε 1 ml ddH₂O.

Ο τελικός όγκος της αντίδρασης ήταν 200 μl, αποτελούμενος από 5 μl ομογενοποιημένου, 15 μl SPB 0.1M pH: 7.0, 70 μl Hepes 50 mM, 90 μl διάλυμα Β και 20 μl διάλυμα αποχρωματισμού. Στο μάρτυρα αντί ομογενούς διαλύματος, χρησιμοποιήθηκε διάλυμα SPB 0.1M pH: 7.0.

Πίνακας 9. Ποσότητες διαλυμάτων για τη μέτρηση της ενεργότητας των ESTs		
Διαλύματα	Μάρτυρας	Δείγμα
SPB: 0.1 M, pH: 7.0	20 μl	15 μl
Ομογενές δείγμα	0	5 μl
Hepes: 50mM, pH: 7.0	70 μl	70 μl
Διάλυμα Β	90 μl	90 μl

Πρώτα, η μικροπλάκα επώαστηκε στους 30°C για 15 λεπτά και εν συνεχεία προστέθηκαν 20 μl διαλύματος αποχρωματισμού σε κάθε πηγάδι της μικροπλάκας. Ακολούθησε δεύτερη επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά. Η απορρόφηση μετρήθηκε σε σπεκτροφωτόμετρο στα 492 nm σε endpoint assay.

❖ **β - naphthyl acetate**

Όπως περιγράφεται για το α- naphthyl acetate.

B.2.5.2. Μεταφορές ή τρανσφεράσες της γλουταθειόνης

Για τον υπολογισμό της ενεργότητας των GSTs (Glutathione-S-transferases) χρησιμοποιήθηκε το παρακάτω ενζυμικό υπόστρωμα:

❖ Monochlorobimane (MCB)

Ο τελικός όγκος της αντίδρασης ήταν 200 μ l, αποτελούμενος από 15 μ l ομογενοποιημένου, 15 μ l 0.1M pH: 7.0 SPB, 20 μ l 3 mM MCB, 150 μ l 4 mM GSH. Στο μάρτυρα αντί ομογενούς διαλύματος χρησιμοποιήθηκε διάλυμα 0.1M pH: 7.0 SPB.

Πίνακας 10. Ποσότητες διαλυμάτων για τη μέτρηση της ενεργότητας των GSTs			
Διαλύματα	Συστατικά	Ποσότητες (μ l)	
		Μάρτυρας	Δείγμα
SPB (0.1 M, pH:7.0)	Na ₂ HPO ₄ : 0.1 M, pH:10.0 (FW: 141.96)	30	15
	NaH ₂ PO ₄ : 0.1 M, pH: 4.0 (FW: 119.98) ποσότητα ώστε να ρυθμιστεί το pH του τελικού διαλύματος στο 7.0		
Ομογενές δείγμα		0	15
Διάλυμα A (4 mM)	Hepes: 17.280 ml, 50 mM, pH:7.0	150	150
	GSH: 720 μ l, 100 mM		
Διάλυμα B (3 mM)	Hepes: 2.250 ml, 50 mM, pH:7.0	20	20
	MCB: 250 μ l, 30 mM		

Για την παρασκευή 30 mM MCB διαλύθηκαν 6.8 mg MCB (Fluca code: 69899) σε 1 ml αιθανόλης.

Για την παρασκευή 100 mM GSH διαλύθηκαν 30.7 mg GSH (L-Glutathione reduced sigma code: G4251) σε 1 ml ddH₂O.

Η μικροπλάκα επώαστηκε στους 22°C για 20 λεπτά και ο φθορισμός υπολογίστηκε στο σπεκτροφωτόμετρο με διέγερση στα 380 nm και εκπομπή στα 465 nm σε endpoint assay.

B.2.5.3. Μικτής λειτουργίας P450 οξειδάσες ή μονοοξυγενάσες

Η μέτρηση της ενεργότητας των P450s οξειδασών έγινε με το ενζυμικό υπόστρωμα 7-Ethoxycoumarin, χρησιμοποιώντας τα δείγματα από την υπερφυγοκέντρωση.

Προετοιμάστηκαν τα εξής διαλύματα:

- Διάλυμα 20 mM 7-ethoxycoumarin: 3.804 mg 7-ethoxycoumarin σε 1 ml ethanol.
- Διάλυμα 10 mM NADPH: 3.61 mg NADPH σε 1 ml ddH₂O.
- Διάλυμα 30 mM GS-SG: 18.378 mg GS-SG (FW:602.6) σε 1 ml ddH₂O.
- Διάλυμα εξουδετέρωσης NADPH: 0.5 μl Glutathione reductase και 10 μl 30 mM GS-SG σε 9.5 μl ddH₂O.
- Διάλυμα 55 mM Glycin ethanol pH: 10.4: 10 ml 55 mM, pH: 10.4 glycin σε 10 ml ethanol.

Ο τελικός όγκος της αντίδρασης ήταν 280 μl, αποτελούμενος από 50 μl ομογενούς δείγματος, 50 μl 0.1M pH: 7.0 SPB, 5 μl 20 mM 7-ethoxycoumarin, 15 μl 10 mM NADPH, 20 μl διάλυμα εξουδετέρωσης NADPH και 140 μl 55mM pH: 10.4 Glycin ethanol. Στο μάρτυρα αντί ομογενούς δείγματος χρησιμοποιήθηκε διάλυμα 0.1M pH: 7.0 SPB.

Πίνακας 11. Ποσότητες διαλυμάτων για τη μέτρηση της ενεργότητας των P450s

Διαλύματα	Μάρτυρας	Δείγμα	Δείγμα (- NADPH)
0.1 M, pH: 7.0 SPB	100 μl	50 μl	65 μl
Ομογενές δείγμα	0	50 μl	50 μl
20 mM 7-ethoxycoumarin	5 μl	5 μl	5 μl
10 mM NADPH	15 μl	15 μl	0

Πρώτα, η μικροπλάκα επώαστηκε στους 30°C για 30 λεπτά σε συνθήκες σκότους (καλυμμένη με φύλλο αλουμινίου) και εν συνεχεία προστέθηκαν 20 μl διαλύματος εξουδετέρωσης NADPH σε κάθε πηγάδι της μικροπλάκας. Ακολούθησε δεύτερη επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 140 μl διαλύματος Glycyl ethanol και τέλος η ποσότητα της 7-ethoxycoumarin που ελευθερώνεται κατά την επώαση, μετρήθηκε σε σπεκτροφωτόμετρο με διέγερση στα 390 nm και εκπομπή στα 465 nm σε endpoint assay.

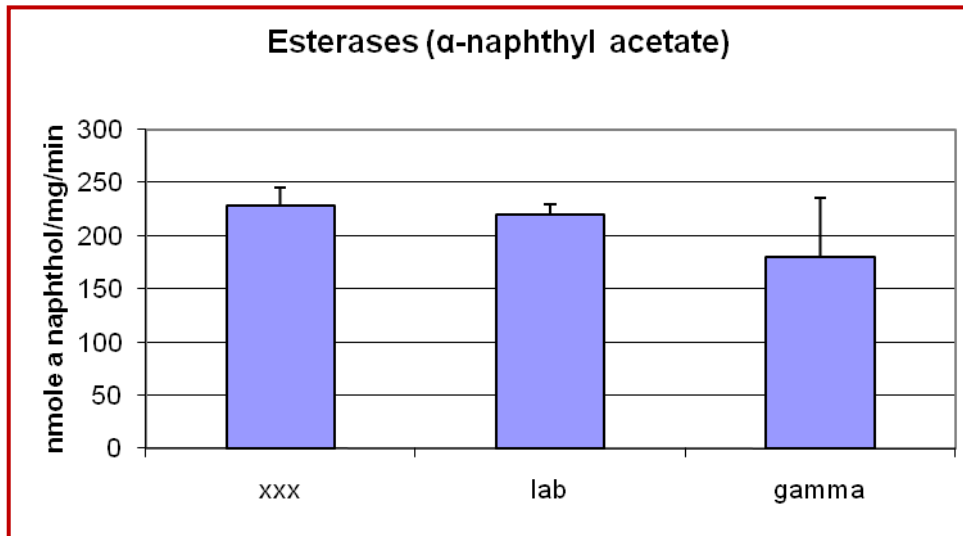
B.3. Αποτελέσματα

B.3.1. Ενεργότητα εστερασών

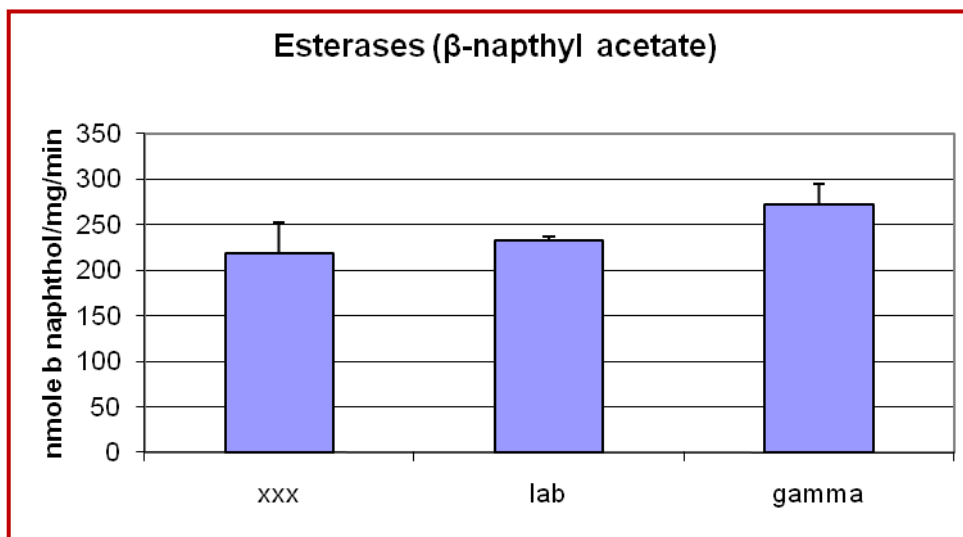
Ο ανθεκτικός πληθυσμός GAMMA strain δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντικές διαφορές στην ενεργότητα των εστερασών συγκρινόμενος με τον ευαίσθητο αναφοράς XXX strain και με τον πατρικό πληθυσμό LAB strain. Πιο συγκεκριμένα, η ενεργότητα των εστερασών με το υπόστρωμα α-naphthyl acetate εμφάνισε παρόμοια εικόνα στον ευαίσθητο αναφοράς και στον πατρικό, αυξημένη σε σχέση με τον ανθεκτικό χωρίς όμως στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσά τους (Διάγραμμα 1).

Όσον αφορά όμως, στην ενεργότητα των εστερασών με το υπόστρωμα β-naphthyl acetate, ο ευαίσθητος αναφοράς και ο

πατρικός εμφάνισαν παρόμοια εικόνα, στην περίπτωση αυτή όμως μειωμένη, σε σχέση με τον ανθεκτικό χωρίς και πάλι να υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσά τους (Διάγραμμα 2).



