

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΩΝ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ  
ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΤΑ ΕΝΤΟΜΟΚΤΟΝΑ ΚΑΙ ΤΗΣ  
ΔΙΑΣΠΟΡΑΣ ΤΩΝ ΥΠΕΥΘΥΝΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΣΕ  
ΠΛΗΘΥΣΜΟΥΣ ΤΩΝ *BEMISIA TABACI* (ΑΛΕΥΡΩΔΗ)  
ΚΑΙ *TETRANYCHUS URTICAE* (ΤΕΤΡΑΝΥΧΟΥ)

ΑΡΗΣ ΗΛΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΑΝΟΥΑΡΙΟΣ 2014

UNIVERSITY OF CRETE  
BIOLOGY DEPARTMENT

INVESTIGATION OF INSECTICIDE RESISTANCE  
MECHANISMS AND GEOGRAPHICAL  
DISTRIBUTION OF RESPONSIBLE GENES IN THE  
WHITEFLY *BEMISIA TABACI* AND THE  
SPIDER MITE *TETRANYCHUS URTICAE*

ARIS ILIAS  
PHD THESIS

JANUARY 2014



Ευρωπαϊκή Ένωση  
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗ  
*επένδυση στην κοινωνία της γνώσης*  
ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ  
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ΕΣΠΑ  
2007-2013  
πρόγραμμα για την ανάπτυξη  
ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ

«Η παρούσα έρευνα έχει συγχρηματοδοτηθεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο - ΕΚΤ) και από εθνικούς πόρους μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» του Εθνικού Στρατηγικού Πλαισίου Αναφοράς (ΕΣΠΑ) – Ερευνητικό Χρηματοδοτούμενο Έργο: Ηράκλειτος II . Επένδυση στην κοινωνία της γνώσης μέσω του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου».

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον επιβλέποντα μου κ. Ιωάννη Βόντα για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντας μου την συγκεκριμένη διατριβή. Γνωριστήκαμε για πρώτη φορά το 2006 στο Γεωπονικό, όπου επέβλεψε το μεταπτυχιακό μου. Σε αυτόν χρωστάω το γεγονός ότι ήρθα στην Κρήτη. Νιώθω ότι του οφείλω ένα τεράστιο ευχαριστώ για την δυνατότητα που μου έδωσε να δουλέψω στο Βιολογικό και να συνεχίσω αυτό που δειλά δειλά ξεκίνησα πριν από 8 χρόνια. Η συνεισφορά του τόσο κατά την διάρκεια των πειραμάτων όσο και κατά την συγγραφή και υποστήριξη της διατριβής μου ήταν ανεκτίμητη. Με καθοδήγησε όλα αυτά τα χρόνια με υπομονή, διαθέτοντας τον χρόνο του όποτε ήταν απαραίτητο.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης ιδιαίτερα την κ. Αναστασία Τσαγκαράκου. Την γνωρίζω εξίσου πολλά χρόνια (από το master μου) όπου είχε και την αρχική ιδέα να δουλέψω με την ανθεκτικότητα του τετράνυχου. Μου έδωσε την δυνατότητα να δουλέψω στο εργαστήριο της και να αποκτήσω πολύτιμες εμπειρίες δίπλα της, για περισσότερα από δύο χρόνια. Είχε την αποκλειστική επίβλεψη του τελευταίου κεφαλαίου του διδακτορικού μου, συμμετείχε ενεργά σε όλα τα πειράματα μου με ενθουσιασμό, παρέχοντας μου απλόχερα συμβουλές όποτε ήταν απαραίτητο.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω το τρίτο μέλος της συμβουλευτικής επιτροπής, τον κ. Χρήστο Λούη. Τον ευχαριστώ για τις πολύτιμες συμβουλές του, καθώς για την συμβολή του στην κατάθεση της πρότασης του Ηράκλειτου, όντας πρόεδρος του τμήματος.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής κ. Κρίτων Καλαντίδη, κ. Εμμανουήλ Λαδουκάκη και κ. Βασίλειο Μπουριώτη που δέχθηκαν να συμμετάσχουν στην επιτροπή και να αφιερώσουν χρόνο για την μελέτη της διατριβής μου, καθώς και για τα χρήσιμα και εποικοδομητικά τους σχόλια.

Θα ήθελα επίσης να πω ένα τεράστιο ευχαριστώ στο τελευταίο μέλος της επιτροπής κ. Thomas Van Leeuwen. Thomas I don't have enough words to express my gratitude for the things that I have learnt from you all these years. I feel very lucky for the opportunity to work with you during the three months you were in Crete. I hope we can collaborate again in the near future. A big thanks also goes to Wannes Dermauw, for the three months we worked together. Wannes thanks a lot for everything.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης όλα τα μέλη του εργαστηρίου του κ. Βόντα για το ευχάριστο περιβάλλον. Ιδιαίτερα την Βαγγελίτσα που ήταν το πρώτο άτομο που γνώριζα

όταν ήρθα στην Κρήτη, καθώς και την Μαρία με την Ελένη που είχα την χαρά και τιμή να συνεργαστώ κατά την διάρκεια του διδακτορικού μου. Να ευχαριστήσω επίσης θερμότατα το προσωπικό του ΕΘΙΑΓΕ. Τον Μανώλη Ροδιτάκη για τις συμβουλές του όσον αφορά τον αλευρώδη και τις ατελείωτες δειγματοληψίες στην Ιεράπετρα. Τα κορίτσια του ΕΘΙΑΓΕ που είχα την χαρά να συνεργαστώ, Μαρία, Μαριάννα, Νατάσα και φυσικά την Ντέμπορα.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω όλους τους φίλους που γνώρισα από την πρώτη μέρα που ήρθα στην Κρήτη, τόσο από το Βιολογικό όσο και εκτός. Επίσης, ένα τεράστιο ευχαριστώ στην φίλη μου, άνθρωπο μου, συνοδοιπόρο μου στην ζωή και οικογένεια μου στην Κρήτη, Βάσια, για την συμπαράσταση, βοήθεια και όλες τις ωραίες στιγμές που περάσαμε τα τελευταία 3 χρόνια, και για όσες ακόμα θα ακολουθήσουν. Δεν θα μπορούσα επίσης να ξεχάσω και την γάτα μας, Τούλα, που μου κρατούσε πιστά συντροφιά όσο καιρό έγραφα το διδακτορικό μου.

Τέλος, ένα τεράστιο ευχαριστώ στους γονείς μου, Στέφανο και Ρούλα, για την βοήθεια, συμπαράσταση και υποστήριξη που μου πρόσφεραν όλα αυτά τα χρόνια. Με έχετε υποστηρίξει πάντα σε όποια απόφαση πήρα στην ζωή και παρότι μας χωρίζουν αρκετά χιλιόμετρα σας ένιωθα πάντα δίπλα μου.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ .....	3
ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....	8
ABSTRACT .....	10
ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	12
1 Βιολογία και οικολογία των <i>Tetranychus urticae</i> και <i>Bemisia tabaci</i> .....	12
1.1 <i>Tetranychus urticae</i> .....	12
1.2 <i>Bemisia tabaci</i> .....	14
2 Τρόποι καταπολέμησης επιβλαβών φυτοπαρασίτων - <i>Tetranychus urticae</i> και <i>Bemisia tabaci</i> .....	17
2.1 Καλλιεργητικά, μηχανικά και άλλα μέτρα .....	17
2.2 Βιολογική καταπολέμηση .....	17
2.3 Χημική καταπολέμηση .....	18
3 Ανθεκτικότητα .....	21
4 Μηχανισμοί ανθεκτικότητας .....	23
4.1 Μηχανισμοί ανθεκτικότητας του τετράνουχου .....	25
4.2 Μηχανισμοί ανθεκτικότητας του αλευρώδη .....	28
5 Αντικείμενο της εργασίας .....	30
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΤΕΤΡΑΝΥΧΟΥ ΣΤΑ ΕΝΤΟΜΟΚΤΟΝΑ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΤΟ ΑΒΑΜΕΣΤΙΝ .....	31
1.1 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ .....	31
1.1.1 Πληθυσμοί τετράνουχου .....	31
1.1.2 Βιοδοκιμές .....	32
1.1.3 Βιοδοκιμές με συνεργιστές .....	33
1.1.4 Γενετικές διασταυρώσεις .....	34
1.1.5 Λειτουργική ανάλυση του ρόλου των οξειδασών στην ανθεκτικότητα χρησιμοποιώντας τεχνική σίγησης RNA (RNAi) .....	34
1.1.5.1 Ανάπτυξη μεθοδολογίας χορήγησης τροφής .....	35
1.1.5.2 Εφαρμογή RNAi στον τετράνουχο .....	36
1.1.6 Γονοτύπηση καναλιών χλωρίου .....	38
1.1.7 Μοριακά διαγνωστικά <i>Taqman</i> .....	39
1.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....	40
1.2.1 Επίπεδα ανθεκτικότητας Ελληνικών πληθυσμών τετράνουχου .....	40
1.2.2 Χαρακτηρισμός της ανθεκτικότητας στο abamectin .....	44

1.2.2.1 Βιοδοκιμές με συνεργιστές .....	44
1.2.2.2 Γενετικές διασταυρώσεις .....	44
1.2.3 Λειτουργική ανάλυση του ρόλου των οξειδασών στην ανθεκτικότητα χρησιμοποιώντας τεχνική σίγασης RNA (RNAi). .....	46
1.2.3.1 Ανάπτυξη μεθοδολογίας χορήγησης τροφής .....	46
1.2.3.2 Εφαρμογή τεχνικής RNAi στον τετράνυχο .....	48
1.2.4 Μοριακός χαρακτηρισμός της ανθεκτικότητας στο <i>abamectin</i> .....	51
1.2.5 Καταγραφή συχνότητας μεταλλαγών ανθεκτικότητας .....	55
1.3 ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	57
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΑΛΕΥΡΩΔΗ ΣΤΑ ΝΕΟΝΙΚΟΤΙΝΟΕΙΔΗ .....	60
2.1 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	60
2.1.1 Πληθυσμοί <i>Bemisia tabaci</i> .....	60
2.1.2 Κλασικές Βιοδοκιμές .....	60
2.1.3 Εργαστηριακή επιλογή με νεονικοτινοειδή .....	61
2.1.4 Επίπεδα ανθεκτικότητας των επιλεγμένων στελεχών .....	62
2.1.5 Βιοδοκιμές με συνεργιστές (PBO) .....	62
2.1.6 Προσδιορισμός ενεργότητας ενζύμων αποτοξικοποίησης .....	62
2.1.6.1 Ενεργότητα των CCEs .....	63
2.1.6.2 Ενεργότητα των GSTs .....	63
2.1.6.3 Ενεργότητα των P450s .....	63
2.1.7 Υπερέκφραση της P450 CYP6CM1.....	64
2.1.8 Ανάπτυξη RNAi μεθοδολογίας μέσω τεχνητής τροφής.....	64
2.1.8.1 Αξιολόγηση αποτελεσματικότητας της σίγησης.....	66
2.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	66
2.2.1 Εκτίμηση επιπέδων ανθεκτικότητας σε φυσικούς πληθυσμούς <i>Bemisia tabaci</i> ...	66
2.2.2 Χαρακτηρισμός της ανθεκτικότητας στα νεονικοτινοειδή.....	67
2.2.3 RNAi και αξιολόγηση σίγησης .....	72
2.3 ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	73
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΣΥΧΝΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΡΟΗΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΤΟΧΟΥ ΣΕ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥΣ ΤΕΤΡΑΝΥΧΟΥ ΑΠΟ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΕΣ ΠΕΡΙΟΧΕΣ .....	76
3.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	76
3.2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	77
3.2.1 Συλλογές τετράνυχου .....	77
3.2.2 Απομόνωση DNA από μεμονωμένα και μαζικά άτομα .....	80

3.2.3 Ανίχνευση μεταλλαγών ανθεκτικότητας στόχου .....	80
3.2.4 Παραλλακτικότητα της ace και γονοτύπηση της ανθεκτικότητας .....	81
3.2.5 Φυλογενετική ανάλυση της ace .....	81
3.2.6 Γενεαλογικές σχέσεις των αλληλομόρφων της ace.....	82
3.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	82
3.3.1 Συχνότητα και γεωγραφική εξάπλωση των μεταλλαγών ανθεκτικότητας στόχου	82
3.3.2 Συχνότητα των μεταλλαγών ανθεκτικότητας στην ace.....	84
3.3.3 Παραλλακτικότητα και φυλογενετική ανάλυση της ace.....	85
3.3.4 Ανίχνευση της γονιδιακής ενίσχυσης.....	90
3.4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	90
3.4.1 Εξάπλωση μεταλλαγών ανθεκτικότητας στόχου στον τετράνυχο .....	90
3.4.2 Προέλευση της ανθεκτικότητας στην ace .....	92
ΣΥΝΟΨΗ .....	96
ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΑ ΣΧΕΔΙΑ .....	100
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	103



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο τετράνυχος *Tetranychus urticae* και ο αλευρώδης *Bemisia tabaci* είναι δύο πολύ σημαντικοί εχθροί των καλλιεργούμενων φυτών. Η χρήση χημικών σκευασμάτων αποτελεί τον κύριο τρόπο ελέγχου των πληθυσμών, όπου η εκτεταμένη χρήση τους είναι υπεύθυνη για εξαιρετικά υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας και για τα δύο είδη.

Εκτιμήθηκαν τα επίπεδα ανθεκτικότητας 9 Ελληνικών πληθυσμών τετράνυχου σε εύρος σκευασμάτων με διαφορετικό τρόπο δράσης. Οι περισσότεροι πληθυσμοί εμφάνισαν υψηλή ανθεκτικότητα σε τουλάχιστον μία δραστική ουσία. Σε πληθυσμό που συλλέχθηκε από θερμοκήπιο τριανταφυλλιάς εντοπίστηκαν πολύ υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας στο abamectin. Μελετήθηκαν οι μοριακοί μηχανισμοί που ήταν υπεύθυνοι για την ανθεκτικότητα στο abamectin μέσω βιοδοκιμών με συνεργιστές, βιοχημική ανάλυση των μονοπατιών αποτοξικοποίησης, χρήσης RNAi μέσω τροφής με τεχνητή διαίτα, και μοριακή ανάλυση του στόχου. Εντοπίσαμε μια καινούρια μεταλλαγή στον τρίτο κανάλι γλωρίου (GluCl3) που σχετίστηκε ισχυρά με την ανθεκτικότητα. Με κλασικές μεθόδους γενετικής και γονοτύπηση μεμονωμένων ατόμων αποδείχθηκε ότι η μεταλλαγή παίζει καθοριστικό ρόλο στην ανθεκτικότητα στο abamectin και είναι απαραίτητη για την επιβίωση του τετράνυχου σε υψηλές συγκεντρώσεις του σκευάσματος. Επιπροσθέτως, σχεδιάστηκαν μοριακά διαγνωστικά για την έγκαιρη παρακολούθηση της ανθεκτικότητας του abamectin στον αγρό.

Στον αλευρώδη, βρέθηκαν υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας σε διαφορετικά σκευάσματα νεονικοτινοειδών εντομοκτόνων, σε 10 πληθυσμούς που συλλέχθηκαν από την Κρήτη. Ακολούθησε εργαστηριακή επιλογή με δύο νεονικοτινοειδή, imidacloprid και acetamiprid, για την καλύτερη μελέτη των μηχανισμών ανθεκτικότητας. Στα ανθεκτικά στελέχη εντοπίστηκαν πολύ υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας στο thiacloprid (RR > 900) και μέτρια επίπεδα στα imidacloprid (24 <RR< 56) και acetamiprid (9 <RR< 17). In vivo πειράματα με ενζυμικούς παρεμποδιστές καθώς και βιοχημικά πειράματα με ενζυμικά υποστρώματα και RNAi μέσω τροφής με τεχνητή διαίτα χρησιμοποιήθηκαν για διερεύνηση των μηχανισμών ανθεκτικότητας.

Υποδείχτηκε συμμετοχή των P450s στην ανθεκτικότητα. Πειράματα Real Time PCR έδειξαν υψηλά επίπεδα έκφρασης της γνωστής για τον ρόλο της στον μεταβολισμό νεονικοτινοειδών P450, CYP6CM1, στα ανθεκτικά στελέχη. Ωστόσο, η συγκεκριμένη P450 έχει συσχετιστεί ισχυρά με την ανθεκτικότητα στα imidacloprid και thiacloprid αλλά όχι στο

acetamiprid. Είναι πιθανή η ύπαρξη επιπρόσθετου μηχανισμού ανθεκτικότητας στα νεονικοτινοειδή.

Στο τελευταίο κεφάλαιο της διατριβής, εξετάστηκε η παρουσία και διασπορά γνωστών μεταλλαγών ανθεκτικότητας στόχου σε 33 δείγματα τετράνυχων από 20 χώρες, με αλληλούχιση. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι αν και οι συχνότητες των μεταλλαγών ανθεκτικότητας διέφεραν σημαντικά, οι περισσότερες από αυτές ήταν ευρύτατα διαδεδομένες γεωγραφικά σε πολλές περιοχές του κόσμου.

Μελετήθηκε η εξελικτική προέλευση των μεταλλαγών της ακετυλοχολινεστεράσης (*ace*) προκειμένου να απαντηθεί το ερώτημα αν οι μεταλλαγές ανθεκτικότητας εμφανίστηκαν σε μια περιοχή και εξαπλώθηκαν παγκοσμίως ή εμφανίστηκαν σε διαφορετικές περιοχές ανεξάρτητα. Εξετάστηκε το γενετικό υπόβαθρο των μεταλλαγών αυτών μέσω αλληλούχισης τμήματος του γονιδίου της *ace* συμπεριλαμβανομένων ιντρονίων. Βρέθηκε σημαντική παραλλακτικότητα της *ace*, χωρίς συσχέτιση με την γεωγραφική κατανομή. Λαμβάνοντας υπόψη τον αριθμό των διαφορετικών μεταλλαγών ή συνδυασμό μεταλλαγών καθώς και το γεγονός ότι κάθε μεταλλαγή σχετίζεται με διαφορετικά γενετικά υπόβαθρά βγήκε το συμπέρασμα ότι οι μεταλλαγές εμφανίστηκαν σε διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές ανεξάρτητα, τουλάχιστον τρεις φορές.

## ABSTRACT

Spider mite *Tetranychus urticae* and whitefly *Bemisia tabaci* are two of the most damaging pests in agriculture. Chemicals are the main way to control their populations. However, their extensive use is responsible for the selection of extremely high levels of insecticide/acaricide resistance for both species.

We examined the levels of resistance in nine *T. urticae* populations from Greece against a range of chemicals with different mode of actions. The majority of the populations displayed high levels of resistance in at least one active ingredient. In one population originating from a roses greenhouse we detected extremely high levels of resistance to abamectin. We examined the molecular mechanisms responsible for abamectin resistance, by employing a comprehensive approach including bioassays with synergists, biochemical analysis of detoxification pathways, use of RNAi via feedings with artificial diet, and molecular analysis of target sites. We identified a novel mutation in the GluCl3 which was strongly correlated with resistance. We employed genetic crosses and single individual genotyping to investigate the link between the mutation and the resistant phenotype, and concluded that the mutation has a crucial role in abamectin resistance and is necessary for the mite to survive at high concentrations of the chemical. Subsequently, molecular diagnostics were developed for the detection of abamectin resistance in the field.

Ten populations of the whitefly *Bemisia tabaci* collected from Crete, exhibited resistance against different neonicotinoid insecticides. Laboratory selection with the neonicotinoids, imidacloprid and acetamiprid, was subsequently undertaken. The resistant strains exhibited very high levels of resistance to thiacloprid ( $RR > 900$ ) and moderate levels to imidacloprid ( $24 < RR < 56$ ) and acetamiprid ( $9 < RR < 17$ ). In vivo experiments with synergists as well as biochemical assays with model substrates and RNAi via feeding with artificial diet were used to investigate the underlying mechanisms.

The involvement of cytochrome P450 detoxification in resistance was indicated. Real Time PCR showed higher expression levels of the known neonicotinoid metaboliser CYP6CM1 in the resistant strains. However, this specific P450 has been strongly associated with resistance to imidacloprid and thiacloprid but not to acetamiprid, and thus the existence of additional mechanism associated with neonicotinoid resistance is possible.

In the last chapter of this thesis, we examined the presence and distribution of known target site resistance mutations in 33 *T. urticae* collections from 20 countries by

sequencing. Those mutations were detected in variable frequencies and most of them had a wide distribution all over the world.

We subsequently looked at the evolutionary history of the resistant acetylcholinesterase (*ace*) alleles, looking at whether the resistance mutations arose in one location and spread globally or in different locations independently. The genetic background of these mutations was examined by sequencing coding and non coding regions. Significant levels of genetic variation were observed, however there was no correlation with their geographical region. Taking into account the number of different mutations or combination of mutations and the fact that each mutation is associated with different genetic backgrounds we concluded that mutations arose in different geographic locations independently, at least three times.

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

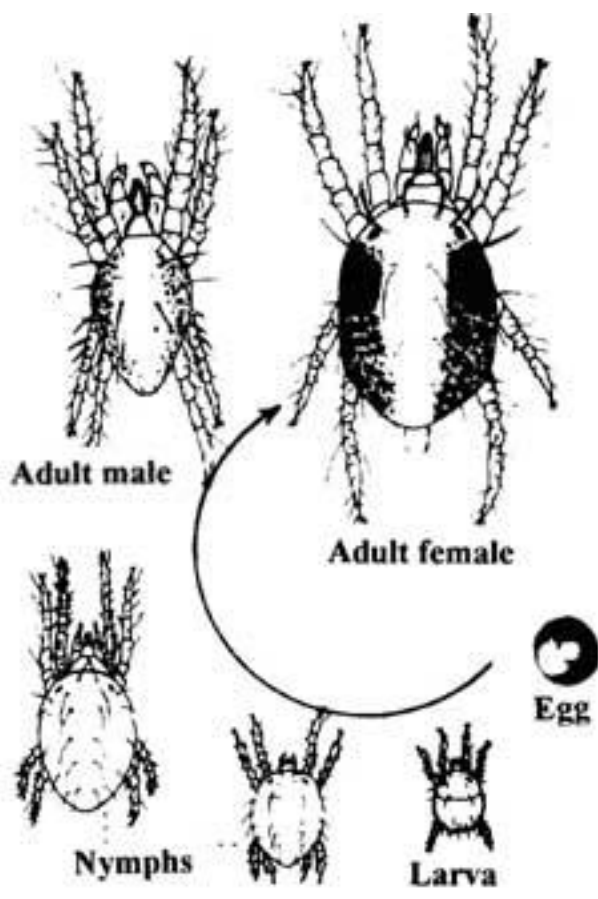
### 1 Βιολογία και οικολογία των *Tetranychus urticae* και *Bemisia tabaci*

#### 1.1 *Tetranychus urticae*

Τα ακάρεα αποτελούν μια πολυπληθή ομάδα της τάξης των αραχνίδων, η οποία περιέχει επίσης σκορπιούς, αράχνες και θεριστές (Zhang, 2003; Lindquist et al., 2009). Έχουν αποικήσει όλα τα χερσαία και υδρόβια περιβάλλοντα ικανά να παρέχουν ζωή. Μέχρι σήμερα έχουν περιγραφεί περίπου 55.000 είδη ακάρεων αλλά υπολογίζεται ότι ο πραγματικός τους αριθμός είναι 500.000 – 1.000.000. Τα είδη που έχουν περιγραφεί κατηγοριοποιούνται σε 5.500 γένη, 540 οικογένειες, 124 υπεριοικογένειες και 6 τάξεις (Krantz, 2009). Το είδος *Tetranychus urticae* ανήκει στην οικογένεια Tetranychidae, την κλάση Arachnida και την υποτάξη Prostigmata (Lindquist et al., 2009). Τα μέλη αυτής της οικογένειας είναι υποχρεωτικά φυτοφάγα είδη και μέσω των κινητών στιλέτων στα χελικέρατα τρυπούν και απομυζούν κύτταρα των φυτών ξενιστών (Walter et al., 2009). Η οικογένεια Tetranychidae απαρτίζεται από 1.250 είδη που ανήκουν σε 73 γένη και αποτελεί την σημαντικότερη οικογένεια που προσβάλλει τα φυτά (Zhang, 2003; Vacante, 2010). Σημαντικής οικονομικής σημασίας είδη αυτής της ομάδας είναι τα *T. urticae*, *Panonychus ulmi* και *Panonychus citri*. Ο *T. urticae* είναι επίσης γνωστός και ως τετράνυχος των θερμοκηπίων εξαιτίας της σημασίας του στις υπό-κάλυψη καλλιέργειες (Jeppson et al., 1975; Zhang, 2003). Τις τελευταίες δεκαετίες η ταξινόμηση του *T. urticae* έχει συζητηθεί εκτενώς και έχουν χρησιμοποιηθεί 44 συνώνυμα ονόματα για το είδος (Bolland et al., 1998).

Ο βιολογικός κύκλος του τετράνυχου διακρίνεται σε 5 στάδια: ωό, λάρβα, πρωτονύμφη, δευτερονύμφη και ακμαίο. Τα σφαιρικά, ημιδιάφανα ωά εναποτίθενται στην κάτω επιφάνεια των φύλλων. Με την ανάπτυξη του εμβρύου το ωό γίνεται λιγότερο διάφανο και κιτρινωπό. Πριν την εκκόλαψη, στα ωά έχουν δύο ευδιάκριτα στίγματα που αποτελούν τα μάτια της λάρβας. Η λάρβα είναι εξάποδη, κίτρινου χρώματος και ακολουθείται από δύο κιτρινωπά νυμφικά στάδια, την πρωτονύμφη και δευτερονύμφη. Τα ακμαία θηλυκά άτομα έχουν μέγεθος περίπου 0.5mm είναι ανοικτού κίτρινου, πρασινωπού ή ωχροκίτρινου χρώματος, με δύο χαρακτηριστικές πλευρικές πράσινες ή μαύρες κηλίδες, που προκαλούνται από την συσσώρευση τροφής στο πεπτικό σύστημα (θερινή μορφή). Ο τετράνυχος διαχειμάζει ως ακμαίο θηλυκό. Το φθινόπωρο λόγω της μικρής φωτοπεριόδου, χαμηλής θερμοκρασίας και διαθεσιμότητας της τροφής αποκτούν πορτοκαλί ή κόκκινο χρώμα και χάνουν τις σκουρόχρωμες κηλίδες του σώματος (διαχειμάζουσα μορφή). Την

άνοιξη εγκαταλείπουν τις περιοχές διάπαυσης και αρχίζουν να τρέφονται, χάνουν το κόκκινο χρώμα και ξεκινούν την εναπόθεση ωών. Τα αρσενικά άτομα είναι μικρότερου μήκους, 0.3 mm, απλοειδή με περισσότερο οξυκατάλυκτη κοιλιά. Μεταξύ των κινητών λαρβικών ή νυμφικών σταδίων παρεμβάλλονται στάδια ηρεμίας που καλούνται νυμφοχρυσαλίδες (πρωτοχρυσαλίδες), δευτεροχρυσαλίδες και τελειοχρυσαλίδες (Εικ.1).



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

Κατά της διάρκεια αυτών των σταδίων οι τετράνυχτοι παραμένουν προσκολλημένοι στα φύλλα ή στον ιστό, μέχρι την έκδυση τους (Crooker, 1985). Ο τρόπος αναπαραγωγής του *T. urticae* είναι η αρρενοτόκος παρθενογένεση. Τα αρσενικά είναι απλοειδή και προέρχονται από αγονιμοποίητα ωά, ενώ τα θηλυκά είναι διπλοειδή και παράγονται από γονιμοποιημένα ωά. Τα αγονιμοποίητα θηλυκά παράγουν αρσενικά άτομα, ενώ τα γονιμοποιημένα μπορούν να δώσουν θηλυκούς και αρσενικούς απογόνους. Ο λόγος θηλυκών προς αρσενικά είναι 3:1 (Helle and Sabelis, 1985). Τα ακμαία αρσενικά άτομα εκκολάπτονται νωρίτερα από τα θηλυκά, αναμένουν την εμφάνιση των θηλυκών και συχνά τα βοηθούν να εξέλθουν από το έκδυμα. Αμέσως μετά την εκκόλαψη του θηλυκού λαμβάνει χώρα το ζευγάρισμα (Mitchell, 1973; Potter et al., 1976). Η διάρκεια του

βιολογικού κύκλου εξαρτάται από την θερμοκρασία, όπως συμβαίνει με τα περισσότερα αρθρόποδα. Σε ευνοϊκές συνθήκες ανάπτυξης 25-30°C η διάρκεια του βιολογικού κύκλου διαρκεί 6 έως 14 ημέρες (Bounfour and Tanigoshi, 2001).

Το είδος *T. urticae* αποτελεί ένα εξαιρετικά πολυφάγο είδος και έχει βρεθεί ότι προσβάλλει περισσότερα από 1.000 φυτά ξενιστές (Migeon and Dorkeld, 2010). Προκαλεί σημαντικές απώλειες παγκοσμίως σε υπαίθριες και θερμοκηπιακές καλλιέργειες (Jerrson et al., 1975). Αποτελεί πολύ σημαντικό εχθρό των υπό κάλυψη κηπευτικών, ιδιαίτερα είδη της οικογένειας Solanaceae (πχ: τομάτες, μελιτζάνες, πιπεριές) και Cucurbitaceae (πχ: αγγούρι, κολοκύθι), των καλλωπιστικών φυτών (πχ: τριαντάφυλλα, χρυσάνθεμα, γαρύφαλλα, αζαλέες). Επίσης αποτελεί κύριο εχθρό ετήσιων υπαίθριων καλλιεργειών όπως αραβόσιτος, σόγια και ζαχαρότευτλο και πολυετών καλλιεργειών όπως τριφύλλι, φράουλα, αμπέλι, εσπεριδοειδή, μήλα, αχλάδια, αμύγδαλα, δαμάσκηνα, σφένδαμο και φτελιά.

Όλα τα κινητά στάδια του τετράνυχου τρέφονται ενεργά από την κατώτερη επιφάνεια των φύλλων τρυπώντας με το στίλετο τα επιδερμικά κύτταρα και απομυζώντας φυτικούς χυμούς. Στην ανώτερη επιφάνεια των φύλλων εμφανίζονται χαρακτηριστικά υπόλευκα ή υποκίτρινα στίγματα. Οι κηλίδες ενώνονται και αποκτούν καστανοκόκκινο χρώμα καθώς η προσβολή γίνεται εντονότερη. Σε πολύ εκτεταμένες προσβολές προκαλείται πλήρης φυλλόπτωση και πρόωρος θάνατος του φυτού (Devine et al., 2001). Λαμβάνοντας υπόψη ότι ο τετράνυχος προκαλεί σημαντικότερες ζημιές σε θερμές και ξηρές συνθήκες, λόγω της αυξημένης διατροφής και αναπαραγωγής (Weidhaas, 1979), η υπερθέρμανση του πλανήτη και οι κλιματικές αλλαγές μπορεί να οδηγήσουν σε εξάρσεις των προσβολών σε ευρύτερη γεωγραφική κλίμακα. Υπάρχουν αναφορές βόρειας εξάπλωσης του είδους σε περιοχές της δυτικής Ευρώπης (Carbonelle et al., 2007).

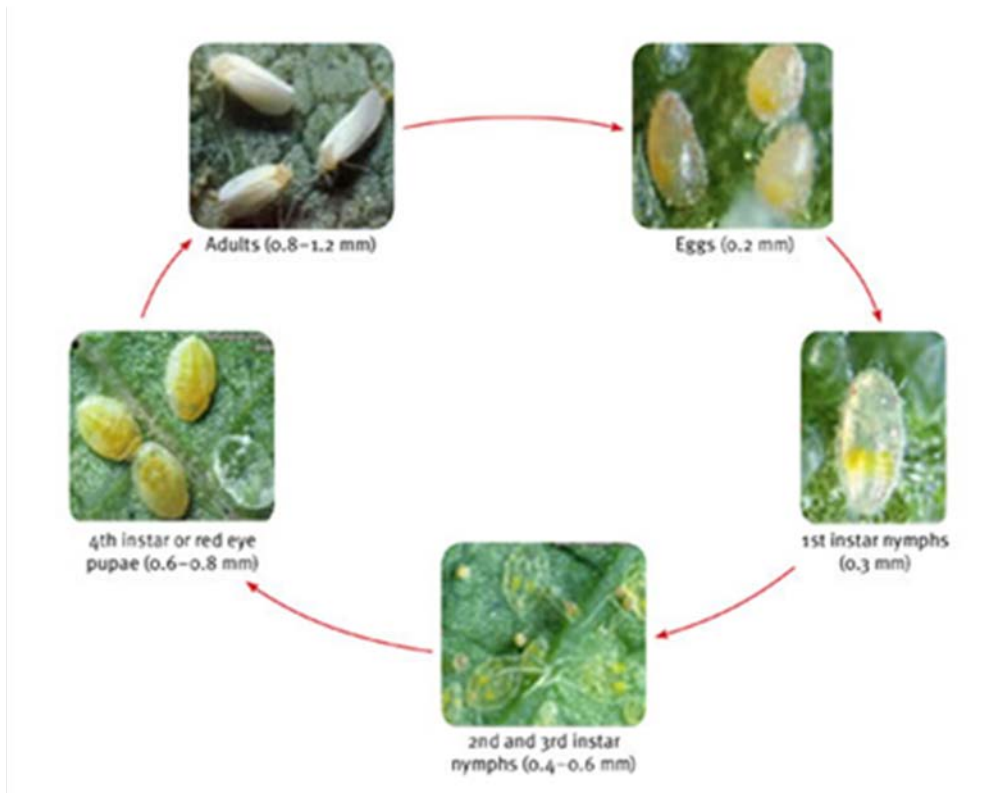
## **1.2 Bemisia tabaci**

Ο αλευρώδης του καπνού, *Bemisia tabaci* Gennadius (Hemiptera: Aleyrodidae), περιγράφηκε πρώτη φορά το 1889 σε Ελληνικά φυτά καπνού (Gennadius, 1889). Οι αλευρώδεις ανήκουν στην οικογένεια Aleyrodidae, τάξης Hemiptera και υποτάξης Homoptera (Mound and Halsey, 1978; Cambel et al., 1994). Έχουν περιγραφεί περίπου 1.500 είδη αλευρώδη (Οικογένεια: Aleyrodidae) (Martin et al., 2000; Mound and Halsey, 1978). Αποτελούν ιδιαίτερα σημαντικούς εχθρούς των καλλιεργειών, λόγω της ικανότητας τους να απομυζούν φυτικούς χυμούς από το φλοιώμα (Cambel et al., 1994). Επιπροσθέτως, οι αλευρώδεις αποτελούν σημαντικό φορέα φυτικών ιώσεων, οι οποίοι ανήκουν στα γένη *Begomovirus*, *Crinivirus* και *Iponovirus* (Jones, 2003).

Ο βιολογικός κύκλος του *B. tabaci* διαρκεί 15-35 ημέρες και εξαρτάται από την θερμοκρασία, την φωτοπερίοδο και το φυτό-ξενιστή (Gerling et al., 1986). Στις Μεσογειακές χώρες το έντομο συμπληρώνει 10-12 γενεές / έτος συνήθως. Ο βιολογικός κύκλος του εντόμου αποτελείται από τα στάδια του ωού, της προνύμφης (η οποία διέρχεται από 4 ηλικίες) και του ακμαίου (Εικ. 2). Μετά την εκκόλαψη των ωών στα φύλλα ή σε επιφάνεια του φυτού προκύπτει η πρώτη κινητού σταδίου νύμφη (N1) η οποία στη συνέχεια δίνει με έκδυση τη δεύτερου σταδίου νύμφη (N2). Μετά από δύο ακόμα εκδύσεις προκύπτει η τέταρτου σταδίου νύμφη (N4). Το στάδιο αυτό συχνά αναφέρεται ως πούπα, παρότι οι αλευρώδεις δεν είναι ολομετάβολα έντομα (Byrne and Bellows, 1991). Το ενήλικο που εξέρχεται από την πούπα, έχει χαρακτηριστικό κιτρινωπό χρωματισμό στο σώμα και φέρει δύο ζεύγη πτερυγών. Τα θηλυκά άτομα είναι ελαφρώς μεγαλύτερου μεγέθους από τα αρσενικά και γεννούν 50 - 400 ωά κατά την διάρκεια της ζωής τους. Ενδιαφέρον παρουσιάζει ο απλοδιπλοειδής τρόπος αναπαραγωγής του *B. tabaci*, όπου τα απλοειδή αρσενικά άτομα προκύπτουν από αγονιμοποιητά ωά (αρρενοτόκος παρθενογένεση), ενώ τα διπλοειδή θηλυκά από γονιμοποιημένα ωά (Byrne and Bellows, 1991; Blackman and Cahill, 1998). Σημαντικό χαρακτηριστικό του αλευρώδη (και άλλων ειδών της υποτάξης Homoptera) είναι η παρουσία ενδοσυμβιωτικών βακτηρίων.