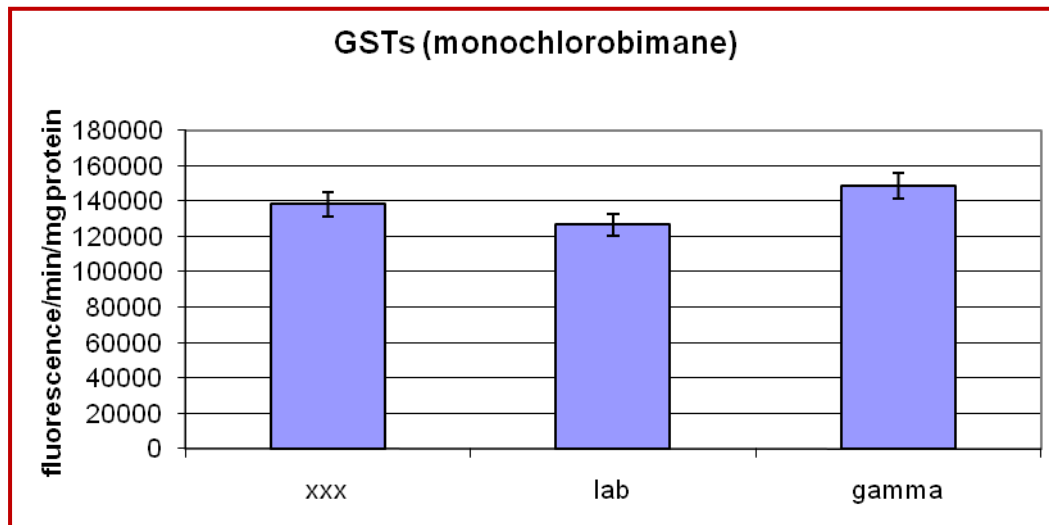
Διάγραμμα 1. Ενεργότητα εστερασών με α-naphthyl acetate



Διάγραμμα 2. Ενεργότητα εστερασών με β-naphthyl acetate

B.3.2. Ενεργότητα τρανσφερασών της γλουταθειόνης

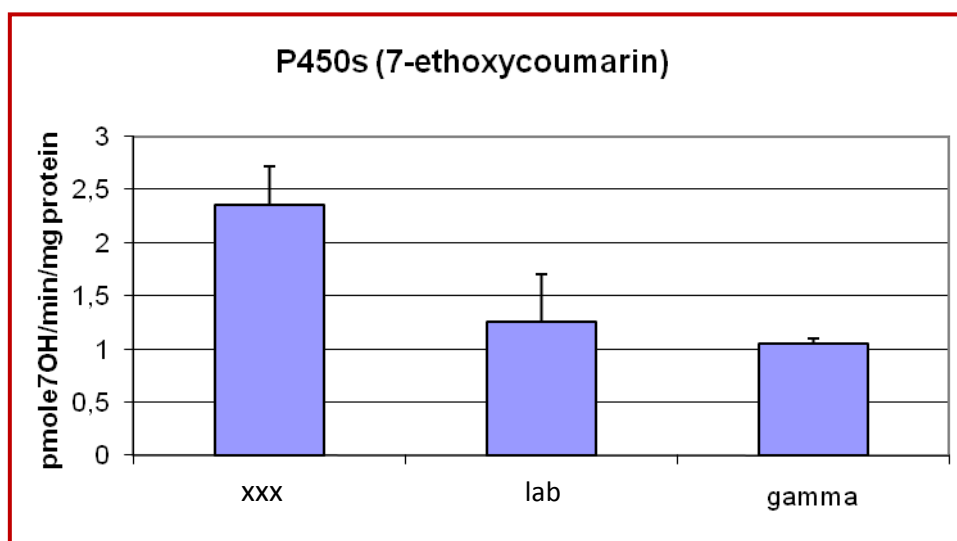
Όσον αφορά στην ενεργότητα των τρανσφερασών της γλουταθειόνης χρησιμοποιώντας το υπόστρωμα monochlorobimane δεν εμφανίστηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές. Πιο συγκεκριμένα, η ενεργότητα των GSTs εμφανίστηκε ελαφρώς αυξημένη στον ανθεκτικό πληθυσμό GAMMA strain σε σχέση με τους δύο άλλους πληθυσμούς XXX και LAB strain που κατ' αναλογία ακολουθούν (Διάγραμμα 3).



Διάγραμμα 3. Ενεργότητα GSTs με Monochlorobimane

B.3.3. Ενεργότητα μικτής λειτουργίας P450 οξειδασών ή μονοοξυγενασών

Το παρακάτω διάγραμμα παρουσιάζει την ενεργότητα των P450s οξειδασών όπως αυτή μετρήθηκε χρησιμοποιώντας την 7-ethoxycoumarin ως υπόστρωμα. Παρατηρείται αυξημένη ενεργότητα στο ευαίσθητο στέλεχος XXX strain, σε σχέση με το ανθεκτικό στέλεχος GAMMA strain και η διαφορά αυτή μεταξύ τους είναι στατιστικά σημαντική. Όσον αφορά στην ενεργότητα του πατρικού στελέχους, αυτή κυμαίνεται περίπου στα ίδια επίπεδα με την ενεργότητα του ανθεκτικού ακομά και μετά την πάροδο των 23 γενεών επιλογής.



Διάγραμμα 4. Ενεργότητα P450s με 7-Ethoxycoumarin

B.4. Συζήτηση

Αναλύοντας τα αποτελέσματα των ενζύμων αποτοξικοποίησης (ESTs, GSTs και P450s) παρατηρήθηκε ότι ο ανθεκτικός πληθυσμός που μελετήθηκε, δεν εμφάνισε στατιστικά σημαντικές διαφορές σε κανένα από τα ενζυμικά συστήματα που χρησιμοποιήθηκαν. Μάλιστα, στην περίπτωση των P450s, το ευαίσθητο στέλεχος φάνηκε να παρουσιάζει μεγαλύτερη ενεργότητα ενζύμων σε σχέση με αυτή του ανθεκτικού, γεγονός που ενδεχομένως να οφείλεται στην τεχνητή τροφή στην οποία αναπτύχθηκε το συγκεκριμένο στέλεχος επί σειρά ετών. Τα βιοχημικά πειράματα λοιπόν, δείχνουν ότι η ανθεκτικότητα του επιλεγμένου με γ -cyhalothrin πληθυσμού, του οποίου τα επίπεδα ανθεκτικότητας εμφανίστηκαν σημαντικά υψηλά βάσει των βιοδοκιμών που προηγήθηκαν, δε φαίνεται να σχετίζεται με αυξημένη ενεργότητα των ενζύμων αποτοξικοποίησης.

Όμως, η ελάχιστη αύξηση που παρατηρήθηκε μόνο στην ειδική δραστηριότητα των εστερασών χρησιμοποιώντας το ενζυμικό υπόστρωμα β -naphthyl acetate, οδήγησε στη δοκιμή ενός δεύτερου τρόπου βιοχημικού ελέγχου με ανάλυση των επιπέδων ενζυμικής ενεργότητας μέσω μη αποδιατακτικού πηκτώματος ακρυλαμίδης (Native gel) με ειδική χρώση με το ίδιο υπόστρωμα.

Γ. Έλεγχος Ενεργότητας Εστερασών με μη Αποδιατακτικό Πήκτωμα Ακρυλαμίδης (εγγενής ηλεκτροφόρηση, NATIVE-PAGE)

Γ.1. Εισαγωγή

Προκειμένου να ελεγχθεί αν υπάρχει διαφορά στα επίπεδα έκφρασης των εστερασών στο ανθεκτικό σε σχέση με το ευαίσθητο και το πατρικό στέλεχος, σε επίπεδο ισοενζύμων, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε μη αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμίδης (εγγενής ηλεκτροφόρηση, NATIVE-PAGE) με χρώση β-naphthyl acetate, ενζυμικό υπόστρωμα στο οποίο παρατηρήθηκε μια μικρή αύξηση στο επίπεδο ενεργότητας εστερασών στο ανθεκτικό στέλεχος.

Γ.2. Υλικά και Μέθοδοι

Στην ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιήθηκαν ο πληθυσμός αναφοράς XXX strain, ο ανθεκτικός GAMMA strain και τέλος ο πατρικός από τον οποίο προήλθε ο ανθεκτικός, LAB strain. Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν προνύμφες 3ου σταδίου.

Η προετοιμασία των δειγμάτων και η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης περιλαμβάνει τα εξής βήματα:

- Ομογενοποίηση κάθε προνύμφης ξεχωριστά σε σωλήνες τύπου erpendorf χωρητικότητας 1.5 ml με τη βοήθεια κατάλληλου ομογενοποιητή προσθέτοντας 100 μl διαλύματος I (1.6% Triton X-100, 20% sucrose w/v, 0.04% Bromophenol blue).
- Φυγοκέντρηση στις 2000 rpm (στροφές το λεπτό) για 5 λεπτά στους 4°C.
- Συλλογή του υπερκείμενου.
- Ανάμειξη του υπερκείμενου με το διάλυμα I σε αναλογία 1:1 (100 μl διαλύματος I: 100 μl υπερκείμενου).
- Παρασκευή πήκτωματος διαχωρισμού – separating gel (7.5 ml stock acrylamide solution, 7.5 ml Tris HCl 1.5M pH: 8.8, 14.85 ml ddH₂O, 150 μl APS 10% και 15 μl TEMED) και τοποθέτησή του στη συσκευή μέχρι να στερεοποιηθεί.

- Παρασκευή πηκτώματος συσσώρευσης – stacking gel (1.5 ml stock acrylamide solution, 3 ml Tris HCl 0.5M pH: 6.8, 7.4 ml ddH₂O, 100 μl APS 10% και 15 μl TEMED) και τοποθέτησή του στη συσκευή μετά την στερεοποίηση του πηκτώματος διαχωρισμού.
- Φόρτωση των δειγμάτων και ηλεκτροφόρησή τους με συνθήκες 200V, σε Laemmli Buffer (3 g Tris base 25mM και 14.4 g glycine 192mM, pH:8.3) στους 4°C για 1 ώρα.

Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα τοποθετήθηκε σε διάλυμα που περιέχει 40 ml Sodium Potassium Phosphate buffer 0.2M pH:6.0, 5 ml 1-NB 10mM και 5 ml fast blue RR salt 25mM και αφέθηκε για 10 λεπτά σε ήπια ανάδευση (χρώση β-naphthyl acetate). Στη συνέχεια το πήκτωμα μεταφέρθηκε σε διάλυμα Acetic acid 7%.

Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε κάνοντας χρώση του πηκτώματος σε διάλυμα Coomassie blue stain (1g Coomassie blue R-250, 400 ml Methanol, 100 ml Acetic Acid και 500 ml ddH₂O) όπου και αφέθηκε για 10 λεπτά σε ήπια ανάδευση (χρώση β-naphthyl acetate). Στη συνέχεια το πήκτωμα μεταφέρθηκε σε διάλυμα αποχρωματισμού (100 ml Acetic acid, 400 ml Methanol και 500 ml ddH₂O) όπου και παρέμεινε για 1 ώρα σε ήπια ανάδευση μέχρι να παραμείνουν βαμμένες μόνο οι ζώνες των πρωτεϊνών.

Γ.3. Αποτελέσματα

Στο πήκτωμα που έγινε ειδική χρώση με 1-NB παρατηρήθηκε το ίδιο πρότυπο πρωτεϊνών ανάμεσα στο ανθεκτικό, το πατρικό και το ευαίσθητο στέλεχος. Δεν ανιχνεύθηκε κάποια διαφορά στην ένταση των ζωνών.