Το *B. tabaci* αποτελεί ένα πολυφάγο είδος που προσβάλλει καλλιεργούμενα, μη-καλλιεργούμενα, ετήσια και πολυετή φυτά (Mound and Halsey, 1978). Έχει αναφερθεί ότι προσβάλλει 500 - 600 φυτά ξενιστές (Naranjo and Ellsworth, 2009), αλλά πιθανόν να είναι περισσότερα καθώς νέα φυτά ξενιστές συνεχώς γίνονται γνωστά (Simmons et al., 2008). Όλα τα αναπτυξιακά στάδια του εντόμου (εκτός του ωού) επιφέρουν άμεσα ζημιές στα φυτά ξενιστές λόγω της μύζησης του φυτικού χυμού, προκαλώντας εξασθένηση των φυτών, προοδευτική μάρανση και σε μεγάλες προσβολές καθολική ξήρανση των φυτών. Η απευθείας μύζηση φυτικών χυμών μέσω τροφής προκαλεί απώλειες στην παραγωγή που φτάνουν σε μερικές περιπτώσεις το 50% (Horowitz et al., 2003). Επιπροσθέτως, μέσω της έκκρισης μελιτωδών αποχωρημάτων ευνοείται η ανάπτυξη των μυκήτων της καπνιάς που προκαλεί μείωση της φωτοσυνθετικής ικανότητας των φύλλων και κατ' επέκταση της εμπορικής αξίας των προϊόντων (Inbar and Gerling, 2008). Χαρακτηριστικά συμπτώματα προσβολής από τον αλευρώδη αποτελούν οι φυτοτοξικές αλλοιώσεις όπως η ασημόχρωση των φύλλων της κολοκυθιάς (Maynard and Cantliffe, 1989), η ανομοιόμορφη ανάπτυξη των καρπών της τομάτας (Yokomi et al., 1990) και η λεύκανση των νεύρων της ποϊνσέτίας (Brown et al., 1995).





Εικόνα 2: Βιολογικός κύκλος του αλευρώδη (<http://www.daff.qld.gov.au>)

Το είδος *B. tabaci* αποτελεί ένα εξαιρετικό παράδειγμα κρυπτικού είδους (cryptic species). Το είδος υπέστη πολλές ταξινομικές αναθεωρήσεις τα προηγούμενα χρόνια (Perring, 2001). Μόλις πρόσφατα, έγινε γνωστό το εύρος της αναπαραγωγικής ασυμβατότητας και γενετικής ποικιλομορφίας εντός του είδους, που έδωσε το έναυσμα στην αναθεώρηση της ταξινόμησής του (Dinsdale et al., 2010). Σύμφωνα με πρόσφατη εργασία (De Barro et al., 2011) το σύμπλεγμα του *B. tabaci* αποτελείται από 11 ξεκάθαρα διαχωριζόμενες ομάδες (well-defined high-level groups) και έχουν προσδιοριστεί τουλάχιστον 24 μορφολογικά πανομοιότυπα είδη (βιότυποι). Οι διαφορετικές ομάδες σχετίζονται με διαφορές που σχετίζονται με τα φυτά ξενιστές και την ικανότητα προσαρμογής του σε αυτά, την ικανότητα πρόκλησης φυτοτοξικών αντιδράσεων, την ανθεκτικότητα τους σε σκευάσματα εντομοκτόνων και σε άλλα χαρακτηριστικά (De Barro et al., 2011). Από τους βιότυπους αυτούς οι B και Q θεωρούνται αυτοί με την μεγαλύτερη δυναμική μετάδοσης ιώσεων εξαιτίας της γεωγραφικής τους εξάπλωσης και του εύρους των ξενιστών.

## 2 Τρόποι καταπολέμησης επιβλαβών φυτοπαρασίτων - *Tetranychus urticae* και *Bemisia tabaci*

Η καταπολέμηση των επιβλαβών για την γεωργία φυτοπαρασίτων είναι αναγκαία. Οι παραγωγοί έχουν στη διάθεση του πολλά εργαλεία για τον έλεγχο των πληθυσμών σε ανεκτά για τις καλλιέργειες επίπεδα. Τα μέτρα αυτά μπορεί να διακριθούν σε καλλιεργητικά, μηχανικά, βιολογικά και χημικά. Παρότι τα τελευταία χρόνια η βιολογική καταπολέμηση έχει κερδίσει έδαφος, σε πολλές περιπτώσεις με εξαιρετικά αποτελέσματα, ο κύριος τρόπος καταπολέμησης του τετράνυχου και του αλευρώδη μέχρι σήμερα γίνεται κυρίως με χρήση χημικών σκευασμάτων.

### 2.1 Καλλιεργητικά, μηχανικά και άλλα μέτρα

Στα καλλιεργητικά μέτρα περιλαμβάνονται διάφορες καλλιεργητικές εργασίες που γίνονται με τα συνηθισμένα γεωργικά μηχανήματα ή εργαλεία και συντελούν στον περιορισμό των βλαβερών εντόμων ή άλλων ζωικών εχθρών της παραγωγής ή στον περιορισμό των ζημιών. Στα καλλιεργητικά μέτρα μπορούν να περιληφθούν: η αμειψισπορά, οι περίοδοι χωρίς φυτό-ξενιστή, η αλλαγή του τρόπου ή του χρόνου φύτευσης ή συγκομιδής, η φύτευση φυτών παγίδων, η καταπολέμηση των ζιζανίων, η καλλιέργεια του εδάφους, η καταστροφή των υπολειμμάτων της καλλιέργειας, η δημιουργία ζωηρών φυτών με κατάλληλη άρδευση, λίπανση, κλάδεμα, αραιώμα καθώς και η χρήση ανθεκτικών ποικιλιών ή ειδών των καλλιεργούμενων φυτών. Συνήθως τα καλλιεργητικά μέτρα είναι επικουρικά άλλων μέτρων καταπολέμησης (Τζανακακης, 1995). Κάποια από αυτά τα μέτρα χρησιμοποιούνται και στην καταπολέμηση των *T. urticae* και *B. tabaci*.

Τα μηχανικά και άλλα μέτρα είναι η συλλογή, η σύνθλιψη, η παγίδευση, τα μηχανικά και άλλα φράγματα, η μηχανική απομάκρυνση, η αποφυγή των νυγμάτων των εντόμων, η αχρήστευση του μέσου που ζουν και πολλαπλασιάζονται, η αλλαγή της υγρασίας, της θερμοκρασίας και του φωτός, η ηλεκτροπληξία, η φωτεινή ή άλλη ακτινοβολία ενέργεια, τα ηχητικά κύματα, τα μέτρα γενικής υγιεινής. Τα μέτρα αυτά, μόνο σε σχετικά λίγες περιπτώσεις προκαλούν μεγάλη θνησιμότητα των εντόμων και είναι συνήθως δαπανηρά (Τζανακακης, 1995). Ορισμένα χρησιμοποιούνται για τον τετράνυχου και τον αλευρώδη.

### 2.2 Βιολογική καταπολέμηση

Η βιολογική καταπολέμηση για τον έλεγχο των επιβλαβών για την γεωργία φυτοπαρασίτων βρίσκει ευρεία εφαρμογή τα τελευταία χρόνια (Arno et al., 2010). Η χρήση

ωφέλιμων αρπακτικών και παρασιτοειδών και η εξαπόλυση τους, κυρίως μέσα σε θερμοκήπια, μπορεί να μειώσει αισθητά τους πληθυσμούς του αλευρώδη και του τετράνυχου. Αρπακτικά ακάρεα της οικογένειας Phytoseiidae καθώς και αρπακτικά έντομα από τα γένη *Orius*, *Anthocoris*, *Feltiella* και *Stethorus* έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για την καταπολέμηση του τετράνυχου. Αρπακτικά έντομα από τα γένη *Delphastus*, *Macrolophus*, *Chrysoperla* καθώς και είδη των παρασιτοειδών *Encarsia formosa* και *Eretmocerus eremicus* διατίθενται στο εμπόριο για την καταπολέμηση του αλευρώδη. Τέλος η εφαρμογή βιολογικών σκευασμάτων με σπόρια των εντομοπαθογόνων μυκήτων, όπως *Beauveria bassiana*, χρησιμοποιείται για τον έλεγχο των δύο αυτών επιβλαβών ειδών.

### 2.3 Χημική καταπολέμηση

Ο κύριος τρόπος για τον έλεγχο των επιβλαβών για την γεωργία εντόμων και ακάρεων γίνεται μέχρι και σήμερα με την χρήση εντομοκτόνων και ακαρεκτόνων. Τα εντομοκτόνα και ακαρεοκτόνα μπορούν να ταξινομηθούν με διάφορους τρόπους, αλλά η πιο χρήσιμη ίσως μέθοδος ταξινόμησης γίνεται ανάλογα με τον τρόπο δράσης (IRAC, 2012). Βάσει αυτής της ταξινόμησης υπάρχουν περίπου 29 διαφορετικοί τρόποι δράσης. Τα σκευάσματα που χρησιμοποιούνται εναντίων του αλευρώδη και του τετράνυχου μπορούν να χωριστούν με βάση την δράση τους: 1) στο νευρικό σύστημα, 2) στα συστήματα παραγωγής ενέργειας, 3) στις διεργασίες αύξησης και εξέλιξης και 4) στα μη ειδικής και αγνώστου δράσης. Ακολουθεί ιστορική καταγραφή των σκευασμάτων που χρησιμοποιήθηκαν ή εξακολουθούν να χρησιμοποιούνται εναντίων των δύο ειδών.

Το DDT, που ανήκει στην οργανοχλωριωμένα, πήρε έγκριση το 1940 για την χρήση στη γεωργία. Δρα προσκολλώντας στις πρωτεϊνικές υπομονάδες των ιόντων Na<sup>+</sup>, προκαλώντας το παρατεταμένο άνοιγμα των διαύλων. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την απώλεια ιόντων και την διατάραξη της ευαίσθητης ισορροπίας μεταξύ ιόντων Na<sup>+</sup> και K<sup>+</sup> στο περιβάλλον των νευρικών κυττάρων. Έχει απαγορευτεί η χρήση του στην γεωργία στις περισσότερες χώρες (EPA, 1975).

Τα οργανοχλωριωμένα (με εξαίρεση το DDT) και τα κυκλοδιένια (τα οποία εισήχθησαν την ίδια περίοδο στην γεωργία) στοχεύουν τον υποδοχέα GABA (Feyereisen, 1995). Το γ-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA) είναι ο κύριος ανασταλτικός νευροδιαβιβαστής των εντόμων και των θηλαστικών, η δέσμευση του προκαλεί το άνοιγμα του διαμεμβρανικού καναλιού χλωρίου επιτρέποντας ροή των ιόντων χλωρίου Cl<sup>-</sup> εντός ή ιόντων K<sup>+</sup> εκτός του κυττάρου (Buckingham SD, 2010). Σκευάσματα που στοχεύουν τον υποδοχέα GABA

εξακολουθούν να χρησιμοποιούνται μέχρι και σήμερα για την καταπολέμηση των τετράνυχων και των αλευρωδών (IRAC, 2012).

Τα οργανοφωσφορικά και τα καρβαμιδικά εντομοκτόνα εισήχθησαν για πρώτη φορά στην καταπολέμηση του τετράνυχου και του αλευρώδη τις δεκαετίες του 1950 και 1960 αντίστοιχα (Casida and Durkin, 2013). Και οι δύο χημικές ομάδες στοχεύουν το ένζυμο ακετυλοχολινεστεράση, αναστέλλοντας την λειτουργία της. Η ακετυλοχολινεστεράση καταλύει την μετατροπή της ακετυλοχολίνης σε χολίνη, διακόπτοντας την μεταφορά μηνυμάτων, οδηγώντας σε αχρήστευση το νευρικού συστήματος και θάνατο των οργανισμών στόχων (Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2007). Την ίδια δεκαετία ανακαλύφθηκαν τα πρώτα εξειδικευμένα ακαρεοκτόνα (dicofol, tetradifon) ο τρόπος δράσης των οποίων μέχρι και σήμερα παραμένει άγνωστος (Marcic et al., 2011).

Κατά την δεκαετία του 1960 και στις αρχές του 1970 ανακαλύφθηκαν το οργανοθειούχο propargite, το οργανοκασσιτερούχο fenbutatin oxide και η φορμαμιδίνη amitraz. Τα παραπάνω σκευάσματα αποτελούν τα δεύτερης γενιάς εξειδικευμένα ακαρεοκτόνα (Marcic et al., 2011). Τα δύο πρώτα στοχεύουν στο σύστημα της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, παρεμποδίζοντας την βιοσύνθεση του ATP (Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2007). Τα σκευάσματα diafenthiuron και chlofenapyr, που ανακαλύφθηκαν την δεκαετία του 1990, στοχεύουν επίσης στο σύστημα της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, και έχουν τόσο εντομοκτόνο όσο και ακαρεοκτόνο δράση (Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2007). Το amitraz δρα στον νευροδιαβιβαστή οκταπαμίνη (Casida and Durkin, 2013), προκαλώντας έντονη νευρική διέγερση.

Τα συνθετικά πυρεθρινοειδή εισήχθησαν στη δεκαετία του 1970 μετά την απαγόρευση της χρήσης του DDT. Έχουν παρόμοιο μηχανισμό δράσης με το DDT, στοχεύοντας τα κανάλια μεταφοράς ιόντων νατρίου. Η γρήγορη κατάρριψη των εντόμων (knockdown effect) οφείλεται στην γρήγορη μυϊκή τους παράλυση (Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2007). Τα πυρεθρινοειδή μέχρι και σήμερα χρησιμοποιούνται ιδιαίτερα εκτεταμένα εναντίων των τετράνυχων και των αλευρωδών.

Στις αρχές της δεκαετίας του 1980 ανακαλύφθηκαν οι παρεμποδιστές ανάπτυξης ακάρεων (clofentezine, hexythiazox), των οποίων ο μηχανισμός μέχρι και σήμερα δεν είναι απόλυτα γνωστός, ωστόσο δρουν εναντίων ατελών σταδίων του τετράνυχου. Την ίδια περίοδο (1980) εισήχθησαν στην γεωργική πράξη οι βενζοϋλουρίες, οι οποίες είναι αποτελεσματικές εναντίων του τετράνυχου. Τα σκευάσματα αυτά παρεμβαίνουν ανασταλτικά στην βιοσύνθεση της χιτίνης με αποτέλεσμα την παρεμπόδιση σχηματισμού

νέου δερματοσκελετού, προκαλώντας τελικά τον θάνατο (Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2007). Παρόμοιο τρόπο δράσης με τις βενζουλουρίες έχουν και οι αζίνες, όπως το burprofezin, που ανακαλύφθηκε αργότερα, οι οποίες έχουν ακαρεοκτόνο και εντομοκτόνο δράση (Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2007).

Το abamectin και το milbemectin που ανακαλύφθηκαν το 1980 και 1990 αντίστοιχα και ανήκουν στις μακροκυκλικές λακτόνες. Έχουν εξαιρετικές εντομοκτόνες, ακαρεοκτόνες και ανθελμινθικές ιδιότητες. Δρουν στο γ-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA) και στους διαύλους χλωρίου οδηγώντας στην ενεργοποίηση των καναλιών χλωρίου, προκαλώντας έτσι την παράλυση του οργανισμού στόχου (Fritz et al., 1979; Bloomquist, 1993; 2000). Χρησιμοποιούνται συχνά μέχρι και σήμερα για να έλεγχο κυρίως των τετρανύχων σε πολλές καλλιέργειες, με σχετικά μεγάλη επιτυχία.

Τα νεονικοτινοειδή στοχεύουν το νικοτινικό υποδοχέα της ακετυλοχολίνης (nAChR). Το πρώτο νεονικοτινοειδές που αναπτύχθηκε ήταν το imidacloprid (1990) και τα επόμενα χρόνια ακολούθησαν και άλλα σκευάσματα της συγκεκριμένης ομάδας. Οι nAChRs είναι χολινεργικοί υποδοχείς και ενεργοποιούνται από την πρόσδεση του νευροδιαβιβαστή ακετυλοχολίνη (Matsuda et al., 2009). Τα νεονικοτινοειδή μιμούνται τη δράση του νευροδιαβιβαστή ακετυλοχολίνη, το νεύρο διεγείρεται συνεχώς, οδηγεί στην υπερδιέγερση του νευρικού συστήματος και τελικά στο θάνατο των εντόμων (Casida και Durkin, 2013). Εξαιτίας των χημικών ιδιοτήτων τους, της υψηλής απόδοσης και της χαμηλής τοξικότητας τα νεονικοτινοειδή θεωρούνται μία από τις πιο επιτυχημένες κατηγορίες χημικών εντομοκτόνων εναντίων του αλευρώδη στη σύγχρονη φυτοπροστασία.

Την δεκαετία του 1990 αναπτύχθηκαν τα METI ακαρεοκτόνα (mitochondrial electron transport inhibitors) που δρουν ως παρεμποδιστές μεταφοράς ηλεκτρονίων στα μιτοχόνδρια (Van Leeuwen et al., 2009). Ανάλογα με το σύμπλοκο (I, II ή III) στο οποίο δρουν διαφοροποιούνται σε τρεις υποκατηγορίες (Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2007). Χρησιμοποιούνται εντατικά μέχρι και σήμερα εναντίων των τετρανύχων, ενώ σκευάσματα του συμπλόκου I (tolfenpyrad και pyridaben) χρησιμοποιούνται και εναντίων των αλευρωδών.

Στα τέλη της δεκαετίας του 1990 ανακαλύφθηκαν το ακαρεοκτόνο bifenazate και το εντομοκτόνο pymetrozine, των οποίων ο μηχανισμός δεν είναι απόλυτα γνωστός (IRAC, 2012). Το bifenazate είναι ένα ιδιαίτερα αποτελεσματικό ακαρεοκτόνο, έχει καταταχθεί στα αγνώστου ή αβέβαιου τρόπου δράσης, και χρησιμοποιείται εναντίων των τετρανύχων. Το pymetrozine, το οποίο σύμφωνα με τον IRAC (2012) ανήκει στην ομάδα των selective

feeding blockers, χαρακτηρίζεται από εκλεκτική δράση εναντίων ομοπτέρων. Παρεμποδίζει την διάθεση για τροφή, με αποτέλεσμα να έντομα να θανατώνονται 1-3 μέρες από την εφαρμογή του (Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2007). Χρησιμοποιείται εναντίων του αλευρώδη.

Το 1998 ανακαλύφθηκε το ακαρεοκτόνο etoxazole, το οποίο είναι αποτελεσματικό εναντίων ατελών σταδίων του τετράνυχου (ωά και λάρβες) (Kim and Yoo, 2002; Dekeyser, 2005). Κατατάσσεται συνήθως στους παρεμποδιστές ανάπτυξης ακάρεων, μαζί με τα ακαρεοκτόνα clofentezine και hexythiazox (IRAC 2012), των οποίων ο στόχος δράσης επίσης δεν είναι πλήρως γνωστός. Σύμφωνα με τους Nauen and Smagghe (2006), το etoxazole δρα ως αναστολέας της σύνθεσης της χιτίνης, παρόμοια με τις βενζουλουρίες.

Τα εντομοκτόνα pyriproxifen και kinoprene, τα οποία επίσης ανακαλύφθηκαν τα τέλη του 1990, ανήκουν στις ενώσεις που μιμούνται την δράση ορμονών νεότητας. Οι ενώσεις αυτές μιμούνται την δράση της νεοτίνης, παρεμποδίζοντας έτσι την φυσιολογική εξέλιξη των εντόμων, τα οποία παραμένουν σε στάδιο γηρασμένων προνυμφών και τελικά πεθαίνουν. Τα σκευάσματα αυτής της κατηγορίας χρησιμοποιούνται για στον έλεγχο των αλευρωδών.

Στις αρχές του 2000 ανακαλύφθηκαν τρεις νέες ενώσεις της ομάδας του τετρονικού οξέος (tetronic acids), τα spirodiclofen, spiromesifen και spiretetrinat, που ανήκουν στην ομάδα των παρεμποδιστών της λιπιδιακής σύνθεσης (IRAC, 2012). Οι ενώσεις αυτές δρουν ως αναστολείς της καρβοξυλάσης του ακέτυλο-συνένζυμου α (ACCase), που αποτελεί βασικό ένζυμο στην βιοσύνθεση του λιπαρού οξέος (Nauen, 2005; Bretschneider et al., 2007). Οι κετοενόλες έχουν αποδειχθεί τα τελευταία χρόνια ιδιαίτερα αποτελεσματικές και χρησιμοποιούνται τόσο εναντίων του τετράνυχου όσο και του αλευρώδη.

Τέλος, τα τελευταία χρόνια έχει ανακαλυφθεί η ομάδα των διαμιδίων (όπως το cyantraniliprole), που παρουσιάζουν δράση στους μυϊκούς ιστούς και πιο συγκεκριμένα στον υποδοχέα της ryanodine (ryanodine receptors) (Casida and Durkin, 2013). Χρησιμοποιείται εναντίων του αλευρώδη.

### 3 Ανθεκτικότητα

Η ανθεκτικότητα είναι μια κληρονομούμενη ιδιότητα και ορίζεται ως η ικανότητα ενός πληθυσμού να επιβιώνει μετά από έκθεση σε δόσεις δραστικής ουσίας που κανονικά θα ήταν θανατηφόρες. Είναι ένα καλό παράδειγμα αντίδρασης και προσαρμογής των οργανισμών σε περιβαλλοντικό στρες (Denholm et al., 2001). Ένας πληθυσμός από ευπαθής, με την πάροδο των γενεών, γίνεται ανθεκτικός με επιλογή των ανθεκτικών στο

εντομοκτόνο γονιδίων που ο πληθυσμός ήδη έχει. Παράγοντας επιλογής είναι το εντομοκτόνο, που επιλέγει τα ανθεκτικά γονίδια, θανατώνοντας τα ευπαθή άτομα.

Σε έναν ευαίσθητο πληθυσμό τα άτομα με γονίδια ανθεκτικότητας σε ένα εντομοκτόνο είναι σπάνια, της τάξης του  $10^{-5}$  με  $10^{-8}$  (Georgiou, 1986). Καταπολεμώντας έναν πληθυσμό με συγκεκριμένη δόση εντομοκτόνου θανατώνεται το πλείστο του πληθυσμού, επιβιώνουν όμως λίγα ανθεκτικά άτομα. Αφού η ανθεκτικότητα είναι κληρονομήσιμη, το ποσοστό των ανθεκτικών ατόμων στην θυγατρική γενεά θα είναι μεγαλύτερο από ότι στην μητρική. Συνεχίζοντας την καταπολέμηση του πληθυσμού, με την ίδια δόση σε κάθε επόμενη γενεά, συνεχίζεται η επιλογή των ανθεκτικών ατόμων, αυξάνεται έτσι η επιλογή των ανθεκτικών γονιδίων στον πληθυσμό, με αποτέλεσμα κάποτε το πλείστο του πληθυσμού να αποτελείται από ανθεκτικά στο εντομοκτόνο άτομα. Τότε λέμε ότι ο πληθυσμός ανέπτυξε ανθεκτικότητα.

Ως κυριότερους παράγοντες που επηρεάζουν ή καθορίζουν την δημιουργία και τον βαθμό της ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα, ο Busvine (1970) θεώρησε τους εξής τρεις: (1) τη συχνότητα, την αποτελεσματικότητα και την υπόσταση (κυριαρχία ή μη) των γονιδίων ανθεκτικότητας στον αρχικό πληθυσμό, (2) την ένταση της επιλογής, δηλαδή το μέγεθος του πληθυσμού που εκτίθεται στο εντομοκτόνο και το ποσοστό που θανατώνεται και (3) τον αριθμό των γενεών ανά έτος, πόσο συχνά δηλαδή επιλέγεται ο πληθυσμός ανά έτος.

Η ανθεκτικότητα ενός πληθυσμού σε ένα εντομοκτόνο τον κάνει συχνά ανθεκτικό, σε μικρότερο συνήθως βαθμό, και σε άλλα εντομοκτόνα με συγγενή τρόπο δράσης. Η ανθεκτικότητα αυτή λέγεται έμμεση ή διασταυρωτή (cross resistance) αφού δημιουργείται έμμεσα χωρίς ο συγκεκριμένος πληθυσμός να έχει προηγουμένως εκτεθεί στην ουσία ή τις ουσίες αυτές. Για παράδειγμα, το DTT και τα πυρεθρινοειδή έχουν τον ίδιο τρόπο και στόχο δράσης και η ανθεκτικότητα στο DTT συχνά προκαλεί ανθεκτικότητα στα πυρεθρινοειδή και αντίστροφα. Μερικές φορές, εντομοκτόνα με διαφορετικό τρόπο δράσης αποτοξικοποιούνται από τα ίδια ένζυμα, προκαλώντας έτσι έμμεση ανθεκτικότητα (Feng et al., 2010).

Πολλαπλή ανθεκτικότητα (multiple resistance) ονομάζεται η ανθεκτικότητα που αφορά περισσότερες από μία τοξικές ουσίες μη συγγενείς μεταξύ τους. Δημιουργείται κάτω από με επιλογή, υπό την επίδραση εντομοκτόνων που ανήκουν σε διαφορετικές κατηγορίες και οφείλεται σε περισσότερους από έναν μηχανισμούς ανθεκτικότητας, που επιλέγονται στο ίδιο άτομο.

## 4 Μηχανισμοί ανθεκτικότητας

Οι μηχανισμοί ανθεκτικότητας στα έντομα και στα ακάρεα εμφανίζονται σε διάφορες μορφές και διακρίνονται σε ηθολογική ανθεκτικότητα, φυσιολογική ανθεκτικότητα, βιοχημική ανθεκτικότητα και ανθεκτικότητα στόχου. Στην πράξη, στις περισσότερες περιπτώσεις, η ανθεκτικότητα προκαλείται από μειωμένη ευαισθησία του στόχου (ανθεκτικότητα στόχου) ή / και αυξημένη αποτοξικοποίηση (βιοχημική ανθεκτικότητα) (Roush and Tabashnik, 1990; Feyereisen, 1995).

Η ηθολογική ανθεκτικότητα αφορά την ποσότητα του εντομοκτόνου που δέχεται ένα έντομο. Οφείλεται σε διαφοροποιημένη συμπεριφορά των ανθεκτικών εντόμων που τα κάνει να μην δέχονται ή να μην έρχονται σε επαφή με θανατηφόρες ποσότητες του εντομοκτόνου.

Η φυσιολογική ανθεκτικότητα αφορά την ποσότητα του εντομοκτόνου που εισδύει στο σώμα του εντόμου και φτάνει στον στόχο σε ορισμένο χρόνο. Αφορά δηλαδή κυρίως την ταχύτητα διείσδυσης και σε συνδυασμό με την ταχύτητα απέκκρισης και τυχόν αποθήκευσης σε μη ευπαθείς ιστούς. Τα ανθεκτικά έντομα έχουν εξωσκελετό λιγότερο περατό στο εντομοκτόνο, άρα βραδύτερη διείσδυση ή ταχύτερη απέκκριση. Αλλαγές στη χημική σύσταση του εξωσκελετού των εντόμων, επιβραδύνει την διείσδυση του εντομοκτόνου δίνοντας έτσι το χρόνο στους μηχανισμούς αποτοξικοποίησης να μειώσουν την ποσότητα του εντομοκτόνου που θα φτάσει στον στόχο.

Η βιοχημική ανθεκτικότητα απαρτίζεται από ένζυμα που μεταβολίζουν τα εντομοκτόνα και ακαρεοκτόνα προτού αυτά φτάσουν στους στόχους τους. Τα ένζυμα που εμπλέκονται στην αποτοξικοποίηση των εντομοκτόνων μπορεί να είναι ποσοτικά ή / και ποιοτικά τροποποιημένα. Τρεις είναι οι κύριες γνωστές ομάδες ενζύμων που σχετίζονται με την βιοχημική ανθεκτικότητα: οι εστεράσες (CCEs), οι μεταφοράσες της γλουταθειόνης (GSTs) και οι μονοοξυγενάσες (P450s).

Οι εστεράσες είναι μια μεγάλη ομάδα ενζύμων που μεταβολίζουν μεγάλο αριθμό εξωγενών και ενδογενών υποστρωμάτων με εστερικούς δεσμούς. Έχουν συσχετιστεί με την ανθεκτικότητα σε πάνω από 50 είδη εντόμων και ακάρεων (Devorshak and Roe, 1998). Μερικές εστεράσες που προσδίδουν ανθεκτικότητα έχουν περιορισμένες καταλυτικές ιδιότητες, παράγονται όμως σε τόσο μεγάλες ποσότητες ώστε να απομακρύνουν το εντομοκτόνο από τον στόχο δεσμεύοντας το, μειώνοντας έτσι την διαθεσιμότητα του (Field et al., 1998). Η διαδικασία αυτή ονομάζεται δέσμευση ή κατακράτηση (sequestration). Η γονιδιακή ενίσχυση των εστερασών είναι ο πιο συχνός και καλά μελετημένος μηχανισμός



υπερέκφρασης, σε ανθεκτικά στα οργανοφωσφορικά στελέχη αφίδων και κουνουπιών (Devonshire and Field, 1991; Hemingway et al., 1998).

Οι μεταφοράσες της γλουταθειόνης είναι μια οικογένεια πρωτεϊνών που καταλύουν την προσθήκη γλουταθειόνης στα λιπόφιλα μόρια των εντομοκτόνων, αυξάνοντας την λιποδιαλυτότητα τους και διευκολύνοντας κατ' αυτόν τον τρόπο την αποβολή τους από τον οργανισμό. Σε μερικές περιπτώσεις τα ένζυμα αυτά μεταβολίζουν το εντομοκτόνο χωρίς την προσθήκη γλουταθειόνης στο τοξικό μόριο, κάτι που συμβαίνει στην αντίδραση αποϋδροχλωρινάσης του DDT (Orteli et al., 2003). Οι τρανσφεράσες της γλουταθειόνης προκαλούν σχετικά ήπια επίπεδα ανθεκτικότητας σε όλες σχεδόν τις κατηγορίες εντομοκτόνων (Fournier et al., 1987, Vontas et al., 2001, Vontas et al., 2002, Stumpf and Nauen, 2002).

Οι μονοοξυγενάσες (γνωστές επίσης ως P450-μονοοξυγενάσες ή μικτής λειτουργίας οξειδάσες) είναι μια λειτουργικά μεγάλη οικογένεια ενζύμων που έχει βρεθεί σε όλους σχεδόν τους οργανισμούς. Πρόκειται για μικροσωμικές αιμοπρωτεΐνες που καταλύουν την οξειδωτική διάσπαση των εντομοκτόνων (Scott, 1999). Για την μειωμένη ευαισθησία των εντόμων ευθύνονται ποσοτικές αλλαγές μελών της οικογένειας που έχουν την ικανότητα να μεταβολίζουν τα μόρια των εντομοκτόνων ουσιών και λιγότερο συχνά ποιοτικές διαφοροποιήσεις (Scott, 1999). Τα ένζυμα αυτά παίζουν έναν κρίσιμο ρόλο στον μεταβολισμό ενδογενών και εξωγενών χημικών μορίων. Εν αντιθέσει με την γονιδιακή ενίσχυση των εστερασών, η αυξημένη γονιδιακή έκφραση είναι η κύρια μοριακή βάση της υπερέκφρασης των P450s, αν και τελευταία έχουν αναφερθεί αρκετές περιπτώσεις γονιδιακής ενίσχυσης (Bass and Field, 2011).

Η ανθεκτικότητα στόχου αποτελεί τον κύριο μηχανισμό ανθεκτικότητας των εντόμων και των ακάρεων, η οποία είναι συνήθως υπεύθυνη για πολύ εντυπωσιακά επίπεδα ανθεκτικότητας. Η μείωση ή ακόμα και κατάργηση της τοξικότητας των χημικών ουσιών είναι συνέπεια μεταλλαγών αντικατάστασης αμινοξέων στο ενεργό κέντρο της πρωτεΐνης, το οποίο αποτελεί στόχο του εντομοκτόνου. Τέτοιες τροποποιήσεις του μοριακού στόχου έχουν προσδιοριστεί ως ο κύριος μηχανισμός ανθεκτικότητας σε αρκετές περιπτώσεις, που περιλαμβάνουν ένα ευρύ φάσμα εντόμων και τύπους χημικών ουσιών (Ffrench – Constant et al., 2000; Martin et al., 2000; Mutero et al., 1994; Vaughan et al., 1997; Williamson et al., 1996). Στις παρακάτω ενότητες αναλύονται οι μηχανισμοί ανθεκτικότητας του τετράνυχου και του αλευρώδη που είναι γνωστοί μέχρι σήμερα.

#### 4.1 Μηχανισμοί ανθεκτικότητας του τετράνυχου

Η ανάπτυξη ανθεκτικότητας του τετράνυχου σε σκευάσματα εντομοκτόνων και ακαρεοκτόνων με διαφορετικό τρόπο δράσης είναι ένα πολύ συχνό φαινόμενο. Οι αναφορές ανθεκτικότητας, καθώς και οι μηχανισμοί ανθεκτικότητας, σε πληθυσμούς και εργαστηριακά στελέχη συνοψίζονται από τους Van Leeuwen et al. (2010). Τα τελευταία πέντε χρόνια έχουν προσδιοριστεί τόσο μεταλλαγές ανθεκτικότητας στόχου όσο και γονίδια αποτοξικοποίησης τα οποία έχουν συσχετιστεί με τον φαινότυπο της ανθεκτικότητας (Πίν. 1). Κάποιοι από τους μηχανισμούς αυτούς έχουν χαρακτηριστεί λειτουργικά – γενετικά και σε μοριακό επίπεδο.

Ένας σημαντικός αριθμός μεταλλαγών στην ακετυλοχολινεστεράση έχουν αναφερθεί σε ανθεκτικά στελέχη και πληθυσμούς τετράνυχου από διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές, οι οποίες σχετίζονται με την ανθεκτικότητα οργανοφωσφορικών και καρβαμιδικών εντομοκτόνων. Αυτές περιλαμβάνουν τις G119S, A201S, T280A, G328A και F331W/Y (Khajehali et al., 2010; Kwon et al., 2010). Η σημαντικότερη όλων και η πιο συχνή στον τετράνυχο είναι η F331W. Η αντικατάσταση αυτή έχει χαρακτηριστεί λειτουργικά σε έντομα (Oh et al., 2006). Οι υπόλοιπες πρωτεϊνικές αντικαταστάσεις έχουν εντοπιστεί σε ανθεκτικά στελέχη τετράνυχου από διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές (Ευρώπη και Κορέα). Οι τρεις (G119S, G328A και A201S), που είναι γνωστές μεταλλαγές ανθεκτικότητας σε είδη εντόμων, εντοπίστηκαν σε ορισμένα ανθεκτικά OP στελέχη τετράνυχου, ενώ η T280A ανιχνεύτηκε σε όλα τα ανθεκτικά στελέχη από την Ευρώπη και την Κορέα (Khajehali et al., 2010; Kwon et al., 2010a).

Τρεις μεταλλαγές (F1538I, A1215D και L1024V) έχουν εντοπιστεί στα κανάλια μεταφοράς ιόντων νατρίου και έχουν συσχετιστεί με την ανθεκτικότητα στα πυρεθρινοειδή (Tsagkarakou et al., 2009; Kwon et al., 2010b). Η F1538I μεταλλαγή βρέθηκε να σχετίζεται με εξαιρετικά υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας στο bifenthrin σε δύο στελέχη από την Ελλάδα (Tsagkarakou et al., 2009). Η ίδια αντικατάσταση είχε προηγουμένως εντοπιστεί στο ανθεκτικό σε πυρεθρινοειδή τσιμπούρι *Boophilus microplus* (He et al., 1999). Επιπροσθέτως, η μεταλλαγή αυτή έχει χαρακτηριστεί λειτουργικά και έχει βρεθεί ότι προσδίδει ανθεκτικότητα σε οκτώ μόρια πυρεθρινοειδών (Tan et al., 2005). Η δεύτερη αντικατάσταση (L1024V) έχει βρεθεί να σχετίζεται με την ανθεκτικότητα σε ένα διαφορετικό πυρεθρινοειδές, το fenpropathrin, σε ανθεκτικά στελέχη από την Κορέα (Kwon et al., 2010b). Η τρίτη μεταλλαγή, στην θέση 1215, εντοπίστηκε σε συνδυασμό με τις δύο προαναφερθέντες μεταλλαγές (είτε με την F1538I είτε με την L1024V) και στις δύο εργασίες (Tsagkarakou et al., 2009; Kwon et al., 2010b).

Πίνακας 1: Γονίδια αποτοξικοποίησης και μεταλλαγές ανθεκτικότητας στόχου που έχουν σχετιστεί με την ανθεκτικότητα του τετράνυχου σε διαφορετικές ομάδες χημικών ουσιών.

Ανθεκτικότητα	RR	Χημική ομάδα	Μεταβολική ανθεκτικότητα	Ανθεκτικότητα στόχου	Αναφορά
pirimiphos methyl	44	OPs		<b>G119S/A201S/T280A/</b>	Khajehali et al., 2009
monocrotophos	3600			<b>G328A/F331W</b>	Kwon et al., 2010a
bifenthrin	>1000	pyrethroids		<b>L1024V/A1215D/F1538I</b>	Tsagkarakou et al., 2009
fenpropathrin	>50				Kwon et al., 2010b
abamectin	18	avermectins		<b>G314D</b>	Kwon et al., 2010c
	>2000				<b>G314D/G326E</b>
bifenazate	>1500			<b>G126S/I136T/S141F/</b>	Van Leeuwen et al., 2008
				<b>D161G/P262T</b>	Van Nieuwenhuhse et al., 2009
etoxazole	>48000			<b>I1017F</b>	Van Leeuwen et al., 2012
spirodiclofen	275	Ketoenols	<b>ApoD29/TUCCE04/CYP392E7/CYP392E10</b>		Demaeght et al., 2013

Με έντονα γράμματα τα γονίδια αποτοξικοποίησης και οι μεταλλαγές στόχου αυτά που έχουν χαρακτηριστεί γενετικά ή λειτουργικά.

Στο κυτόχρωμα β του μιτοχondριακού DNA, προσδιορίστηκαν πέντε μεταλλαγές (G126S, I136T, S141F, D161G και P262T) που ευθύνονται για πολύ υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας στο ακαρεοκτόνο bifenazate (Van Leeuwen et al., 2008; Van Nieuwenhuijse et al., 2009). Οι μεταλλαγές αυτές έχουν βρεθεί, είτε μόνες τους είτε σε συνδυασμό, σε στελέχη και πληθυσμούς τετράνυχου από την Βόρεια Ευρώπη κυρίως (Van Leeuwen et al., 2009).

Σε πρόσφατη εργασία, με την με την μέθοδο της ανάλυσης διαχωρισμού μεγέθους (BSA, bulk segregant analysis), προσδιορίστηκε το γονίδιο της συνθετάσης της χιτίνης (CHS1) ως ο μοριακός στόχος του ακαρεοκτόνου etoxazole (Van Leeuwen et al., 2012). Εντοπίστηκε η μεταλλαγή I1017F να σχετίζεται με πολύ υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας στο etoxazole, σε ανθεκτικά στελέχη από διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές (Van Leeuwen et al., 2012).

Το spiroadiclofen είναι ένα ακαρεοκτόνο, που σύμφωνα με πρόσφατες εργασίες, είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικό εναντίον φυσικών πληθυσμών τετράνυχου από την Ελλάδα και την Ολλανδία (Ilias et al., 2012; Khajehali et al., 2011). Ωστόσο, υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας έχουν αναπτυχθεί μετά από εργαστηριακή επιλογή στελεχών τετράνυχου με spiroadiclofen (Van Pottelberge et al., 2008; 2009). Σε πρόσφατα πειράματα μικροσυστοιχειών, δύο διαφορετικών ανθεκτικών στελεχών, βρέθηκαν να υπερεκφράζονται σημαντικά η εστεράση TUCCE04, οι P450s CYP392E7 και CYP392E10, καθώς και από την ομάδα των αποπολυπρωτεϊνών, η AroD29. Από τις δύο P450s μόνο η CYP392E10 βρέθηκε ότι μπορούσε να μεταβολίσει το spiroadiclofen (Demaeght et al., 2013).

Δύο μεταλλαγές έχουν εντοπιστεί στους διαύλους γλυταμίου (glutamate-gated chloride channels) που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα στο abamectin (αναλύονται στο Κεφάλαιο 1). Η G314D στο πρώτο κανάλι εντοπίστηκε, για πρώτη φορά, σε ανθεκτικό στέλεχος από την Κορέα και βρέθηκε να ευθύνεται για μέτρια επίπεδα ανθεκτικότητας στο abamectin (17 φορές) (Kwon et al., 2010c). Η δεύτερη αντικατάσταση (G326E) στο τρίτο κανάλι, στην ίδια ακριβώς θέση με αυτή του πρώτου καναλιού, βρέθηκε επίσης να σχετίζεται με την ανθεκτικότητα στο abamectin, σε Ελληνικό ανθεκτικό στέλεχος τετράνυχου (Dermauw et al., 2012). Η μεταλλαγή αυτή βρέθηκε μαζί με την μεταλλαγή του πρώτου καναλιού, συνδυασμός που ευθύνεται για πολύ υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας (RR ~ 2000 φορές) (Dermauw et al., 2012). Οι δύο μεταλλαγές αυτές, έχουν χαρακτηριστεί γενετικά ότι ευθύνονται για την ανθεκτικότητα στο συγκεκριμένο σκεύασμα.

## 4.2 Μηχανισμοί ανθεκτικότητας του αλευρώδη

Η ανθεκτικότητα του αλευρώδη σε εύρος δραστικών ουσιών είναι επίσης συχνή, και το είδος συνεχίζει να προκαλεί σοβαρές ζημιές παγκοσμίως. Οι μηχανισμοί ανθεκτικότητας του αλευρώδη δεν έχουν μελετηθεί εκτενώς, ωστόσο έχουν προσδιοριστεί τόσο μεταλλαγές ανθεκτικότητας στόχου (ακετυλοχολινεστεράση και κανάλια μεταφοράς ιόντων νατρίου) όσο και γονίδια αποτοξικοποίησης (για τα νεονικοτινοειδή κυρίως) τα οποία έχουν σχετιστεί με τον φαινότυπο της ανθεκτικότητας (Πίν. 2).

Στον αλευρώδη η γνωστή και χαρακτηρισμένη μεταλλαγή στην ακετυλοχολινεστεράση (F331W) εντοπίστηκε πρώτη φορά σε ανθεκτικό σε OP στέλεχος B βιότυπου από το Ισραήλ (Alon et al., 2008). Έκτοτε, η μεταλλαγή αυτή έχει βρεθεί σε πολύ υψηλές συχνότητες σε πληθυσμούς B και Q βιότυπου από την Κύπρο και την Κρήτη αντίστοιχα (Vassiliou et al., 2011; Tsagkarakou et al., 2009). Οι Alon et al. (2008) εκτός από την μεταλλαγή στην θέση 331 βρήκαν ότι η καρβοξυλεστεράση COE1 υπερεκφραζόταν στο ανθεκτικό στέλεχος (4 φορές), ενώ η αυξημένη έκφραση δεν οφειλόταν στην γονιδιακή ενίσχυση.

Στα κανάλια μεταφοράς ιόντων νατρίου έχουν προσδιοριστεί τρεις μεταλλαγές (M918V, L925I, T929V) που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα στα πυρεθρινοειδή (Morin et al., 2002; Roditakis et al., 2006). Τα επίπεδα ανθεκτικότητας σε διαφορετικά σκευάσματα των πυρεθρινοειδών, που προσδίδει η κάθε μία από αυτές, ποικίλει. Οι μεταλλαγές αυτές έχει αποδειχθεί ότι προσδίδουν μειωμένη ευαισθησία των καναλιών στα πυρεθρινοειδή (συνοψίζονται από τους Rinkevich et al., 2013).

Η ανθεκτικότητα του αλευρώδη στα νεονικοτινοειδή εντομοκτόνα είναι ιδιαίτερα συχνό φαινόμενο. Οι Karunker et al. (2008) εντόπισαν την υπερέκφραση μιας συγκεκριμένης P450, της CYP6CM1, να σχετίζεται ισχυρά με την ανθεκτικότητα στο imidacloprid σε στελέχη αλευρώδη Q και B βιότυπου. Η συγκεκριμένη P450 αργότερα βρέθηκε ότι μπορούσε να μεταβολίσει το imidacloprid (Karunker et al., 2009). Πιο πρόσφατα βρέθηκε ότι η συγκεκριμένη πρωτεΐνη μπορούσε να μεταβολίσει και άλλα νεονικοτινοειδή (clothianidin και thiacloprid) αλλά όχι τα επίσης νεονικοτινοειδή acetamiprid και thiamethoxam (Roditakis et al., 2011). Σε πιο πρόσφατη εργασία από τους Nauen et al. (2013) βρέθηκε ότι η ίδια P450 μπορούσε να μεταβολίσει και το pymetrozine, σκευάσμα που ανήκει σε εντελώς διαφορετική χημική ομάδα. Επίσης εντοπίστηκε η CYP6CM1 και η CYP4C64 να σχετίζονται ισχυρά με την ανθεκτικότητα στο imidacloprid, σε αρκετούς πληθυσμούς *bemisia tabaci* από την Κίνα (Yang et al., 2013b)

Πίνακας 2: Γονίδια αποτοξικοποίησης και μεταλλαγές ανθεκτικότητας στόχου που έχουν σχετιστεί με την ανθεκτικότητα του αλευρώδη σε διαφορετικές ομάδες χημικών ουσιών.

<b>Χημική ομάδα</b>	<b>Ανθεκτικότητα</b>	<b>RR</b>	<b>Μεταβολική ανθεκτικότητα</b>	<b>Ανθεκτικότητα στόχου</b>	<b>Αναφορά</b>
<b>OPs</b>	<b>chlorpyrifos</b>	<b>&gt;437</b>	<b>COE1</b>	<b>F331W</b>	<b>Alon et al., 2008</b>
<b>Pyrethroids</b>				<b>M918V/L925I/T929V</b>	<b>Morin et al., 2002</b> <b>Roditakis et al., 2006</b>
<b>Neonicotinoids</b>	<b>imidacloprid</b>	<b>38</b>	<b>CYP6CM1</b>		<b>Karunker et al., 2008; 2009</b>
<b>Neonicotinoids</b>	<b>thiamethoxam</b>	<b>63</b>	<b>CYP6a8/CYP4v2/CYP6v5/ CYP6CM1vB/GST sigma</b>		<b>Xie et al., 2012</b> <b>Yang et al., 2013a</b>
<b>Neonicotinoids</b>	<b>imidacloprid</b>	<b>311</b>	<b>CYP6CM1/CYP4C64</b>		<b>Yang et al., 2013b</b>

Με έντονα γράμματα τα γονίδια αποτοξικοποίησης και οι μεταλλαγές στόχου αυτά που έχουν χαρακτηριστεί γενετικά ή λειτουργικά.

Το γονιδίωμα του αλευρώδη δεν είναι ακόμα γνωστό, ωστόσο τα τελευταία χρόνια έχουν γίνει αρκετές μελέτες ανάλυσης μεταγραφώματος (Wang et al., 2010; 2011; 2012) σε διαφορετικούς βιότυπους του *Bemisia tabaci*. Σε δύο μεταγενέστερες εργασίες (Xie et al., 2012; Yang et al., 2013a) εντοπίστηκαν εκτός της CYP6CM1 τρεις ακόμα P450s και μία GST οι οποίες βρέθηκαν να υπερεκφράζονται σε ανθεκτικό στο thiamethoxam στέλεχος αλευρώδη, B βιότυπου (Πίν. 2). Ωστόσο, ο ακριβής ρόλος τους στην ανθεκτικότητα του thiamethoxam και άλλων νεονικοτινοειδών, δεν έχει διερευνηθεί ακόμα.

## 5 Αντικείμενο της εργασίας

Ο σκοπός της παρούσας διατριβής είναι η διερεύνηση των μηχανισμών ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα και της διασποράς των υπεύθυνων γονιδίων σε πληθυσμούς των *Bemisia tabaci* (αλευρώδη) και *Tetranychus urticae* (Τετράνυχου). Η εργασία χωρίζεται σε τρία κεφάλαια:

- 1) Διερεύνηση των επιπέδων ανθεκτικότητας του τετράνυχου στα εντομοκτόνα και χαρακτηρισμός της ανθεκτικότητας στο abamectin.
- 2) Διερεύνηση των επιπέδων ανθεκτικότητας και χαρακτηρισμός της ανθεκτικότητας του αλευρώδη στα νεονικοτινοειδή.
- 3) Ανάλυση της συχνότητας και ροής γονιδίων ανθεκτικότητας στόχου σε πληθυσμούς τετράνυχου από διαφορετικές περιοχές.

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΤΕΤΡΑΝΥΧΟΥ ΣΤΑ ΕΝΤΟΜΟΚΤΟΝΑ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΤΟ ΑΒΑΜΕΣΤΙΝ**

Στο συγκεκριμένο κεφάλαιο: (α) μελετήθηκαν τα επίπεδα ανθεκτικότητας, σε εύρος δραστικών ουσιών, πληθυσμών τετράνυχου που συλλέχθηκαν από διαφορετικές περιοχές της Ελλάδας, (β) έγινε χαρακτηρισμός της ανθεκτικότητας στο abamectin ανθεκτικού στελέχους από τον Μαραθώνα, σε βιοχημικό και μοριακό επίπεδο, (γ) αναπτύχθηκε μεθοδολογία διατήρησης του τετράνυχου σε τεχνητή τροφή και εξετάστηκε η δυνατότητα μείωσης της έκφρασης γονιδίων στόχων με της τεχνική σίγησης RNAi και (δ) αναπτύχθηκαν και εφαρμόστηκαν απλά μοριακά διαγνωστικά (Taqman) για την παρακολούθηση της ανθεκτικότητας του τετράνυχου στον αγρό.

### **1.1 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

#### **1.1.1 Πληθυσμοί τετράνυχου**

Δέκα πληθυσμοί τετράνυχου συλλέχθηκαν το 2006-2007 από υπό-κάλυψη και υπαίθριες καλλιέργειες, η πλειονότητα των οποίων είχε ιστορικό επεμβάσεων και αναφορές αποτυχημένης καταπολέμησης. Πληροφορίες για τους πληθυσμούς δίνονται στον πίνακα 3. Δύο πληθυσμοί προήλθαν από θερμοκήπια: ο TU7 συλλέχθηκε από τριαντάφυλλα στην περιοχή του Μαραθώνα και ο TU11 από γαρύφαλλα στην Πελοπόννησο. Οι πληθυσμοί TU1, TU2, TU3, TU4, TU5 και TU9 προήλθαν από καλλιέργειες κηπευτικών, όπου κυρίως τα abamectin και bifenthrin χρησιμοποιούνταν εκτεταμένα για τον έλεγχο των πληθυσμών. Ο πληθυσμός TU6 συλλέχθηκε από οικογενειακό κήπο με κηπευτικά, απομονωμένο από εντατικές καλλιέργειες.

**Πίνακας 3: Πληθυσμοί, περιοχή – έτος συλλογής και φυτά ξενιστές των πληθυσμών τετράνυχου**

Πληθυσμός	Περιοχή συλλογής	Έτος συλλογής	Φυτό ξενιστής *
TU1	Τυμπάκι	2006	Πεπόνι - Θ
TU2	Τυμπάκι	2006	Τομάτα - Υ
TU3	Ιεράπετρα	2006	Αγγούρι, Φασόλι - Θ
TU4	Βιάννος	2006	Φασόλι - Υ
TU5	Ιεράπετρα	2006	Καρπούζι, Τομάτα - Θ
TU6	Ζάκρος	2006	Μελιτζάνα - Υ
TU7	Μαραθώνας	2007	Τριαντάφυλλο - Θ
TU9	Πύργος	2007	Αγγούρι - Θ
TU11	Πύργος	2007	Γαρύφαλλο - Θ
TU12	Αίγιο	2007	Λεμόνια - Υ
MAR_AB	Μαραθώνας	2010	Τριαντάφυλλο - Θ

\*Θ και Υ αποτελούν συντομογραφίες των θερμοκηπιακών και υπαίθριων καλλιεργειών αντίστοιχα.



Το καλοκαίρι του 2010 έγινε συλλογή του πληθυσμού MAR\_AB από τον Μαραθώνα, από το ίδιο θερμοκήπιο που είχε προέλθει και ο TU7, και διατηρήθηκε κάτω από εργαστηριακή με επιλογή σε abamectin (10mg/L). Η εκτροφή πραγματοποιήθηκε σε φυτά φασολιού, σε θερμοκρασία 25°C και φωτοπερίοδο 16:8 L/:D. Τρία εργαστηριακά στελέχη τετράνουχου επίσης χρησιμοποιήθηκαν: τα SAMB και GSS που είχαν συλλεχθεί από φυτά Solanum nigra (L.) στην Ολλανδία και άγνωστους ξενιστές από την Γερμανία αντίστοιχα. Και τα δύο στελέχη έχουν διατηρηθεί σε εργαστηριακές συνθήκες χωρίς χημική επέμβαση από το 1965. Τέλος, το στέλεχος LONDON συλλέχθηκε από τον Καναδά και χρησιμοποιήθηκε στην ανάλυση του γονιδιώματος του τετράνουχου (Grbic et al., 2011).

### 1.1.2 Βιοδοκιμές

Τα επίπεδα ανθεκτικότητας των φυσικών πληθυσμών και του εργαστηριακού στελέχους (MAR\_AB), σε σκευάσματα με διαφορετικό τρόπο δράσης, εξετάστηκαν με κλασικές μεθόδους βιοδοκιμών. Οι χημικές ομάδες των εντομοκτόνων / ακαρεοκτόνων καθώς και το στάδιο ανάπτυξης που εφαρμόστηκαν παρουσιάζονται στον πίνακα 4.

**Πίνακας 4: Δραστική ουσία, στάδιο ανάπτυξης που εφαρμόστηκε και χημική ομάδα των εντομοκτόνων/ακαρεοκτόνων που χρησιμοποιήθηκαν.**

<b>ΔΡΑΣΤΙΚΗ ΟΥΣΙΑ</b>	<b>ΣΤΑΔΙΟ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ</b>	<b>ΧΗΜΙΚΗ ΟΜΑΔΑ</b>
Pirimiphos - methyl	Ακμαίο	Οργανοφωσφορικό
Abamectin	Ακμαίο	Μακροκυκλική λακτόνη
Milbemectin	Ακμαίο	Μακροκυκλική λακτόνη
Bifenthrin	Ακμαίο	Πυρεθρινοειδές
Pyridaben	Ακμαίο	METI ακαρεοκτόνο
Fenazaquin	Ακμαίο	METI ακαρεοκτόνο
Fenbutatin oxide	Ακμαίο	Οργανοκασσιτερούχο
Propargite	Ακμαίο	Οργανοθειούχο
Bifenazate	Ακμαίο	Hydrazine derivative
Hexythiazox	Λάρβα	Παρεμποδιστής ανάπτυξης
Clofentezin	Ωό	Παρεμποδιστής ανάπτυξης
Spirodiclofen	Λάρβα	Κετοενόλη

Για τις βιοδοκιμές ακμαίων ατόμων, κομμένα φύλλα φασολιού τοποθετήθηκαν σε τρυβλία με βρεγμένο βαμβάκι και σε κάθε φύλλο μεταφέρθηκαν περίπου 25 ακμαία θηλυκά άτομα (Εικ. 3). Ακολούθησε ψεκασμός με κατάλληλες συγκεντρώσεις των σκευασμάτων. Όσον αφορά τις βιοδοκιμές σε ατελή στάδια σε κάθε φύλλο μεταφέρονται 10-15 ακμαία θηλυκά άτομα σε φύλλα φασολιού τα οποία μετά από 24 ώρες αφαιρούνται.

Για τις βιοδοκιμές σε ωά ο ψεκασμός πραγματοποιήθηκε ακριβώς μετά την αφαίρεση των θηλυκών ενώ στις λάρβες μόλις αρχίζουν και εκκολάπτονται τα ωά, μετά από 3-4 μέρες. Δοκιμάστηκαν 5 συγκεντρώσεις και τουλάχιστον 3 επαναλήψεις για κάθε συγκέντρωση. Ο ψεκασμός του μάρτυρα έγινε με απιονισμένο νερό. Ο ψεκασμός των φύλλων διενεργήθηκε στο potter tower με όγκο 1ml διαλύματος. Το potter tower είναι μια

συσκευή ψεκασμού ακριβείας που προκαλεί ομοιόμορφη κατανομή του ψεκαστικού υγρού, σε μορφή μικροσταγονιδίων.

Η καταμέτρηση της θνησιμότητας πραγματοποιείται μετά από 48 ώρες για τα ακμαιοκτόνα, ενώ για τις λάρβες και τα ωά μόλις εμφανιστούν ακμαία στον μάρτυρα. Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα POLO PC (LeOra Software, Berkeley, CA).



Εικόνα 3: Βιοδοκιμή τετράνουχου σε φύλλα φασολιού (Ρήγα, Master, 2011)

### 1.1.3 Βιοδοκιμές με συνεργιστές

Οι συνεργιστές είναι σχετικά μη τοξικές ουσίες που δρουν παρεμποδίζοντας ενζυμικά συστήματα αποτοξικοποίησης. Όταν συνδυαστούν με δραστικές ουσίες μπορούν να προκαλέσουν αυξημένη θνησιμότητα, στην περίπτωση που τα ένζυμα εμπλέκονται στον φαινότυπο της ανθεκτικότητας. Χρησιμοποιήθηκαν οι συνεργιστικές ουσίες S,S,S-trybutyl phosphorotrithioate (DEF), piperonyl butoxide (PBO) και diethyl maleate (DEM) οι οποίες παρεμποδίζουν τις εστεράσες, μικτής λειτουργίας P450s οξειδάσες και μεταφοράσες της γλουταθειόνης αντίστοιχα.

Η εύρεση των κατάλληλων συγκεντρώσεων των συνεργιστών, για τον ψεκασμό του ανθεκτικού (MAR\_AB) και του ευαίσθητου στελέχους (LONDON), επιλέχθηκαν μετά από προκαταρκτικά πειράματα βιοδοκιμών. Προσδιορίστηκε η μέγιστη συγκέντρωση που δεν προκαλεί θνησιμότητα στο ευαίσθητο στέλεχος, αλλά παρεμποδίζει τα ενζυμικά συστήματα βάσει in vivo δοκιμών. Η μεθοδολογία των βιοδοκιμών με συνεργιστές είναι η ίδια με αυτή των βιοδοκιμών στα ακμαιοκτόνα και γίνεται με ψεκασμό στο rotter tower. 4 ώρες μετά την εφαρμογή των συνεργιστών ακολουθεί η βιοδοκιμή με το εντομοκτόνο και μετά από 48 ώρες γίνεται η τελική μέτρηση θνησιμότητας.

#### 1.1.4 Γενετικές διασταυρώσεις

Ο τετράνυχος αναπαράγεται με αρρενοτόκο παρθενογένεση, δηλαδή τα απλοειδή αρσενικά προκύπτουν μετά από εκκόλαψη αγονιμοποιητών ωών. Για να υπολογιστεί η κυριαρχία του φαινοτύπου της ανθεκτικότητας καθώς και ο αριθμός των εμπλεκόμενων στην ανθεκτικότητα γονιδίων, πραγματοποιήθηκαν ανάδρομες διασταυρώσεις (reciprocal crosses) ευαίσθητων (LONDON) και ανθεκτικών ατόμων (MAR-AB) των γονέων για δύο διαδοχικές γενεές, για την παραγωγή υβριδικών F1 και F2 απογόνων (Σε συνεργασία με Μαρία Ρήγα, Ρήγα 2011). Μελετήθηκε η θνησιμότητα των F1 και F2 θηλυκών ατόμων με βιοδοκιμή σε κατάλληλες συγκεντρώσεις abamectin, όπως προαναφέρθηκε σε προηγούμενη ενότητα. Για τον έλεγχο της κυριαρχίας του φαινοτύπου της ανθεκτικότητας χρησιμοποιήθηκε ο τύπος του Stone (1968):  $D = 2X_2 - X_3 - X_1 / X_3 - X_1$ , όπου,  $X_2$  είναι ο λογάριθμος του LC50 της F1 γενιάς,  $X_3$  ο λογάριθμος του LC50 του ανθεκτικού γονέα και  $X_1$  ο λογάριθμος του LC50 του ευαίσθητου γονέα. Η μεταβλητή D υποδηλώνει την κυριαρχία και η τιμή της κυμαίνεται από -1 αν ο φαινότυπος είναι υπολειπόμενος και +1 αν είναι κυρίαρχος. Ο αριθμός των εμπλεκόμενων στην ανθεκτικότητα γονιδίων υπολογίστηκε με τον τύπο  $c = 0,5 W (\text{parent } 1) + 0,5 W (\text{parent } 2)$  (Georghiou, 1969), όπου c είναι η αναμενόμενη θνησιμότητα σε συγκεκριμένη δόση εντομοκτόνου και W η παρατηρούμενη θνησιμότητα του κάθε γονέα σε συγκεκριμένη δόση. Ανάλυση  $\chi^2$  (goodness - of - fit) χρησιμοποιήθηκε για να προσδιοριστεί πόσο καλά ταιριάζουν οι παρατηρούμενες τιμές θνησιμότητας της F2 γενιάς με τις αναμενόμενες.

#### 1.1.5 Λειτουργική ανάλυση του ρόλου των οξειδασών στην ανθεκτικότητα χρησιμοποιώντας τεχνική σίγησης RNA (RNAi)

Η τεχνολογία σίγησης RNAi (RNA interference) είναι ένας ισχυρός και ειδικός μηχανισμός αποσιώπησης της γονιδιακής έκφρασης, όπου κεντρικό ρόλο διαδραματίζουν μόρια RNA. Το έναυσμα της RNA σίγησης είναι δίκλινα μόρια RNA τα οποία μέσω της ενζυμικής δράσης τύπου III RNAσών (Dicers) μετατρέπονται σε μικρά δίκλινα RNA (siRNAs 21-24 βάσεων). Στη συνέχεια μια από τις δύο αλυσίδες των παραπάνω μορίων ενσωματώνεται στο πρωτεϊνικό σύμπλοκο (RISC) και το οδηγεί σε συμπληρωματικές αλληλουχίες στόχους, ώστε να επιτευχθεί η καταστολή τους. Η καταστολή επιτυγχάνεται με διάφορους τρόπους όπως: κοπή του mRNA στόχου, αναστολή της μετάφρασης του ή μεθυλίωση και μεταγραφική απενεργοποίηση του γονιδίου που παράγει τον στόχο (Carthew and Sontheimer, 2009). Ο μηχανισμός της σίγησης απαντάται στο σύνολο σχεδόν

των ευκαρυωτικών οργανισμών και οι πρωτεΐνες που είναι απαραίτητες για τη δράση του εμφανίζουν σημαντικά επίπεδα συντήρησης.

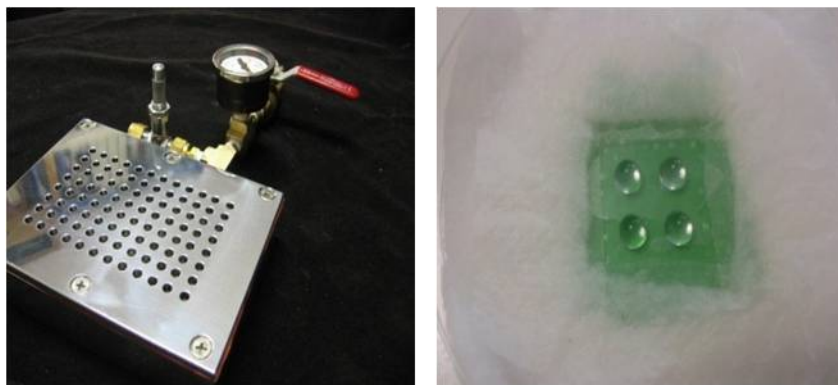
Στην ενότητα που ακολουθεί αναπτύχθηκε μεθοδολογία διατήρησης του τετράνυχου τρεφόμενου αποκλειστικά με τεχνητή τροφή, με απώτερο σκοπό την λειτουργική ανάλυση του ρόλου των οξειδασών στην ανθεκτικότητα με την τεχνική RNAi. Έγινε προσπάθεια σίγησης του γονιδίου της CPR, η οποία ελέγχει το μεταβολικό μονοπάτι των μικροσωμικών P450s. Ως θετικός μάρτυρας αξιολόγησης της αποτελεσματικότητας της σίγησης επιλέχθηκε το γονίδιο της VATP-ase, η οποία εκφράζεται στο στομάχι, και έχει φανεί από εργασίες ότι αποτελεί εύκολο στόχο σίγησης μέσω τροφής (Yu et al., 2012). Το γονίδιο της GFP τέλος, χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας χορήγησης δίκλωνου RNA.

#### 1.1.5.1 Ανάπτυξη μεθοδολογίας χορήγησης τροφής

Αρχικά προσπαθήσαμε να επιλέξουμε την κατάλληλη τεχνητή τροφή μέσω της οποίας θα παρέχουμε το dsRNA, με υψηλό ποσοστό επιβίωσης (>80%) για τουλάχιστον 72 ώρες χορήγησης. Το διάλυμα της δίαιτας ενσωματώθηκε σε μικροσφαιρίδια parafilm, χρησιμοποιώντας κατάλληλα σχεδιασμένη συσκευή, από τα οποία μπορούν να τραφούν μυζητικά έντομα. Τα μικροσφαιρίδια ακολούθως τοποθετήθηκαν σε τρυβλία petri (Εικ. 4). Δοκιμάστηκαν δύο διαφορετικές τεχνητές τροφές από την βιβλιογραφία με τροποποιήσεις. Η πρώτη είχε σχεδιαστεί για τον τετράνυχο (Van Der Geest et al., 1983) και η δεύτερη για την αφίδα *Acyrtosiphon pisum* (Febvay et al., 1987). Δοκιμάσαμε την τεχνητή τροφή της αφίδας (AD) σε δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις με προσθήκη και μη αντιβιοτικών ενώ του τετράνυχου (TU) με και χωρίς προσθήκη φύτρου σιταριού. Για κάθε επέμβαση πραγματοποιήθηκαν τέσσερις επαναλήψεις και σε κάθε τρυβλίο δημιουργήθηκαν τέσσερα μικροσφαιρίδια με parafilm, στα οποία μεταφέρθηκαν περίπου 40 ακμαία θηλυκά άτομα για να τραφούν. Η καταμέτρηση της θνησιμότητας πραγματοποιήθηκε κάθε 12 ώρες για διάστημα 72 ωρών. Τα τρυβλία διατηρήθηκαν σε θάλαμο με ελεγχόμενες συνθήκες θερμοκρασίας, υγρασίας και φωτοπεριόδου καθ' όλη την διάρκεια του πειράματος (25°C, 70% και 16/8 L/D αντίστοιχα).

Αφού επιλέξαμε την κατάλληλη για τον τετράνυχο τεχνητή τροφή θέλαμε να υπολογίσουμε την ποσότητα της τροφής που καταναλώθηκε ανά άτομο. Για τον σκοπό αυτό ενσωματώθηκε στην δίαιτα χρωστική τροφής (eriochlorogenic acid) και η απορρόφηση της χρωστικής μετρήθηκε σε φασματοφωτόμετρο (Edgcomb et al., 1994). Χρησιμοποιήθηκαν περίπου 100 ακμαία θηλυκά άτομα και αφέθηκαν να τραφούν για 4-8-16-24 και 36 ώρες αντίστοιχα, σε τρυβλία με 12 μικροσφαιρίδια τεχνητής τροφής με προσθήκη αντιβιοτικών

και 0.25% erioglaucine. Οι πρώτες 16 ώρες ήταν παρουσία φωτός, ακολούθησαν 8 σκότους και τέλος 12 ώρες φωτός. Πραγματοποιήθηκαν 3 βιολογικές επαναλήψεις, ενώ στον μάρτυρα χρησιμοποιήθηκε τροφή χωρίς προσθήκη χρωστικής. 70 ακμαία θηλυκά άτομα ομογενοποιήθηκαν σε 100μl sodium phosphate buffer 0.1M (pH 7.2) και ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 12000g για 2 λεπτά. Συλλέχθηκε το υπερκείμενο διάλυμα και επαναφυγοκεντρήθηκε για 2 ακόμα λεπτά. 90μl από το υπερκείμενο μεταφέρθηκαν σε 96 well ELISA microplate και η απορρόφηση μετρήθηκε στα 625nm.



**Εικόνα 4: Συσκευή παρασκευής μικροσφαιριδίων (αριστερά) και τρόπος χορήγησης (δεξιά).**

Τέλος, εξετάσαμε της κατανάλωση της τροφής σε διαφορετικά στάδια ανάπτυξης των τετρανύχων (λάρβα-πρωτονύμφη-δευτερονύμφη-ακμαίο) σε μικροσφαιρίδια με τεχνητή τροφή και προσθήκη της χρωστικής erioglaucine, προκειμένου να αποφασιστεί το στάδιο ανάπτυξης που θα χρησιμοποιηθεί για τα περαιτέρω πειράματα. Μεταφέρθηκαν 40 άτομα και κάθε 10 λεπτά καταμετρούνταν τα άτομα που είχαν τραφεί. Για κάθε επέμβαση πραγματοποιήθηκαν 4 βιολογικές επαναλήψεις.

#### **1.1.5.2 Εφαρμογή RNAi στον τετράνυχο**

Μετά την ανάπτυξη της τεχνικής χορήγησης τροφής, έγιναν προσαρμογές, για χορήγηση dsRNA και siRNA, με σκοπό την σίγηση των γονιδίων στόχων. Ως γονίδια στόχοι επιλέχθηκαν η CPR και η VATP-ase, ενώ η GFP χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο μάρτυρας χορήγησης δίκλωνου RNA. Η CPR (cytochrome P450 reductase) δρα ως δότης ηλεκτρονίων σε συστήματα οξυγενασών, έχει καταλυτικό ρόλο στο σύμπλοκο των P450s, ενώ η VATP-ase είναι μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη που δρα ως αντλία πρωτονίων στην σταθεροποίηση της τιμής του pH εντός του πεπτικού συστήματος πολλών εντόμων. Η τελευταία πρωτεΐνη επιλέχθηκε ως γονίδιο έλεγχου της αποτελεσματικότητας της μεθόδου καθώς εκφράζεται στο στομάχι των εντόμων, άρα αν επιτελεστεί η σίγηση θα υπάρχει επίδραση στον φαινότυπο.

Πραγματοποιήθηκε *in vitro* σύνθεση και παραγωγή dsRNA. Αρχικά έγινε εξαγωγή γενωμικού DNA από 400 ακμαία θηλυκά άτομα όπως περιγράφεται από τους Van Leewen et al. (2008). Στην συνέχεια ακολούθησε ενίσχυση ειδικά επιλεγμένου, μη συντηρημένου τμήματος των γονιδίων στόχων (περίπου 500 βάσεων), με εξειδικευμένους εκκινητές που φέρουν T7 promoter αλληλουχία. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε dsRNA για το γονίδιο της πρωτεΐνης GFP, μεγέθους περίπου 600 βάσεων. Ως μήτρα για την ενίσχυση του τμήματος αυτού χρησιμοποιήθηκε φορέας κλωνοποίησης που έφερε το γονίδιο της GFP. Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν εμφανίζονται στον πίνακα 5. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε 50μl και περιλάμβαναν 100 - 200 ng DNA, 0.2μM primers, 0.2 mM dNTP's, 5 μl 10 X Buffer και 1 U Kapa Taq DNA polymerase (KAPABIOSYSTEMS). Οι συνθήκες της αντίδρασης ήταν στους 95 °C για 2 λεπτά, στη συνέχεια για 35 κύκλους: 95 °C για 30 δευτερόλεπτα, 57 °C για 30 δευτερόλεπτα, 72 °C για 1 λεπτό και τέλος 72 °C για 2 λεπτά. Ακολούθησε καθαρισμός των προϊόντων των αντιδράσεων, *in vitro* αντιγραφή (MEGAScript RNAi kit, Ambion) και παραγωγή RNA που μετατρέπεται σε dsRNA. Η παραγωγή siRNA προέκυψε μετά από *in vitro* πέψη του δίκλωνο RNA με το ένζυμο Dicer (BLOCK-IT Dicer RNAi Kit - Invitrogen) και ακολούθησε καθαρισμός με το RNAi purification kit (Invitrogen). Τα προϊόντα της πέψης (21 - 23 βάσεις) ελέγχθηκαν σε 4% πήκτωμα αγαρόζης.