Γ.4. Συζήτηση

Αναλύοντας τα αποτελέσματα από την ηλεκτροφόρηση σε μη αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμίδης με χρώση β-naphthyl acetate στο οποίο μπορούμε να ανιχνεύσουμε εστεράσες που υπάρχουν στο κυτταρικό εκχύλισμα του εντόμου, δεν ανιχνεύθηκε κάποια διαφορά των επιπέδων έκφρασης διαφόρων ισοενζύμων εστερασών του ανθεκτικού στελέχους. Οδηγούμαστε λοιπόν στο συμπέρασμα ότι η ενεργότητα εστερασών, που έχει συσχετισθεί με το φαινότυπο σε πληθυσμούς από άλλες περιοχές του κόσμου (Kranthi et al. 2001) δε φαίνεται να σχετίζεται με τον ανθεκτικό φαινότυπο που επιλέχθηκε στην Ελλάδα.

Ενδεχομένως, η ανθεκτικότητα να οφείλεται σε αλλαγές στη δομή του υπομοριακού στόχου των πυρεθρινοειδών εντομοκτόνων που όπως έχει αναφερθεί είναι το κανάλι μεταφοράς ιόντων νατρίου (Sodium channel).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

Μοριακή ανάλυση ανθεκτικότητας στόχου

3.1. Εισαγωγή

Σύμφωνα με τα παραπάνω η ανθεκτικότητα του πληθυσμού GAMMA πιθανόν οφείλεται στην ανθεκτικότητα στόχου. Όπως έχει προαναφερθεί, ο στόχος των πυρεθρινοειδών είναι το γονίδιο των καναλιών μεταφοράς ιόντων νατρίου (sodium channel). Στο κεφάλαιο αυτό, κλωνοποιήθηκαν και αλληλουχήθηκαν τμήματα του γονιδίου από πατρικά και ανθεκτικά άτομα και συγκρίθηκαν οι αλληλουχίες με σκοπό την εύρεση πιθανών μεταλλαγών που ευθύνονται για την ανθεκτικότητα.

3.2. Υλικά και Μέθοδοι

3.2.1. Πληθυσμοί *H. armigera*

Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν ευαίσθητα και ανθεκτικά στελέχη του εντόμου *H. armigera*. Πιο συγκεκριμένα, ο πληθυσμός GAMMA strain ο οποίος παρουσίασε υψηλή ανθεκτικότητα στο πυρεθρινοειδές γ -cyhalothrin και ο πατρικός πληθυσμός LAB strain από τον οποίο προήλθε ο ανθεκτικός.

3.2.2. Απομόνωση ολικού RNA και σύνθεση μονόκλωνου cDNA.

3.2.2.1. Απομόνωση ολικού RNA

Έγινε απομόνωση ολικού RNA από 3 κεφάλια ζωντανών προνυμφών του εντόμου, για το GAMMA strain, ενώ για το LAB strain χρησιμοποιήθηκαν 3 κεφάλια ενηλίκων εντόμων. Για την απομόνωση RNA το περιβάλλον στο οποίο εργαστήκαμε ήταν απαλλαγμένο από ριβονουκλεάσες χάρη στη χρησιμοποίηση RNase free αντιδραστηρίων και αναλώσιμων υλικών, την ειδική επεξεργασία γυαλικών, μεταλλικών αντικειμένων και διαλυμάτων με τη χρήση DEPC (diethyl-pyrocabonate, ειδικός αναστολέας ριβονουκλεασών) και κλιβανισμού και την αποφυγή οποιασδήποτε επαφής αντιδραστηρίων ή υλικών με γυμνά χέρια (συχνή αλλαγή γαντιών).

Η μέθοδος επιτρέπει την παράλληλη απομόνωση ολικού RNA, γενωμικού DNA και πρωτεϊνών από το ίδιο δείγμα. Το βιολογικό

υλικό ομογενοποιείται στο μίγμα απομόνωσης, όπου ελευθερώνονται το RNA, το DNA και οι πρωτεΐνες. Στην συνέχεια με φυγοκέντρηση κατακρημνίζονται τα μη διαλυτά συστατικά όπως μεμβράνες, πολυσακχαρίτες και μεγάλου μοριακού βάρους DNA. Ακολουθεί προσθήκη χλωροφορμίου στο υπερκείμενο με νέα φυγοκέντρηση, μετά την οποία το μίγμα διαχωρίζεται σε τρεις φάσεις: μια υπερκείμενη υδατική, μια μεσόφαση και μια υποκείμενη οργανική φάση.

Για την απομόνωση και τον καθαρισμό του ολικού RNA συλλέγεται η υπερκείμενη φάση και με προσθήκη ισοπροπανόλης γίνεται κατακρήμνιση του RNA. Ακολουθεί πλύση του ιζήματος (RNA) με διάλυμα 75% αιθανόλης, για απομάκρυνση των αλάτων και άλλων μη επιθυμητών μορίων. Μετά την απομάκρυνση της αλκοόλης το RNA επαναδιαλύεται σε νερό (απαλλαγμένο ριβονουκλεασών).

Η απόδοση μιας τυπικής απομόνωσης ολικού RNA είναι της τάξης των 1-10 μg RNA ανά mg αρχικού ιστού. Η ποιότητα του ολικού RNA εκτιμάται με φωτόμετρο ή εμπειρικά με ανάλυση σε πήκτωμα αγαρόζης. Το ολικό RNA μπορεί στην συνέχεια να χρησιμοποιηθεί για απομόνωση mRNA, σύνθεση cDNA. (Τεχνικές μοριακής βιολογίας II, εργαστηριακές ασκήσεις, Αλεξανδρούπολη 2006).

Η απομόνωση περιλαμβάνει τα εξής βήματα:

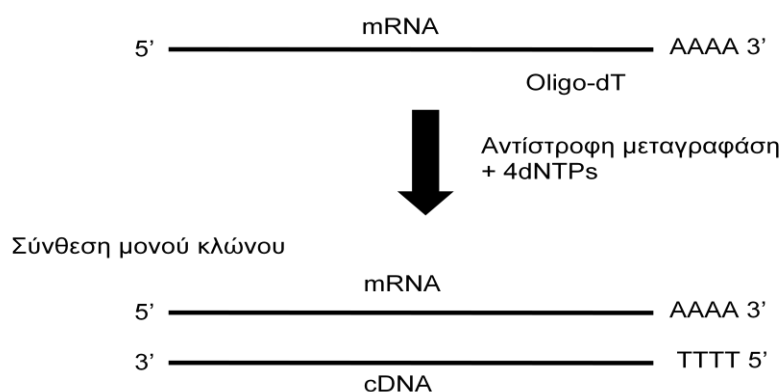
- Προετοιμασία δειγμάτων. Ομογενοποιήθηκαν δείγματα ιστών σε 600 μl TRI REAGENT (SIGMA) χρησιμοποιώντας ένα κατάλληλο ομογενοποιητή που εφαρμόζει σε σωλήνα τύπου eppendorf 1.5 ml. Ακολούθησε φυγοκέντρηση σε 14000 rpm (στροφές το λεπτό) για 15 λεπτά σε θερμοκρασία 4°C ψυχόμενης φυγοκέντρου, για την απομάκρυνση των αδιάλυτων συστατικών. Το υπερκείμενο διάλυμα μεταφέρθηκε σε καινούργιο σωλήνα τύπου eppendorf 1.5 ml.
- Για τη διάσπαση των νουκλεοπρωτεϊνικών συμπλόκων το δείγμα αφέθηκε σταθερό για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Ακολούθησε προσθήκη 120 μl χλωροφορμίου (χωρίς isoamyl ή άλλα πρόσθετα χημικά) και ισχυρή ανάμιξη για 15 δευτερόλεπτα. Στη συνέχεια το δείγμα αφέθηκε σταθερό σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά.
- Ακολούθησε φυγοκέντρηση σε ψυχόμενη φυγόκεντρο στους 4°C σε 14000 rcf για 15 λεπτά.

Στο τέλος αυτού του σταδίου το μείγμα διαχωρίστηκε σε 3 φάσεις: σε μια κόκκινη οργανική φάση (όπου περιέχονται οι πρωτεΐνες), σε μια ενδιάμεση φάση που περιέχεται το DNA και σε μια υπερκείμενη άχρωμη υδατική φάση με το RNA.

- Μεταφορά υδατικής φάσης σε νέο σωλήνα τύπου erpendorf 1.5 ml.
- Προσθήκη ίσης ποσότητας ισοπροπανόλης (~300 μl).
- Παραμονή του δείγματος για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- Φυγοκέντρηση στις 16000 rcf στους 4°C για 15 λεπτά. Σε αυτό το στάδιο εξασφαλίστηκε η κατακρήμνιση του RNA με το σχηματισμό ιζήματος στο κάτω μέρος του σωλήνα τύπου erpendorf 1.5 ml.
- Αφαίρεση υπερκείμενου και πλύσιμο του RNA σε 1000 μl αιθανόλης 75%. Φυγοκέντρηση στις 8000 rcf για 15 λεπτά σε ψυχόμενη φυγόκεντρο και θερμοκρασία 4°C.
- Αφαίρεση αιθανόλης.
- Φυγοκέντρηση στις 8000 rcf για 5 λεπτά στους 4° C.
- Αφαίρεση υπόλοιπης αιθανόλης και παραμονή του ιζήματος σε θερμοκρασία δωματίου για να στεγνώσει προσεκτικά ώστε να μην αφυδατωθεί.
- Επαναδιάλυση του ιζήματος σε 50 μl DEPC (nuclease free) ddH₂O.

3.2.2.2. Σύνθεση μονόκλωνου συμπληρωματικού DNA

Για τη σύνθεση μονόκλωνου συμπληρωματικού DNA χρησιμοποιήθηκαν 5μg ολικού RNA ως εκμαγείο, αντίστροφη μεταγραφάση Superscript III RNase H-(GIBCO) και ένα ολιγονουκλεοτίδιο (oligo-dT) συμπληρωματικό με την πολύ(A) ουρά του 3' άκρου του mRNA που υβριδίζεται με το RNA και δρα ως εκκινήτης για την αντίστροφη μεταγραφάση (Εικόνα 10).



Εικόνα 10. Σύνθεση μονόκλωνου cDNA

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

1. Αρχικά, έγινε υπολογισμός της συγκέντρωσης ολικού RNA που περιέχεται στα 20 μl όγκου των δειγμάτων, με χρήση φασματοφωτόμετρου και σε μια αραιώση 1:100. Εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο της παρασκευάστριας εταιρίας (Invitrogen):

- a. 5 μg ολικού RNA
- b. 1 μl oligo-dT (500 μg/ml)
- c. DEPC-H₂O μέχρι τα 12 μl

Επώαση του δείγματος σε θερμοκρασία 65°C για 10 λεπτά.

2. Μεταφορά των δειγμάτων στον πάγο και προσθήκη των ακόλουθων αντιδραστηρίων:

- a. 4 μl 5X First- Strand Buffer (GIBCO- BRL)
- b. 2 μl 0.1M DTT
- c. 1 μl 10mM dNTP Mix(10mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)

Επώαση του δείγματος σε θερμοκρασία 50°C για 2 λεπτά.

3. Προσθήκη 1 μl Superscript III RNase H - ανάστροφης μεταγραφάσης (200 u/μl) και επώαση του δείγματος σε θερμοκρασία 50°C για 50 λεπτά. Απενεργοποίηση της αντίδρασης σε θερμοκρασία 70°C για 15 λεπτά .

3.2.3. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) για την ανάκτηση και ενίσχυση τμήματος του γονιδίου στόχου

Χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της PCR με σκοπό την ανάκτηση και ενίσχυση τμημάτων του γονιδίου στόχου DOMAIN II (D-II), DOMAIN III (D-III), DOMAIN IV (D-IV) των πυρεθρινοειδών sodium channel (διαμεμβρανικά κανάλια μεταφοράς ιόντων νατρίου). Για το σκοπό αυτό, διεξήχθησαν ανεξάρτητες αντιδράσεις PCR με διαφορετικούς συνδυασμούς εκκινητών και δοκιμάστηκαν διαφορετικές συνθήκες για κάθε στέλεχος.