**Πίνακας 5: Αλληλουχία εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή dsRNA.**

Εκκινητής	Αλληλουχία 5'-3'
T7 GFP F	TAATACGACTCACTATAGGGGAGAACGTAACGGCCACAAGTTC
T7 GFP R	TAATACGACTCACTATAGGGGAGACTTGTACAGCTCGTCCATGCC
CPR_Ri_One_F	TAATACGACTCACTATAGGGGAGACCCATGTCTTGCAGCTATC
CPR_Ri_One_R	TAATACGACTCACTATAGGGGAGACGGAGCTAAACCAGTCCAG
VATPase_Ri_One_F	TAATACGACTCACTATAGGGGAGATGACGCTTTGTTTCTTGTG
VATPase_Ri_One_R	TAATACGACTCACTATAGGGGAGATACGGGATCGGAGAAGTCAC

Προκειμένου να ενσωματωθούν τα dsRNA/siRNA στην τροφή έγινε κατακρήμνιση με ammonium acetate σύμφωνα με το πρωτόκολλο Megaclear Kit (Ambion) και επαναδιάλυσή τους στην τεχνητή τροφή που προαναφέρθηκε. Σχηματίστηκαν μικροσφαιρίδια με δίαιτα που περιείχαν 50μg dsRNA και 12μg siRNA αντίστοιχα. Ως γονίδια στόχοι όπως προαναφέρθηκε επιλέχθηκαν τα CPR και VATP, ενώ στον μάρτυρα χρησιμοποιήθηκαν μικροσφαιρίδια με το γονίδιο GFP. Ακμαία θηλυκά άτομα μεταφέρθηκαν στα μικροσφαιρίδια και αφέθηκαν να τραφούν για τουλάχιστον 72 ώρες.

Η σίγηση ελέγχθηκε με κατάλληλα σχεδιασμένο qPCR. Η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής: Εξαγωγή ολικού RNA από 40 ακμαία θηλυκά άτομα με το κίτ

RNeasy Mini Kit (QIAGEN). Το παραχθέν RNA επεξεργάστηκε με TURBO DNase (Ambion) και 1 μg από το ολικό RNA χρησιμοποιήθηκε για σύνθεση cDNA με Superscript III (Invitrogen) και oligo-dT<sub>20</sub> primer (Invitrogen) για 60 min στους 50°C. Τα παραχθέντα cDNAs διαλύθηκαν 5 φορές σε RNase-free νερό για τις αντιδράσεις της real time PCR. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε τελικό όγκο 25μl χρησιμοποιώντας Fast Start SYBR Green Master (Promega), 0.3μM από κάθε εκκινητή και 2μl από (5x) αραιωμένο cDNA αντίστοιχα. Οι συνθήκες της PCR ήταν ο πρώτος κύκλος στους 95°C για 2 λεπτά και ακολούθησαν 34 κύκλοι: 95°C για 15 s, 57°C για 30 s και 60°C για 30 s. Η ακτίνη και η ριβοσομική πρωτεΐνη (RP49) χρησιμοποιήθηκαν ως γονίδια αναφοράς. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο ΔΔCt efficiency (Pfaffl, Horgan et al., 2002).

### **1.1.6 Γονοτύπηση καναλιών χλωρίου**

Μελετήθηκε η συμμετοχή της ανθεκτικότητας στόχου στον φαινότυπο με γονοτύπηση των καναλιών χλωρίου 1 και 3. Χρησιμοποιήθηκαν άτομα της δεύτερης θυγατρικής γενιάς και από τις δύο διασταυρώσεις, ((SS♀ x R♂) x S♂) και ((RR♀ x S♂) x R♂), που περιγράφηκαν σε προηγούμενη ενότητα, πριν και μετά την επιλογή με συγκέντρωση 10 και 100mg/L abamectin αντίστοιχα.

Ακολούθησε εξαγωγή DNA σύμφωνα με το πρωτόκολλο εξαγωγής CTAB (Navajas et al., 1999). Περιληπτικά, μεμονωμένα άτομα τετράνυχου ομογενοποιήθηκαν στους 65°C σε 200 μl ρυθμιστικού διαλύματος CTAB (5% CTAB, 1,4 M NaCl, 0,5 M EDTA pH = 8, 1M, Tris pH = 8, 0,2 % β-mercaptethanol) και επώστηκαν στους 65 °C για 5 - 30 λεπτά. Ακολούθησε προσθήκη ίσου όγκου χλωροφόρμιο - ισοαμυλική αλκοόλη (24:1), κατακρήμνιση του DNA με προσθήκη ίσου όγκου ισοπροπανόλης και επώαση για 1 ώρα στους -20 °C. Τέλος έγινε καθαρισμός με 70% αιθανόλη και επαναδιάλυση του DNA σε 20μl ddH<sub>2</sub>O.

Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε PCR για την ανάκτηση και ενίσχυση τμημάτων του γονιδίου στόχου των 2 καναλιών χλωρίου. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε όγκο 50μl και περιλάμβανε 4μl DNA, 0.4μM primers, 0.2mM dNTP's, 5 μl 10 X Buffer και 1 U Kapa Taq DNA polymerase (KAPABIOSYSTEMS). Οι συνθήκες της αντίδρασης ήταν οι ακόλουθες: 95°C για 2 λεπτά ακολουθούμενο από 35 κύκλους στους 95°C για 30 δευτερόλεπτα, 58°C για 30 δευτερόλεπτα, 72°C για 30 δευτερόλεπτα και τελική επιμήκυνση στους 72°C για 2 λεπτά. Ακολούθησε καθαρισμός των προϊόντων της αντίδρασης με το kit NucleoSpin Extract II (Macherey - Nagel) και τα δείγματα στάλθηκαν για αλληλούχιση με τους εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των γονιδίων (Πίν. 6). Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με το λογισμικό πρόγραμμα BioEdit.

**Πίνακας 6: Αλληλουχίες εκκινητών για την γονοτύπηση των καναλιών χλωρίου**

Εκκινητής	Αλληλουχία 5' - 3'
GluCl1_F1	TTGGATTGACCCTAACTCAGCA
GluCl1_R1	TTGCACCAACAATTCCTTGA
GluCl3_F1	CCGGGTCAAGTCTTGGTGTTA
GluCl3_R1	CACCACCAAGAACCTGTTGA

### 1.1.7 Μοριακά διαγνωστικά Taqman

Σχεδιάστηκαν απλά μοριακά διαγνωστικά Taqman για την ανίχνευση των δύο προαναφερθέντων μεταλλαγών ανθεκτικότητας στα κανάλια χλωρίου. Για κάθε μεταλλαγή σχεδιάστηκε ένα ζεύγος εκκινητών και δύο probes με την χρήση του Custom TaqMan Assay Design Tool (Applied Biosystems) (Πίν. 7). Οι εκκινητές G314D\_F + G314D\_R και G326E\_F + G326E\_R χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση τμημάτων των γονιδίων που περιείχαν τις μεταλλαγές ανθεκτικότητας G314D και G326E αντίστοιχα (Πίν. 7). Για όλα τα διαγνωστικά ο ένας probe είναι σημασμένος με χρωστική VIC που υβριδίζει αποκλειστικά με τοευαίσθητο αλληλόμορφο, ενώ ο δεύτερος με την χρωστική FAM που υβριδίζει με το ανθεκτικό αλληλόμορφο. Οι probes G314D\_VIC + G314D\_FAM και G326E\_VIC + G326E\_FAM χρησιμοποιήθηκαν για τις μεταλλαγές G314D και G326E αντίστοιχα (Πίν. 7).

**Πίνακας 7: Αλληλουχίες εκκινητών και probes των διαγνωστικών Taqman για τις δύο μεταλλαγές στα κανάλια χλωρίου**

Εκκινητές/probes	Αλληλουχία 5'-3'
G314D_F	CACGTCAAATATCAGGAATCAATGCAT
G314D_R	GGCAAATTCATGAGAGCACCAAAA
G314D_VIC	TTGACATTTGGACAGATTG
G314D_FAM	TGACATTTGGACAGGTTG
G326E_F	TCCACCGGTCAGTTACATTAAGC
G326E_R	CAAACCTCTAGGAGGGCACCAAAA
G326E_VIC	TTGGACCGAAGTCTG
G326E_FAM	TTTGGACCGAGTCTG

Οι PCR αντιδράσεις (15μl) περιείχαν 2μl DNA, 7.5μl TaqMan Universal PCR Master Mix, 800 nM εκκινητές και 200 nM probes. Οι συνθήκες της αντίδρασης ήταν οι ακόλουθες: 95°C για 2 λεπτά ακολουθούμενο για 40 κύκλους από 92°C για 15 δευτερόλεπτα, 60°C για 1 λεπτό. Η αύξηση του φθορισμού των 2 probes παρακολουθήθηκε σε πραγματικό χρόνο σε κάθε κύκλο για την VIC (530 nm excitation και 555 nm emission) και την FAM χρωστική (470 nm excitation και 510 nm emission) στην real time PCR. DNA από άτομα εργαστηριακών στελεχών τετρανύχων, με γνωστούς γονότυπους, χρησιμοποιήθηκαν για την αξιολόγηση και βελτιστοποίηση της μεθόδου, πριν την εφαρμογή της στα υπό εξέταση δείγματα. Συνολικά



ελέχθησαν 66 άτομα από 6 πληθυσμούς που συλλέχθηκαν από την Κρήτη, την Αττική και την Πελοπόννησο (Πίν. 8).

**Πίνακας 8: Πληθυσμοί, περιοχή – έτος συλλογής και φυτά ξενιστές των πληθυσμών τετράνυχου.**

Πληθυσμός	Περιοχή Συλλογής	Φυτό Ξενιστής	Έτος συλλογής
TU82	Μαραθώνας, Αττική	Τριαντάφυλλο - Θ	2010
TU106	Φοινικιά, Κρήτη	Τριαντάφυλλο - Θ	2010
TU115	Σίσι, Κρήτη	Τριαντάφυλλο - Θ	2011
TU116	Τερψιθέα, Πελοπόννησος	Φασόλι - Υ	2011
TU122	Ναύπλιο, Πελοπόννησος	Κολοκύθι - Υ	2011
TU125	Ασήμι, Κρήτη	Διάφορα - Υ	2011

\*Θ και Υ αποτελούν συντομογραφίες των θερμοκηπιακών και υπαίθριων καλλιεργειών αντίστοιχα.

Σε κάθε διαγνωστικό εκτός από τα άγνωστα δείγματα συμπεριλήφθησαν παράλληλα DNA γνωστών γονοτύπων (ομοζυγωτά ευαίσθητα, ομοζυγωτά ανθεκτικά και ετερόζυγα) και έγινε καταγραφή των ανθεκτικών αλληλομόρφων.

## 1.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 1.2.1 Επίπεδα ανθεκτικότητας Ελληνικών πληθυσμών τετράνυχου

Τα αποτελέσματα των τοξικολογικών βιοδοκιμών 10 πληθυσμών τετράνυχου από διαφορετικές περιοχές της Ελλάδας παρουσιάζονται στον πίνακα 9.

**Πίνακας 9: Αποτελέσματα θνησιμότητας πληθυσμών τετράνυχου σε 7 δραστικές ουσίες.**

Πληθυσμός	n	LC <sub>50</sub> (95% CI) ‡	Slope ± SE*	RR ¶
<b>Pirimiphos - methyl</b>				
SAMB	254	18 (16 - 21)	4.50 ± 0.14	-
GSS	577	332 (166 - 665)	6.56 ± 6.85	19
TU6	346	158 (22 - 1150)	2.54 ± 2.58	8.9
TU1	294	248 (180 - 342)	1.81 ± 0.36	14
TU2	347	225 (27 - 1837)	2.25 ± 2.02	12
TU5	525	204 (115 - 364)	2.59 ± 0.65	11
TU12	207	77 (55 - 105)	2.47 ± 0.40	4.3
TU3	388	130 (104 - 169)	2.62 ± 0.39	7.3
TU4	405	98 (44 - 218)	3.64 ± 2.37	5.5
TU9	486	248 (105 - 605)	0.82 ± 0.19	14
TU11	658	417 (157 - 1104)	1.56 ± 0.59	23
TU7	395	1332 (908 - 1960)	4.31 ± 1.47	74
<b>Bifenthrin</b>				
SAMB	317	8.9 (6.4 - 12)	1.88 ± 0.29	-
GSS	257	13 (4.4 - 41)	1.79 ± 0.92	1.5
TU6	327	8.5 (6.8 - 11)	2.49 ± 0.30	0.9
TU1	439	115 (84 - 171)	1.26 ± 0.15	13
TU2	308	42 (19 - 92)	1.16 ± 0.24	4.7
TU5	372	45 (36 - 58)	2.11 ± 0.21	5
TU12	404	85 (49 - 149)	2.63 ± 0.79	9.5
TU3	477	741 (349 - 3183)	0.91 ± 0.17	83
TU4	506	3136 (1307 - 19383)	0.76 ± 0.15	351
TU9	406	112 (76 - 165)	3.16 ± 0.88	12
TU11	373	168 (130 - 220)	2.60 ± 0.37	19

TU7	455	75093 (15144- 390580)	2.78 ± 2.18	8413
Pyridaben				
SAMB	659	6.4 (4.9 - 8.3)	2.57 ± 0.46	-
GSS	376	4.4 (3.7 - 5.3)	3.17 ± 0.32	0.7
TU6	502	16 (12 - 21)	2.10 ± 0.24	2.6
TU1	272	29 (15 - 44)	1.26 ± 0.21	4.5
TU2	312	71 (38 - 132)	1.52 ± 0.37	11
TU5	339	38 (28 - 48)	1.86 ± 0.20	5.9
TU12	217	62 (48 - 78)	2.65 ± 0.37	9.8
TU3	387	117 (63 - 214)	3.53 ± 1.64	18
TU4	388	26 (16 - 40)	2.09 ± 0.45	4
TU9	370	166 (129 - 217)	2.50 ± 0.35	26
TU11	829	248 (193 - 321)	1.05 ± 0.08	39
TU7	395	221 (177 - 269)	2.50 ± 0.27	34
Fenazaquin				
SAMB	612	13 (11 - 15)	4.15 ± 0.38	-
GSS	281	17 (14 - 21)	4.44 ± 0.65	1.3
TU6	481	29 (15 - 59)	2.13 ± 0.57	2.2
TU1	581	179 (146 - 219)	1.94 ± 0.16	13
TU2	471	97 (30 - 307)	1.02 ± 0.27	7.3
TU5	299	49 (21 - 114)	2.30 ± 0.89	3.7
TU12	418	215 (143 - 322)	3.05 ± 0.86	15
TU3	429	77 (57 - 105)	1.81 ± 0.18	5.7
TU4	366	55 (41 - 74)	1.84 ± 0.20	4.1
TU9	508	316 (265 - 374)	2.55 ± 0.25	23
TU11	328	562 (145 - 2208)	1.39 ± 0.70	42
TU7	478	447 (324 - 619)	1.96 ± 0.28	33
Fenbutatin oxide				
SAMB	546	24 (1 - 546)	2.21 ± 1.79	-
GSS	346	18 (14-22)	2.72 ± 0.33	0.7
TU6	564	46 (25 - 84)	2.78 ± 0.99	1.9
TU1	351	131 (91 - 183)	1.34 ± 0.18	5.5
TU2	262	113 (74 - 182)	1.06 ± 0.18	4.7
TU5	390	158 (125 - 196)	2.21 ± 0.25	6.6
TU12	464	61 (47 - 81)	1.78 ± 0.20	2.6
TU3	318	27 (16 - 44)	3.97 ± 1.78	1.1
TU4	419	134 (96 - 188)	2.67 ± 0.55	5.6
TU9	554	47 (23 - 97)	1.14 ± 0.25	2
TU11	566	3511 (2118 - 7327)	0.80 ± 0.13	146
TU7	570	35784 (25333 - 54932)	0.96 ± 0.11	1494
Abamectin				
SAMB	318	0.22 (0.11 - 0.43)	4.2 ± 3.61	-
GSS	542	0.19 (0.11 - 0.32)	3.73 ± 1.48	0.8
TU6	419	0.28 (0.02 - 3.53)	3.68 ± 8.13	1.3
TU1	461	0.14 (0.09 - 0.23)	2.68 ± 0.74	0.6
TU2	460	0.25 (0.22 - 0.28)	4.08 ± 0.45	1.1
TU5	498	0.39 (0.24 - 0.64)	4.01 ± 1.33	1.8
TU12	639	0.52 (0.21 - 1.3)	2.16 ± 0.88	2.4
TU3	375	0.52 (0.43 - 0.64)	2.32 ± 0.29	2.4
TU4	499	0.36 (0.33 - 0.42)	5.34 ± 0.68	1.6
TU9	678	0.20 (0.11 - 0.37)	1.40 ± 0.36	0.9
TU11	558	0.21 (0.18 - 0.24)	4.22 ± 0.41	0.9
TU7	394	94 (66 - 122)	2.19 ± 0.31	434
Spirodiclofen				
SAMB	2096	2.2 (1.8 - 2.7)	3.02 ± 0.37	-
GSS	1658	1.4 (0.6 - 2.9)	4.26 ± 3.41	0.6
TU6	1198	0.5 (0.3 - 1.2)	2.68 ± 0.99	0.2
TU1	777	2.7 (1.3 - 5.7)	1.99 ± 0.82	1.2
TU2	1127	3.2 (2.4 - 4.3)	2.16 ± 0.34	1.4
TU5	676	2.5 (1.6 - 3.9)	6.17 ± 6.37	1.1
TU12	799	5.5 (4.7 - 6.3)	2.58 ± 0.20	2.5

TU3	643	1.6 (1.4 - 1.8)	3.33 ± 0.29	0.7
TU4	1171	2.5 (1.8 – 3.4)	3.25 ± 0.84	1.1
TU9	644	5 (2.6 – 9.7)	1.75 ± 0.54	2.2
TU11	1564	8.7 (7.7 – 10)	2.27 ± 0.14	3.9
TU7	931	27(19 – 39)	3.23 ± 0.65	12
ALL-14§	2493	9.5 (7 - 12.9)	3.11 ± 0.57	4.3

†αριθμός ατόμων τετράνυχων που εξετάστηκαν

‡LC, lethal concentration (mg / L): συγκέντρωση που θανατώνει το 50% του πληθυσμού

¶RR, resistance ratio: συντελεστής ανθεκτικότητας = LC<sub>50</sub> πληθυσμού / LC<sub>50</sub> SAMB

\*Slope και SE: κλίση ευθείας και απόκλιση

Μόνο ένας πληθυσμός (TU6) εμφάνισε παρόμοια επίπεδα ευαισθησίας με τα δύο εργαστηριακά στελέχη αναφοράς SAMB και GSS. Ο Πληθυσμός αυτός προήλθε από μικρή βιολογική οικογενειακή καλλιέργεια κηπευτικών της Ανατολικής Κρήτης, απομονωμένη από περιοχές εντατικής καλλιέργειας. Στους πληθυσμούς TU1, TU2, TU5 και TU12 εντοπίστηκαν σχετικά χαμηλά επίπεδα ανθεκτικότητας (RR < 15), σε όλα τα σκευάσματα που δοκιμάστηκαν. Οι πληθυσμοί TU3, TU4 και TU9 εμφάνισαν υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας σε τουλάχιστον ένα σκευάσμα: ο TU9 26-φορές ανθεκτικότητα στο pyridaben, ενώ οι TU3 και TU4 83- και 351- φορές ανθεκτικότητα στο bifenthrin αντίστοιχα. Τα υψηλότερα επίπεδα ανθεκτικότητας εντοπίστηκαν στους πληθυσμούς TU11 και TU7 που συλλέχθηκαν από θερμοκήπια καλλωπιστικών, με υψηλό ιστορικό επεμβάσεων με εντομοκτόνα. Ο TU11 είχε υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας στα pirimiphos-methyl (RR = 23), fenbutatin oxide (RR = 146) και τα δύο METI ακαρεοκτόνα (RR = 42 για το fenazaquin και RR = 39 για το pyridaben). Ο TU7 εμφάνισε υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας σε 5 χημικές ομάδες και τα υψηλότερα επίπεδα ανθεκτικότητας στα bifenthrin (RR = 8413) και fenbutatin oxide (RR = 1494). Επιπροσθέτως, ήταν ο μόνος πληθυσμός που εμφάνισε υψηλή ανθεκτικότητα στο abamectin (RR = 443) και μειωμένη ευαισθησία στο spiroadiclofen (RR = 12). Όλοι οι υπόλοιποι πληθυσμοί εντοπίστηκαν ευαίσθητοι στα δύο αυτά σκευάσματα.

Όπως αναφέρθηκε ο πληθυσμός TU7 από τον Μαραθώνα εμφάνισε τα υψηλότερα επίπεδα ανθεκτικότητας στα περισσότερα από τα σκευάσματα που δοκιμάστηκαν. Για τον σκοπό αυτό, το 2010 συλλέχθηκε πληθυσμός από το ίδιο θερμοκήπιο προκειμένου να μελετηθεί η ανθεκτικότητα του σε μεγαλύτερο εύρος δραστικών ουσιών (Πίν. 10). Σύμφωνα με τον παραγωγό, υπήρχε αδυναμία ελέγχου του πληθυσμού παρότι εφαρμόζονταν υψηλές συγκεντρώσεις abamectin κατά την διάρκεια όλης της καλλιεργητικής περιόδου.

**Πίνακας 10: Αποτελέσματα θνησιμότητας του ανθεκτικού (MAR\_AB) και ευαίσθητου στελέχους αναφοράς (LONDON) σε εύρος σκευασμάτων.**

ΣΤΕΛΕΧΟΣ	n	LC <sub>50</sub> (95% CI)	Slope ± SE	RR (95% CI)
<b>Abamectin</b>				
LONDON	600	0.23 (0.19-0.25)	3.71 ± 0.37	-
MAR_AB	593	445.6 (402-483)	4.44 ± 0.53	1980 (1719-2281)
<b>Milbemectin</b>				
LONDON	702	1.97 (1.84-2.10)	4.98 ± 0.49	-
MAR_AB	431	67 (48-81)	3.92 ± 0.59	34 (29-40)
<b>Bifenthrin</b>				
LONDON	651	8.37 (7.20-9.76)	2.13 ± 0.19	-
MAR_AB	692	3571 (2861-4331)	2.17 ± 0.29	426 (331-450)
<b>Pyridaben</b>				
LONDON	528	9.22 (7.28-12.06)	1.32 ± 0.15	-
MAR_AB	571	2955 (1662-4062)	1.85 ± 0.36	320 (218-471)
<b>Fenbutatin oxide</b>				
LONDON	472	58 (40-74)	5.49 ± 0.92	-
MAR_AB		>100000		>1700
<b>Propargite</b>				
LONDON	666	61 (58-65)	6.39 ± 0.60	-
MAR_AB	438	333 (240-441)	1.35 ± 0.13	5.4 (4.0-7.4)
<b>Bifenazate</b>				
LONDON	577	1.70 (1.47-1.91)	5.25 ± 0.71	-
MAR_AB	380	3.94 (3.60-4.27)	6.03 ± 0.67	2.3 (2.1-2.6)
<b>Hexythiazox</b>				
LONDON	1314	6.66 (4.61-9.05)	1.13 ± 0.08	-
MAR_AB		>10000		>1500
<b>Clofentezin</b>				
LONDON	1274	9.63 (7.30-12.92)	1.34 ± 0.08	-
MAR_AB		>10000		>1000
<b>Spirodiclofen</b>				
LONDON	574	2.24 (1.80-2.73)	2.79 ± 0.28	-
MAR_AB	628	18 (14-24)	3.32 ± 0.27	8.0 (6.5-9.8)

Ο ανθεκτικός πληθυσμός από τον Μαραθώνα εμφάνισε πολύ υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας στα abamectin (RR = 1980), fenbutatin oxide (RR > 1700), hexythiazox (RR > 1500), clofentezin (RR > 100), bifenthrin (RR = 426) και pyridaben (RR = 320), μέτρια στο milbemectin (RR = 34) και χαμηλά στα spirodiclofen (RR = 8), propargite (RR = 5.4) και bifenazate (RR = 2.3), σε σχέση με το ευαίσθητο εργαστηριακό στέλεχος αναφοράς. Εν συνεχεία εστίασαμε στον χαρακτηρισμό των μηχανισμών ανθεκτικότητας που σχετίζονται με το abamectin λόγω των εξαιρετικά υψηλών επιπέδων ανθεκτικότητας που παρατηρήθηκαν.

## 1.2.2 Χαρακτηρισμός της ανθεκτικότητας στο abamectin

### 1.2.2.1 Βιοδοκιμές με συνεργιστές

Μελετήθηκε ο ρόλος των γνωστών ενζύμων αποτοξικοποίησης (P450s, CCEs και GSTs) στην ανθεκτικότητα του abamectin, με την χρήση τριών ενζυμικών παρεμποδιστών PBO, DEF και DEM αντίστοιχα (Πιν. 11). Παρατηρήθηκε μία μικρή επίδραση των ενζυμικών παρεμποδιστών στην ανθεκτικότητα στο abamectin για το στέλεχος MAR\_AB, από 1.68- έως 2.54- φορές, που όμως δεν μπορούσε να εξηγήσει τα εξαιρετικά υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας στο abamectin.

Πίνακας 11: Αποτελέσματα βιοδοκιμών με συνεργιστές.

Επέμβαση	LC50 (95% CI)	Slope ± SE	RR* (95% CI)	SR* (95% CI)
MAR_AB	512 (431 - 579)	4.3 ± 0.8	1644 (1381 - 1957)	-
MAR_AB + PBO	275 (195 - 345)	2.7 ± 0.5	1337 (1026 - 1742)	1.86 (1.44 - 2.40)
MAR_AB + DEF	202 (178 - 220)	6.3 ± 0.8	989 (889 - 1097)	2.54 (2.16 - 2.99)
MAR_AB + DEM	238 (196 - 276)	3.8 ± 0.4	1221 (1045 - 1428)	2.15 (1.78 - 2.60)
LONDON	0.31 (0.28 - 0.34)	5.1 ± 0.8	-	-
LONDON + PBO	0.21 (0.17 - 0.23)	3.9 ± 0.5	-	1.50 (1.26 - 1.82)
LONDON + DEF	0.20 (0.19 - 0.22)	6.7 ± 0.6	-	1.53 (1.35 - 1.72)
LONDON + DEM	0.20 (0.18-0.21)	5.3 ± 0.5	-	1.60 (1.39 - 1.83)

\*RR: resistance ratio = LC50 MAR\_AB / LC50 LONDON, κάθε επέμβασης

\*\*SR: synergistic ratio = LC50 στελέχους χωρίς συνεργιστή / LC50 στελέχους με συνεργιστή

### 1.2.2.2 Γενετικές διασταυρώσεις

Μελετήθηκε η κυριαρχία του φαινοτύπου της ανθεκτικότητας στο abamectin στους θηλυκούς F1 απογόνους και των δύο διασταυρώσεων, με τη χρήση βιοδοκιμών. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η ανθεκτικότητα ήταν ατελώς υπολειπόμενη και όχι μητρικά κληρονομήσιμη (Πίν. 12). Στην συνέχεια θηλυκά άτομα από τις F1 διασταυρώσεις διασταυρώθηκαν με αρσενικά άτομα από τις πατρικές γενιές και η καμπύλη απόκρισης της τοξικότητας στο abamectin των F2 θηλυκών απογόνων, έδειξε ότι η ανθεκτικότητα ελεγχόταν από περισσότερα από ένα γονίδια για τα F2b (F1b ♀ x S ♂)  $\chi^2 = 14.63$  ( $p < 0.01$ ,  $df=4$ ) και για τα F2a (F1a ♀ x R ♂)  $\chi^2 = 38.14$  ( $p < 0.001$ ,  $df=4$ ) (Πίν. 12). Ακολούθως, θηλυκά άτομα και από τις δύο διασταυρώσεις επιλέχθηκαν σε υψηλή συγκέντρωση abamectin και συλλέχθηκαν τα άτομα που επιβίωσαν, καθώς και άτομα τα οποία δεν είχαν δεχθεί επέμβαση, για περαιτέρω πειράματα.

Πίνακας 12: Αποτελέσματα θνησιμότητας στο abamectin του London (S) και του MAR-AB (R) στελέχους και υπολογισμός του τρόπου κληρονομής της ανθεκτικότητας σε θηλυκούς απογόνους.

ΣΤΕΛΕΧΟΣ	n	LC <sub>50</sub> (ppm)	95% CI	Slope ±SE	χ <sup>2</sup> (df) <sup>a</sup>	RR <sup>b</sup>	DD <sup>c</sup>
London (S)	600	0.23	0.20 - 0.24	3.7 ± 0.4	10.5 (18)	1	
Mar-AB	543	475	394 - 518	6.1 ± 1.3	19.1 (13)	2065	
F1a (RR ♀ x S ♂)	526	9.1	7.1 - 11.6	1.4 ± 0.1	11.1(13)	39.6	-0.03
F1b (SS ♀ x R ♂)	528	8.2	6.4 - 10.3	1.6 ± 0.14	11.0 (13)	35.6	-0.05
F2a (F1a ♀ x R ♂)	426	30.8	23.0 - 42.0	1.8 ± 0.2	13.4 (10)	133.9	
F2b (F1b ♀ x S ♂)	513	1.6	1.2 - 2.0	1.5 ± 0.1	3.9 (13)	7.0	

<sup>a</sup> Βαθμοί ελευθερίας (df)

<sup>d</sup> RR= Συντελεστής ανθεκτικότητας

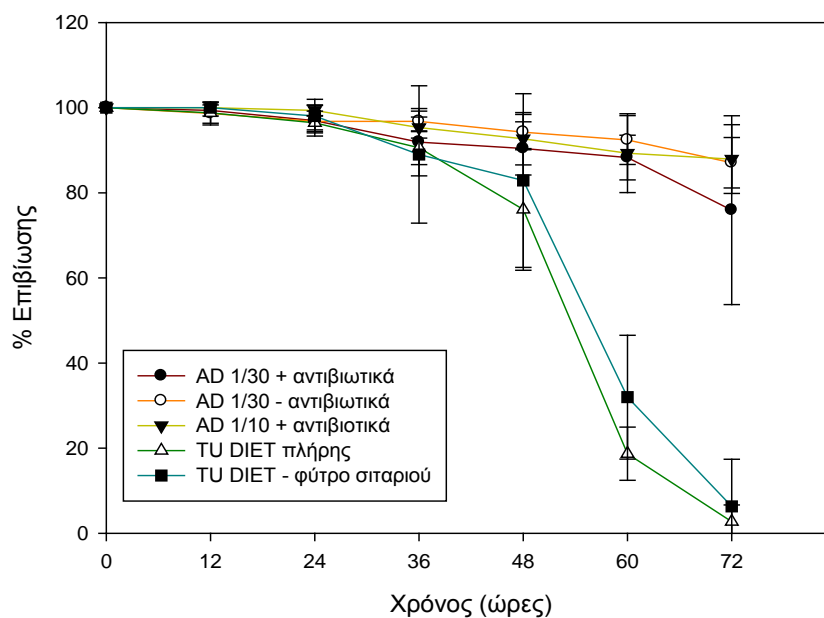
<sup>e</sup> Κυριαρχία του φαινότυπου της ανθεκτικότητας

### 1.2.3 Λειτουργική ανάλυση του ρόλου των οξειδασών στην ανθεκτικότητα χρησιμοποιώντας τεχνική σίγασης RNA (RNAi).

Για να μελετήσουμε τον ρόλο των οξειδασών στην ανθεκτικότητα, με την RNAi τεχνική μέσω τροφής, αρχικά αναπτύχθηκε μεθοδολογία ανάπτυξης του τετράνυχου τρεφόμενου αποκλειστικά σε τεχνητή τροφή και στην συνέχεια εφαρμόστηκε για την σίγηση γονιδίων στόχων. Τα στάδια για την ανάπτυξη του πρωτόκολλου χορήγησης περιλάμβαναν την επιλογή της κατάλληλης διαίτας, τον προσδιορισμό της ποσότητας και του ρυθμού κατανάλωσης της τροφής, καθώς και τον υπολογισμό του χρόνου κατανάλωσης της τροφής από διαφορετικά στάδια ανάπτυξης. Στην συνέχεια έγινε εφαρμογή της τεχνικής και προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων στόχων, μετά την σίγηση.

#### 1.2.3.1 Ανάπτυξη μεθοδολογίας χορήγησης τροφής

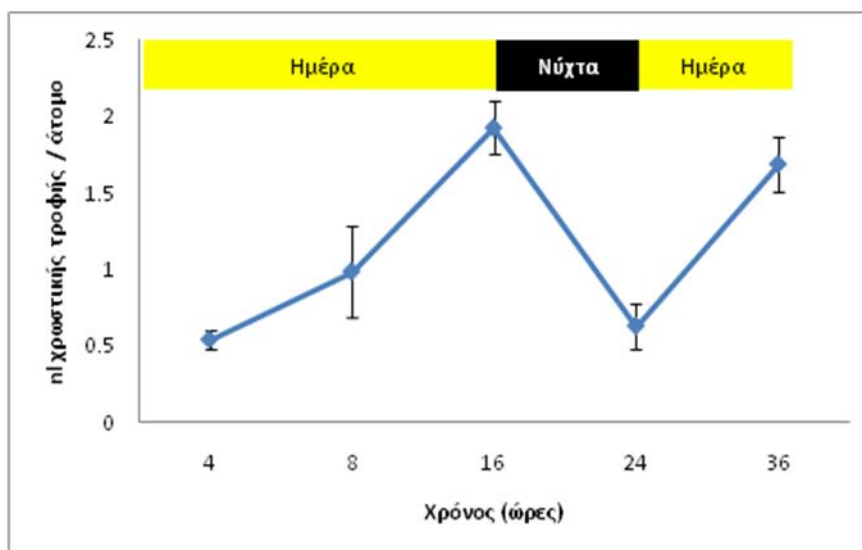
Αρχικά δοκιμάστηκαν δύο διαφορετικές τεχνητές δίαιτες. Από τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν παρατηρείται ότι για τις πρώτες 36 ώρες το ποσοστό επιβίωσης των τετρανύχων είναι παρόμοιο για όλες τις δίαιτες που εξετάστηκαν, με ποσοστό επιβίωσης μεγαλύτερο από 85%. Μετά από 48 ώρες χορήγησης παρατηρήθηκε αυξανόμενη θνησιμότητα και στις 2 παραλλαγές της τροφής που είχε σχεδιαστεί για τον τετράνυχο (TU).



Εικόνα 5: Ποσοστά επιβίωσης ακμαίων θηλυκών ατόμων τετράνυχου σε μικροσφαιρίδια με τεχνητή τροφή σε σχέση με τον χρόνο διατροφής για διαφορετικές τεχνητές τροφές.

Το ποσοστό επιβίωσης με την ΤΥ δίαιτα μετά από 72 ώρες εφαρμογής ήταν μικρότερο από 7%. Αντίθετα στην τροφή που είχε σχεδιαστεί για αφίδες (AD) και για τις τρεις τροποποιήσεις το ποσοστό επιβίωσης μετά από 72 ώρες ήταν υψηλό. Η AD 1/10 με προσθήκη αντιβιοτικών εμφάνισε τα υψηλότερα ποσοστά επιβίωσης (87,9%) ακολούθησε η AD 1/30 χωρίς αντιβιοτικά με παρόμοια αποτελέσματα, ενώ η AD 1/30 με αντιβιοτικά παρουσίασε ελαφρώς χαμηλότερα ποσοστά επιβίωσης (76%) (Εικ. 5).

Η AD 1/10 με αντιβιοτικά, που εμφάνισε να υψηλότερα ποσοστά επιβίωσης, επιλέχθηκε ως η κατάλληλη τροφή για τον τετράνυχο. Στην συνέχεια θέλαμε να υπολογίσουμε την ποσότητα της τροφής και τον ρυθμό κατανάλωσης ανά άτομο. Για τον σκοπό αυτό ενσωματώθηκε χρωστική στη τεχνητή τροφή. Η ποσότητα και ο ρυθμός κατανάλωσης τροφής παρουσιάστηκε αυξανόμενος τις πρώτες 16 ώρες διατροφής σε συνθήκες φωτός (1.925 nl/άτομο), ενώ μετά από 8 ώρες σκότους η ποσότητα της τροφής εμφανίστηκε μειωμένη (0.625 nl/άτομο). Τέλος μετά από 12 ώρες παρουσίας φωτός η ποσότητα και ο ρυθμός κατανάλωσης της τροφής αυξήθηκε και πάλι (1.687 nl/άτομο) (Εικ. 6).

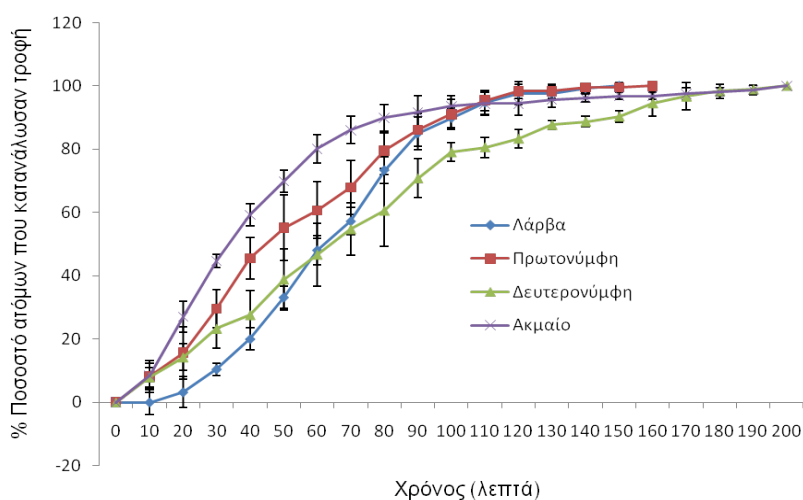


Εικόνα 6 : Παρακολούθηση ποσότητας κατανάλωσης τροφής / ακμαίο θηλυκό άτομο *T. urticae* σε σχέση με τον χρόνο, παρουσία και απουσία φωτός.

Στην συνέχεια μελετήθηκε ο χρόνος κατανάλωσης της τροφής από τα διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια του τετράνυχου. Παρατηρήθηκε ότι τα πρώτα 60 λεπτά εφαρμογής το 80% των ακμαίων ατόμων είχαν καταναλώσει την χορηγηθείσα τροφή, ενώ στον ίδιο χρόνο το 60% των πρωτονυμφών και περίπου το 50% των λαρβών και δευτερονυμφών αντίστοιχα. Ο χρόνος που απαιτήθηκε έως ότου το σύνολο των λαρβών είχαν τραφεί ήταν 150 λεπτά.



Όλες οι πρωτονύμφες είχαν καταναλώσει τροφή μετά από 160 λεπτά, ενώ το αντίστοιχο χρονικό διάστημα για τις δευτερονύμφες και τα ακμαία άτομα ήταν 200 λεπτά (Εικ. 7). Στα πειράματα σιγασής που ακολουθούν επιλέχθηκαν να χρησιμοποιηθούν ακμαία θηλυκά άτομα, λόγω του μεγαλύτερου μεγέθους και της ευκολότερης διαχείρισής τους.



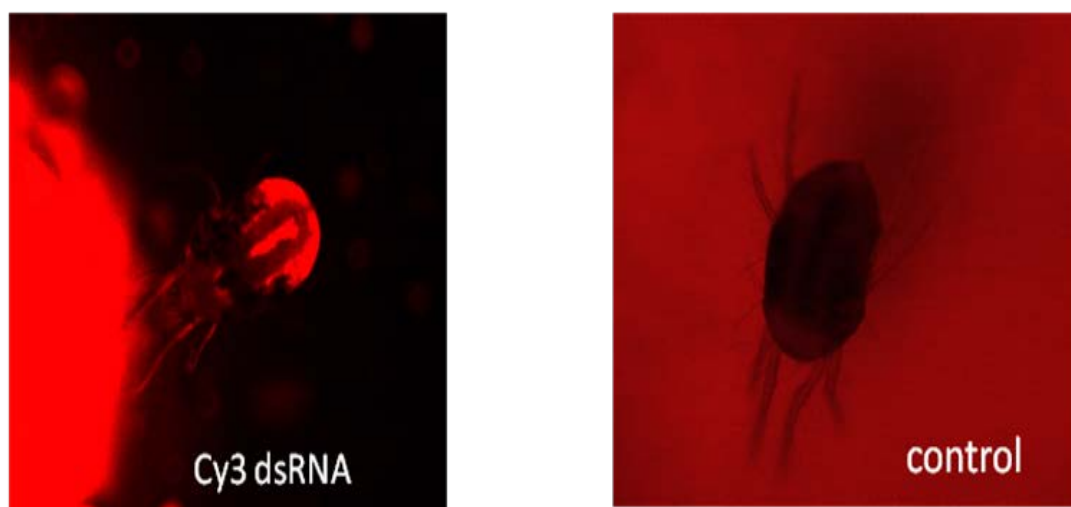
**Εικόνα 7: Παρακολούθηση κατανάλωσης τεχνητής τροφής σε σχέση με τον χρόνο σε διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια του τετράνυχου.**

### 1.2.3.2 Εφαρμογή τεχνικής RNAi στον τετράνυχου

Προκειμένου να μελετηθεί αν μέσω τροφής μπορεί να εισέλθει το dsRNA εντός των τετρανύχων, πραγματοποιήθηκαν μικροσφαιρίδια parafilm με δίαιτα στην οποία ενσωματώθηκε σημασμένο dsRNA με cy3 χρωστική. Ακολούθως μεταφέρθηκαν ακμαία θηλυκά άτομα τετράνυχου και αφέθηκαν να τραφούν για 1 ώρα περίπου, ενώ στον αρνητικό μάρτυρα χρησιμοποιήθηκε μικροσφαιρίδιο με τροφή χωρίς σήμανση. Τα δείγματα στην συνέχεια ελέγχθηκαν σε στερεοσκόπιο φθορισμού. Όπως παρατηρείται στην εικόνα 8 εντοπίστηκε έντονος φθορισμός στην κοιλιά των τετρανύχων που είχαν τραφεί με σημασμένο dsRNA.

Στην συνέχεια δημιουργήθηκαν μικροσφαιρίδια με dsRNA, για τα γονίδια CPR, VATP-ase και GFP. Σε κάθε επανάληψη ενσωματώθηκαν 50μg dsRNA, με τελική συγκέντρωση στην δίαιτα 500ng/μl. Πραγματοποιήθηκαν 3 βιολογικές επαναλήψεις για κάθε επέμβαση και σε κάθε μία μεταφέρθηκαν 40 ακμαία άτομα τετράνυχου, που αφέθηκαν να τραφούν για 72 ώρες. Ακολούθως, έγινε συλλογή των ατόμων, εξαγωγή RNA, σύνθεση cDNA και μελετήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης με real time PCR ως προς δύο γονίδια αναφοράς, την ακτίνη και την ριβοσομική πρωτεΐνη (RP49). Όπως φαίνεται και στην

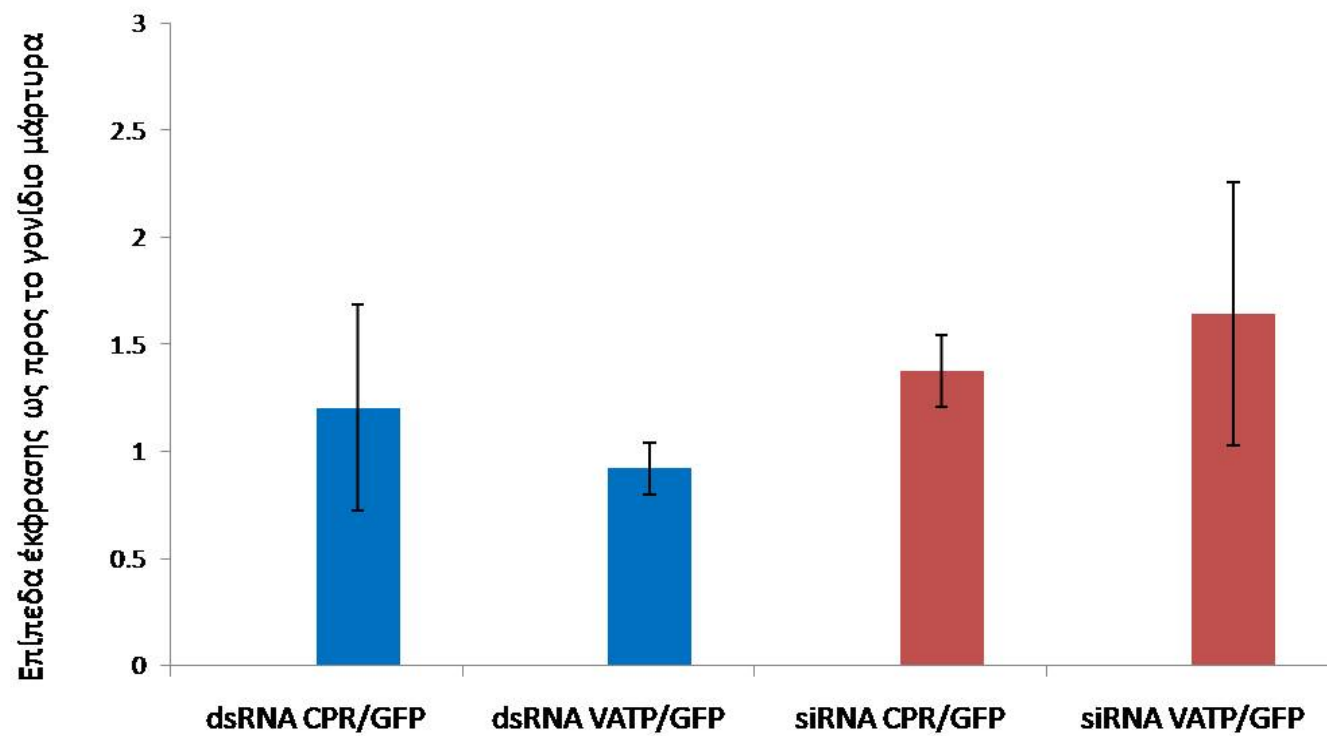
εικόνα 9 δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στους λόγους των επιπέδων έκφρασης τόσο της CPR όσο και της VATP-ase, προς το γονίδιο GFP. Φαίνεται ότι η σίγηση δεν ήταν επιτυχής μετά από 72 ώρες κατάποσης dsRNA.



**Εικόνα 8:** Ακμαίο θηλυκό άτομο σε στερεοσκόπιο φθορισμού που έχει τραφεί σε μικροσφαιρίδιο με σημασμένο με Cy3 dsRNA (αριστερά) και σε μικροσφαιρίδιο μάρτυρα (δεξιά)

Στην συνέχεια θέλαμε να δοκιμάσουμε αν τα μικρά RNAs (siRNA) θα έδιναν καλύτερα αποτελέσματα. Για τον λόγο αυτό πραγματοποιήθηκε *in vitro* πέψη του dsRNA με το ένζυμο Dicer. Τα προϊόντα τα πέψης (21-23 βάσεων) αφού ελέγχθησαν σε πήκτωμα αγαρόζης ενσωματώθηκαν στην δίαιτα. Αντίστοιχα δημιουργήθηκαν μικροσφαιρίδια με 12 μg siRNA, τελικής συγκέντρωσης στην δίαιτα 200ng/μl, με τρεις επαναλήψεις για κάθε επέμβαση. Στην συνέχεια σε κάθε μικροσφαιρίδιο μεταφέρθηκαν 25 άτομα, που συλλέχθηκαν μετά από 72 ώρες και ακολούθησε η ίδια διαδικασία που αναφέρθηκε προηγουμένως. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων της real time PCR έδειξε ότι ούτε με τα siRNAs δεν επιτεύχθηκε σίγηση των γονιδίων στόχων (Εικ. 9).

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι 72 ώρες διατροφής, με dsRNA και με siRNA, δεν είναι αρκετές για την σίγηση των γονιδίων στόχων. Προκαταρκτικά πειράματα χορήγησης για περισσότερο χρόνο έδειξαν αύξηση της θνησιμότητας και γι αυτό επιλέχθηκε το χρονικό διάστημα των 72 ωρών. Τέλος, μετά από 7 ημέρες παραμονής του dsRNA και του siRNA σε θερμοκρασία δωματίου, ελέγχθηκε η σταθερότητα τους σε πήκτωμα αγαρόζης, και εντοπίστηκαν σταθερά.



Εικόνα 9: Λόγος επιπέδων έκφρασης γονιδίων σε ακμαία θηλυκά άτομα τετράνυχου που έχουν τραφεί για 72 ώρες σε μικροσφαιρίδια με dsRNA και siRNA, για τα γονίδια στόχους CPR και VATPase ως προς το γονίδιο της GFP.

#### 1.2.4 Μοριακός χαρακτηρισμός της ανθεκτικότητας στο *abamectin*

Τα πειράματα που προηγήθηκαν υπέδειξαν πιθανή συμμετοχή της ανθεκτικότητας στόχου στον φαινότυπο της ανθεκτικότητας στο *abamectin*. Η ανάλυση του γονιδιώματος του τετράνυχου υπέδειξε την παρουσία 6 καναλιών χλωρίου, τα οποία αποτελούν και τον υπομοριακό στόχο του *abamectin* (Grbic et al., 2011). Η πολυγονιδιακή φύση της ανθεκτικότητας του MAR\_AB στο *abamectin*, που προέκυψε από τα πειράματα γενετικών διασταυρώσεων, είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα λαμβάνοντας υπόψη τα πολλαπλά GluCl γονίδια του τετράνυχου. Αυτό μας ώθησε να αλληλουχίσουμε τα κανάλια αυτά στα δύο στελέχη προκειμένου να διερευνηθεί η πιθανή παρουσία μεταλλαγών στόχου, που σχετίζονται με τον φαινότυπο της ανθεκτικότητας. Η πολλαπλή πρωτεϊνική στοίχιση των GluCl υπομονάδων των δύο στελεχών έδειξε την παρουσία γλουταμικού οξέως και στα δύο στελέχη στα κανάλια GluCl4 και GluCl5/6 στην ίδια θέση που είχε αναφερθεί και από τους Kwon et al. (2010). Ωστόσο μόνο στον MAR-AB βρέθηκε η γνωστή μεταλλαγή G314D στο πρώτο κανάλι. Επιπροσθέτως, εντοπίστηκε μια καινούρια αντικατάσταση (G326E) στην ίδια ακριβώς θέση, στο τρίτο κανάλι χλωρίου, μόνο στο στέλεχος MAR-AB (Εικ. 10).

Τα ευρήματα μας, επιβεβαιώνουν την γνωστή μεταλλαγή στο GluCl1, αλλά υποδεικνύουν ότι η παρουσία μιας επιπρόσθετης μεταλλαγής στο GluCl3 που μπορεί να έχει παρόμοια ή επιπρόσθετη επίδραση, καθώς ο MAR-AB έχει πιο ανθεκτικό φαινότυπο σε σχέση με το ανθεκτικό στέλεχος των Kwon et al. (2010). Προκειμένου να διερευνηθεί ο ρόλος των δύο μεταλλαγών στην ανθεκτικότητα ακολούθησε γονοτύπηση των F2 θηλυκών απογόνων και από τις δύο διασταυρώσεις. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν άτομα που επιβίωσαν σε δόση *abamectin* καθώς και άτομα που δεν είχαν δεχθεί επέμβαση. Από τους F2 θηλυκούς απογόνους των δύο διασταυρώσεων χωρίς επέμβαση υπολογίστηκε ο τρόπος κληρονομής των δύο μεταλλαγών και επιβεβαιώθηκε η υπόθεση της ανεξάρτητης κληρονομής των δύο μεταλλαγών (Πίν. 13).

**TM3**

GluCl	292...	GINASLSPVSYTKAIDVWT	G	VCLTFVFGALLEFALVNY	...331
Amel_GluCl	289...	GINASLPPVSYTKAIDIWT	G	VCLTFVFGALLEFALVNY	...328
Tcas_GluCl	289...	GINASLPPVSYTKAIDVWT	G	VCLTFVFGALLEFALVNY	...328
CeGlc-3	292...	GINAKLPPVSYTKAIDVWI	G	ACLTFIFGALLEFAWVTY	...331
Tu_GluCl1 Lon	294...	GINASLPPVSYTKAVDIWT	G	CCLIFVFGALIEFAIVNY	...333
Tu_GluCl2 Lon	316...	GINASLPPVSYIKAVDIWT	G	VCLAFVFGALLEFALVNY	...355
Tu_GluCl3 Lon	306...	GINASLPPVSYIKAVDIWT	G	VCLFFVFGALLEFALVNY	...345
Tu_GluCl4 Lon	286...	GINASLPPVSYIKAVDIWT	E	SCLTFVFGALLEFALVNY	...325
Tu_GluCl5 Lon	271...	GINASLPPVSYIKAVDVWT	E	CCLTFVFGALLEFALVNY	...310
Tu_GluCl1 Mar	294...	GINASLPPVSYTKAVDIWT	<b>D</b>	CCLIFVFGALIEFAIVNY	...333
Tu_GluCl2 Mar	316...	GINASLPPVSYIKAVDIWT	G	VCLAFVFGALLEFALVNY	...355
Tu_GluCl3 Mar	306...	GINASLPPVSYIKAVDIWT	<b>E</b>	VCLFFVFGALLEFALVNY	...345
Tu_GluCl4 Mar	286...	GINASLPPVSYIKAVDIWT	E	SCLTFVFGALLEFALVNY	...325
Tu_GluCl5 Mar	271...	GINASLPPVSYIKAVDVWT	E	CCLTFVFGALLEFALVNY	...310

Εικόνα 10: Πολλαπλή πρωτεϊνική στοίχιση του τρίτου διαμεμβρανικού τμήματος (TM3) των υπομονάδων χλωρίου των *D. melanogaster* (GluCl), *A. mellifera* (Amel\_GluCl), *T. castaneum* (Tcas\_GluCl), *C. elegans* (CeGlc-3) και London (Lon) και MAR-AB (Mar) στελέχη *T. urticae* (Tu\_GluCl1, Tu\_GluCl2, Tu\_GluCl3, Tu\_GluCl4, Tu\_GluCl5). Πλήρως συντηρημένη αμινοξική αλληλουχία με μαύρο χρώμα, ενώ παρόμοια αμινοξέα με γκρίζο χρώμα. Οι μεταλλαγές G314D και G326E στα Tu\_GluCl1 και Tu\_GluCl3, αντίστοιχα, του MAR\_AB στελέχους, που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα στο abamectin παρουσιάζονται με κόκκινο χρώμα.

Πίνακας 13:  $\chi^2$  τεστ (goodness of fit test) της ανεξάρτητης κληρονομιάς των μεταλλαγών G314D και G326E των Tu\_GLUCL1 και Tu\_GLUCL3, αντίστοιχα.

	n <sup>a</sup>	Tu_GLUCL1/Tu_GLUCL3 <sup>b</sup>				$\chi^{2c}$
		AspAsp/GluGlu	GlyAsp/GluGlu	GlyAsp/GlyGlu	AspAsp/GlyGlu	
<b>(F1a ♀ x R ♂)<sup>d</sup> Χωρίς επιλογή</b>	<b>20</b>	<b>25.0</b>	<b>30.0</b>	<b>25.0</b>	<b>20.0</b>	<b>0.4</b>
		<b>GlyGly/GlyGlu</b>	<b>GlyAsp/GlyGly</b>	<b>GlyAsp/GlyGlu</b>	<b>GlyGly/GlyGly</b>	
<b>(F1b ♀ x S ♂)<sup>d</sup> Χωρίς επιλογή</b>	<b>20</b>	<b>15.0</b>	<b>40.0</b>	<b>25.0</b>	<b>20.0</b>	<b>2.8</b>

<sup>a</sup> Αριθμός ατόμων που έγινε γονοτύπηση

<sup>b</sup> Ποσοστά γονότυπων που παρατηρήθηκαν στα Tu\_GLUCL1 και Tu\_GLUCL3

<sup>c</sup>  $\chi^2_{critical}$  = 7.82, df=3, p=0.05

<sup>d</sup> R= ανθεκτικό στέλεχος (MAR-AB); S= ευαίσθητο στέλεχος (London); F1a = (RR ♀ x S ♂); F1b = (SS ♀ x R ♂).

Πίνακας 14: Γονοτύπηση των μεταλλαγών G314D και G326E σε F2 απογόνους χωρίς επέμβαση και μετά από επιλογή με abamectin.

	n <sup>a</sup>	Tu_GLUCL1		Συχνότητα G314D (%)	$\chi^{2b}$	Tu_GLUCL3		Συχνότητα G326E (%)	$\chi^{2b}$
		Gly/Asp	Asp/Asp			Gly/Glu	Glu/Glu		
(F1a ♀ x R ♂) <sup>c</sup> 100 ppm επιλογή	30	50.0	50.0	75.0	0.0	6.7	93.3	96.7	22.6
(F1a ♀ x R ♂) <sup>c</sup> χωρίς επιλογή	20	55.0	45.0	72.5	0.2	45.0	55.0	77.5	0.1
		Gly/Asp	Gly/Gly			Gly/Glu	Gly/Gly		
(F1b ♀ x S ♂) <sup>c</sup> 10 ppm επιλογή	24	75.0	25.0	37.5	6.0	87.5	12.5	43.7	13.5
(F1b ♀ x S ♂) <sup>c</sup> χωρίς επιλογή	20	65.0	35.0	32.5	1.8	40.0	60.0	20.0	0.8

<sup>a</sup> Αριθμός ατόμων που έγινε γονοτύπηση

<sup>b</sup>  $\chi^2$  critical = 3.84, df=1, p=0.05

<sup>c</sup> R= ανθεκτικό στέλεχος (MAR-AB); S= ευαίσθητο στέλεχος (London); F1a = (RR ♀ x S ♂); F1b = (SS ♀ x R ♂).

Στην συνέχεια, όσον αφορά τον ρόλο των δύο μεταλλαγών στην ανθεκτικότητα, παρατηρήθηκε ότι: (α) Τα άτομα της F2a διασταύρωσης (γονότυποι RS και RR, LC50 = 30.8mg/L, Πίν. 11) που επιβίωσαν σε υψηλή δόση abamectin (100 mg/L) βρέθηκαν ομοζυγωτα ανθεκτικά στο τρίτο κανάλι (93.3%), υποδηλώνοντας ότι η συγκεκριμένη μεταλλαγή είναι υπολειπόμενη και σχετίζεται ισχυρά με την ανθεκτικότητα σε υψηλές συγκεντρώσεις (Πίν. 13). Από την άλλη οι γονότυποι στο πρώτο κανάλι εμφανίστηκαν σε 50/50 αναλογία ομοζυγωτά ανθεκτικοί (Asp/Asp) και ετερόζυγοι (Gly/Asp), άρα η μεταλλαγή αυτή είναι κυρίαρχη ή όχι απαραίτητη για την επιβίωση σε υψηλές συγκεντρώσεις. (β) Τα άτομα από την F2b διασταύρωση (γονότυποι SS και RS, LC50 = 1.6 mg/L, Πίν. 11) που επιλέχθηκαν με χαμηλότερη συγκέντρωση abamectin εμφανίστηκαν ετερόζυγα (Gly/Asp) σε ποσοστό 75% στο πρώτο κανάλι και 87.5% (Gly/Glu) στο τρίτο κανάλι (Πίν. 14). Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι σε χαμηλές συγκεντρώσεις abamectin και οι δύο μεταλλαγές σχετίζονται με την ανθεκτικότητα. Άτομα ομόζυγα για τον ευαίσθητο αλληλόμορφο και για τις δύο μεταλλαγές δεν εντοπίστηκαν σε κανένα από τα άτομα που επιβίωσαν, και από τις δύο διασταυρώσεις.

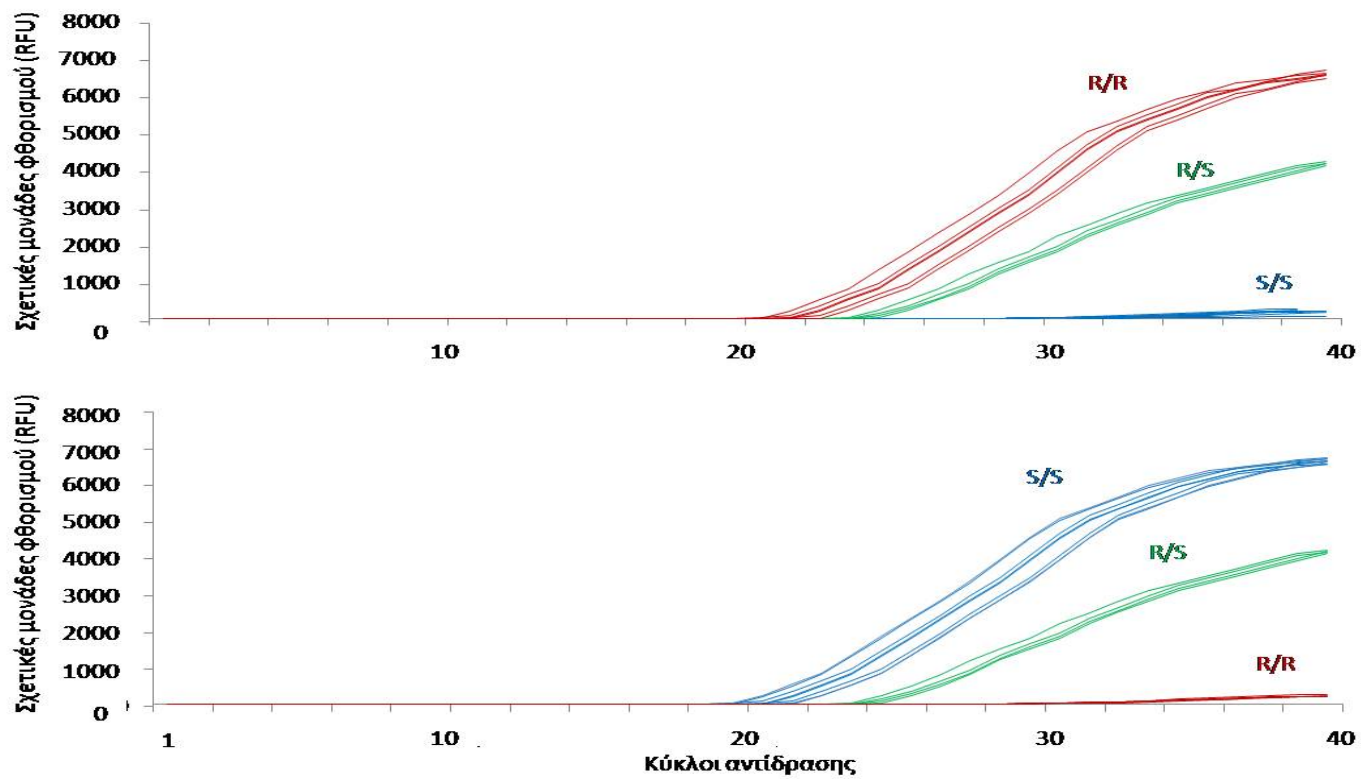
### 1.2.5 Καταγραφή συχνότητας μεταλλαγών ανθεκτικότητας

Σχεδιάστηκαν με επιτυχία μοριακά διαγνωστικά Taqman για εύκολη ανίχνευση των μεταλλαγών στα δύο κανάλια χλωρίου. Αρχικά, η αξιοπιστία των διαγνωστικών ελέγχθηκε με προκαταρκτικά πειράματα από μεμονωμένα άτομα εργαστηριακών συλλογών, με γνωστούς γονότυπους για τις θέσεις των μεταλλαγών (Εικ. 11). Στην συνέχεια εφαρμόστηκαν σε Ελληνικούς πληθυσμούς τετράνυχου από διαφορετικές περιοχές και φυτά ξενιστές και καταγράφηκαν οι συχνότητες των δύο μεταλλαγών (Πίν. 15).

**Πίνακας 15: Συχνότητα των μεταλλαγών ανθεκτικότητας στόχου στα κανάλια χλωρίου Ελληνικών πληθυσμών τετράνυχου.**

Όνομα	Περιοχή Συλλογής	Φυτό Ξενιστής	Έτος	N	Συχνότητα μεταλλαγής	
					G314D	G326E
TU82	Μαραθώνας, Αττική	Τριαντάφυλλο - Θ	2010	12	1.00	1.00
TU106	Φοινικιά, Κρήτη	Τριαντάφυλλο - Θ	2010	12	1.00	1.00
TU115	Σίσι, Κρήτη	Τριαντάφυλλο - Θ	2011	12	0.04	0.08
TU116	Τερψιθέα, Πελοπόννησος	Φασόλι - Υ	2011	12	0.00	0.00
TU122	Ναύπλιο, Πελοπόννησος	Κολοκύθι - Υ	2011	9	0.00	0.00
TU125	Ασήμι, Κρήτη	Διάφορα - Υ	2011	9	0.00	0.00
TOTAL				132	0.34	0.35





Εικόνα 11: Γράφημα καμπυλών ενίσχυσης μεμονωμένων θηλυκών ακμαίων ατόμων τετράνυχου με το διαγνωστικό Taqman.

Σε δύο πληθυσμούς (TU82 και TU106) όλα τα άτομα που μελετήθηκαν βρέθηκαν ομοζυγωτά ανθεκτικά και για τις 2 μεταλλαγές. Οι πληθυσμοί αυτοί προήλθαν από θερμοκηπιακές καλλιέργειες τριανταφυλλιάς με ιστορικό ψεκασμών με abamectin. Στον τρίτο πληθυσμό από καλλιέργεια τριανταφυλλιάς (TU115) οι συχνότητες το δύο μεταλλαγών εμφανίστηκαν σε πολύ χαμηλά επίπεδα, 4 και 8% αντίστοιχα. Στους πληθυσμούς (TU116, TU122 και TU125) από υπαίθριες καλλιέργειες κηπευτικών όλα τα άτομα που εξετάστηκαν εμφανίστηκαν ευαίσθητα, όπως φαίνεται από τον πίνακα 15.

### 1.3 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σε σημαντικό αριθμό πληθυσμών που συλλέχθηκαν από διαφορετικές περιοχές τις Ελλάδας το 2006 - 07 βρέθηκαν υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας σε ένα εύρος δραστικών ουσιών με διαφορετικό τρόπο δράσης. Ο πληθυσμός TU7 από τον Μαραθώνα εμφάνισε πολύ υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας στα περισσότερα από αυτά και ήταν ο μόνος πληθυσμός που εντοπίστηκε υψηλή ανθεκτικότητα στο abamectin.

Το 2010 συλλέχθηκε ξανά πληθυσμός από το ίδιο θερμοκήπιο (MAR\_AB) και εντοπίστηκαν εξαιρετικά υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας στο abamectin (~2000 φορές), καθώς και πολύ υψηλά επίπεδα διασταυρωτής ανθεκτικότητας στα bifenthrin, pyridaben, fenbutatine oxide, hexythiazox και clofentezine. Το abamectin αποτελεί ένα ιδιαίτερα αποτελεσματικό σκεύασμα για τον έλεγχο του τετράνυχου, και οι αναφορές ανθεκτικότητας στην βιβλιογραφία είναι λίγες (Συνοψίζονται από Van Leeuwen et al., 2009). Οι Campos et al (1995) ανέφεραν, για πρώτη φορά μειωμένη αποτελεσματικότητα του abamectin στην Καλιφόρνια. Τα επόμενα χρόνια ακολούθησαν και άλλες αναφορές ανθεκτικότητας σε πληθυσμούς και στελέχη τετράνυχου από διάφορες περιοχές (Campos et al., 1996; Beers et al., 1998; Stumpf and Nauen, 2002; Sato et al., 2005).

Τα υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας που εντοπίστηκαν στο abamectin, από τα υψηλότερα παγκοσμίως, μας ώθησε να μελετήσουμε περαιτέρω τους μηχανισμούς ανθεκτικότητας στο συγκεκριμένο σκεύασμα. Πειράματα με ενζυμικούς παρεμποδιστές έδειξαν μικρή συμμετοχή των CCEs, GSTs και P450s στον φαινότυπο της ανθεκτικότητας. Οι Stumpf and Nauen (2002) υπέδειξαν, επίσης με ενζυμικούς παρεμποδιστές, την συμμετοχή των GSTs και P450s στην ανθεκτικότητα στο abamectin. Η συμμετοχή της μεταβολικής αποτοξικοποίησης ως σημαντικό μηχανισμό στην ανθεκτικότητα του abamectin, προέκυψε επίσης από την άμεση μέτρηση την ενζυμικής δραστηριότητας των P450s και GSTs, αποκαλύπτοντας 13- και 11- φορές αύξηση, αντίστοιχα. Άρα, η ανθεκτικότητα στο

abamectin είναι πιθανόν πολυπαραγοντική, με την συμμετοχή τόσο του οξειδωτικού μεταβολισμού όσο και της αυξημένης σύζευξης της γλουταθειόνης. Υψηλότερη οξειδωτική διάσπαση, ακολουθούμενη από σύζευξη της γλουταθειόνης μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένη έκκριση, η οποία επίσης ανιχνεύτηκε από τους Clark et al. (1995).

Πειράματα μικροσυστοιχειών που πραγματοποιήθηκαν στο ανθεκτικό στέλεχος από τον Μαραθώνα και το ευαίσθητο αναφοράς υπέδειξαν υψηλό αριθμό γονιδίων αποτοξικοποίησης, που πιθανά σχετίζονται με τον φαινότυπο της ανθεκτικότητας στο abamectin (Riga et al., 2013 unpublished). Εντοπίστηκαν υψηλά επίπεδα έκφρασης σε αρκετές P450s (CYP392D2, CYP392D8, CYP392D10, CYP392A16 και CYP392A11) και σε μία GST την TuGSTd14 (Dermauw et al., 2013; Riga et al., unpublished). Από τις πέντε P450s η CYP392A16 βρέθηκε in vitro ότι μπορούσε να μεταβολίσει το abamectin, συμμετέχοντας ενεργά στον φαινότυπο της ανθεκτικότητας (Riga et al., unpublished).

Στην συνέχεια θέλαμε να μελετήσουμε αν ο φαινότυπος της ανθεκτικότητας του συγκεκριμένου στελέχους στο abamectin είναι κυρίαρχος και αν οφείλεται στην δράση ενός ή περισσότερων γονιδίων. Ο τρόπος κληρονομής της ανθεκτικότητας βρέθηκε ατελώς υπολειπόμενος για το abamectin και οφειλόταν στην δράση περισσότερων από ένα γονιδίων. Άρα η κληρονομία της ανθεκτικότητας στο abamectin μπορεί να ελέγχεται από περισσότερους από έναν ατελώς υπολειπόμενους παράγοντες, κάτι το οποίο επιβεβαιώνεται από προηγούμενες μελέτες γενετικής στο συγγενές είδος *Tetranychus cinnabarinus* (He et al., 2009).

Όσον αφορά τον μοριακό στόχο του abamectin, τους διαύλους χλωρίου, βρήκαμε εκτός από την γνωστή μεταλλαγή στο πρώτο κανάλι και μια καινούρια μεταλλαγή στο τρίτο κανάλι, η οποία σχετίστηκε με πολύ πιο ανθεκτικό φαινότυπο. Με κλασικές μεθόδους γενετικής και γονοτύπησης δείξαμε ότι η καινούρια μεταλλαγή στο τρίτο κανάλι είναι απαραίτητη για την επιβίωση σε υψηλές συγκεντρώσεις abamectin. Επίσης, δείξαμε ότι οι δύο μεταλλαγές κληρονομούνται ανεξάρτητα. Η γνώση της συχνότητας και της παρουσίας των μεταλλαγών, είναι απαραίτητη για την έγκαιρη διάγνωση της ανθεκτικότητας. Λαμβάνοντας υπόψη την σημασία των μεταλλαγών στα κανάλια χλωρίου αναπτύξαμε και εφαρμόσαμε μοριακά διαγνωστικά Taqman σε πληθυσμούς από την Ελλάδα.

Τέλος, προσπαθήσαμε να μελετήσουμε την πιθανή συμμετοχή ενζύμων αποτοξικοποίησης με την τεχνολογία RNAi μέσω τροφής, στοχεύοντας το γονίδιο της CPR, που παίζει καθοριστικό ρόλο στην λειτουργία των P450s. Εκτός της CPR δοκιμάστηκε και το γονίδιο της VATP-ase που εκφράζεται στο στομάχι των εντόμων και τα αποτελέσματα της

σίγησης θα ήταν άμεσα μέσω τροφής, μετά από 72 ώρες κατανάλωσης. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι δεν επιτεύχθηκε σίγηση, τουλάχιστον με την παροχή τροφής για 72 ώρες. Τα αρνητικά αποτελέσματα ενδέχεται να οφείλονται κυρίως στον χρόνο του χορηγηθέντος dsRNA – siRNA καθώς και στην ποσότητα που καταναλώθηκε μέσω τροφής, που ίσως δεν ήταν επαρκής για την παρεμπόδιση του RNA στόχου. Επιπλέον, το περιβάλλον του στομάχου μπορεί να αδρανοποιεί το dsRNA ή να παρεμποδίζει την αλληλεπίδραση του με το mRNA. Τέλος, το dsRNA μπορεί να παρέμεινε σε ιστούς που δεν είχαν επίδραση στον φαινότυπο. Σύμφωνα με πρόσφατη εργασία στον τετράνυχο η σίγηση μέσω χορήγησης dsRNA με φυλλικούς δίσκους ήταν επιτυχής, για τέσσερα γονίδια που δοκιμάστηκαν, μεταξύ των οποίων και η VATP-ase (Kwon et al., 2013). Στην συγκεκριμένη εργασία επιτεύχθηκε τόσο αυξημένη θνησιμότητα των ατόμων όσο και μειωμένα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων στόχων (Kwon et al., 2013). Επομένως, η σίγηση μέσω διαγονιδιακών φυτών ίσως να είναι περισσότερο αποτελεσματική, καθώς θα εξασφαλίζουν την δυνατότητα διατροφής για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα.