A. PCR για την ανάκτηση και ενίσχυση τμήματος του γονιδίου στόχου DOMAIN II (D-II)

Αλληλουχία εκκινητών

Εμπρόσθιος εκκινητής: 5'-CGACACTTAATTTACTCATCTC-3'(Cb2cs)

Οπίσθιος εκκινητής: 5'-TGATGAGCCGAAATTTGACAGT-3'(Cb6cs)

Για την αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν τα συστατικά που περιγράφονται στον παρακάτω Πίνακα 12.

Πίνακας 12. Αντίδραση PCR	
5x Crimson Taq Reaction Buffer	10 µl
Cb2cs (10 mM)	1 µl
Cb6cs (10 mM)	1 µl
dNTP's (10 mM)	1 µl
Crimson Taq DNA Polymerase	0.3 µl
ddH ₂ O (μέχρι τα 49 µl)	35.7 µl

Ως μήτρα (template) χρησιμοποιήθηκε 1 µl cDNA από το στέλεχος GAMMA strain του *H. armigera* ενώ το αναμενόμενο μέγεθος του γονιδίου υπολογίστηκε σε 367 bp.

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε 35 κύκλους ενίσχυσης σύμφωνα με το ακόλουθο πρόγραμμα:

1. T=95°C για 2'
2. T=95°C για 30"
3. T=54°C για 40"
4. T=68°C για 30"
5. Επιστροφή στο βήμα 2 και επανάληψη των βημάτων (2-4) 35 φορές.
6. T=68°C για 5'
7. Παραμονή στους 4°C

B. PCR για την ανάκτηση και ενίσχυση τμήματος του γονιδίου στόχου DOMAIN III (D-III)

Αλληλουχία εκκινητών

Εμπρόσθιος εκκινητής: 5'-ATTCAGGCGTTCAAAACGAT-3'

(Ha_SC_IIIF)

Οπίσθιος εκκινητής: 5'-CCGTCACTATCTCGAACACG-3'

(Ha_SC_IIIR)

Για την αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν τα συστατικά που περιγράφονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 13).

Πίνακας 13. Αντίδραση PCR	
5x Crimson Taq Reaction Buffer	10 µl
Ha_SC_IIIF (10 mM)	1 µl
Ha_SC_IIIR (10 mM)	1 µl
dNTP's (10 mM)	1 µl
Crimson Taq DNA Polymerase	0.3 µl
ddH ₂ O (μέχρι τα 49 µl)	35.7 µl

Ως μήτρα (template) χρησιμοποιήθηκε 1 µl cDNA από το στέλεχος GAMMA strain του *H. armigera* ενώ το αναμενόμενο μέγεθος του γονιδίου υπολογίστηκε σε 680 bp.

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε 35 κύκλους ενίσχυσης σύμφωνα με το ακόλουθο πρόγραμμα:

1. T=95°C για 2'
2. T=95°C για 30"
3. T=54°C για 40"
4. T=68°C για 30"
5. Επιστροφή στο βήμα 2 και επανάληψη των βημάτων (2-4) 35 φορές.
6. T=68°C για 5'
7. Παραμονή στους 4°C

Γ. PCR για την ανάκτηση και ενίσχυση τμήματος του γονιδίου στόχου DOMAIN IV (D-IV)

Αλληλουχία εκκινητών

Εμπρόσθιος εκκινητής: 5'-TAGTCGTCGTCCTCCGTCAGACC-3' (DIV-F)

Οπίσθιος εκκινητής: 5'-ATGACGCTCGATCACAACCA-3' (DIV-R)

Για την αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν τα συστατικά που περιγράφονται στον Πίνακα 14.

Πίνακας 14. Αντίδραση PCR	
5x Colorless GoTaq Flexi Buffer	10 μ l
Εμπρόσθιος εκκινητής (10 mM)	1 μ l
Οπίσθιος εκκινητής (10 mM)	1 μ l
dNTP's (10 mM)	1 μ l
MgCl ₂ (25mM)	2 μ l
Go Taq Hot Start Polymerase (5 units/ μ l)	0.25 μ l
ddH ₂ O (μέχρι τα 49 μ l)	33.75 μ l

Ως μήτρα (template) χρησιμοποιήθηκε 1 μ l cDNA από το στέλεχος GAMMA strain του *H. armigera* ενώ το αναμενόμενο μέγεθος του γονιδίου υπολογίστηκε σε 731 bp.

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε 35 κύκλους ενίσχυσης σύμφωνα με το ακόλουθο πρόγραμμα:

1. T=95°C για 2'
2. T=95°C για 30"
3. T=53°C για 30"
4. T=72°C για 1'
5. Επιστροφή στο βήμα 2 και επανάληψη των βημάτων (2-4) 35 φορές.
6. T=72°C για 5'
7. Παραμονή στους 4°C

3.2.4. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης (1.0%)

Για την παρασκευή gel αγαρόζης 1%w/v χρησιμοποιήθηκαν:

- 0.25 gr agarose
- 4 μ l βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr)
- 0.5 ml T.A.E (50X) ρυθμιστικό διάλυμα
- 24.5 ml ddH₂O

Μέσα σε κωνική φιάλη διαλύθηκαν 0.25 gr αγαρόζης σε 0.5 ml T.A.E και 24.5 ml ddH₂O. Ακολούθησε θέρμανση του διαλύματος για 3 περίπου λεπτά μέχρις ότου έγινε διαφανές. Εν συνεχεία μεταφέρθηκε σε ειδικά εκμαγεία που έφεραν προσαρμοσμένα χτένια (combs) και αφέθηκε να πήξει. Το gel μεταφέρθηκε σε συσκευή

ηλεκτροφόρησης γεμάτη με ρυθμιστικό διάλυμα T.A.E (1X). Αφού προστέθηκε στα προϊόντα PCR loading buffer (6X), αυτά τοποθετήθηκαν στις εσοχές που είχαν σχηματιστεί από τα ειδικά χτένια. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε στα 100mV. Τα τμήματα DNA που προέκυψαν από την PCR έγιναν ορατά μετά την έκθεση του gel σε συσκευή εκπομπής υπέρυθρης ακτινοβολίας και στη συνέχεια φωτογραφήθηκαν.

Παρασκευή διαλυμάτων:

Πίνακας 15. Συστατικά διαλυμάτων		
Διαλυμα EtBr (10 mg/ml)	Loading buffer (6X)	T.A.E (50X)
1000 mg stock solution EtBr	5 ml glycerol	242 gr Tris base
100 ml ddH ₂ O	5 ml ddH ₂ O	57.1 ml glacial acetic acid
	Orange G χρωστική	200 ml Na ₂ EDTA

3.2.5. Εξαγωγή DNA από πήκτωμα αγαρόζης με εμπορικό ΚΙΤ

Η μέθοδος βασίζεται στις επιλεκτικές για τα μόρια DNA προσροφητικές ιδιότητες ειδικά σχεδιασμένων μεμβρανών silica gel, παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων χαοτροπικών αλάτων, σε ελαφρώς όξινο pH. Ανεπιθύμητα μόρια όπως αυτά της αγαρόζης, χρωστικών, βρωμιούχου αιθιδίου, πρωτεϊνών κ.α. διαπερνούν την μεμβράνη και απορρίπτονται. Ακολουθεί πλύση για την απομάκρυνση των αλάτων και τέλος έκλυση και παραλαβή του DNA σε ρυθμιστικό διάλυμα ή νερό, σε ελαφρά αλκαλικό pH (Τεχνικές μοριακής βιολογίας II, εργαστηριακές ασκήσεις, Αλεξανδρούπολη 2006).

- Απομόνωση της ζώνης DNA με το αναμενόμενο μέγεθος χρησιμοποιώντας καθαρό νυστέρι και μεταφορά της σε σωλήνα τύπου erpendorf χωρητικότητας 1.5 ml.
- Ζύγισμα του κομματιού αγαρόζης και προσθήκη σ'αυτό 3 όγκων ειδικού για την διαλυτοποίηση της αγαρόζης ρυθμιστικού διαλύματος (QG buffer) για κάθε όγκο gel αγαρόζης(π.χ. 300 μl buffer QG σε 100 mg αγαρόζης).
- Θέρμανση για 10 λεπτά στους 50°C (σε προθερμασμένο water bath) και ισχυρό ανακάτεμα κάθε 2 λεπτά για διαλυτοποίηση της αγαρόζης.

- Προσθήκη 1 όγκου διαλύματος ισοπροπανόλης 100% για κάθε όγκο αρχικής ποσότητας gel αγαρόζης (π.χ. 100 μl ισοπροπανόλης σε 100 mg agarose gel) και ελαφριά ανάμειξη.
- Μεταφορά του μείγματος σε κολόνες με ειδική μεμβράνη πρόσδεσης (MinElute Column).
- Φυγοκέντρηση της κολόνας για 1 λεπτό στις 13000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου. Σε αυτό το στάδιο το DNA έχει προσδεθεί στο φίλτρο της κολόνας και τα ανεπιθύμητα μόρια την διαπερνούν και απομακρύνονται.
- Προσθήκη 500 μl QG Buffer και φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 13000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου για την απομάκρυνση κάθε ίχνους αγαρόζης.
- Προσθήκη 750 μl αιθανολικού διαλύματος πλύσης PE Buffer για την απομάκρυνση αλάτων και υπολειμμάτων από το DNA. Παραμονή της κολόνας για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρηση αυτής για 1 λεπτό σε 13000 rpm.
- Απόρριψη του υγρού που εκλούεται και επιπρόσθετη φυγοκέντρηση για 1 λεπτό σε 13000 rpm για απομάκρυνση ιχνών αιθανόλης από την κολόνα.
- Μεταφορά του φίλτρου σε καθαρό σωληνάριο τύπου erpendorf 1.5 ml και έκλουση του προσδεδμένου στην κολόνα DNA με διάλυμα EB buffer όγκου 12 μl.
- Παραμονή της κολόνας για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρηση για 1 λεπτό σε 13000 rpm.

3.2.6. Αντίδραση σύνδεσης οχήματος κλωνοποίησης και ενθέματος που καταλύεται από το ένζυμο DNA λιγάση του βακτηριοφάγου T4.

Σκοπός του σταδίου αυτού ήταν η εισαγωγή των τμημάτων DNA που απομονώθηκαν και καθαρίστηκαν στην προηγούμενη φάση, και που πιθανά έφεραν την αλληλουχία των επιθυμητών γονιδίων, σε ένα κατάλληλο όχημα κλωνοποίησης (cloning vector). Επιλέχθηκε ο pGEM-T easy vector (PROMEGA).

Η σύνδεση του οχήματος κλωνοποίησης με τις επιθυμητές αλληλουχίες (inserts) πραγματοποιήθηκε με το ένζυμο DNA λιγάση του βακτηριοφάγου T4. Αρχικά έγινε βελτιστοποίηση της μοριακής αναλογίας φορέα-ενθέματος (insert-vector) στο διάλυμα της αντίδρασης. Μια αναλογία που δίνει καλά αποτελέσματα είναι η εξής: 3 (insert):1 (vector).