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΑΛΕΥΡΩΔΗ ΣΤΑ ΝΕΟΝΙΚΟΤΙΝΟΕΙΔΗ**

Στον παρόν κεφάλαιο α) εξετάστηκαν τα επίπεδα ανθεκτικότητας Ελληνικών πληθυσμών αλευρώδη στα νεονικοτινοειδή, β) διερευνήθηκε η πιθανή συμμετοχή επιπρόσθετου μηχανισμού ανθεκτικότητας στα νεονικοτινιειδή σκευάσματα και γ) έγινε προσπάθεια καταστολής της ανθεκτικότητας μέσω τεχνολογίας RNAi.

### **2.1 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

#### **2.1.1 Πληθυσμοί *Bemisia tabaci***

Συλλέξαμε 9 πληθυσμού αλευρώδη την άνοιξη του 2012 από διαφορετικές περιοχές της Κρήτης. Εστίασαμε κυρίως στην Ιεράπετρας, περιοχή με μία από τις εντατικότερες καλλιέργειες κηπευτικών στην Ελλάδα. Επίσης χρησιμοποιήθηκε Ελληνικό ευαίσθητο εργαστηριακό στέλεχος GR176, που είχε συλλεχθεί το 2006 και έκτοτε είχε παραμείνει στο εργαστήριο απουσία εντομοκτόνων. Πληροφορίες για τους πληθυσμούς που χρησιμοποιήθηκαν εμφανίζονται στον πίνακα 16.

**Πίνακας 16: Πληθυσμοί αλευρώδη, περιοχή συλλογής και φυτά ξενιστές.**

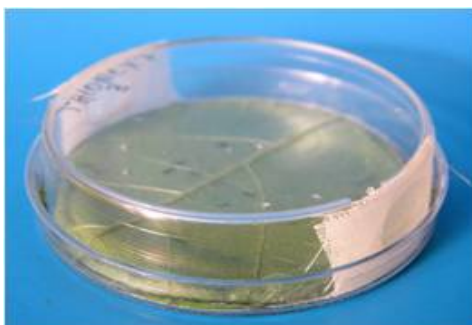
Πληθυσμός	Περιοχή συλλογής	Ξενιστής
GR176	Επισκοπή, Ηράκλειο	Αγγούρι
Bt448	Κατσαμπάς, Ηράκλειο	Μελιτζάνα
Bt449	Άρβη, Βιάννος	Αγγούρι
Bt450	Βαϊνιά, Ιεράπετρα	Μελιτζάνα-Πιπεριά
Bt453	Στόμιο, Ιεράπετρα	Μελιτζάνα
Bt454	Στόμιο, Ιεράπετρα	Μελιτζάνα
Bt455	Καθαράδες, Ιεράπετρα	Μελιτζάνα
Bt457	Στόμιο, Ιεράπετρα	Μελιτζάνα
Bt458	Στόμιο, Ιεράπετρα	Μελιτζάνα
Bt459	Γρά Λυγιά, Τυμπάκι	Μελιτζάνα

#### **2.1.2 Κλασικές Βιοδοκιμές**

Μελετήθηκαν τα επίπεδα ανθεκτικότητας των 9 προαναφερθέντων πληθυσμών σε σχέση με το ευαίσθητο στέλεχος αναφοράς GR176. Δοκιμάστηκαν 4 σκευάσματα εντομοκτόνων, τρία νεονικοτινοειδή (imidacloprid, acetamiprid και thiacloprid) και το pymetrozine. Για την βιοδοκιμή ακολουθήθηκε η μέθοδος εμβάπτισης φύλλου (leaf-dip bioassay) (Roditakis et al., 2005). Η διαδικασία που πραγματοποιήθηκε ήταν η ακόλουθη:

Φυλλικοί δίσκοι βαμβακιού εμβαπτίστηκαν για 5 sec σε διαδοχικές αραιώσεις εντομοκτόνων που περιείχε 2g/L Triton X-100. Τα φύλλα αφήνονταν να στεγνώσουν και κατόπιν τοποθετούνταν σε τρυβλία Petri πάνω σε λεπτό στρώμα άγαρ (20g/L). Στον μάρτυρα αντί για εντομοκτόνο τα φύλλα εμβαπτίστηκαν σε αποσταγμένο νερό με Triton. Στην κάθετη πλευρά των τρυβλίων είχαν δημιουργηθεί δύο τρύπες καλυμμένες με τούλι για να επιτρέπει τον αερισμό.

Ακμαία άτομα αναισθητοποιήθηκαν με παροχή CO<sub>2</sub> και 20-25 θηλυκά τοποθετήθηκαν σε κάθε τρυβλίο (Εικ. 12). Η μέτρηση χειρισμού πραγματοποιήθηκε μετά το πέρας περίπου μίας ώρας. Τα τρυβλία τοποθετήθηκαν ανάποδα έτσι ώστε τα έντομα να προσανατολιστούν φυσιολογικά και τοποθετήθηκαν σε δωμάτιο με ελεγχόμενες συνθήκες θερμοκρασίας 25 (±1) °C, 50-60% υγρασία και φωτοπερίοδο 16:8 φώς:σκοτάδι. Εφαρμόστηκαν πέντε συγκεντρώσεις με τουλάχιστον τρεις επαναλήψεις ανά συγκέντρωση, που προκαλούσαν 0 -100% θνησιμότητα. Η μέτρηση θνησιμότητας υπολογίστηκε μετά από 72 ώρες για τα imidacloprid, acetamiprid, thiacloprid και 96 ώρες για το pymetrozine. Ένα έντομο θεωρούταν ζωντανό αν παρατηρούνταν οποιοδήποτε σημάδι κίνησης.



Εικόνα 12: Τρυβλίο βιοδοκιμών με φύλλο βαμβακιού σε άγαρ.

### 2.1.3 Εργαστηριακή επιλογή με νεονικοτινοειδή

Πραγματοποιήθηκε εργαστηριακή επιλογή τριών από τους προαναφερθέντες πληθυσμούς με δύο σκευάσματα νεονικοτινοειδών, για την επίτευξη περισσότερο ομοιογενών πληθυσμών και την καλύτερη μελέτη των μηχανισμών ανθεκτικότητας. Επιλέξαμε να μελετήσουμε τους πληθυσμούς που εμφάνισαν τα υψηλότερα επίπεδα στα imidacloprid και acetamiprid (Bt450 και Bt454), καθώς και το πληθυσμό Bt459 που εμφάνισε σχετικά μέτρια - χαμηλά επίπεδα στα δύο αυτά σκευάσματα. Οι πληθυσμοί Bt450 και Bt459 επιλέχθηκαν με το imidacloprid και ο Bt454 με το acetamiprid για έξι διαδοχικές γενεές σε συγκέντρωση που θανατώνει > 70% των ατόμων. Η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε ήταν παρόμοια με αυτή των κλασικών βιοδοκιμών με την διαφορά ότι τα άτομα που επιβίωσαν μετά από 72 ώρες μεταφέρθηκαν σε νέα φυτά βαμβακιού για την

δημιουργία της επόμενης γενιάς. Χρησιμοποιήθηκαν συγκεντρώσεις 200-1200 ppm και αύξηση της συγκέντρωσης πραγματοποιούνταν όταν η θνησιμότητα ήταν μικρότερη από το 70%.

#### **2.1.4 Επίπεδα ανθεκτικότητας των επιλεγμένων στελεχών**

Εκτιμήθηκαν τα επίπεδα ανθεκτικότητας των επιλεγμένων στελεχών, καθώς και των πατρικών πληθυσμών από τους οποίους προήλθαν σε σχέση με τα ευαίσθητο στέλεχος GR176, σε τρία νεονικοτινοειδή (imidacloprid, acetamiprid, thiacloprid), το pymetrozine και το πυρεθρινοειδές deltamethrin. Η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε έχει περιγραφεί σε προηγούμενη ενότητα και καταμέτρηση θνησιμότητας για το deltamethrin πραγματοποιήθηκε μετά από 48 ώρες.

#### **2.1.5 Βιοδοκιμές με συνεργιστές (PBO)**

Μελετήθηκε η συμμετοχή των P450s στην ανθεκτικότητα του imidacloprid με την χρήση του ενζυμικού παρεμποδιστή PBO. Προσδιορίστηκε η μέγιστη συγκέντρωση που δεν προκαλεί θνησιμότητα αλλά παρεμποδίζει τα ενζυμικά συστήματα. Η μέθοδος επαφής χρησιμοποιήθηκε για την εφαρμογή του συνεργιστή. Η μεθοδολογία συνοπτικά περιλάμβανε μεταφορά ακμαίων θηλυκών ατόμων σε 30 ml vials με 300 mg/L PBO (v/v) διαλυμένο σε ακετόνη και έκθεση τους στον συνεργιστή για 4 ώρες. Ακολούθησε βιοδοκιμή με διαφορετικές συγκεντρώσεις imidacloprid, όπως περιγράφηκε σε προηγούμενη ενότητα.

#### **2.1.6 Προσδιορισμός ενεργότητας ενζύμων αποτοξικοποίησης**

Μελετήθηκε η ενεργότητα ενζύμων αποτοξικοποίησης (COEs, GSTs και P450s) με την χρήση πρότυπων ενζυμικών υποστρωμάτων για τα τρία επιλεγμένα στελέχη, τα τρία πατρικά και το ευαίσθητο στέλεχος αναφοράς GR176. Οι μετρήσεις της ενεργότητας των ενζύμων αποτοξικοποίησης πραγματοποιήθηκαν με φασματοφωτόμετρο SpectraMaxM2 microplatereader (MolecularDevices).

Αρχικά έγινε προετοιμασία των δειγμάτων. 200 ακμαία άτομα αλευρώδη ομογενοποιήθηκαν σε 0.2ml ρυθμιστικού διαλύματος 0.1M sodium phosphate buffer (PH=7.2) που περιείχε και 0.1% (w/v) TritonX-100. Ακολούθησε φυγοκέντρηση των δειγμάτων στα 5000 g για 5λεπτά (4°C) και συλλογή του υπερκείμενου διαλύματος. Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης μετρήθηκε σύμφωνα με το μέθοδο Bradford (Bradford, 1976) και η κατασκευή της πρότυπης καμπύλης πραγματοποιήθηκε με την χρήση της πρωτεΐνης BSA (bovine serum albumin).

### 2.1.6.1 Ενεργότητα των CCEs

Για την ενεργότητα των εστερασών, το ομογενοποίηση αραιώθηκε 10 φορές και στην συνέχεια 10 μl από το αραιό ομογενοποίηση επώαστηκε με 200μl διαλύματος A (Σύσταση διαλύματος A: σε 12ml 0,02M sodium phosphate buffer pH:7.4 προστέθηκαν 0,12ml διαλύματος α ή β parhthyl acetate συγκέντρωσης 30mM) στους 25°C για 30 λεπτά. Στην συνέχεια προστέθηκε στο δείγμα 0,05ml από το διάλυμα B και επώαστηκε 5 λεπτά ακόμα σε θερμοκρασία δωματίου. (Σύσταση διαλύματος B: σε 7,5ml 0.05M sodium phosphate buffer pH:7 και 2.5% SDS προστέθηκαν 23mg χρωστικής fast blue). Η απορρόφηση μετρήθηκε στα 570nm. Για το υπόστρωμα *para*-nitrophenolacetate (*p*-NPA) σε 5 μl ομογενοποίησης προστέθηκαν 200 μl ρυθμιστικού διαλύματος (0.1m M*p*-NPA σε 50mM sodium phosphate buffer, pH 7.4) και η ενεργότητα μετρήθηκε στα 405 nm για 3 λεπτά κινητικά. Για κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκαν 2 τεχνικές επαναλήψεις.

### 2.1.6.2 Ενεργότητα των GSTs

Για την μέτρηση της ενεργότητας των GSTs 20μl του ομογενοποίησης προστέθηκαν σε 200μl διαλύματος 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) που περιείχαν 10mM reduced glutathione και 3mM CDNB και η ενεργότητα μετρήθηκε στα 340 nm για 5 λεπτά κινητικά. Για κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκαν 2 τεχνικές επαναλήψεις.

### 2.1.6.3 Ενεργότητα των P450s

Η ενεργότητας των P450s οξειδασών προσδιορίστηκε με το ενζυμικό υπόστρωμα 7-Ethoxycoumarin. 1200 ακμαία άτομα αλευρώδη ομογενοποιήθηκαν σε 1ml 0.1M sodium phosphate buffer που περιείχε 1 mM EDTA, 1 mM DTT και 200 mM σακχαρόζη. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στα 5000g για 5 λεπτά (4°C). Στην συνέχεια το υπερκείμενο διάλυμα φυγοκεντρήθηκε στα 15000g για 15 λεπτά και ακολούθησε υπερφυγοκέντρωση στα 180000g για 1 ώρα. Το ίζημα των μικροσωμάτων επαναδιαλύθηκε σε 100 μl του παραπάνω διαλύματος. Σε 10 μl μικροσωμάτων προστέθηκαν 90μl sodium phosphate buffer (PH=7.6) που περιείχε τελικές συγκεντρώσεις 0.4mM 7-ethoxycoumarin και 1mM NADPH. Ακολούθησε επώαση για 30 λεπτά στους 30°C σε σκοτάδι. Ο αυτό-φθορισμός του NADPH αφαιρέθηκε με προσθήκη 20μl διαλύματος που περιείχε 1.5 mM oxidized glutathione, 0.5 units glutathione reductase και επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Η αντίδραση σταμάτησε με προσθήκη 120μl διαλύματος 50% ακετονιτριλίου σε Trizma base buffer (0.05M, pH = 10). Η ποσότητα της 7 hydroxycoumarin που ελευθερώνεται κατά την επώαση υπολογίζεται στο φασματοφωτόμετρο με διέγερση στα 390nm και εκπομπή στα 465nm.



### 2.1.7 Υπερέκφραση της P450 CYP6CM1

Έγινε απομόνωση RNA από τα στελέχη του αναφέρθηκαν σε προηγούμενη ενότητα με το Kit Quiagen RNeasy. Για κάθε απομόνωση χρησιμοποιήθηκαν 300 ενήλικα άτομα και από κάθε στέλεχος πραγματοποιήθηκαν δύο βιολογικές επαναλήψεις. Οι προσμίξεις DNA απομακρύνθηκαν με το DNaseI digestion kit της Quiagen. Ο χειρισμός με τη DNάση έγινε πάνω στην κολώνα RNeasy σύμφωνα με το πρωτόκολλο του kit. Η συγκέντρωση του RNA μετρήθηκε στο Nanodrop και αναλύθηκε σε 1% gel αγαρόζης. Μέσω της αντίστροφης μεταγραφής, χρησιμοποιώντας ως καλούπι το RNA έγινε σύνθεση 1.5μg cDNA με Superscript III (Invitrogen) και oligo-dT<sub>20</sub> primer (Invitrogen) για 60 min στους 50°C. Τα παραχθέντα cDNAs διαλύθηκαν 15 φορές σε RNase-free νερό. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε τελικό όγκο 25μl χρησιμοποιώντας Fast Start SYBR Green Master (Promega), 0.3μM από κάθε εκκινητή και 5μl από (15x) αραιωμένο cDNA αντίστοιχα. Με real-time PCR μελετήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου στόχου, CYP6CM1, με δύο ζεύγη εκκινητών (Πιν. 17) στα στελέχη που προαναφέρθηκαν. Η ριβοσωμική πρωτεΐνη (RPL29) χρησιμοποιήθηκε ως ενδογενές σύστημα αναφοράς. Οι συνθήκες της αντίδρασης ήταν ο πρώτος κύκλος στους 95°C για 2 λεπτά και ακολούθησαν 34 κύκλοι: 95°C για 15 s, 57°C για 30 s και 60°C για 30 s. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο ΔΔCt efficiency (Pfaffl, Horgan et al., 2002).

**Πίνακας 17: Αλληλουχία εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην Real time PCR.**

Εκκινητής	Forward 5'-3'	Reverse 5'-3'
CYP6CM1	GTTAGGTTGGTTTCGAAATA	CTTTTTCAGCAGGCTGTACC
CYP6A14	TCCAGCTTCTCTGGCAGATT	TATCACCGATGGCTCTCTCC
RPL29	TCGAAAATTACCGTGAGAA	GAACTTGTGATCTACTCCTCTCG

### 2.1.8 Ανάπτυξη RNAi μεθοδολογίας μέσω τεχνητής τροφής

Για την RNA σίγηση των πρωτεϊνών CYP6CM1 και CPR μέσω τεχνητής τροφής συντέθηκε δίκλωνο RNA με το kit MEGASCRIP T7 (Ambion). Για τη σύνθεση δίκλωνου RNA ενισχύθηκαν με PCR τμήματα των γονιδίων μεγέθους 508bp και 510bp. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε dsRNA για το γονίδιο της πρωτεΐνης GFP. Η αλληλουχία των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν δίνεται στον πίνακα 18. Οι συνθήκες της αντίδρασης ήταν 95 °C για 2 min, στη συνέχεια για 35 κύκλοι με 95 °C για 30 sec, 57 °C για 30 sec, 72 °C για 10 sec και τέλος 72 °C για 2 min. Ακολούθησε καθαρισμός των προϊόντων και σύνθεση dsRNA όπως περιγράφηκε σε προηγούμενο κεφάλαιο.

Πίνακας 18: Αλληλουχία εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή dsRNA.

Εκκινητής	Αλληλουχία 5'-3'
BtCPR_Ri_F	TAATACGACTCACTATAGGGAGACAATGATCCAGCTC
BtCPR_Ri_R	TAATACGACTCACTATAGGGAGACTCAGAAGCGTTGT
BtCYP6MC1_Ri_	TAATACGACTCACTATAGGGAGACGAACTTGTTTTCA
BtCYP6MC1_Ri_	TAATACGACTCACTATAGGGAGACACATCCATCAATG
T7 GFP F	TAATACGACTCACTATAGGGAGAACGTAAACGGCCAC
T7 GFP R	TAATACGACTCACTATAGGGAGACTTGTACAGCTCGT

Ως τεχνητή τροφή χρησιμοποιήθηκε διάλυμα 30% σουκρόζης / 5% Yeast. Η συγκεκριμένη τεχνητή τροφή είχε χρησιμοποιηθεί από τους Uradhyay et al. (2011) στο αλευρώδη, με υψηλά ποσοστά επιβίωσης. Επιπροσθέτως, έγινε προσθήκη στην τροφή 0,1 mg/ml Niragim και 1X *Penicilin Streptomisine* για αποφυγή μόλυνσης του dsRNA. Η τελική συγκέντρωση του δίκλωνου RNA που προστέθηκε στη δίαιτα ήταν 20ng/μl. Σε κάθε γυάλινο σωλήνα των 30ml (vial) τοποθετήθηκαν περίπου 300 ακμαία άτομα από το στέλεχος Bt450\_IMI\_SEL5 που ήταν επιλεγμένο με το imidacloprid για πέντε διαδοχικές γενιές. 200μl από την τεχνητή τροφή ενσωματώθηκε εντός δύο parafilm, όπως φαίνεται στην εικόνα 13. Μετά από 72 ώρες διατροφής τα άτομα συλλέχθηκαν για βιοδοκιμή με imidacloprid και απομόνωση RNA για περαιτέρω πειράματα.



Εικόνα 13: Τροφικός θάλαμος με ενήλικα άτομα αλευρώδη (αριστερά) και τρόπος λήψης της τροφής με το dsRNA (δεξιά).

### 2.1.8.1 Αξιολόγηση αποτελεσματικότητας της σίγησης

Για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας της σίγησης πραγματοποιήθηκε βιοδοκιμή με imidacloprid, σε συγκέντρωση (100mg/L) σε ακμαία άτομα αλευρώδη που είχαν τραφεί με dsCPR, dsCYP6CM1 και dsGFP, όπως προαναφέρθηκε σε προηγούμενη ενότητα. Η συγκέντρωση αυτή προκαλεί περίπου 30% θνησιμότητα στο στέλεχος που δοκιμάστηκε. Επιπροσθέτως μελετήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης των δύο γονιδίων στόχων (CPR και CYP6CM1) σε σχέση με άτομα που είχαν τραφεί με dsGFP μετά από 72 ώρες με real-time PCR. Η απομόνωση ολικού RNA πραγματοποιήθηκε από περίπου 150 άτομα, 1 μg ολικού RNA χρησιμοποιήθηκε για την σύνθεση του cDNA και οι συνθήκες της αντίδρασης περιγράφηκαν σε προηγούμενη ενότητα. Για κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκαν δύο βιολογικές επαναλήψεις. Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στον πίνακα 19.

**Πίνακας 19: Αλληλουχίες εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την αξιολόγηση της σίγησης με real time PCR.**

Εκκινητής	Forward 5'-3'	Reverse 5'-3'
CYP6CM1	GTTAGGTTGGTTTCGAAATACG	CTTTTTCAGCAGGCTGTACC
Bt_αCPR1	TTGACACCGTCCTATTGGC	CTGGCTACCGTAGAACACGAC
RPL29	TCGGAAAATTACCGTGAGAAAG	GAACCTGTGATCTACTCCTCTC

## 2.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 2.2.1 Εκτίμηση επιπέδων ανθεκτικότητας σε φυσικούς πληθυσμούς *Bemisia tabaci*

Μελετήθηκαν τα επίπεδα ανθεκτικότητας 9 φυσικών πληθυσμών αλευρώδη που συλλέχθηκαν από διαφορετικές περιοχές της Κρήτης σε τρία νεονικοτινοειδή και το pymetrozine (Πίν. 20). Όπως φαίνεται και στον πίνακα παρατηρήθηκαν υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας και στα τέσσερα σκευάσματα που δοκιμάστηκαν. Τα επίπεδα ανθεκτικότητας των 9 πληθυσμών στο imidacloprid κυμάνθηκαν από 6.2- (Bt448) έως 64- (Bt450) φορές σε σχέση με το ευαίσθητο στέλεχος GR176. Παρόμοια επίπεδα εντοπίστηκαν και στο acetamiprid, από 2- (Bt448) έως 62- (Bt454) φορές. Τα υψηλότερα επίπεδα εντοπίστηκαν στα thiacloprid και pyetrozine, τα οποία ξεπέρασαν τις 273- και 390- φορές αντίστοιχα.

Πίνακας 20: Αποτελέσματα θνησιμότητας 9 πληθυσμών αλευρώδη από την Κρήτη.

Πληθυσμός	n†	LC50‡ (95%CI)	RR¶ (95%CI)	n	LC50 (95%CI)	RR (95%CI)
<b>IMIDACLOPRID</b>				<b>ACETAMIPRID</b>		
GR176	580	7.5 (5.4 – 10)	-	503	7.9 (5.1 – 11)	-
Bt448	456	46 (29 – 67)	6.2 (4.0 – 9.5)	376	16 (5.4 – 26)	2 (1.0 – 3.9)
Bt449	449	160 (80 – 409)	21 (14 – 32)	282	< 300	
Bt450	506	484 (300 – 1003)	64 (37 – 112)	281	< 300	
Bt453	482	301 (150 – 493)	40 (26 – 62)	639	195 (134 – 261)	25 (16 – 38)
Bt454	521	112 (66 – 170)	15 (9.5 – 23)	653	493 (325 – 641)	62 (40 – 97)
Bt455	504	146 (88 – 213)	19 (13 – 28)	300	212 (167 – 279)	27 (17 – 42)
Bt457	503	165 (73 – 322)	22 (13 – 37)	295	< 300	
Bt458	503	86 (41 – 151)	11 (7.5 – 17)	287	194 (110 – 426)	25 (16 – 39)
Bt459	540	100 (61 – 148)	13 (8.6 – 20)	303	< 300	
<b>THIACLOPRID</b>				<b>PYMETROZINE</b>		
GR176	507	11 (4.2 – 22)	-	724	77 (19 – 293)	-
Bt448	357	< 30		450	246 (71 – 514)	3.2 (0.9 – 11)
Bt449		> 100	> 9.1		> 1000	> 13
Bt450		> 100	> 9.1			
Bt453	669	> 3000	> 273	347	18240 (9687 – 62561)	183 (88 – 379)
Bt454	634	> 3000	> 273	414	< 300	
Bt455	299	> 3000	> 273		> 10000	> 130
Bt457	302	1650 (742 – 4287)	157 (81 – 304)		> 30000	> 390
Bt458		> 3000	> 273	271	2136 (1008 – 5953)	28 (9.5 – 80)
Bt459	360	> 3000	> 273	534	4053 (1742 – 15415)	52 (18 – 151)

†αριθμός ατόμων αλευρώδη που εξετάστηκαν

‡LC, lethal concentration (mg / L): συγκέντρωση που θανατώνει το 50% του πληθυσμού

¶RR, resistance ratio: συντελεστής ανθεκτικότητας = LC<sub>50</sub> πληθυσμού / LC<sub>50</sub> GR176

### 2.2.2 Χαρακτηρισμός της ανθεκτικότητας στα νεονικοτινοειδή

Στον πίνακα 21 παρουσιάζονται τα τοξικολογικά αποτελέσματα των τριών ανθεκτικών στα νεονικοτινοειδή στελεχών και των πατρικών πληθυσμών από τους οποίους προήλθαν, στα 4 προαναφερθέντα σκευάσματα, καθώς και στο πυρεθρινοειδές deltamethrin.

Όσον αφορά τα imidacloprid και acetamiprid παρατηρήθηκε αύξηση της ανθεκτικότητας μετά την εργαστηριακή επιλογή σε σχέση με τους πατρικούς τους πληθυσμούς. Τα υψηλότερα επίπεδα ανθεκτικότητας στο imidacloprid τα εμφάνισε το επιλεγμένο με acetamiprid στέλεχος (RR=56). Τα ανθεκτικά στελέχη Bt454\_ACE\_SEL6 και Bt459\_IMI\_SEL6 εμφάνισαν τα υψηλότερα επίπεδα ανθεκτικότητας στο acetamiprid, 16- και 17- φορές αντίστοιχα. Επιπλέον, εντοπίστηκαν μειωμένα επίπεδα ανθεκτικότητας στο thiacloprid σε σχέση με τα πατρικά στελέχη, τα οποία όμως παρέμειναν σε πολύ υψηλά επίπεδα, ενώ στο pymetrozine παρατηρήθηκε μικρή αύξηση της ανθεκτικότητας μόνο στο

στέλεχος Bt459. Τέλος, σε όλα τα ανθεκτικά στελέχη παρατηρήθηκαν χαμηλά επίπεδα ανθεκτικότητας στο deltamethrin, μέχρι 4.9- φορές.

**Πίνακας 21: Αποτελέσματα θνησιμότητας πληθυσμών αλευρώδη σε 5 δραστικές ουσίες**

Στέλεχος	n	LC50 (95%CI)	slope ± SE	RR (95%CI)
<b>Imidacloprid</b>				
GR176	580	7.5 (5.4 - 10)	1.33 ± 0.11	-
Bt_450_PARENTAL	699	82 (61 - 107)	1.39 ± 0.13	11 (7.2 - 16)
Bt_450_IMI_SEL6	451	177 (55 - 336)	1.07 ± 0.15	24 (14 - 39)
Bt_454_PARENTAL	586	69 (46 - 98)	1.33 ± 0.12	9.2 (6.1 - 14)
Bt_454_ACE_SEL6	479	423 (258 - 657)	1.04 ± 0.14	56 (36 - 87)
Bt_459_PARENTAL	547	176 (82 - 268)	1.94 ± 0.27	23 (15 - 35)
Bt_459_IMI_SEL6	479	301 (186-443)	1.72 ± 0.16	40 (28 - 58)
<b>Acetamiprid</b>				
GR176	503	7.9 (5.1 - 11)	1.38 ± 0.18	-
Bt_450_PARENTAL	402	49 (33 - 69)	2.08 ± 0.22	6.2 (3.9 - 9.6)
Bt_450_IMI_SEL6	460	71 (42 - 105)	1.37 ± 0.15	9.0 (5.3 - 15)
Bt_454_PARENTAL	442	44 (20 - 80)	1.37 ± 0.14	5.6 (3.5 - 9.0)
Bt_454_ACE_SEL6	539	128 (54 - 205)	1.46 ± 0.19	16 (9.2 - 29)
Bt_459_PARENTAL	391	56 (28.- 90)	1.88 ± 0.21	7.1 (4.4 - 11)
Bt_459_IMI_SEL6	535	137 (110-163)	3.13 ± 0.36	17 (11 - 26)
<b>Thiacloprid</b>				
GR176	517	11 (4.2 - 22)	0.95 ± 0.09	-
Bt_450_PARENTAL	422	>30000		>2857
Bt_450_IMI_SEL6	281	10477 (3373 - 21100)	0.86 ± 0.17	994 (457 - 2161)
Bt_454_PARENTAL	403	>30000		>2857
Bt_454_ACE_SEL6	300	9740 (835 - 27145)	0.63 ± 0.15	924 (378 - 2259)
Bt_459_PARENTAL	523	>30000		>2857
Bt_459_IMI_SEL6	320	13061 (5253-25522)	1.52 ± 3.14	1239 (720 - 2134)
<b>Pymetrozine</b>				
GR176	724	78 (19 - 293)	0.44 ± 0.05	-
Bt_450_PARENTAL	401	>30000		>387
Bt_450_IMI_SEL6	402	>30000		>387
Bt_454_PARENTAL	422	>30000		>387
Bt_454_ACE_SEL6	280	>30000		>387
Bt_459_PARENTAL	453	1957(316-8198)	0.65 ± 0.08	25 (9.2 - 69)
Bt_459_IMI_SEL6	324	3860 (920 - 20100)	0.94 ± 0.10	50 (14 - 77)
<b>Deltamethrin</b>				
GR176	421	212 (81 - 419)	1.14 ± 0.16	-
Bt_450_PARENTAL	346	456 (372 - 550)	2.33 ± 0.21	2.1 (1.2 - 3.5)
Bt_450_IMI_SEL6	476	678 (400 - 1107)	1.59 ± 0.15	3.1 (1.8 - 5.2)
Bt_454_PARENTAL	348	608 (280 - 938)	2.18 ± 0.29	2.7 (1.5 - 4.8)
Bt_454_ACE_SEL6	394	920 (521 - 1287)	2.72 ± 0.33	4.1 (2.4 - 7.1)
Bt_459_PARENTAL	467	1083 (573 - 1356)	5.06 ± 0.87	4.9 (2.9 - 8.2)
Bt_459_IMI_SEL6	470	462 (291 - 665)	1.94 ± 0.18	2.1 (1.2 - 3.6)

†αριθμός ατόμων αλευρώδη που εξετάστηκαν

‡LC, lethal concentration (mg / L): συγκέντρωση που θανατώνει το 50% του πληθυσμού

¶RR, resistance ratio: συντελεστής ανθεκτικότητας = LC<sub>50</sub> στελέχους / LC<sub>50</sub> GR176

\*Slope και SE: κλίση ευθείας και απόκλιση

Ακολούθως αξιολογήθηκε η επίδραση του ενζυμικού παρεμποδιστή PBO στην ανθεκτικότητα του imidacloprid. Παρατηρήθηκε μερική επίδραση του συνεργιστή στην ανθεκτικότητα για τα στελέχη Bt450\_IMI\_SEL6 (SR= 3.3) και Bt454\_ACE\_SEL6 (SR= 2.2) και καμία επίδραση στο στέλεχος Bt459\_IMI\_SEL6 (SR= 1.1) (Πίν. 22).

Πίνακας 22: Αποτελέσματα βιοδοκιμών με τον συνεργιστή PBO στα ανθεκτικά στελέχη.

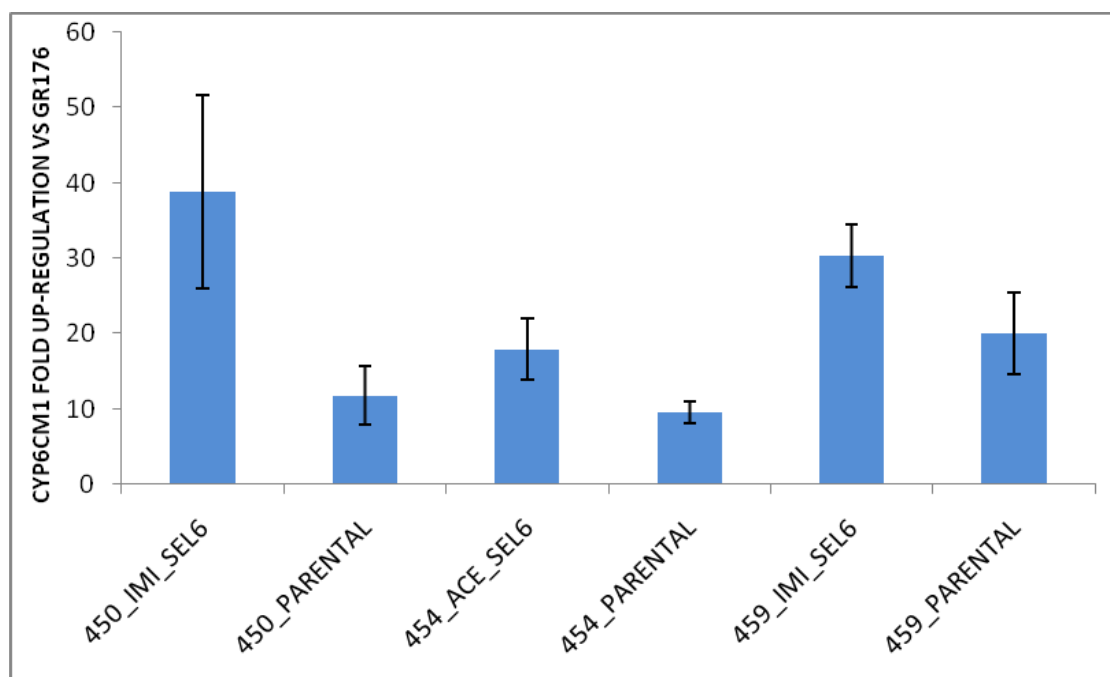
<b>Στέλεχος</b>	<b>n</b>	<b>LC50 (95%CI)</b>	<b>slope ± SE</b>	<b>RR (95%CI)</b>	<b>SR (95%CI)</b>
GR176	580	7.5 (5.4 - 10)	1.33 ± 0.11	-	
Bt_450_IMI_SEL6	451	177 (55 - 336)	1.07 ± 0.15	24 (14 - 39)	-
Bt_450_IMI_SEL6+PBO	425	53 (11 - 149)	0.73 ± 0.12	7.0 (3.1 - 16)	3.3 (1.4 - 7.9)
Bt_454_ACE_SEL6	479	423 (258 - 657)	1.04 ± 0.14	56 (36 - 87)	-
Bt_454_ACE_SEL6+PBO	433	191 (67 - 405)	1.12 ± 0.23	25 (14 - 45)	2.2 (1.2 - 3.9)
Bt_459_IMI_SEL6	479	301 (186-443)	1.72 ± 0.16	40 (28 - 58)	-
Bt_459_IMI_SEL6+PBO	435	265 (187 - 350)	4.17 ± 0.66	35 (25 - 50)	1.1 (0.9 - 1.5)

\*SR: synergistic ratio = LC50 χωρίς συνεργιστή / LC50 με συνεργιστή  
 Συγκέντρωση PBO = 100 mg/L

Πίνακας 23: Υπολογισμός ενεργότητας ενζύμων αποτοξικοποίησης με ενζυμικά υποστρώματα για τα 7 στελέχη αλευρώδη.

Στέλεχος	CCEs			GSTs	P450s
	nmole a naphthol /min/mg	nmole b naphthol /min/mg	p-NPA μmole /min/mg	CDNB μmole /min/mg	pmole7OH /min/mg
Bt450_IMI_SEL6	352	439	4630	0.19	2208
Bt450_PARENTAL	285	376	4482	0.13	1242
Bt454_ACE_SEL6	310	452	5650	0.062	1499
Bt454_PARENTAL	284	382	3739	0.075	1324
Bt459_IMI_SEL6	283	354	4219	0.14	1255
Bt459_PARENTAL	269	317	2704	0.11	1366
GR176	185	294	1011	0.14	919

Για την διερεύνηση της συμμετοχής των ενζύμων αποτοξικοποίησης στην ανθεκτικότητα διενεργήθηκε ενζυμική ανάλυση με κατάλληλα υποστρώματα για εστεράσες, GSTs και κυτοχρωμικές οξειδάσες (P450s) (Πίν. 23). Παρατηρήθηκε σχετικά αυξημένη ενεργότητα των εστερασών, με τα τρία ενζυμικά υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν σε όλα τα ανθεκτικά στελέχη, σε σχέση με το ευαίσθητο στέλεχος αναφοράς. Δεν παρατηρήθηκαν ωστόσο σημαντικές διαφορές μεταξύ των επιλεγμένων και των πατρικών στελεχών. Όσον αφορά τις P450s όλα τα στελέχη εμφάνισαν αυξημένη ενεργότητα σε σχέση με το ευαίσθητο στέλεχος. Η υψηλότερη ενεργότητα των P450s εντοπίστηκε στο στέλεχος Bt450\_IMI\_SEL6. Το συγκεκριμένο στέλεχος ήταν το μόνο που εμφάνισε αυξημένη ενεργότητα σε σχέση με το πατρικό του στέλεχος, περίπου 2- φορές. Αντίθετα, οι GSTs φαίνεται να μην εμπλέκονται στην ανθεκτικότητα στα νεονικοτινειδή, καθώς δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στην ενεργότητα μεταξύ των ανθεκτικών στελεχών και του ευαίσθητου.