Για τον υπολογισμό της κατάλληλης ποσότητας (σε ng) insert εφαρμόστηκε η ακόλουθη εξίσωση:

$$\frac{\text{ng of vector} \times \text{kb size of insert}}{\text{Kb size of vector}} \times \text{insert : vector molar ratio} = \text{ng of insert}$$

Χρησιμοποιήθηκε το μείγμα (ligation mix) :

Ligation mix	Όγκος
Insert DNA	X μl
2X Rapid ligation buffer	5 μl
PGEM-Teasy vector (50 ng)	1 μl
T4 DNA Ligase (3 weiss u/μl)	1 μl
ddH ₂ O σε όγκο τελικό 10 ml	Ψ μl

Επώαση των αντιδράσεων για 3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.

3.2.7. Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων

- Για κάθε μετασχηματισμό χρειάστηκαν 90 μl δεκτικών κυττάρων DH5a του βακτηρίου *Escherichia coli*, τα οποία αφέθηκαν να ξεπαγώσουν από τους -80°C και τα οποία διατηρήθηκαν σε πάγο καθ' όλη τη διάρκεια της διαδικασίας.
- Προσθήκη κατάλληλης ποσότητας (10 μl) από την αντίδραση σύνδεσης φορέα-ενθέματος (περίπου 100 ng) σε falcon tubes που ήταν τοποθετημένα εντός πάγου και ανάμειξή τους με 90 μl κυττάρων DH5a.
- Τοποθέτησή τους στον πάγο για 25 λεπτά.
- Εφαρμογή θερμικού σοκ σε προθερμασμένο υδατόλουτρο στους 42°C για 1 λεπτό (heat shock).
- Άμεση μεταφορά των tubes στον πάγο και παραμονή τους εκεί για 2 λεπτά (recovery of cells).
- Προσθήκη 900 μl θρεπτικού μέσου LB (Luria Bertani) και επώαση για 1 ώρα στους 37°C σε 225 rpm.
- Παράλληλη προετοιμασία των τρυβλίων Petri, τα οποία περιείχαν LB agar και αμπικιλίνη (10 mg/ml) και επίστρωση X-Gal 20 mg/ml (30 μl X-Gal, 60 μl LB και 10 μl IPTG για καλύτερη απορρόφηση από το στερεό θρεπτικό μέσο). Τα τρυβλία διατηρήθηκαν στους 37°C για 1 ώρα τουλάχιστον.

- Συλλογή των κυττάρων με φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία δωματίου σε 2200 rpm για 2 λεπτά.
- Αφαίρεση υπερκλειμένου.
- Επαναδιάλυση σε 200 µl LB και επίστρωση στα τρυβλία Petri (LB/amp/X-Gal) του μίγματος.

Τα τρυβλία τοποθετήθηκαν σε επωαστικό κλίβανο στους 37° C overnight (12-16h).

3.2.8. Έλεγχος με μαζικό τρόπο (σάρωση) μονών αποικιών για τον εντοπισμό κλώνων που φέρουν το ένθεμα με τη μέθοδο αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR-screening of single colonies)

Με τη μέθοδο της σάρωσης μονών αποικιών με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR-screening of single colonies) μπορούμε να εντοπίσουμε τις αποικίες εκείνες που πιθανόν φέρουν το επιθυμητό insert, ενισχύοντας την αλληλουχία που έχει ενσωματωθεί στο πλασμίδιο με PCR και ελέγχοντας το μέγεθός του με ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκαν οι ίδιοι συνδυασμοί εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν αρχικά για την ανάκτηση της επιθυμητής αλληλουχίας (insert). Το μέγεθος της ζώνης DNA που αναμένεται, παραμένει το ίδιο.

Για κάθε αντίδραση των τριών στελεχών (Gamma, Lab και XXX strain) στις τρεις επικράτειες (Domain II, III, IV), χρησιμοποιήθηκαν τα ίδια συστατικά αντίδρασης με αυτά που αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 16).

Πίνακας 16. PCR screening	
5x Crimson Taq Reaction Buffer	5 µl
Εμπρόσθιος εκκινητής (10 mM)	0.5 µl
Οπίσθιος εκκινητής (10 mM)	0.5 µl
dNTP's (10 mM)	0.5 µl
Crimson Taq DNA Polymerase	0.2 µl
ddH₂O (μέχρι τα 25 µl)	17.35 µl

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν και οι συνθήκες των αντιδράσεων για κάθε διαφορετικό στέλεχος, είναι ίδιες με αυτές που περιγράφονται στο κεφάλαιο 3.2.3 (Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης για την ανάκτηση και ενίσχυση τμήματος του γονιδίου στόχου).

Το μείγμα PCR μοιράστηκε σε αριθμημένα PCR tubes και με ένα καθαρό ακρορύγχιο πιπέτας (tip) επιλέχθηκε μια αποικία από το τρυβλίο και τοποθετήθηκε στο μείγμα.

Τα αποτελέσματα των αντιδράσεων PCR ελέχθησαν με ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης (1.0% w/v).

Οι αποικίες που σκόραραν θετικά για το insert μπολιάστηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιείχαν 4 ml LB και αμπικιλίνη (50 mg/ml) και καλλιεργήθηκαν overnight στους 37°C σε 250 rpm (στροφές το λεπτό).

3.2.9. Απομόνωση και καθαρισμός πλασμιδιακού DNA από υγρή βακτηριακή καλλιέργεια με εμπορικό kit (QIAPREP Spin Miniprep Kit Protocol)

- Μεταφορά 1.5 ml από την υγρή βακτηριακή καλλιέργεια σε σωλήνα τύπου erpendorf 1.5 ml κοντά σε φλόγα και συλλογή των βακτηριακών κυττάρων με φυγοκέντρηση για 10 λεπτά σε 15000 rpm.
- Απομάκρυνση-απόρριψη του υπερκείμενου και επαναδιάλυση του ιζήματος των βακτηριακών κυττάρων σε 250 μl διαλύματος P1 (στο οποίο είχε προστεθεί κατάλληλη ποσότητα RNase A).
- Προσθήκη 250 μl διαλύματος P2 (διάλυμα λύσης) και ανάμειξη αντιστρέφοντας το σωλήνα τύπου erpendorf 4-6 φορές έως ότου το διάλυμα γίνει διαυγές (στο στάδιο αυτό γίνεται η αλκαλική λύση των κυττάρων και η αποδόμηση του RNA).
- Προσθήκη 350 μl διαλύματος N3, για την εξουδετέρωση του διαλύματος λύσης και τη ρύθμιση της τιμής του pH και της συγκέντρωσης των αλάτων, σε επίπεδα κατάλληλα για την προσρόφηση. Ακολούθησε νέα ανάμειξη.
- Φυγοκέντρηση για 10 λεπτά σε 13000 rpm για την κατακρήμνιση υπολειμμάτων βακτηριακών κυττάρων και χρωματοσωμικού DNA.
- Μεταφορά του υπερκείμενου σε κολόνα φυγοκέντρησης (QIAPrep spin mini column) και φυγοκέντρηση για 40 δευτερόλεπτα σε 13000 rpm. Στο τέλος του σταδίου αυτού το πλασμιδιακό DNA προσροφάται στην κολόνα.

- Καθαρισμός του DNA με προσθήκη 0.75 ml διαλύματος πλύσης PE για την απομάκρυνση των αλάτων και φυγοκέντρωση για 1 λεπτό σε 13000 rpm. Το έκπλυμα απορρίπτεται.
- Επιπρόσθετη φυγοκέντρωση για 1 λεπτό για την απομάκρυνση της αιθανόλης από το φίλτρο.
- Μεταφορά της κολόνας σε νέο σωληνάριο τύπου erpendorf και προσθήκη 30 μl ρυθμιστικού διαλύματος EB (10mM Tris-Cl, pH 8.5) στο κέντρο της κολόνας για την έκλυση του DNA. Παραμονή για 10 λεπτά, φυγοκέντρωση για 1 λεπτό σε 13000 rpm και παραλαβή του πλασμιδιακού DNA.

Η συγκέντρωση DNA υπολογίστηκε με χρήση νανοφωτόμετρου (Nanodrop, ND 1000).

3.2.10. Πέψη πλασμιδιακού DNA με τη χρήση ενζύμων περιορισμού

Είναι ένας επιπλέον τρόπος να επιβεβαιώσουμε ότι το πλασμίδιο φέρει την αλληλουχία που μας ενδιαφέρει (insert).

Εκατέρωθεν της τοποθεσίας εισαγωγής ενθέματος στον PGEM-Teasy φορέα κλωνοποίησης, υπάρχουν θέσεις περιορισμού (restriction sites: ειδικές θέσεις με συγκεκριμένη αλληλουχία που αναγνωρίζονται από περιοριστικές ενδονουκλεάσες οι οποίες κόβουν το DNA στις θέσεις αυτές απελευθερώνοντας το ένθεμα). Για την πέψη του πλασμιδιακού DNA επιλέχθηκε το ένζυμο EcoR I το οποίο αναγνωρίζει μια παλινδρομική αλληλουχία μήκους 6 bp. Η συχνότητα με την οποία απαντάται η αλληλουχία αναγνώρισης του EcoR I στο DNA είναι μικρή, έτσι αποφεύγουμε την πιθανότητα το ένζυμο να κόψει εντός της αλληλουχίας του insert. Χρησιμοποιήθηκε το παρακάτω μείγμα:

Συστατικά διαλύματος πέψης	
DNA template	2 μl
2x Buffer H	2 μl
Acetylated BSA 10 μg/μl	0.2 μl
EcoR I enzyme 10 u/μl	0.5 μl
ddH₂O (Vτελ=20 μl)	15.3 μl

Επίωση των μειγμάτων στους 37°C για 3 ώρες. Τα αποτελέσματα ελέχθησαν με ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης 1% w/v.

3.2.11. Ανάλυση νουκλεοτιδικής αλληλουχίας για την αναγνώριση της ταυτότητας του γονιδίου που κλωνοποιήθηκε

- Δόθηκαν για ανάλυση 500 ng από κάθε πλασμίδιο σε 5 μl ddH₂O (100 ng/μl).
- Για την αντίδραση αλληλούχισης χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές T7 ή SP6 οι οποίοι είναι συμπληρωματικοί με αλληλουχίες του οχήματος κλωνοποίησης, σε μικρή απόσταση από τη θέση εισαγωγής του ένθετου DNA.
- Ο έλεγχος και η επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με χρήση του προγράμματος DNA STAR.
- Ακολούθησε εφαρμογή του ευρεστικού αλγόριθμου BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) για την αναζήτηση ομόλογων αλληλουχιών καταχωρημένων στις βάσεις δεδομένων. Χρησιμοποιήθηκαν τα υποπρογράμματα:

BLASTP: ερευνά πρωτεϊνικές βάσεις δεδομένων με πρωτεϊνική αλληλουχία στόχο και,

BLASTN: ερευνά νουκλεοτιδικές βάσεις δεδομένων με νουκλεοτιδική αλληλουχία στόχο.

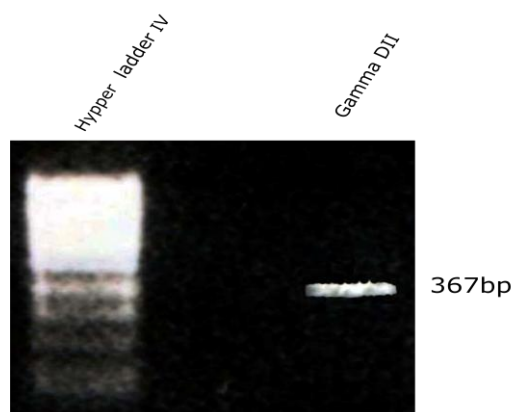
3.3. Αποτελέσματα

Οι ζώνες DNA που είχαν το αναμενόμενο μέγεθος και πιθανά κωδικοποιούν τις επικράτειες II, III, IV για το κανάλι νατρίου απομονώθηκαν μετά από ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.