**Εικόνα 14:** Επίπεδα έκφρασης της CYP6CM1 σε στελέχη αλευρώδη σε σχέση με το ευαίσθητο στέλεχος αναφοράς GR176.

Στην συνέχεια με real-time PCR μελετήσαμε τα επίπεδα έκφρασης της CYP6CM1 στα προαναφερθέντα στελέχη σε σχέση με το ευαίσθητο στέλεχος GR176 (Πίν. 23). Όπως φαίνεται από το παρακάτω γράφημα και τα τρία ανθεκτικά στελέχη εμφανίζουν αυξημένα επίπεδα έκφρασης της CYP6CM1 σε σχέση, τόσο με τα πατρικά στελέχη, όσο και με το ευαίσθητο. Στα 2 επιλεγμένα στο imidacloprid (450\_IMI\_SEL6 και 459\_IMI\_SEL6)

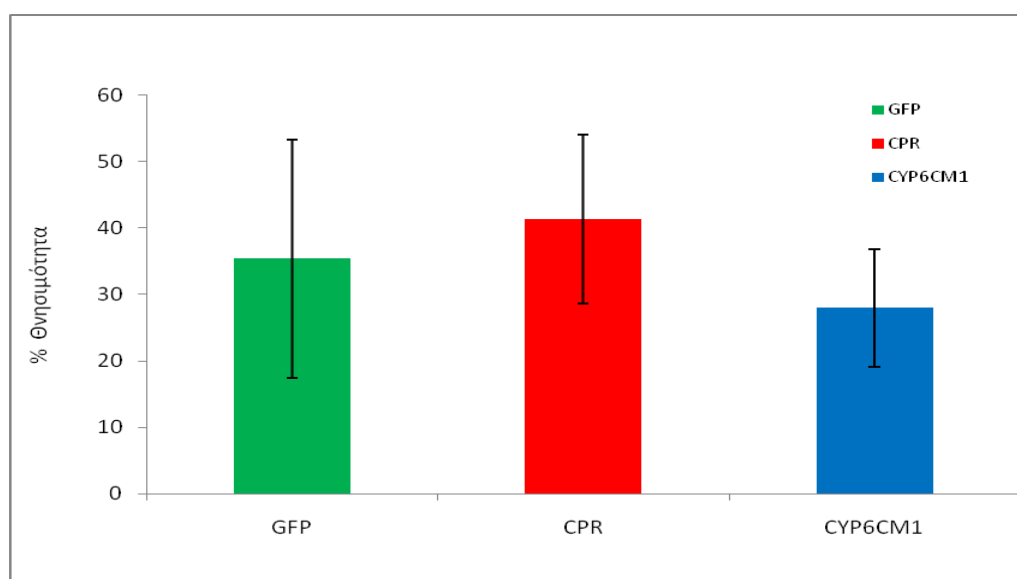


εντοπίστηκαν τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης, 39 και 30 φορές αντίστοιχα, ενώ τα επίπεδα έκφρασης του 454\_ACE\_SEL6 ήταν επίσης υψηλά (18 φορές) σε σχέση με τον ευαίσθητο GR176 (Εικ. 14).

### 2.2.3 RNAi και αξιολόγηση σίγησης

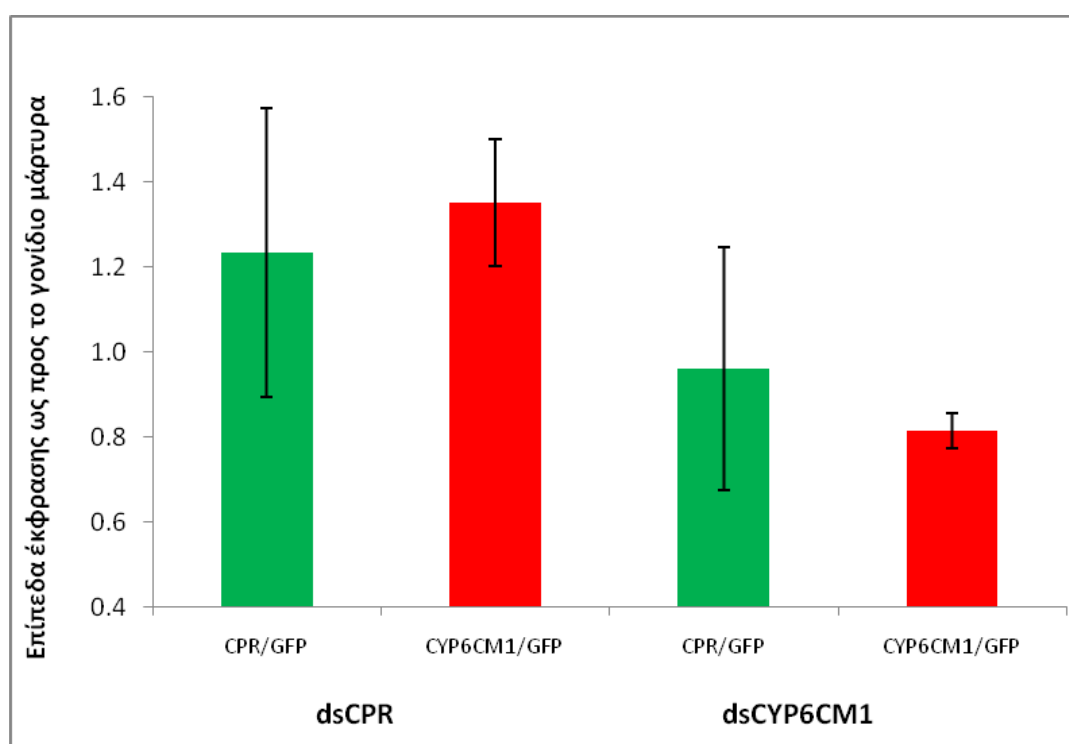
Στην συνέχεια αναπτύξαμε RNAi μεθοδολογία μέσω τεχνητής τροφής για την σίγηση των γονιδίων της CPR και της CYP6CM1 (θετικός μάρτυρας) σε σχέση με την GFP. Χρησιμοποιήθηκε το επιλεγμένο στέλεχος Bt450\_IMI\_SEL5, το οποίο εμφάνισε τα την υψηλότερη ενεργότητα των P450s και τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης της CYP6CM1. Η αποτελεσματικότητα της σίγησης μετά από 72 ώρες διατροφής αξιολογήθηκε τόσο με βιοδοκιμή σε imidacloprid, όσο και με έλεγχο των επιπέδων έκφρασης με real-time PCR (Εικ. 15 και 16).

Ακμαία άτομα αλευρώδη αφέθηκαν να τραφούν σε τροφή που είχε ενσωματωθεί dsRNA. Δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στην θνησιμότητα σε διάστημα 72 ωρών, μεταξύ των διαφορετικών επεμβάσεων. Στην συνέχεια ακολούθησε βιοδοκιμή με δόση imidacloprid που προκαλεί χαμηλή θνησιμότητα στο συγκεκριμένο στέλεχος (περίπου 30%). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι δεν παρατηρήθηκε αυξημένη θνησιμότητα στα άτομα που είχαν τραφεί με δίκλωνο RNA στα δύο γονίδια στόχους (CPR και CYP6CM1) σε σχέση με τα άτομα που είχαν τραφεί με GFP. Και στις δύο περιπτώσεις οι αλευρώδεις εμφάνισαν παρόμοιο ποσοστό θνησιμότητας με τον μάρτυρα.



Εικόνα 15: Ποσοστά θνησιμότητας σε βιοδοκιμή με 100 ppm imidacloprid μετά από 72 ώρες διατροφής σε δίαιτα με dsRNA.

Στην συνέχεια επαναλήφθηκε η χορήγηση δίκλωνου RNA και μετά από 72 ώρες διατροφής, ακμαία άτομα συλλέχθηκαν και έγινε έλεγχος των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων CYP6CM1 και CPR με real time PCR. Ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η ριβοσωμική πρωτεΐνη RPL29. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην εικόνα 16. Δεν παρατηρήθηκε μειωμένη έκφραση της CPR και της CYP6CM1 σε άτομα που είχαν τραφεί σε δίαιτα με dsCPR. Παρατηρήθηκε ωστόσο μια μικρή μείωση στα επίπεδα έκφρασης της CYP6CM1 στα άτομα που είχαν τραφεί με dsCYP6CM1, κατά 0.2 φορές, σε σχέση με τα άτομα που τράφηκαν με dsGFP, η οποία όμως δεν είναι στατιστικά σημαντική.



Εικόνα 16: Επίπεδα έκφρασης των γονιδίων στόχων CPR και CYP6CM1 σε σχέση με το GFP σε άτομα αλευρώδη που έχουν τραφεί με dsRNA για τα δύο γονίδια στόχους.

### 2.3 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Εντοπίστηκαν υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας των φυσικών πληθυσμών στα σκευάσματα που εξετάστηκαν. Τα LC50s στο imidacloprid ήταν σε παρόμοια επίπεδα με προηγούμενη εκτεταμένη μελέτη σε Κρητικούς πληθυσμούς (Roditakis et al., 2009). Το *B. tabaci* ήταν το πρώτο είδος στο οποίο αναπτύχθηκε ανθεκτικότητα σε ένα νεονικοτινοειδές, τονίζοντας παράλληλα την ιδιότητα του ως σημαντικό εχθρό των καλλιεργειών, γεγονός που καθιστά την διαχείριση της ανθεκτικότητας του είδος απαραίτητη (Denholm et al., 1998; Nauen and Denholm, 2005). Η πρώτη αναφορά ανθεκτικότητας στο imidacloprid προήλθε από Q βιότυπου αλευρώδη την από την περιοχή Αλμερία το 1994 (Cahill et al.,

1996). Η πρώτη καταγεγραμμένη αναφορά ανθεκτικότητας Β βιότυπου προήλθε από την Γουατεμάλα (Byrne et al., 2003). Τα επόμενα χρόνια ακολούθησαν εκτεταμένες αναφορές ανθεκτικότητας του αλευρώδη στα νεονικοτινοειδή (Horowitz et al., 2004; Luo et al., 2010; Nauen and Denholm, 2005; Roditakis et al., 2009; 2011; Vassiliou et al., 2011). Στους πληθυσμούς που συλλέχθηκαν από την Κρήτη εντοπίστηκαν επίσης μέτρια έως υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας στο acetamiprid και πολύ υψηλά επίπεδα στα thiacloprid και pymetrozine. Τα πολύ υψηλά επίπεδα μπορούν να εξηγηθούν από εκτεταμένο ιστορικό ψεκασμών με τα δύο αυτά σκευάσματα, στις θερμοκηπιακές καλλιέργειες από όπου συλλέχθηκαν οι πληθυσμοί.

Η εργαστηριακή επιλογή αύξησε τα επίπεδα ανθεκτικότητας σε σχέση με τα πατρικά τους στελέχη. Παρατηρήθηκε ότι η εργαστηριακή επιλογή με acetamiprid αύξησε τα επίπεδα ανθεκτικότητας στο imidacloprid. Αντίθετα η επιλογή με imidacloprid δεν προκάλεσε αύξηση της ανθεκτικότητας στο acetamiprid. Είναι πιθανό η ανθεκτικότητα στο acetamiprid να προκαλεί διασταυρωτή ανθεκτικότητα στο imidacloprid, και όχι το αντίστροφο. Επίσης, η εργαστηριακή επιλογή με τα δύο προαναφερθέντα νεονικοτινοειδή προκάλεσε μείωση της ανθεκτικότητας στο τρίτο νεονικοτινοειδές thiacloprid. Επιπλέον, τα νεονικοτινοειδή δεν φαίνεται να εμφανίζουν διασταυρωτή ανθεκτικότητα με το πυρεθρινοειδές deltamethrin.

Οι βιοδοκιμές με τον ενζυμικό παρεμποδιστή PBO έδειξε μερική συμμετοχή των P450s στην ανθεκτικότητα του imidacloprid σε δύο από τα τρία επιλεγμένα στελέχη. Ευαισθησία ανακτήθηκε σε ανθεκτικούς σε imidacloprid πληθυσμούς *B. tabaci* μετά την εφαρμογή του συνεργιστή PBO, υποδηλώνοντας την συμμετοχή των μονοοξυγενασών στην ανθεκτικότητα (Nauen et al., 2002). Βιοχημικά πειράματα με ενζυμικά υποστρώματα έδειξαν αυξημένη ενεργότητα κυρίως των P450s και δευτερευόντως των εστερασών, αλλά όχι των GSTs και στα τρία ανθεκτικά στελέχη. Αυξημένη ενεργότητα των P450s έχει επίσης βρεθεί να σχετίζεται με την ανθεκτικότητα στο imidacloprid (Rauch and Nauen, 2003; Roditakis et al., 2009). Ωστόσο η πιθανή συμμετοχή των εστερασών στην ανθεκτικότητα είναι υπό διερεύνηση.

Η συμμετοχή μιας συγκεκριμένης P450, της CYP6CM1, έχει βρεθεί ως ο κύριος μηχανισμός ανθεκτικότητας στο imidacloprid (Karunker et al., 2008). Η συγκεκριμένη P450 μεταβολίζει τα imidacloprid, clothianidin, thiacloprid και pymetrozine, αλλά όχι τα acetamiprid και thiamethoxam (Karunker et al., 2009; Roditakis et al., 2011; Nauen et al., 2013). Παρατηρήθηκαν υψηλά επίπεδα έκφρασης της CYP6CM1 και στα τρία ανθεκτικά στελέχη, ενώ υψηλότερα επίπεδα εντοπίστηκαν στα δύο ανθεκτικά στο imidacloprid. Το

επιλεγμένο στο acetamiprid στέλεχος, παρότι εμφάνισε τα υψηλότερα επίπεδα στο imidacloprid είχε τα χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης της CYP6CM1. Είναι πιθανή η συμμετοχή επιπρόσθετου μηχανισμού ανθεκτικότητας στο acetamiprid, πέραν της CYP6CM1, δεδομένου ότι η συγκεκριμένη P450 δεν μεταβολίζει το acetamiprid. Αυτός ο ισχυρισμός πιθανόν θα επιβεβαιωθεί με βαθιά αλληλούχιση μεταγραφώματος (RNA-seq) των προαναφερθέντων ανθεκτικών στα imidacloprid και acetamiprid στελεχών. Σημαντικός αριθμός γονιδίων αποτοξικοποίησης βρέθηκαν να υπερεκφράζονται στα ανθεκτικά στελέχη, είτε από κοινού είτε σε ένα από τα δύο. Πιο συγκεκριμένα, εντοπίστηκε σημαντική υπερέκφραση μελών της οικογένειας των P450s, εκτός της CYP6CM1, καθώς και γονίδια εστερασών και GSTs. Ωστόσο και η πιθανή συμμετοχή ανθεκτικότητας στόχου δεν μπορεί να αποκλειστεί πλήρως (Tsagkarakou et al., unpublished). Σε πρόσφατη παρόμοια εργασία αλληλούχισης μεταξύ ανθεκτικού και ευαίσθητου στελέχους στο νεονικοτινοειδές thiamethoxan, το οποίο επίσης δεν μεταβολίζεται από την CYP6CM1, εντοπίστηκαν αρκετά γονίδια που σχετίζονται με την αποτοξικοποίηση, όπως P450s, GSTs και ABC transporters (Yang et al., 2013a).

Τέλος, έγινε προσπάθεια σίγησης μέσω τροφής για τα γονίδια των πρωτεϊνών CYP6CM1 και CPR. Η πρώτη χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας, εφόσον ο ρόλος της στον μεταβολισμό είναι γνωστός, ενώ η δεύτερη επειδή ελέγχει το μεταβολικό μονοπάτι των P450s. Ακολουθήθηκε παρόμοια μεθοδολογία με προηγούμενη εργασία σε αλευρώδη όπου η σίγηση ήταν επιτυχής (Uradhyay et al., 2011), ωστόσο τα αποτελέσματα ήταν αρνητικά. Στην εργασία αυτή είχε επιτευχθεί η σίγηση των γονιδίων actin ortholog, ADP/ATP translocase,  $\alpha$ -tubulin, ribosomal protein L9 (RPL9) και V-ATPase A subunit, γονίδια τα οποία εκφράζονται στην περιοχή του στομάχου κυρίως. Παρατηρήθηκε μικρή μείωση της έκφρασης της CYP6CM1, που εκφράζεται σε ιστούς γύρω από το στομάχι, και πιθανότατα αποτελεί ευκολότερο στόχο σίγησης μέσω τροφής. Αντιθέτως η CPR εκφράζεται σε διάφορους ιστούς και όργανα των εντόμων και η επίτευξη της σίγησης είναι δυσκολότερη. Πιθανόν θα μπορούσε να δοκιμαστεί χορήγηση dsRNA μέσω μικροενέσεων, μέθοδος που έχει εφαρμοστεί με επιτυχία σε άλλα είδη εντόμων (Huvette and Smagghe, 2009), ωστόσο λόγω του μικρού μεγέθους του αλευρώδη ενδέχεται να προκληθούν αυξημένα ποσοστά θνησιμότητας. Η μικρή διάρκεια χορήγησης του δίκλωνου RNA πιθανόν να οφείλεται για την μη αποτελεσματική σίγηση. Μεγαλύτερη διάρκεια χορήγησης μπορεί να ελεγχθεί μέσω διατροφής σε διαγονιδιακά φυτά καπνού, που εκφράζουν CPR και CYP6CM1 (Σε εξέλιξη, Ελένη Σιώζιου, 2013).

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΣΥΧΝΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΡΟΗΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΤΟΧΟΥ ΣΕ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥΣ ΤΕΤΡΑΝΥΧΟΥ ΑΠΟ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΕΣ ΠΕΡΙΟΧΕΣ**

### **3.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

Αρκετές διαφορετικές ομάδες εντομοκτόνων έχουν χρησιμοποιηθεί για τον έλεγχο του τετράνυχου *Tetranychus urticae*, από τα παλαιότερα οργανοφωσφορικά και καρβαμιδικά (1950-1960), που στοχεύουν την ακετυλοχολινεστεράση, τα πυρεθρινοειδή και τις αβερμεκτίνες (1970-1980) με στόχο τους διαύλους νατρίου και χλωρίου αντίστοιχα, έως και τα πιο πρόσφατα etoxazole και bifenazate (1998-99). Οι πρώτες αποτυχίες στην καταπολέμηση των ενώσεων αυτών εμφανίστηκαν αμέσως μετά την εισαγωγή τους στα προγράμματα καταπολέμησης, από τις αρχές του 1950 για τα OPs (Helle, 1962) και μέχρι τα τελευταία 5 χρόνια για τα etoxazole και bifenazate (Van Leeuwen et al., 2009).

Πολλοί μηχανισμοί ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα έχουν προσδιοριστεί σε μοριακό επίπεδο για τον *T. urticae*, ειδικότερα αυτοί που σχετίζονται με διαφοροποιήσεις στις θέσεις στόχους των εντομοκτόνων. Οι μεταλλαγές ανθεκτικότητας στόχου περιλαμβάνουν, τις μεταλλαγές στην ακετυλοχολινεστεράση (*ace*) G119S, A201S, T280A, G328A και F331W, τις F1538I, A1215D, L1024V στα κανάλια μεταφοράς ιόντων νατρίου (VGSC), τις G314D και G326E των διαύλων χλωρίου (GluCl), τις G126S, I136T, S141F, D161G και P262T του κυτοχρώματος β (*cytb*) και την I1017F στο γονίδιο της συνθετάσης της χιτίνης 1 (CHS1) (Πίν. 1, εισαγωγή).

Η γνώση της εξελικτικής προέλευσης των αλληλόμορφων ανθεκτικότητας, καθώς και της διασποράς και γεωγραφικής τους κατανομής, είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη των κατάλληλων τακτικών διαχείρισης της ανθεκτικότητας. Η ανθεκτικότητα αντιπροσωπεύει ένα κλασικό παράδειγμα μικρο-εξέλιξης κάτω από ανθρωπογενή επιλογή. Η ανάπτυξη της εξαρτάται από την ένταση της επιλογής, το κόστος αρμοστικότητας (*fitness cost*) των ανθεκτικών αλληλόμορφων και τη ροή γονιδίων μεταξύ των πληθυσμών. Σε πολλές περιπτώσεις η ανθεκτικότητα φαίνεται να έχει πολλαπλή προέλευση, που μπορεί να συνέβη σε διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές ανεξάρτητα. Σημειακές μεταλλαγές στο VGSC των *Myzus persicae*, *Bemisia tabaci*, *Anopheles gambiae*, *Musca domestica* (Anstead et al., 2005; Alon et al., 2006; Pinto et al., 2007; Rinkevich et al., 2012), στους υποδοχείς γ-αμινοβουτυρικού οξέως (GABA) του *Tribolium castaneum* (Andreev et al., 1999) και σε γονίδια εστερασών του *Lucilia cuprina* (Newcomb et al., 2005) είναι χαρακτηριστικές

περιπτώσεις που υπάγονται σε αυτήν την κατηγορία. Ωστόσο, οι μεταλλαγές ανθεκτικότητας μπορεί να συνέβησαν μία φορά και να εξαπλώθηκαν παγκοσμίως μέσω ενεργής μετανάστευσης, που μπορεί να διευκολύνεται από ανθρωπογενείς δραστηριότητες (μεταφορά, διεθνές εμπόριο). Μοναδική προέλευση και παγκόσμια διασπορά μιας P450 που σχετίζεται με της ανθεκτικότητα του *Drosophila melanogaster* στο DTT (Daborn et al., 2002) και γονίδια εστερασών που προσδίδουν μεταβολική ανθεκτικότητα στο *Culex pipiens* (Raymond et al., 1991; Guillemaud et al., 1996; Labbé et al., 2005) είναι χαρακτηριστικές περιπτώσεις.

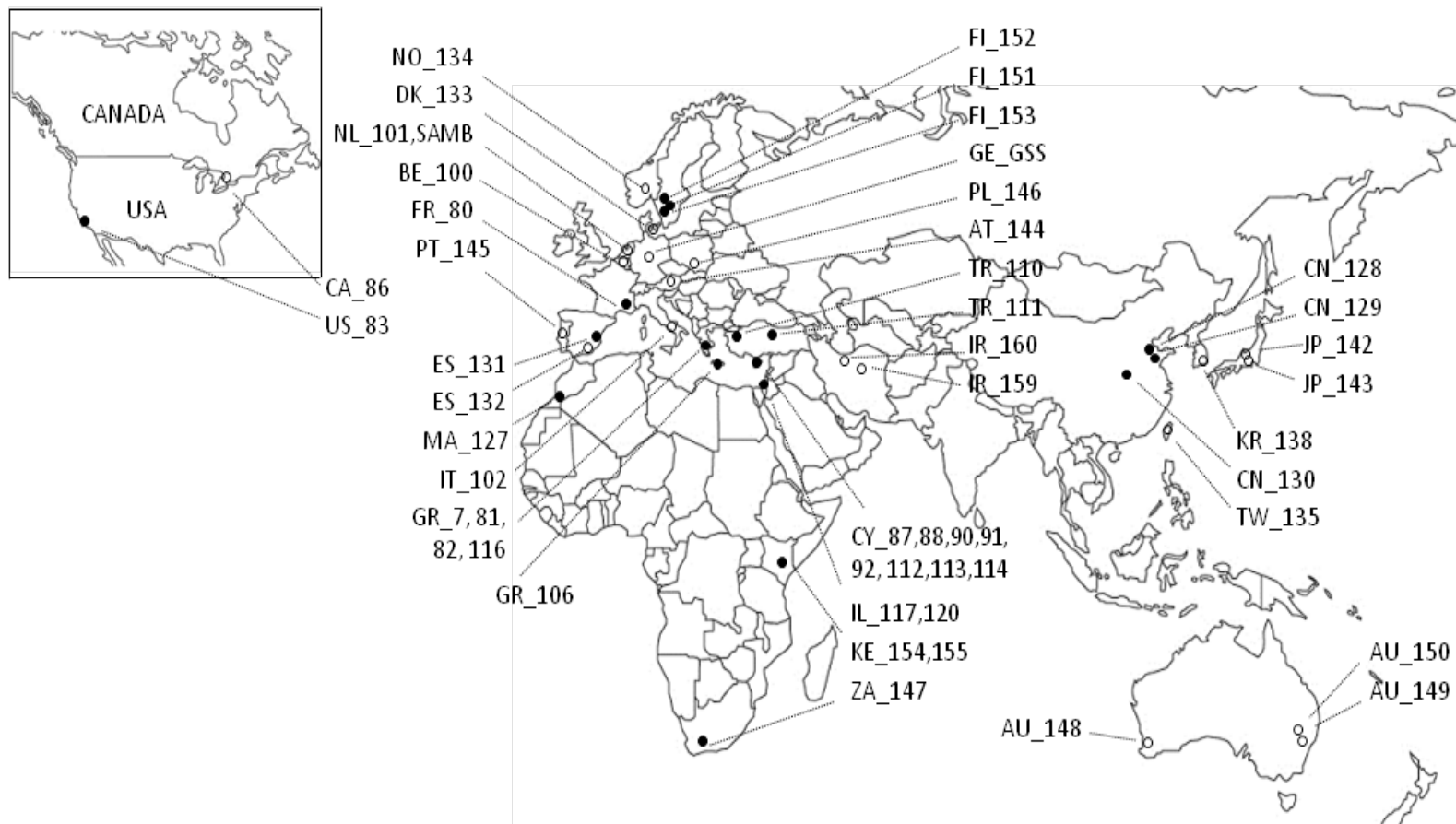
Ο *T. urticae* θεωρείται ένα πολύ χρήσιμο μοντέλο για τη μελέτη των μηχανισμών ανθεκτικότητας και την εξέλιξή τους στον αγρό, για διάφορους λόγους: (α) είναι ένα παγκοσμίως διαδεδομένο και εξαιρετικά πολυφάγο είδος με περισσότερα από 1000 φυτά ξενιστές, συμπεριλαμβανομένων καλλιεργειών μεγάλης οικονομικής σημασίας (Migeon and Dorkeld, 2010); (β) ένα ευρύ φάσμα εντομοκτόνων και ακαρεοκτόνων χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο του, ενώ κατατάσσεται ανάμεσα στα πιο ανθεκτικά αρθρόποδα και μεταξύ αυτών με το υψηλότερο ιστορικό ανθεκτικότητας ([http:// pesticideresistance.org /DB](http://pesticideresistance.org/DB)); (γ) η αρρενοτόκος παρθενογένεση, ο μικρός βιολογικός κύκλος και η υψηλή αναπαραγωγική ικανότητα σε συνδυασμό με την ισχυρή επιλογή τον καθιστούν πολύ χρήσιμο γενετικό μοντέλο; (δ) η ύπαρξη γενετικά δομημένων (genetically structured) πληθυσμών (Tsagkarakou et al., 1998; 1999; Navajas et al., 2002), πολύ συχνά αναπαραγωγικά απομονωμένων (reproductively isolated) (De Boer, 1985), ευθύνεται για την μειωμένη γονιδιακή ροή μεταξύ των πληθυσμών.

Στο κεφάλαιο αυτό εξετάστηκε η παρουσία και η συχνότητα των μεταλλαγών ανθεκτικότητας στόχου που προσδίδουν ανθεκτικότητα εναντίων σκευασμάτων, με διαφορετικές χρονικές περιόδους εισαγωγής στον έλεγχο του τετράνυχου, σε ένα μεγάλο αριθμό πληθυσμών που συλλέχθηκαν παγκοσμίως. Επιπροσθέτως, εξετάζοντας τους πολυμορφισμούς σε κωδικές και μη κωδικές περιοχές του *ace*, ερευνήθηκε η εξελικτική προέλευση των μεταλλαγών της ακετυλοχολινεστεράσης, στόχος των οργανοφωσφορικών και καρβαμιδικών, εντομοκτόνα με το παλαιότερο ιστορικό εφαρμογής στον τετράνυχο.

## 3.2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 3.2.1 Συλλογές τετράνυχου

Συνολικά 51 συλλογές *T. urticae* από 27 χώρες και 5 Ηπείρους, κυρίως από την Ευρώπη, χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση (Εικ. 17).



Εικόνα 17: Χάρτης με την προέλευση των 51 δειγμάτων τετράνυχου που χρησιμοποιήθηκαν. Οι πλήρεις και οι κενοί κύκλοι υποδηλώνουν τους 30 φυσικούς πληθυσμούς και 21 εργαστηριακά στελέχη αντίστοιχα.

Τριάντα από τις συλλογές προήλθαν από τον αγρό και 21 από εργαστηριακά στελέχη. Δύο εργαστηριακές συλλογές (AU\_150 και IR\_159) ήταν ανθεκτικές σε OPs και abamectin αντίστοιχα. Οι πληροφορίες για τις συλλογές εμφανίζονται στον πίνακα 24.

**Πίνακας 24: Όνομα, χώρα, ξενιστής και χρόνος συλλογής των 51 δειγμάτων τετράνυχων.**

Code	Field/Lab	Country	Location	Host collected	Year collected
GR_7	Field	Greece	Marathonas	Rose	2007
GR_82	Field	Greece	Marathonas	Rose	2010
GR_81	Field	Greece	Peloponessus	Citrus	2010
GR_116	Field	Greece	Peloponessus	Bean	2011
GR_106	Field	Greece	Crete	Rose	2010
CY_87	Field	Cyprus	Kelaki	Cucumber	2010
CY_88	Field	Cyprus	Arediou	Rose	2010
CY_90	Field	Cyprus	Pareklisia	Eggplant	2010
CY_91	Field	Cyprus	Pareklisia	Tomato	2010
CY_92	Field	Cyprus	Akaki	Bean	2010
CY_112	Field	Cyprus	Ksylofagou	Tomato	2011
CY_113	Field	Cyprus	Argakas	Bean	2011
CY_114	Field	Cyprus	Kiti	Tomato	2011
IT_102	Lab	Italy	-	-	-
FR_80	Field	France	Nice	Rose	2010
ES_131	Field	Spain	Castelo De La Plata	Climentine	2011
ES_132	Lab	Spain	Les Alqueries	Climentine	2010
PT_145	Lab	Portugal	Carregado	Tomato	2010
GE_GSS	Lab	Germany	-	-	1965
AT_144	Lab	Austria	-	-	-
NL_SAMB	Lab	Netherlands	-	<i>Sambucus nigra</i>	1965
NL_101	Lab	Netherlands	Hoek Van Holland	Rose	2007
BE_100	Lab	Belgium	Ghent	Rose	2008
PL_146	Lab	Poland	Kalisz	Cucumber	2010
DK_133	Lab	Denmark	Slagelse	-	-
NO_134	Lab	Norway	-	Aspidistra	2000
FI_151	Field	Finland	Kangasala	Rose	2012
FI_152	Field	Finland	Lauhal	Rose	2012
FI_153	Field	Finland	Turku	Rose	2012
MA_127	Field	Morocco	Sidi Bibi	Cucumber	2011
KE_154	Field	Kenya	Nairobi	Rose	2012
KE_155	Field	Kenya	Nairobi	Bean	2012
ZA_147	Field	South Africa	Ceres	Apple	2012
TR_110	Field	Turkey	Salur	Tomato	2011
TR_111	Field	Turkey	Kavak	Tomato	2011
IL_117	Field	Israel	Megadim	<i>Chenopodium sp.</i>	2011
IL_120	Field	Israel	Rehovot	Squash	2011
IR_159	Lab	Iran	Isfahan	Rose	2007
IR_160	Lab	Iran	Rasht	<i>Convolvulus sp.</i>	2007
CN_128	Field	China	Shouguang Weifeng	Eggplant	2011
CN_129	Field	China	Yiyuan Zibo	Apple	2011
CN_130	Field	China	Zhenzhou	-	2011
TW_135	Lab	Taiwan	Taipey	Strawbery	1970
KR_138	Lab	South Korea	-	-	-
JP_142	Lab	Japan	Morokawa Ibaraki	Rose	2006
JP_143	Lab	Japan	Shiunji Niigata	Carnation	2004
AU_148	Lab	Australia	Wenneroo Perth	Rose	-
AU_149	Lab	Australia	Cheltenham	Ornamentals	1987
AU_150	Lab	Australia	Auscott Warren	Cotton	1987
US_83	Field	USA	Riverside	-	2010
CA_86	Lab	Canada	Ontario	-	-



Οι συλλογές διατηρήθηκαν σε 95% αιθανόλη μέχρι να χρησιμοποιηθούν. Διαγνωστικό PCR-RFLP για αναγνώριση του είδους, διενεργήθηκε σε 10 ακμαία θηλυκά άτομα από κάθε συλλογή. Το παραπάνω διαγνωστικό βασίζεται σε διακεκριμένες νουκλεοτιδικές διαφορές του γονιδίου ITS μεταξύ μορφολογικά παρόμοιων ειδών τετρανύχων (Hurtado et al., 2008). Από συνολικά 55 συλλογές, τέσσερις δεν είχαν τυπικό περιοριστικό πρότυπο *T. urticae* και ως εκ τούτου αποκλείστηκαν από την ανάλυση. Όλες οι συλλογές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα ανάλυση ανήκαν στο είδος *T. urticae*, ενώ μείγματα περισσότερων από ένα ειδών δεν εντοπίστηκαν σε καμία συλλογή.

### 3.2.2 Απομόνωση DNA από μεμονωμένα και μαζικά άτομα

Γεωμικό DNA απομονώθηκε με ομογενοποίηση 100 ή μεμονωμένων ακμαίων ατόμων με την μέθοδο CTAB όπως έχει περιγραφεί στο κεφάλαιο 1. Η DNA πελέτα επαναδιαλύθηκε σε 50 και 20 μl νερό για μαζικά και μεμονωμένα άτομα αντίστοιχα.

### 3.2.3 Ανίχνευση μεταλλαγών ανθεκτικότητας στόχου

DNA από μαζικές απομονώσεις 100 ατόμων, συνολικά από 33 συλλογές τετρανύχου, χρησιμοποιήθηκαν ως μήτρα για την ενίσχυση PCR τμημάτων των γονιδίων με εξειδικευμένους εκκινητές (Πίν. 25).

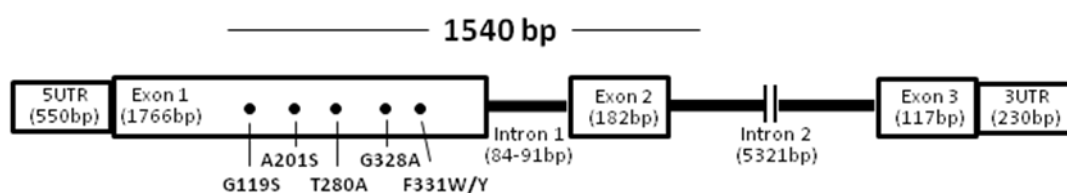
**Πίνακας 25: Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στο παρόν κεφάλαιο και τα προϊόντα ενίσχυσης.**

Primer name	Gene	Sequence (5' - 3')	Amplified product (bp)	Annealing T. (°C)	Reference
UAF_119	ace	GCCTATCAGTAAACATTTGG	639	52	THIS STUDY
UAR_280		AAACCTCGGGATCTTCATCG	(Exon1)		
UAF_1552		ACCTGCCTCTGAATTGGTTG	571	52	THIS STUDY
UAR_331		TGCAGGCGTATAACCATGAAC	(Exon1)		
UAF_INTRON		CTGGATGGGAGTTATTCATG	546-560	52	THIS STUDY
UAR_INTRON		TACATCAACTCAGTATGCTAG	(Intron1-Exon2-Intron2)		
KdrF4	VGSC	CAACATTCAAAGGTTGGACAAT	226	54	Khajehali et al., 2011
KdrR1		TCTTCCGTCATCAACATCTCC		54	Khajehali et al., 2011
KdrF2		TGCATCTCAATTGTCCAAGG	255		
KdrR2		GTTTCTTCCAGGCAACATGG		54	Khajehali et al., 2011
KdrF5		TGATTGTTTTCCGTGCTCTG	292		
KdrR5		CTGCGAAGCTGCTTAAGTCC		58	Dermauw et al., 2012
GluCl1_F1	GluCl1	TTGGATTGACCCTAACTCAGCA	263		
GluCl1_R1		TTGCACCAACAATTCCTTGA		58	Dermauw et al., 2012
GluCl3_F1	GluCl3	CCGGGTCAGTCTTGGTGTTA	251		
GluCl3_R1		CACCACCAAGAACCTGTTGA		54	modified from Khajehali et al., 2011
mcytbWTF	Cytb	AATAATTTTACAAATAACTCATGC	822		
mPEWYR		GAAATTTCTGTAAGGGTATTC		57	modified from Van Leeuwen et al., 2012
TuTuCHS1m_diaF	CHS1	GTCCGCTTGTTATGCACTACT	541		
TuTuCHS1_diaR		GCCACCAAGTGGGTCAAGAT		52	Navia et al., 2005
FOR5.8S	ITS1,5.8S, ITS2	GATCACTCGAATTACCAATCG	661		
28S		ATATGCTTAAATTCAGCGGG			Ben ali et al., 2000

Οι PCR αντιδράσεις (50μl) αποτελούνταν από 1 μl DNA, 0.4 μM εκκινητές, 0.2 mM dNTP's, 5 μl 10 X buffer και 1U Kara Taq DNA polymerase (KAPABIOSYSTEMS). Οι συνθήκες των αντιδράσεων ήταν 95 C για 2 λεπτά και στην συνέχεια 35 κύκλοι από 95 °C για 30 s, 54 - 58 °C για 30 s, 72 °C για 60 s, και τελική ενίσχυση στους 72 °C για 2 λεπτά. Τα προϊόντα των αντιδράσεων καθαρίστηκαν με το kit NucleoSpin Extract II (Macherey–Nagel) και στάλθηκαν για αλληλούχιση. Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα BioEdit 7.0.1.