α. PCR για την ανάκτηση και ενίσχυση τμήματος του γονιδίου στόχου DOMAIN II (D-II)

Για την ενίσχυση της επικράτειας II (DOMAIN II) του γονιδίου του καναλιού του νατρίου για το ανθεκτικό στέλεχος χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές (Cb2cs-εμπρόσθιος/Cb6cs-οπίσθιος).

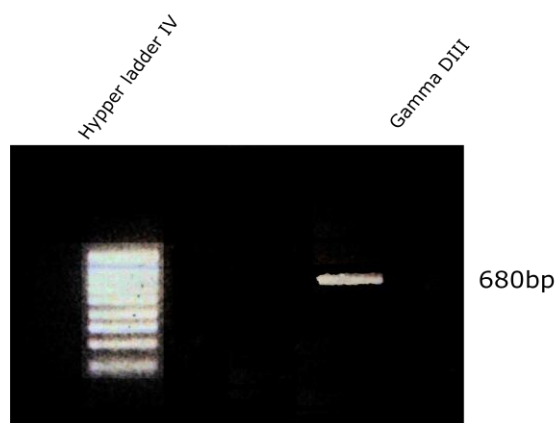
Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης έδωσε το αναμενόμενο μέγεθος της ενισχυμένης αλληλουχίας στόχου 367 bp (Εικόνα 11).



Εικόνα 11. Ηλεκτροφόρηση του προϊόντος της αντίδρασης σε gel αгарόζης, για κλωνοποίηση της επικράτειας II του ανθεκτικού στελέχους.

β. PCR για την ανάκτηση και ενίσχυση τμήματος του γονιδίου στόχου DOMAIN III (D-III)

Για την ενίσχυση της επικράτειας III (DOMAIN III) του γονιδίου του καναλιού του νατρίου για το ανθεκτικό στέλεχος χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές (Ha_SC_IIIIF-εμπρόσθιος/ Ha_SC_IIIR-οπίσθιος). Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης έδωσε το αναμενόμενο μέγεθος της ενισχυμένης αλληλουχίας στόχου 680 bp (Εικόνα 12).

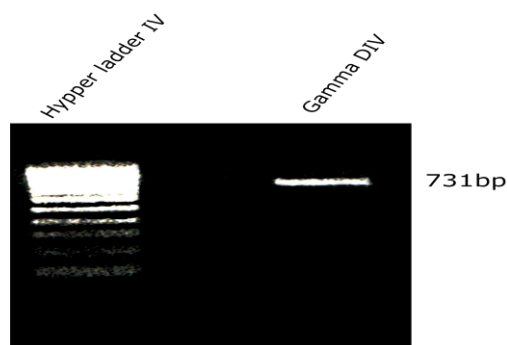


Εικόνα 12. Ηλεκτροφόρηση του προϊόντος της αντίδρασης σε gel αгарόζης, για κλωνοποίηση της επικράτειας III του ανθεκτικού στελέχους.

γ. PCR για την ανάκτηση και ενίσχυση τμήματος του γονιδίου στόχου DOMAIN IV (D-IV)

Για την ενίσχυση της επικράτειας IV (DOMAIN IV) του γονιδίου του καναλιού του νατρίου για το ανθεκτικό στέλεχος χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές (DIV-F-εμπρόσθιος/DIV-R-οπίσθιος).

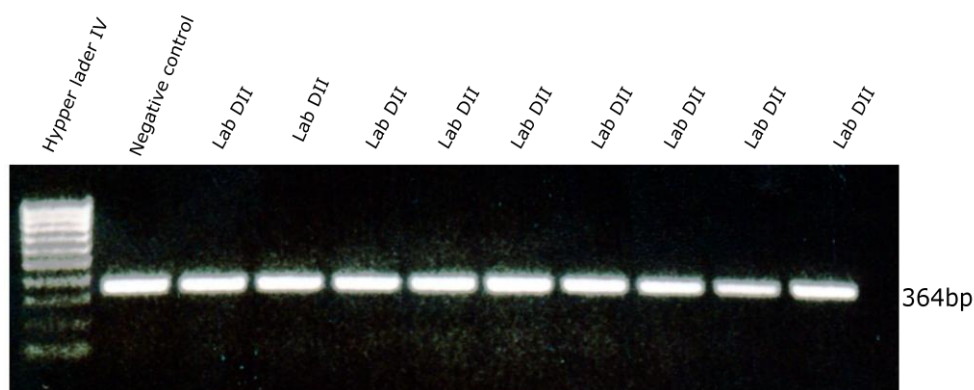
Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης έδωσε το αναμενόμενο μέγεθος της ενισχυμένης αλληλουχίας στόχου 731 bp (Εικόνα 13).



Εικόνα 13. Ηλεκτροφόρηση του προϊόντος της αντίδρασης σε gel αгарόζης, για κλωνοποίηση της επικράτειας IV του ανθεκτικού στελέχους.

Οι ζώνες που είχαν το αναμενόμενο μέγεθος και πιθανά κωδικοποιούσαν για τις επικράτειες του γονιδίου που μας ενδιέφεραν απομονώθηκαν από το gel αгарόζης, ακολούθησε αντίδραση σύνδεσης των αλληλουχιών με το όχημα κλωνοποίησης pGEM T-easy vector και εισαγωγή των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων σε δεκτικά κύτταρα DH5a του βακτηρίου *E. coli*. Στη συνέχεια, έγινε επιλογή των αποικιών που έφεραν το ένθεμα με X-Gal και αμπικιλίνη.

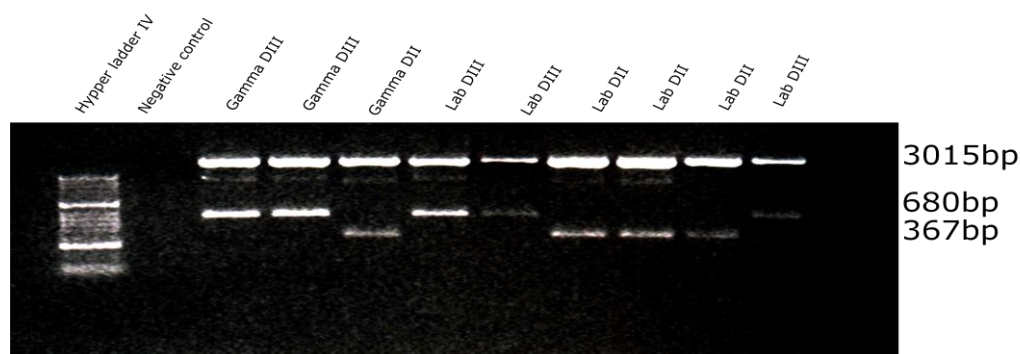
Για να επιβεβαιωθεί ότι οι αποικίες έφεραν το επιθυμητό ένθεμα πραγματοποιήθηκε έλεγχος μονών λευκών αποικιών με τη μέθοδο αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR screenings of single colonies) (Εικόνα 14).



Εικόνα 14. Αντιπροσωπευτική εικόνα των αντιδράσεων για το πατρικό στέλεχος (LAB strain) και την επικράτεια II (DOMAIN II), από τη σάρωση λευκών αποικιών.

Επόμενο βήμα, ήταν η απομόνωση και ο καθαρισμός πλασμιδιακού DNA για τις βακτηριακές αποικίες που έφεραν το

επιθυμητό μέγεθος ενθέματος (insert) και πέψη του πλασμιδιακού DNA με το κατάλληλο ένζυμο περιορισμού (Εικόνα 15).



Εικόνα 15. Αντιπροσωπευτική εικόνα των προϊόντων πέψης για το πατρικό στέλεχος (LAB strain) και το ανθεκτικό στέλεχος (GAMMA strain) για τις επικράτειες II και III (DOMAIN II, III).

Για τα πλασμίδια που έφεραν το επιθυμητό μέγεθος ενθέματος έγινε ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας με τους εκκινητές T7 ή SP6.

Ο έλεγχος και η επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με το DNA star λογισμικό. Στη συνέχεια ελέχθησαν τα χρωματογραφήματα των αλληλουχιών με χρήση του λογισμικού Chromas. Έγινε στοίχιση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών με τις αλληλουχίες του *H. armigera* (αδημοσίευτα στοιχεία) για τις επικράτειες II, III, και IV του γονιδίου του καναλιού νατρίου. Ελέγξαμε την πιθανή παρουσία γνωστών μεταλλάξεων σε συντηρημένα κατάλοιπα (V421M-Park et al. 1997, E1565G, D1561V-Head et al. 1998) των οποίων η παρουσία έχειδειχθεί ότι προσδίδει ανθεκτικότητα στόχου.

Δεν παρατηρηθήκαν γνωστές μεταλλάξεις σε καμιά από τις επικράτειες (II, III, IV) στο κανάλι μεταφοράς ιόντων νατρίου ή νέες σε συντηρημένα κατάλοιπα που θα δικαιολογούσαν την περαιτέρω διερεύνησή τους.

3.4. Συζήτηση

Αναλύοντας τα αποτελέσματα από την απομόνωση των επικρατειών II, III και IV του καναλιού νατρίου, δεν εντοπίστηκαν μεταλλαγές ανθεκτικότητας στον ανθεκτικό πληθυσμό (Gamma strain).

Πιθανόν, να υπάρχει κάποια ή κάποιες μεταλλαγές σε κάποια άλλη επικράτεια του καναλιού μεταφοράς ιόντων νατρίου την οποία δεν ελέγξαμε ή, ενδεχομένως να μην υπάρχει κάποια μεταλλαγή στην οποία να οφείλονται τα υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας που παρατηρήθηκαν στο ανθεκτικό στέλεχος.

ΓΕΝΙΚΗ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το έντομο *Helicoverpa armigera* είναι ένα σημαντικό έντομο εχθρός καθώς έχει καταγραφεί παγκοσμίως ότι προσβάλλει 60 διαφορετικές καλλιέργειες και 67 διαφορετικά είδη αυτοφυών φυτών, ενώ θεωρείται ένας από τους σημαντικότερους εχθρούς του βαμβακιού. Από έρευνες που έχουν γίνει παγκοσμίως, έχει αποδειχθεί ότι έχει αναπτύξει ανθεκτικότητα στα περισσότερα φυτοπροστατευτικά σκευάσματα κάτι που επηρεάζει άμεσα την αποτελεσματική αντιμετώπισή του. Όσον αφορά στην Ελλάδα, από μία έρευνα του 2005 στην οποία μελετήθηκε ένας φυσικός πληθυσμός του εντόμου, διαπιστώθηκε ότι αυτός παρουσίαζε κάποιο δυναμικό ανάπτυξης ανθεκτικότητας στο πυρεθρινοειδές γ -cyhalothrin.

Στην παρούσα εργασία συνεχίστηκε η μελέτη του συγκεκριμένου ελληνικού πληθυσμού, με σκοπό την ανάλυση του μηχανισμού ανθεκτικότητας στο πυρεθρινοειδές σκευάσμα γ -cyhalothrin.

Χρησιμοποιήθηκαν 3 πληθυσμοί, ένας ευαίσθητος αναφοράς, ο φυσικός πληθυσμός στον οποίο είχε γίνει η μελέτη του 2005 και ένας ανθεκτικός πληθυσμός, ο οποίος είχε προέλθει από τον φυσικό έπειτα από επιλογή διαδοχικών γενεών, με το γ -cyhalothrin.

Η επιλογή του αγρίου πληθυσμού με το πυρεθρινοειδές σκευάσμα γ -cyhalothrin, συνεχίστηκε για δύο επιπλέον διαδοχικές γενεές, όχι μόνο γιατί ο πληθυσμός παρουσίασε κάποιο δυναμικό ανάπτυξης ανθεκτικότητας, αλλά και για το ότι για να μπορέσει να γίνει μελέτη των μηχανισμών ανθεκτικότητας απαιτείται ομοιόμορφος και όσο το δυνατό περισσότερο ανθεκτικός πληθυσμός. Ακολούθησε προσδιορισμός των επιπέδων ανθεκτικότητας των πληθυσμών στο γ -cyhalothrin με τη μέθοδο των κλασικών βιοδοκιμών. Τα αποτελέσματα έδειξαν μια σημαντική αύξηση (44 folds) των επιπέδων ανθεκτικότητας του ανθεκτικού πληθυσμού στη δραστική ουσία με την οποία έγινε η επιλογή του.

Ακολούθησαν βιοδοκιμές με συνεργιστές (PB και DEF) για να παρατηρηθεί η επίδραση των ενζυμικών παρεμποδιστών στο φαινόμενο της ανθεκτικότητας. Αυτές έδειξαν ότι η εφαρμογή των συνεργιστικών ουσιών ναι μεν επέδρασε στον πληθυσμό που μελετήθηκε, όμως η επίδραση αυτή δε φάνηκε να είναι καθολική. Επομένως, ο φαινότυπος ενδεχομένως να οφείλεται κατά ένα μέρος

σε αυξημένη δράση των ενζύμων αποτοξικοποίησης και σε ένα άλλο μέρος σε ανθεκτικότητα στόχου.

Στη συνέχεια προσδιορίστηκαν οι ενεργότητες των ενζυμικών συστημάτων τα οποία είναι υπεύθυνα για την αποτοξικοποίηση των εντομοκτόνων (εστεράσες, μεταφοράσες της γλουταθειόνης και μικτής λειτουργίας P40 οξειδάσες). Τα ένζυμα αυτά έχουν ενοχοποιηθεί για την πρόκληση ανθεκτικότητας σε πολλούς πληθυσμούς του εντόμου διεθνώς (Πίνακας 1).

Έγινε προσδιορισμός της ενεργότητάς τους, αλλά τα αποτελέσματα που προέκυψαν έδειξαν ότι τα υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας του επιλεγμένου πληθυσμού, δε φαίνεται να σχετίζονται με αυξημένη ενεργότητα των ενζύμων αποτοξικοποίησης.

Τέλος αναλύθηκε ο στόχος των πυρεθρινοειδών εντομοκτόνων, οι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες μεταφοράς ιόντων νατρίου, με σκοπό την εύρεση τυγχόν μεταλλαγών που σχετίζονται με το φαινότυπο της ανθεκτικότητας. Τέτοιες μεταλλαγές έχουν προηγούμενα αναφερθεί (Πίνακας 1).

Κλωνοποιήθηκε και αλληλουχήθηκε τμήμα του γονιδίου και συγκρίθηκαν οι αλληλουχίες μεταξύ ανθεκτικών και ευαίσθητων στελεχών. Στις επικράτειες που απομονώθηκαν (DOMAIN II, III, IV), δεν εντοπίστηκαν μεταλλαγές που σύμφωνα με τη βιβλιογραφία ευθύνονται για την ανθεκτικότητα.

Δεν αποκλείεται να υπάρχουν μεταλλαγές σε κάποια άλλη επικράτεια του καναλιού μεταφοράς ιόντων νατρίου η οποία δεν ελέγχθηκε στην παρούσα εργασία.

Ενδεχομένως, η αιτία στην οποία οφείλονται τα υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας που παρατηρήθηκαν στο ανθεκτικό στέλεχος, να είναι κάποιες επιδερμικές διαφοροποιήσεις, οι οποίες είτε αυξάνουν την απέκκριση των εντομοκτόνων, είτε μειώνουν τη διείσδυσή τους. Τέτοιος μηχανισμός έχει επίσης αναφερθεί στη βιβλιογραφία (Πίνακας 1) και η πιθανή του συμμετοχή στο φαινότυπο της ανθεκτικότητας ελληνικών πληθυσμών *H. armigera* θα μελετηθεί σε επόμενες εργασίες.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Ahmad, M. And McCaffery, A.R. 1999.** Penetration and metabolism of trans-Cypermethrin in a susceptible and a pyrethroid-resistant strain of *Helicoverpa armigera*. Pest. Bioch. Physiol. 65: 6-14.
- Ahmad, M. and McCaffery, A.R. 1988.** Resistance to insecticides in a Thailand strain of *Heliiothis armigera* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae). Econ. Entomol. 81: 45-48.
- Ahmad, M., Denholm, I. and Bromilow, R.H. 2006.** Delayed cuticular penetration and enhanced metabolism of deltamethrin in pyrethroid-resistant strains of *Helicoverpa armigera* from China and Pakistan. Pest Manag. Sci. 62: 805-810.
- Ahmad, M., Arif, M.I., Ahmad, Z. and Attique, M.R. 1998.** *Helicoverpa armigera* resistance to insecticides in Pakistan. In Proceedings of the Beltwide Cotton Production Research Conference. Memphis, TN: National Cotton Council.
- Ahmad, M., Arif, M.I. and Ahmad, Z. 1995.** Monitoring insecticide resistance of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Pakistan. Econ. Entomol. 88: 771-778.
- Anon. 1986.** Worldwide resistance to synthetic pyrethroids. Technical Paper, Union Carbide Agricultural Products Co. USA.
- Armes, N.J., Jadhav, D.R. and De Souza, K.R. 1996.** A survey of insecticide resistance in *Helicoverpa armigera* in the Indian subcontinent. Bull. Entomol. Res. 86: 499-514.
- Armes, N.J., Jadhav, D.R., Bond, G.S. and King, A.B.S. 1992.** Insecticide resistance in *Helicoverpa armigera* in South India. Pestic. Sci. 34: 355-364.
- Ashraf, O. and Subrahmanyam, B. 2009.** Pyrethroid resistance and esterase activity in three strains of the cotton bollworm,

Helicoverpa armigera (Hubner). Pest. Bioch. Biol. 96: 155-159.

Brun-Barale, A., Hema, O., Martin, T., Suraporn, S., Audant P., Sezutzu, H. And Feyereisen, R. 2010. Multiple P450 genes overexpressed in deltamethrin-resistant strains of *Helicoverpa armigera*. Pest Manag. Sci. 66: 900-9.

Bues, R., Bouvier, J.C. and Boudinhon, L. 2005. Insecticide resistance and mechanisms of resistance to selected strains of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in the south of France. Crop Protect. 24: 814-820.

Cameron, P.J., Walker, G.P. and Herman, T.J.B. 1995. Development of resistance to fenvalerate in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in New Zealand. Crop Hortic. Sci. 23: 429-436.

Daborn, P.J., Yen, J.L., Bogwitz, M.R., Goff, G.L., Feil, E., Jeffers, S., Tijet, N., Perry, T., Heckel, D., Batterham, P., Feyereisen, R., Wilson, T.G. and Ffrench-Constant, R.H. 2002. A single P450 allele associated with insecticide resistance in *Drosophila*. Science. 297: 2253-2256.

EPPO. 2006. Distribution maps of Quarantine Pests. *Helicoverpa armigera*. On-line available at: www.eppo.org/QUARANTINE/insects/Helicoverpa_armigera/H_ELIAR_map.htm

EPPO/CABI. 1997. *Helicoverpa armigera*. In: *Quarantine Pests for Europe*. 2nd ed. pp.289-294. CAB International. Wallingford (GB).

Fitt, G.P. 1989. The ecology of *Heliothis* in relation to agroecosystems. Ann. Rev. Entomol. 34: 17-52.

Forrester, N.W. 1990. Designing, implementing and servicing an insecticide resistance management strategy. Pestic. Sci. 28: 167-179.

- Fournier, D., Bride, J., Mouches, C., Raymond, M., Magnin, M., Berge, J., Pasteur, N. And Georghiou, G.P. 1987.** Biochemical characterization of the esterases A1 and B1 associated with organophosphate resistance in the *Culex pipiens* L. complex. *Pest. Bioch. Phys.* 27: 211-217.
- Grubor, V. and Heckel, D. 2007.** Evaluation of the role of CYP6B cytochrome P450s in pyrethroid resistant Australian *Helicoverpa armigera*. *Insect Mol. Biol.* 16: 15-23.
- Gunning, R.V. and Easton, C.S. 1994.** Response of *Helicoverpa punctigera* (Wallengren) (Lepidoptera: Noctuidae) to pyrethroids, DDT and endosulfan. *Aust. Entomol. Soc.* 33: 9-12.
- Gunning, R.V. and Easton, C.S. 1993.** Resistance to organophosphate insecticides in *Helicoverpa armigera* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae) in Australia. *Gen. Appl. Entomol.* 25: 27-34.
- Gunning, R.V., Devonshire, A.L. and Moores, G.D. 1995.** Metabolism of esfenvalerate by pyrethroid-susceptible and -resistant Australian *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Pestic. Biochem. Physiol.* 51: 205-213.
- Gunning, R.V., Balfe, M.E. and Easton, C.S. 1992.** Carbamate resistance in *Helicoverpa armigera* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae) in Australia. *Aust. Entomol. Soc.* 31: 97.
- Gunning, R.V., Easton, C.S., Greenup, L.R. and Edge, V.E. 1984.** Pyrethroid resistance in *Heliothis armigera* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae) in Australia. *Econ. Entomol.* 77: 1283-1287.
- Head, D.J., McCaffery, A.R. and Callaghan, A. 1998.** Novel mutations in the para-homologous sodium channel gene associated with phenotypic expression of nerve insensitivity resistance to pyrethroids in Heliiothine lepidoptera. *Insect Mol. Biol.* 7: 191-196.

- Hemingway, Karunaratne. 1998.** Mosquito carboxylesterases: a review of the molecular biology and biochemistry of a mayor insecticide resistance mechanism. *Med. Veter. Entomol.* 12: 1-12.
- Horowitz, A.R., Forer, G. and Ishaaya, I. 1995.** Insecticide resistance management as a part of an IRM strategy in Israeli cotton fields. In *Challenging the future: Proceedings of the World Cotton Research Conference*, vol.1. pp. 537-544. Australia: CSIRO.
- Horowitz, A.R., Seligman, I.M., Forer, G., Bar, D. And Ishaaya, I. 1993.** Preventative insecticide resistance management strategy in *Helicoverpa* (*Heliothis*) *armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Israeli cotton. *Econ. Entomol.* 86: 205-212.
- Kay, I.R. 1977.** Insecticide resistance in *Heliothis armigera* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae) in areas of Queensland, Australia. *Aust. Entomol. Soc.* 16: 43-45.
- Khambay, B.P.S., and Jewess, P.J. 2005.** Pyrethroids. Chapter 6.1. In: *Comprehensive Molecular Insect Science*. Vol. 5. Pharmacology. Gilbert, L., Iatrou, K., and Gill, S. (Eds). Elsevier. Pergamon.
- Kim Y.J., Lee S.W., Lee S.H., Ahn Y.J. 2004.** Fenpyroximate resistance in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae): cross resistance and biochemical resistance mechanisms. *Pest Manag. Sci.* 60: 1001-1006.
- King, A.B.S. 1994.** *Heliothis/Helicoverpa* (Lepidoptera: Noctuidae). In *Insect Pests of Cotton*, Mathews G.A. and Turnstall J.P. (eds.). CAB International. Wallingford. U.K. pp. 39-106.
- Kranthi, K.R., Jadhav, D., Wanjari, R., Kranthi, S. and Russell, D. 2001.** Pyrethroid resistance and mechanisms of resistance in field strains of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Econ. Entomol.* 94: 253-263.

- Leonova, I.N. and Slynko, N.M. 1996.** Comparative study of insecticide susceptibility and activities of detoxification enzymes in larvae and adults of cotton bollworm *Heliothis armigera*. Arch. Insect Biochem. Physiol. 32: 157-172.
- Martin, T., Ochou, G.O., Hala-N'Klo, F., Vassal, J. and Vaissayre, M. 2000.** Pyrethroid resistance in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hubner), in West Africa. Pest Manag. Sci. 56: 549-554.
- Martinez-Torres, D., Foster, S.P., Field, L.M., Devonshire, A.L. and Williamson, M.S. 1999.** A sodium channel point mutation is associated with resistance to DDT and pyrethroid insecticides in the peach-potato aphid, *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae). Insect Molec. Biol. 8: 339-346.
- McCaffery, A.R. 1998.** Resistance to insecticides in heliothine Lepidoptera: a global view. Philos. Trans. R. Soc. London (Biol.). 353: 1735-1750.
- McCaffery, A.R., Walker, A.J. and Topper, C.P. 1991a.** Insecticide resistance in the bollworm *Heliothis armigera* from Indonesia. Pestic. Sci. 31: 41-52.
- McCaffery, A.R., King, A.B.S., Walker, A.J. and El-Nayir, H. 1989.** Resistance to synthetic pyrethroids in the bollworm *Helicoverpa armigera* from Andhra Pradesh, India. Pestic. Sci. 27: 65-67.
- Mitter, C., Poole, R.W. and Matthews, M. 1993.** Biosystematics of the Heliothinae (Lepidoptera: Noctuidae). Ann. Rev. Entomol. 38: 207-225.
- Park, Y. and Taylor, M. 1997.** A novel mutation L1029H in sodium channel gene hscp associated with pyrethroid resistance in *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). Insect Bioch. Mol. Biol. 27: 9-13.

- Parsons, F.S. 1939.** Investigations of the cotton bollworm, *Heliothis armigera*, Hubn. (obsolete, Fabr.) Part I. The annual march of bollworm incidence and related factors. Bull.Entomol. Res. 30: 321-327.
- Pearson, E.O. 1958.** The Insect Pests of Cotton in Tropical Africa. London: Commonw. Inst. Entomol. 355.
- Pittendrigh, B., Aronstein, K., Zinkovsky, E., Andreev, O., Campbell, B., Daly, J., Trowell, S. and French-Constant, R.H. 1997.** Cytochrome P450 genes from *Helicoverpa armigera*: expression in a pyrethroid-susceptible and -resistant strain. Insect Biochem. Molec. Biol. 27: 07-512.
- Ranasinghen, C. and Hobbs, A. 1998.** Isolation and characterization a cytochrome b5 cDNA clone from *Helicoverpa armigera* (Hubner): possible involvement of cytochrome b5 in cytochrome P450 CYP6B7 activity towards pyrethroids. Insect Bioch. Mol. Biol. 29: 145-151.
- Ranson, H., Jensen, B., Vulule, J.M., Wang, X., Hemingway, J. and Collins, F.H. 2000.** Identification of a point mutation in the voltage-gated sodium channel gene of Kenyan *Anopheles gambiae* associated with resistance to DDT and pyrethroids. Insect Mol. Biol. 9: 491-497.
- Reed, W., and Pawar, C.S. 1982.** *Heliothis* : a global problem. Pp. 9-14 in Reed, W., and V. Kumble (Eds). Proceeding of the International Workshop on *Heliothis* Management. Pantanchera, India, ICRISAT.
- Reed, W. 1965.** *Heliothis armigera* (Hb.) (Noctuidae) in Western Tanganyika. I-Biology, with special reference to the pupal stage. Bull. Entomol. Res. 56: 117-125.
- Roome, R.E. 1975.** Activity of adult *Heliothis armigera* (Hb) (Lepidoptera: Noctuidae) with reference to the flowering of sorghum and maize in Botswana. Bull. Entomol. Res. 65: 523-30.

- Sannino, L., Espinosa, B. and Balbiani, A. 1995.** [Comparative morphology of the preimaginal stages of Lepidoptera on tobacco. 2.Larvae]. Bollettino del Laboratorio di Entomologia Agraria Filippo Silvestri. 50: 23-91.
- Scott, J.G. 1999.** Cytochromes P450 and insecticide resistance. Insect. Biochem. Mol. Biol. 29 : 757-777.
- Shen, J., Wu, Y., Tan, J., Zhou, B., Jin, C. and Tan, F. 1993.** Comparison of two monitoring methods for pyrethroid resistance in cotton bollworm (Lepidoptera: Noctuidae). Resist. Pest Mgmt. 5: 5-7.
- Shen, J., Wu, Y., Tan, J. and Tan, F. 1992.** Pyrethroid resistance in *Heliothis armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in China. Resist. Pest Mgmt. 4: 22-24.
- Shen, J., Tan, J., Xiao, B., Tan, F. and You, Z. 1991.** Monitoring and forecasting of pyrethroids resistance of *Heliothis armigera* (Hubner) in China. Kunchong Zhinshi. 28: 337-341.
- Soderlund, D. M., Knipple, D. C. 2003.** The molecular biology of knockdown resistance to pyrethroid insecticides. Insect Biochem. Mol. Biol. 33: 563-577.
- Stumpf, N. and Nauen, R. 2002.** Biochemical Markers Linked to Abamectin Resistance in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). Pestic. Biochem. Physiol. 69: 131-142.
- Suckling, D.M. 1996.** Status of insecticide and miticide resistance in New Zealand. In Pesticide resistance: prevention and management, pp. 49-58. New Zealand: Rotorua New Zealand Plant Protection Society.
- Sukhoruchenko, G.I. 1996.** Pesticide resistance of cotton plant pests in Central Asia and Azerbaijan: state of the problem in the early 90s. Entomologicheskoe Oboozrenie. 75: 3-15.
- Tan, J., Tan, F. and You, Z. 1987.** Monitoring and selection for resistance of cotton bollworm, *Heliothis armigera* (H.) to four pyrethroids. Nanjing Agric. Univ. 4: 36-43.

- Toguebaye, B.S. and Couilloud, R. 1982.** Etude descriptive de l'oeuf et des stades larvaires de *Heliothis armigera* en microscopie electronique a balayage. Coton et Fibres Tropicaux. 37: 197-209.
- Van Leeuwen T., Van Pottelberge S., Tirry, L. 2005.** Comparative acaricide susceptibility and detoxifying enzyme activities in field-collected resistant and susceptible strains of *Tetranychus urticae* . Pest Manag. Sci. 61: 499-507.
- Vontas, J.G., Hejazi, M.J., Hawkes, N.J., Cosmidis, N., Loukas, M. and Hemingway, J. 2002.** Resistance-associated point mutations of organophosphate insensitive acetylcholinesterase, in the olive fruit fly *Bactrocera oleae*. Insect Mol. Biol. 11: 329-336.
- Vontas, J.G., Small G.J. and Hemingway J. 2001a.** Glutathione S-transferases as antioxidant defence agents confer pyrethroid resistance in *Nilaparvata lugens*. Biochem. J. 357: 65-72.
- Vontas, J.G., Small, G.J. and Hemingway, J. 2000.** Comparison of esterase gene amplification and esterase activity in insecticide susceptible and resistant strains of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Stal). Insect Mol. Biol. 9: 655-660.
- Wardhaugh, K.G., Room, P.M and Greenup, L.R. 1980.** The incidence of *Heliothis armigera* (Hubner) and *H. punctigera* Wallengren (Lepidoptera: Noctuidae) on cotton and other host-plants in the Namoi Valley of New South Wales. Bull. Entomol. Res. 70: 113-131.
- Williamson, M.S., Martinez-Torres, D., Hick, C.A. and Devonshire, A.L. 1996.** Identification of mutations in the housefly *para*-type sodium channel gene associated with

- knockdown resistance (*kdr*) to pyrethroid insecticides. *Molec. Gen. Genet.* 252: 51-60.
- Wu, K., Liang, G. and Guo, Y. 1997.** Phoxim resistance in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in China. *Econ. Entomol.* 90: 868-872.
- Wu, Y., Shen, J., Tan, F. And You, F. 1997b.** Resistance monitoring of *Helicoverpa armigera* in Yanggu County of Shandong Province. *Nanjing Agric. Univ.* 18: 48-53.
- Wu, Y., Shen, J., Chen, J., Lin, X. and Li, A. 1996.** Evaluation of two resistance monitoring methods in *Helicoverpa armigera*: topical application method and leaf dipping method. *Plant Protect.* 5: 3-6.
- Wu, Y., Shen, J., Tan, F. and You, Z. 1995.** Mechanism of fenvalerate resistance in *Helicoverpa armigera* Hubner. *Nanjing Agric. Univ.* 18: 63-68.
- Yang, Y., Chen, S., Wu, S., Yue, L. and Wu, Y. 2006.** Constitutive overexpression of multiple cytochrome P450s genes associated with pyrethroid resistance in *Helicoverpa armigera*. *Econ. Entomol.* 99: 1784-1789.
- Yang, Y., Wu, Y., Chen, S., Devine, G.J., Denholm, I., Jewess, P. and Moores, G.D. 2004.** The involvement of microsomal oxidase in pyrethroid resistance in *Helicoverpa armigera* from Asia. *Insect Bioch. Molec. Biol.* 34: 763-773.
- Zalucki, M.P., Murray, D.A.H., Gregg, P.C., Fitt, G.P., Twine, P.H. and Jones, C. 1994.** Ecology of *Helicoverpa armigera* (Hubner) and *H. punctigera* (Wallengren) in the island of Australia: larval sampling and host plant relationships during winter and spring. *Australian Journal of Zoology.* 42: 329-346.
- Zalucki, M. P., Dashglish, G., Firempong, S. and Twine, P. H. 1986.** The biology and ecology of *Heliothis armigera* and *H. punctigera* Wallengren (Lepidoptera: Noctuidae) in Australia:

what in Australia: what do we know? Australian Journal of Zoology. 34: 779-814.

Βόντας, Ι., Ροδιτάκης, Ε. και Τσαγκαράκου, Α. 2007. Η μοριακή βάση της ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα: παραδείγματα εντόμων και ακάρεων Ελληνικού ενδιαφέροντος. Γεωτεχνικά επιστημονικά θέματα. 18: 60-68.

Ζιώγας Β.Ν. και Μαρκόγλου Α. 2007. Γεωργική Φαρμακολογία, Βιοχημεία, Φυσιολογία, Μηχανισμοί Δράσης και Χρήσεις των Φυτοπροστατευτικών Προϊόντων.

Σταμόπουλος, Δ.Κ. 1999. Έντομα αποθηκών, μεγάλων καλλιεργειών & λαχανικών. Εκδόσεις ΖΗΤΗ.

Τζανακάκης, Μ.Ε. 1995. Εντομολογία: 203-242.

Τόλης, Ι.Δ. 1986. Βαμβάκι: Εχθροί, Ασθένειες, Ζιζάνια.