### 3.2.4 Παραλλακτικότητα της *ace* και γονοτύπηση της ανθεκτικότητας

Για την *ace* απομονώθηκε γενωμικό DNA από συνολικά 139 μεμονωμένα αρσενικά ήθηλυκά άτομα τετράνυχων. Τρία ζεύγη εκκινητών χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε άτομο για ενίσχυση συνολικού τμήματος 1540 βάσεων που περιλάμβανε το πρώτο εξόνιο (με τις 5 μεταλλαγές ανθεκτικότητας), το πρώτο ιντρόνιο, το δεύτερο εξόνιο και ένα τμήμα του δευτέρου ιντρονίου του γονιδίου της *ace* (Εικ. 18).



**Εικόνα 18:** Η δομή του γονιδίου της ακετυλοχολινεστεράσης. Τα εξόνια και τα ιντρόνια συμβολίζονται με τετράγωνα και γραμμές αντίστοιχα. Οι μαύροι κύκλοι υποδηλώνουν τις θέσεις των 5 μεταλλαγών ανθεκτικότητας.

Οι PCR αντιδράσεις (50 μl) αποτελούνταν από 4 μl DNA, 0.4 μM εκκινητές, 0.2 mM dNTP's, 5 μl 10 X buffer και 1U Kara Taq DNA polymerase (KAPABIOSYSTEMS). Οι συνθήκες της αντίδρασης ήταν : 95 °C για 2 min και στην συνέχεια 35 κύκλοι από 95 °C για 30 s, 52 °C για 30 s 72 °C για 60 s, και τελική ενίσχυση στους 72 °C για 2 min. Ακολούθησε καθαρισμός των προϊόντων και αλληλούχιση όπως προαναφέρθηκε στην προηγούμενη ενότητα. Τα PCR προϊόντα που παρουσίασαν διπλές κορυφές στα χρωματογραφήματα απλοειδών αρσενικών ατόμων (4) κλωνοποιήθηκαν για τον διαχωρισμό διαφορετικών αντιγράφων σε pGEM-TEasy (Promega) και αλληλουχήθηκαν. Για κάθε αρσενικό απομονώθηκαν 10 κλώνοι.

### 3.2.5 Φυλογενετική ανάλυση της *ace*

Για την φυλογένεση εξετάστηκε συνολικό προϊόν 1540 βάσεων της *ace*, συμπεριλαμβανομένων των εξονίων 1-2 και των ιντρονίων 1 - 2, χωρίς να λαμβάνονται υπόψη οι πέντε μεταλλαγές ανθεκτικότητας. Ο προσδιορισμός των φυλογενετικών σχέσεων

των απλότυπων πραγματοποιήθηκε στην πλατφόρμα Phylogeny.fr (Dereeper et al., 2008). Οι αλληλουχίες στοιχήθηκαν με το πρόγραμμα MUSCLE (v3.7) (Edgar, 2004) για μεγαλύτερη ακρίβεια. Το φυλογενετικό δέντρο έγινε με την μέθοδο maximum likelihood που παρέχει η πλατφόρμα με το πρόγραμμα PhyML (v3.0 aLRT) (Guindon and Gascuel, 2003). Το μοντέλο HKY85 επιλέχθηκε βάσει του αριθμού των μεταβλητών θέσεων (0.971) και τεσσάρων κατηγοριών gamma-κατανομημένου ρυθμού, για να λάβει υπόψη την ετερογένεια του ρυθμού σε διάφορες θέσεις. Η παράμετρος σχήματος της gamma κατανομής εκτιμήθηκε απευθείας από τα δεδομένα (gamma=0.612). Η αξιοπιστία των εσωτερικών κλάδων εκτιμήθηκε με το aLRT test (SH-like) Η γραφική απεικόνιση του φυλογενετικού δέντρου έγινε με τα πρόγραμμα TreeDyn (v198.3) (Chevenet et al., 2006).

### 3.2.6 Γενεαλογικές σχέσεις των αλληλομόρφων της *ace*

Το πρόγραμμα TCS (Clement et al., 2000) χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή του γενεαλογικού δικτύου και για τον υπολογισμό των γενετικών σχέσεων μεταξύ των απλότυπων. Ο αλγόριθμος του Templeton et al. (1992) χρησιμοποιήθηκε για τους κατά ζεύγη υπολογισμούς του αριθμού των mutational steps μεταξύ των απλοτύπων. Για την ανάλυση αυτή χρησιμοποιήθηκαν απλότυποι συμπεριλαμβανομένων των θέσεων των μεταλλαγών ανθεκτικότητας.

## 3.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 3.3.1 Συχνότητα και γεωγραφική εξάπλωση των μεταλλαγών ανθεκτικότητας στόχου

Η παρουσία των μεταλλαγών ανθεκτικότητας στα γονίδια VGSC, GluCl<sub>s</sub>, Cytb και CHS1 από διαφορετικές συλλογές πραγματοποιήθηκε με απευθείας αλληλούχιση προϊόντων PCR σε DNA που είχε εξαχθεί από 100 άτομα. Παρουσία διπλής κορυφής στην θέση της μεταλλαγής σήμαινε ταυτόχρονη παρουσία ανθεκτικών και ευαίσθητων αλληλομόρφων στο ίδιο δείγμα. Η σύνοψη των μεταλλαγών ανθεκτικότητας που εντοπίστηκαν παρουσιάζονται αναλυτικά στον πίνακα 26.

Στα κανάλια μεταφοράς ιόντων νατρίου η μεταλλαγή F1538I εντοπίστηκε σε εννιά από τις 33 συλλογές *T. urticae*, σε συχνότητα 27%. Η δεύτερη μεταλλαγή, L1024V, εμφανίστηκε σε παρόμοιες συχνότητας (24% του συνόλου των συλλογών). Η τρίτη μεταλλαγή που έχει συσχετιστεί με την ανθεκτικότητα στο ίδιο γονίδιο (A1215D) ήταν η πιο συχνή, παρούσα σε 23 από τα 33 δείγματα και σε συχνότητα 70%.

Πίνακας 26: Γονοτύπηση των αμινοξικών αντικαταστάσεων 33 συλλογών τετράνυχου για τα γονίδια VGSC, GluCl, cytb και GHS1. Παρουσία ανθεκτικού και ευαίσθητου σε μια θέση μεταλλαγής συμβολίζεται με (/). Οι συλλογές IR\_159 και AU\_150 ήταν ανθεκτικές στο abamectin και OPs αντίστοιχα.

Field/Lab	Code	VGSC <sup>a</sup>			GluCl1 <sup>b</sup>	GluCl3 <sup>b</sup>	CHS1 <sup>a</sup>	cytb <sup>a</sup>				
		L1024V	A1215D	F1538I	G314D	G326E	I1017F	G126S	I136T	S141F	D161G	P262T
Field	GR_82	L	D	F	D	E	F	G	I	S	D	P
Field	GR_106	L	A	I	G/D	E	I	G	I	S	D	P
Field	GR_116	L	D	I	G	G	F	G	I	S	D	P
Field	CY_87	V	D	F	G	G	I	G	I	S	D	P
Field	CY_88	L	A/D	I	G	G	I	S	I	S	D	P
Field	CY_112	V	D	F	G	G	I/F	G	I	S	D	P
Field	CY_113	V	D	F	G	G	I	G	I	S	D	P
Field	CY_114	V	D	F	G	G	I	G	I	S	D	P
Field	ES_131	L	D	F	G	G	I	G	I	S	D	P
Field	FR_80	L	A	I	G	G	F	G	I	S	D	P
Field	FI_151	L	D	F	G	E	I	S	I	S	D	P
Field	FI_152	L	A	F	G	E	I	S	I	S	D	P
Field	TR_110	L	D	F	G	G	I	G	I	S	D	P
Field	TR_111	L	D	F	G	G	I/F	G	I	S	D	P
Field	IL_117	L	D	F	G	G	I	G	I	S	D	P
Field	CN_129	L	D	F	G	G	I	G	I	S	D	P
Field	CN_130	L	D	F	G	G	I	G	I	S	D	P
Field	MA_127	V	D	F	G	G	-	G	I	S	D	P
Field	KE_154	L	D	I	G	G/E	F	G	I	S	D	P
Field	KE_155	L	A	F	G	G	I	G	I	S	D	P
Field	ZA_147	L	D	F/I	G	G	I	G	I	S	D	P
Field	US_83	L/V	D	F	G	G	I	G	I	S	D	P
Lab	IT_102	L	D	F	G	G	I	G	I	S	D	P
Lab	PT_145	L	D	F	G	G	I	G	I	S	D	P
Lab	GE_GSS	L	A	F	G	G	I	G	I	S	D	P
Lab	BE_100	L/V	A	F/I	G	E	F	G	I	S	D	T
Lab	NL_101	L	A/D	F	G	G	F	S	T	S	D	P
Lab	DK_133	L	A	F	G	G	I	G	I	S	D	P
Lab	IR_159	L	A	I	G	E	I	G	I	S	D	P
Lab	JP_142	L	D	F	G	G	F	S	I	S	D	P
Lab	JP_143	L	D	I	G	G	F	G	I	S	D	P
Lab	AU_148	L/V	A	F	G	G	I	G	I	S	D	P
Lab	AU_150	L	A	F	G	G	I	G	I	S	D	P

<sup>a</sup> *Musca domestica* numbering

<sup>b</sup> *T. urticae* numbering

Οι δύο μεταλλαγές που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα στο abamectin εντοπίστηκαν σε λιγότερες περιπτώσεις. Η μεταλλαγή G314D στο πρώτο κανάλι χλωρίου ήταν παρούσα μόλις σε δύο φυσικούς πληθυσμούς από την Ελλάδα, ενώ η G326E στο τρίτο κανάλι βρέθηκε σε μεγαλύτερη συχνότητα (21%).

Η I1017F μεταλλαγή στο γονίδιο CHS1, που ευθύνεται για πολύ υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας στο etoxazole (Van Leeuwen et al., 2012), εντοπίστηκε σε δέκα συλλογές. Οι ανθεκτικές συλλογές προήλθαν από διαφορετικές γεωγραφικά περιοχές (Ευρώπη, Ασία και Αφρική).

Οι μεταλλαγές ανθεκτικότητας στο μιτοχονδριακό *cytb* βρέθηκαν σε μικρό αριθμό δειγμάτων, εντοπισμένες κυρίως στην Βόρεια Ευρώπη. Η G126S μεταλλαγή εντοπίστηκε σε πέντε συλλογές. Μόνο στο στέλεχος από την Ολλανδία (NL\_101) η συγκεκριμένη μεταλλαγή βρέθηκε μαζί με μια δεύτερη μεταλλαγή, την I136T. Η P262T μεταλλαγή εντοπίστηκε μόνο σε ένα στέλεχος από το Βέλγιο. Οι δύο μεταλλαγές ανθεκτικότητας, στις θέσεις 141 και 161, δεν εντοπίστηκαν σε κανένα από τα δείγματα.

### 3.3.2 Συχνότητα των μεταλλαγών ανθεκτικότητας στην *ace*

Συνολικά 139 δείγματα τετράνυχου (27 αρσενικά και 112 θηλυκά, τρία άτομα / συλλογή) αναλύθηκαν για τον υπολογισμό της συχνότητας των μεταλλαγών ανθεκτικότητας στην *ace*. Από τα συνολικά 251 αλληλόμορφα που εξετάστηκαν βρέθηκαν μόλις 14 που έφεραν αλληλόμορφα αγρίου τύπου (5.6%). Στα υπόλοιπα 237 αλληλόμορφα εντοπίστηκε είτε μία είτε συνδυασμός περισσότερων μεταλλαγών ανθεκτικότητας. Τα ευαίσθητα αλληλόμορφα προήλθαν τόσο από φυσικούς πληθυσμούς (Τουρκία, Γαλλία) όσο και από εργαστηριακά στελέχη (Δανία, Γερμανία, Αυστρία, Νορβηγία και Αυστραλία). Η μεταλλαγή ανθεκτικότητας 331W ήταν η πιο συχνή (68%). Η δεύτερη πιο συχνή μεταλλαγή ήταν η 280A (41%), ακολουθούμενη από τις μεταλλαγές 119S (22%), 328A (21%) και 201S (18%). Η εναλλακτική αντικατάσταση στην θέση 331 από F (TTT) σε Y (TAT) εντοπίστηκε επίσης (14%).

Λαμβάνοντας υπόψη τις θέσεις των πέντε μεταλλαγών ανθεκτικότητας, τα δεδομένα από τις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες που προέρχονταν από μεμονωμένα άτομα επέτρεψαν τον προσδιορισμό νουκλεοτιδικών πολυμορφισμών ανθεκτικότητας (Resistance Nucleotide Polymorphisms) και τον υπολογισμό των συχνοτήτων τους. Τα RNPs που εντοπίστηκαν περιλάμβαναν μεταλλαγές ανθεκτικότητας σε μία ή σε συνδυασμό περισσότερων θέσεων. Συνολικά βρέθηκαν 13 RNPs (r1 - r13) στα δείγματα μας σε διαφορετικές συχνότητες (Πίν. 27). Δεν χρησιμοποιήθηκαν όλα τα άτομα στον υπολογισμό

των RNPs συχνοτήτων, διότι ο ακριβής προσδιορισμός των γονοτύπων σε μερικά ετεροζυγωτά θηλυκά άτομα δεν ήταν εφικτός. Συνολικά 97 άτομα συμπεριλήφθηκαν στην παρούσα ανάλυση και στο σύνολο 167 αλληλόμορφα.

Η πλειονότητα των RNPs αποτελούταν από συνδυασμό μεταλλαγών ανθεκτικότητας (66%). Ο πιο συχνός συνδυασμός ήταν ο r1 (28%) (Πίν. 27), ακολουθούμενος από τους r2 (17%) και r4 (10%). Βρέθηκαν και άλλοι συνδυασμοί μεταλλαγών, σε μικρότερη όμως συχνότητα (Πίν. 27). Μεταλλαγές ανθεκτικότητας σε μία θέση βρέθηκαν επίσης σε υψηλή συχνότητα στα δείγματα μας (r3, r5, r6 και r8), αντιπροσωπεύοντας το 29 % του συνόλου των αλληλομόρφων. Η πιο συχνή μεταλλαγή σε μία θέση ήταν η 331W, που εντοπίστηκε σε ποσοστό 12.5%, ενώ οι μεταλλαγές 201S και 328A δεν βρέθηκαν ποτέ μόνες τους, παρά μόνο σε συνδυασμό με μεταλλαγές σε μία ή περισσότερες άλλες θέσεις (Πίν. 27).

**Πίνακας 27: Οι νουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί ανθεκτικότητας (RNPs) που εντοπίστηκαν στον *T. urticae* και η συχνότητα τους (τελευταία στήλη). Η συχνότητα της κάθε μεταλλαγής δίνεται στην τελευταία σειρά.**

RNP	G119S	A201S	T280A	G328A	F331W/Y	% Frequency of RNP*
s	G	A	T	G	F	4.79
r1	G	A	A	A	W	28.14
r2	S	A	T	G	W	17.37
r3	G	A	T	G	W	12.57
r4	G	S	A	G	W	9.58
r5	G	A	T	G	Y	7.78
r6	S	A	T	G	F	5.39
r7	G	A	A	G	W	3.59
r8	G	A	A	G	F	2.99
r9	G	S	T	G	W	2.99
r10	G	A	A	G	Y	2.40
r11	G	S	A	A	W	1.20
r12	G	A	T	A	W	0.60
r13	G	S	T	G	Y	0.60
Frequency of each mutation **	22%	18%	42%	21%	68% / 14%	

\*Η συχνότητα του κάθε RNP υπολογίστηκε από συνολικά 167 αλληλόμορφα.

\*\*Η συχνότητα κάθε μεταλλαγής ανθεκτικότητας υπολογίστηκε από συνολικά 251 αλληλόμορφα.

### 3.3.3 Παραλλακτικότητα και φυλογενετική ανάλυση της ace

Η ολική παραλλακτικότητα μελετήθηκε με ενίσχυση 1540 bp τμήματος DNA που περιλάμβανε το πρώτο εξόνιο, το πρώτο ιντρόνιο, το δεύτερο εξόνιο και τμήμα του δευτέρου ιντρονίου. Πιο αναλυτικά, η ανάλυση 1139 bp του πρώτου εξονίου υπέδειξε 24 σημειακές πολυμορφικές θέσεις (SNPs), 19 συνώνυμες και 5 μη-συνώνυμες αντικαταστάσεις που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα. Από την ανάλυση του πρώτου

ιντρονίου προέκυψαν 4 indels και μια 2 bp πολυμορφική θέση. Η ανάλυση του δευτέρου εξονίου περιλάμβανε μόνο μια συνώνυμη αντικατάσταση, ενώ η 128 bp αλληλουχία του δευτέρου ιντρονίου αποκάλυψε 3 σημειακές πολυμορφικές θέσεις και 2 indels (Πίν. 28).

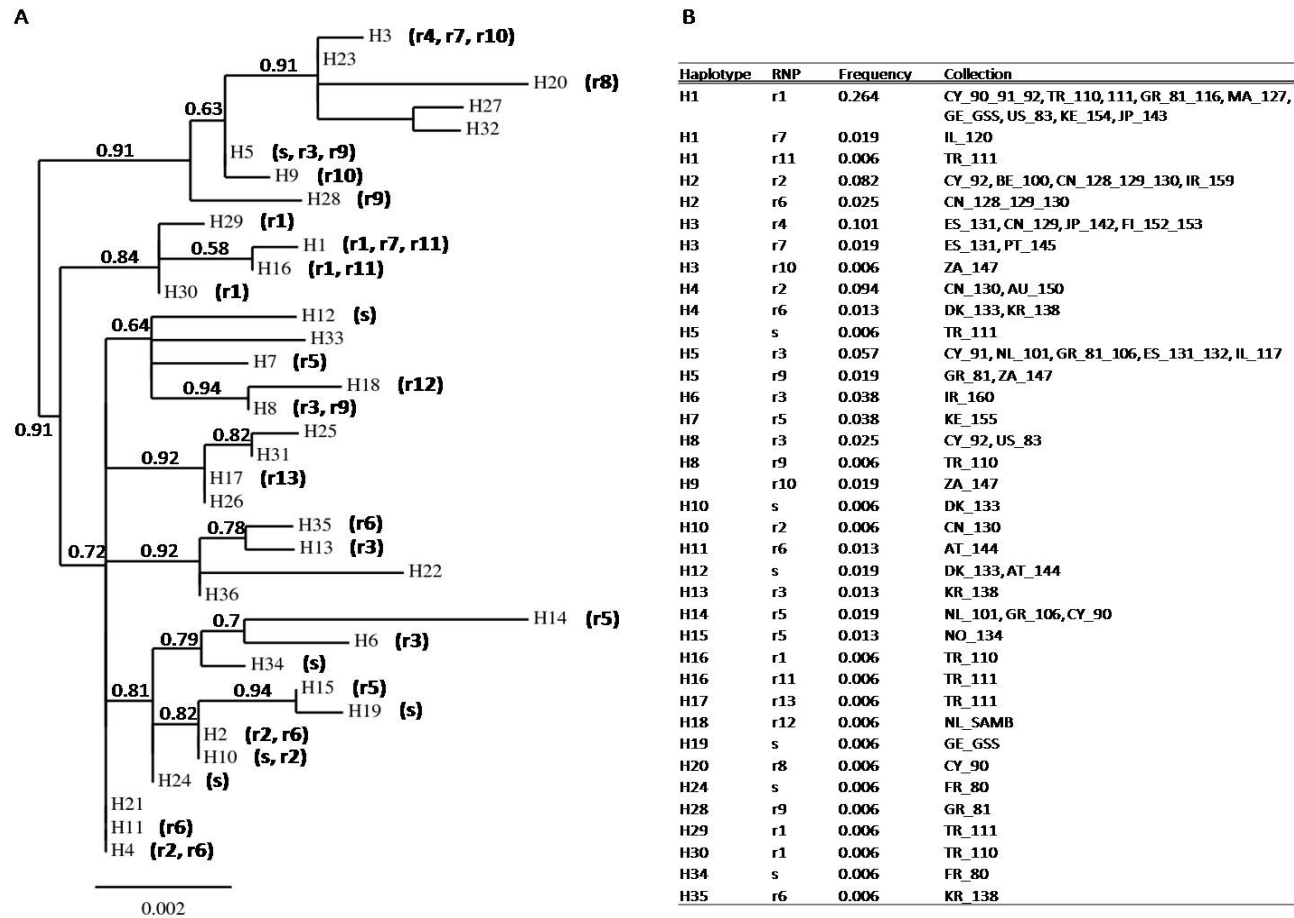
Από τον συνδυασμό των εντοπισμένων πολυμορφισμών, μη συμπεριλαμβανομένων των μη συνώνυμων RNPs, προέκυψαν 36 απλότυποι (H1 - H36) αντιπροσωπεύοντας έναν σημαντικό αριθμό διαφορετικών γενετικών υπόβαθρων. Ο απλότυπος H1 ήταν ο πιο συχνός (22%) και εντοπίστηκε σε άτομα από 9 χώρες (Κύπρος, Τουρκία, Ελλάδα, Ισραήλ, Μαρόκο, Γερμανία, ΗΠΑ, Κένυα και Ιαπωνία) (Εικ. 19b). Πέντε απλότυποι (H1-H5) αποτελούν το 63% της συνολικής παραλλακτικότητας, ενώ 15 από αυτούς εντοπίστηκαν μία φορά (Πίν. 28).

Δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση των απλότυπων με την γεωγραφική τους κατανομή. Πρώτον, διαφορετικά γενετικά υπόβαθρα εντοπίστηκαν σε άτομα από την ίδια χώρα. Δεύτερον, ίδιοι απλότυποι απαντούν σε άτομα με πολύ διαφορετική γεωγραφική προέλευση. Από την φυλογενετική ανάλυση των απλοτύπων προέκυψαν τρεις κύριους κλάδοι στο δέντρο. Η bootstrap ανάλυση έδειξε ότι οι τρεις κλάδοι υποστηρίζονται ισχυρά, με ποσοστό περισσότερο από 72%. Επιπροσθέτως, όλοι οι κλάδοι περιλάμβαναν ανθεκτικά αλληλόμορφα, ενώ ευαίσθητα αλληλόμορφα απαντούν μόλις σε δύο κλάδους του δέντρου (Εικ. 19a).

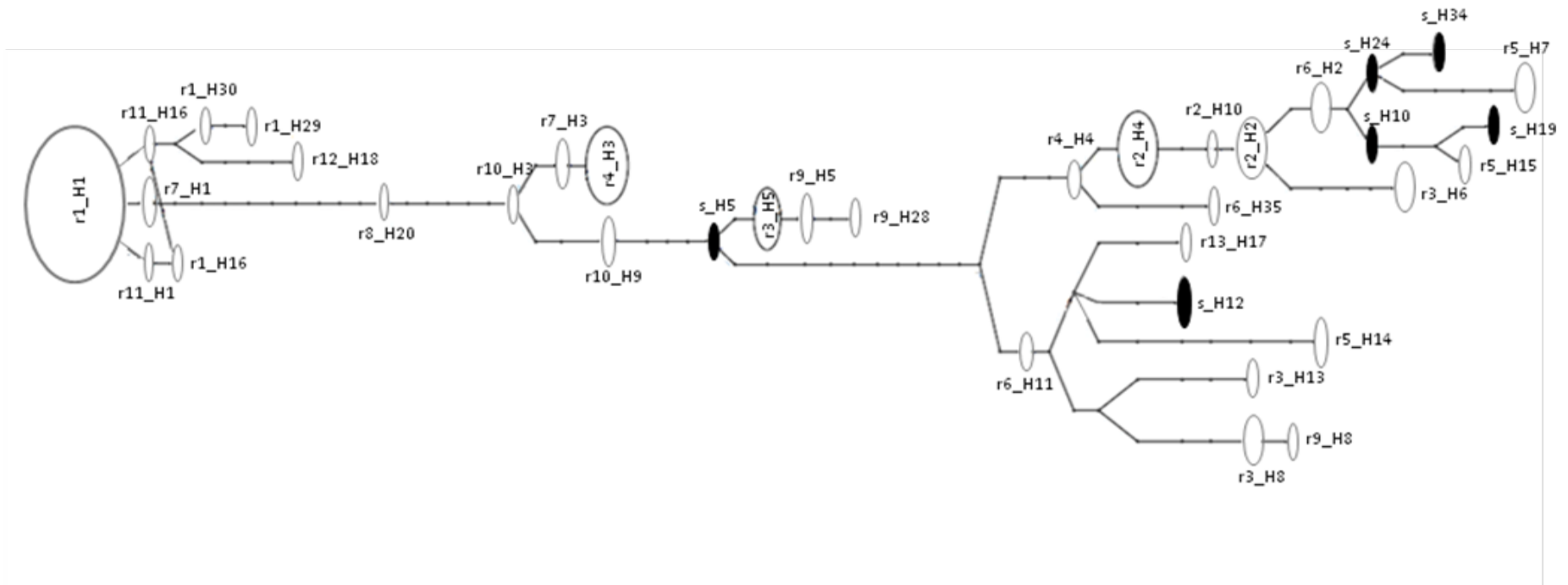
Από τα 13 RNPs (r1-r13) σε συνδυασμό με τους διαφορετικούς απλότυπους (H1 - H36) προέκυψαν 6 ευαίσθητα (H5-s, H10-s, H12-s, H19-s, H24-s και H34-s) και 31 ανθεκτικά αλληλόμορφα (Εικ. 19b). Το H1-r1 ήταν το πιο συχνό ανθεκτικό αλληλόμορφο και ομαδοποιούταν με επτά ακόμα ανθεκτικά αλληλόμορφα, με πανομοιότυπη αλληλουχία ιντρονίων (Εικ. 20). Σε 10 απλότυπους δεν ήταν δυνατό να προσδιοριστούν οι μεταλλαγές ανθεκτικότητας με τις οποίες σχετίζονταν, καθώς βρέθηκαν μόνο σε ετερόζυγα θηλυκά άτομα. Το πιο συχνό RNP (r1) σχετίστηκε με τέσσερις απλότυπους, που απαντούν στον ίδιο κλάδο του δέντρου (Εικ. 19a), ενώ άλλα RNPs (r3, r5, r6) εντοπίστηκαν να σχετίζονται με διαφορετικούς απλότυπους, που απαντούν σε διαφορετικούς κλάδους, υποδηλώνοντας πολλαπλή εξελικτική προέλευση των μεταλλαγών ανθεκτικότητας της *ace* (Εικ. 19).







Εικόνα 19: (A) Δενδρόγραμμα των 36 απλότυπων από την νουκλεοτιδική αλληλουχία 1540bp της *ace*. Τα RNPs που σχετίζονται με κάθε απλότυπο φαίνονται στην παρένθεση. Για δέκα απλότυπους δεν προσδιορίστηκαν τα RNPs με τα οποία σχετίζονται καθώς βρέθηκαν σε ετερόζυγα θηλυκά. (B) Τα 31 ανεκτικά και 6 ευαίσθητα αλληλόμορφα, οι συχνότητές τους και η χώρα προέλευσης.



Εικόνα 20: Γενεαλογική σχέση των *ace* αλληλομόρφων από το TCS. Το μέγεθος των κύκλων είναι ανάλογο της συχνότητας που απαντά το κάθε αλληλόμορφο. Με μαύρους κύκλους επισημαίνονται τα ευαίσθητα αλληλόμορφα. Τα mutational steps συμβολίζονται με τις τελείες πάνω στις γραμμές.

Η πλειονότητα των ευαίσθητων αλληλόμορφων (τέσσερα από τα έξι) ομαδοποιούνται στον ίδιο κλάδο του δικτύου (Εικ. 20). Τα ευαίσθητα αλληλόμορφα σχετίζονται με 6 απλότυπους (H5, H10, H12, H19, H24 και H34). Δύο από αυτούς, H5 και H10, βρέθηκαν να σχετίζονται με τρία RNPs (r3, r9 και r2) (Εικ. 19). Άρα τα ευαίσθητα αλληλόμορφα H5-s και H10-s μπορούν να θεωρηθούν οι πιθανοί πρόγονοι των H5-r3/ H5-r9 και H10-r2 αντίστοιχα. Τα ανθεκτικά αλληλόμορφα H5-r3 και H5-r9 προέκυψαν από 2 και 3 βήματα μεταλλαξιγένεσης (mutational steps) από τον κοινό του ευαίσθητο πρόγονο H5-s, ενώ ο H5-r9 από τον H5-r3 με ένα mutational step. Το αλληλόμορφο H10-r2 προέκυψε από πέντε mutational steps από τον ευαίσθητο πρόγονο (H10-s) (Εικ. 20). Ωστόσο, τα r2, r3 και r9 βρέθηκαν και σε διαφορετικά γενετικά υπόβαθρα, υποδηλώνοντας την πολλαπλή εξελικτική προέλευση των συγκεκριμένων RNPs. Η φυλογενετική ανάλυση δεν εντόπισε τον ευαίσθητο πρόγονο κάθε ανθεκτικού αλληλομόρφου, λόγω της απουσίας ευαίσθητων αλληλόμορφων από κάποιους κλάδους του δέντρου, οι οποίοι απαρτίζονταν μόνο από ανθεκτικά αλληλόμορφα.

### 3.3.4 Ανίχνευση της γονιδιακής ενίσχυσης

Η απευθείας αλληλούχιση των προϊόντων της PCR από αρσενικά (απλοειδή) άτομα αποκάλυψε διπλές κορυφές στις θέσεις των μεταλλαγών ανθεκτικότητας 328 και 331. Αυτό μας ώθησε στην κλωνοποίηση του τμήματος του γονιδίου με τις δύο αυτές μεταλλαγές, συμπεριλαμβανομένης επίσης της μεταλλαγής στην θέση 280. Αναλύσαμε τέσσερα αρσενικά άτομα από τρεις συλλογές τετράνυχου (GE\_GSS, BE\_100 και GR\_7). Οι δύο πρώτες συλλογές εμφάνισαν "διπλή κορυφή" στη θέση 331, ενώ η τρίτη στην 328. Στις συλλογές GE\_GSS και GR\_7 βρέθηκαν δύο, ενώ στην BE\_100 τρεις διαφορετικές νουκλεοτιδικές αλληλουχίες, αντίστοιχα. Λαμβάνοντας υπόψη την απλοειδή φύση των αρσενικών ατόμων, τα αποτελέσματα υποδηλώνουν γονιδιακή ενίσχυση της *ace*, η οποία ωστόσο δεν εξετάστηκε περαιτέρω.

## 3.4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

### 3.4.1 Εξάπλωση μεταλλαγών ανθεκτικότητας στόχου στον τετράνυχο

Προσδιορίστηκε η γεωγραφική εξάπλωση των μεταλλαγών ανθεκτικότητας στόχου, που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα σε πέντε διαφορετικές κατηγορίες εντομοκτόνων – ακαρεοκτόνων, σε δείγματα από ευρεία γεωγραφική κατανομή.

Οι μεταλλαγές ανθεκτικότητας F1538I και L1024V στα κανάλια νατρίου, που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα στα πυρεθρινοειδή (Tsagkaraku et al., 2009b; Kwon et al., 2010b), βρέθηκαν τόσο σε φυσικούς πληθυσμούς όσο και σε εργαστηριακές συλλογές.

Συνδυασμός των δύο αυτών μεταλλαγών δεν φαίνεται να υπάρχει ταυτόχρονα στην ίδια συλλογή, ωστόσο αλληλούχηση μεμονωμένων ατόμων απαιτείται για να επιβεβαιωθεί ο ισχυρισμός. Η αντικατάσταση A1215D ήταν η πιο συχνή. Παρόμοια αποτελέσματα (υψηλή συχνότητα της μεταλλαγής A1215D) παρατηρήθηκαν σε πληθυσμούς τετράνυχου από την Ολλανδία (Khajehali et al., 2011).

Οι μεταλλαγές που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα στο abamectin δεν ήταν συχνές, παρότι το συγκεκριμένο σκεύασμα χρησιμοποιείται για περισσότερο από 30 χρόνια στον έλεγχο του είδους. Η G326E, βρέθηκε συνολικά σε 7 συλλογές, που προήλθαν από τρεις διαφορετικές ηπείρους (Ευρώπη, Αφρική και Ασία). Η G314D, η οποία έχει συσχετιστεί με μέτρια επίπεδα ανθεκτικότητας στο abamectin (Kwon et al., 2010c), βρέθηκε σε μόλις 2 πληθυσμούς από την Ελλάδα (Κρήτη και Μαραθώνα). Οι δύο αυτοί πληθυσμοί είχαν συλληχθεί από θερμοκήπια τριανταφυλλιάς, με βεβαρυμμένο ιστορικό επεμβάσεων με abamectin. Και στις δύο περιπτώσεις η συγκεκριμένη μεταλλαγή βρέθηκε μαζί με την προηγούμενη (G326E), συνδυασμός που ευθύνεται για πολύ υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας στο abamectin (RR ~ 2000) (Dermauw et al., 2012). Η μειωμένη συχνότητα των μεταλλαγών ανθεκτικότητας στόχου στο abamectin είναι σύμφωνες με τον μικρό αριθμό αναφορών ανθεκτικότητας (Van Leeuwen et al., 2010), παρότι το σκεύασμα έχει εισαχθεί για τον έλεγχο των τετράνυχων περισσότερο από 30 χρόνια.

Στα δείγματα μας σε χαμηλές συχνότητες εντοπίστηκαν οι μεταλλαγές ανθεκτικότητας στο cytb, που είναι ο στόχος του ακαρεοκτόνου bifenazate. Η G126S, εντοπίστηκε σε πέντε συλλογές, ενώ σε ένα στέλεχος από την Ολλανδία βρέθηκε μαζί με την I136T, συνδυασμός που προκαλεί υψηλή ανθεκτικότητα στο συγκεκριμένο σκεύασμα (RR > 10.000) (Van Leeuwen et al., 2008; Van Nieuwenhuysse et al., 2009). Η μεταλλαγή P262T που επίσης ευθύνεται για υψηλή ανθεκτικότητα στο bifenazate (RR > 10000), εντοπίστηκε μόνο σε ένα εργαστηριακό στέλεχος από το Βέλγιο. Γενικά οι μεταλλαγές φαίνεται να είναι περιορισμένες στην Βόρεια Ευρώπη και την Ιαπωνία, το οποίο είναι σύμφωνο με τις αναφορές ανθεκτικότητας σε πληθυσμούς της Βορειότερης Ευρώπης (Van Leeuwen et al., 2010), με μία εξαίρεση, τον πληθυσμό CY88 από την Κύπρο που έφερε την μεταλλαγή G126S.

Όσον αφορά το γονίδιο CHS1, ο στόχος του ακαρεοκτόνου etoxazole, η μεταλλαγή I1017F βρέθηκε σχετικά διαδεδομένη ανά τον κόσμο. Η μεταλλαγή αυτή έχει πρόσφατα συσχετιστεί με εξαιρετικά υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας στο etoxazole και εντοπίστηκε σε ανθεκτικά στελέχη που προήλθαν από διαφορετικές γεωγραφικά περιοχές (Van Leeuwen et al., 2012). Η μεταλλαγή βρέθηκε σε σχετικά μεγάλο αριθμό συλλογών από την Ευρώπη,

Ασία και Αφρική παρά το γεγονός ότι το etoxazole είναι σχετικά πρόσφατο (1998) στον έλεγχο του είδους. Η σύνδεση των γενετικών τόπων μεταξύ etoxazole και hexythiazox (Asahara et al., 2008), το οποίο χρησιμοποιείται για περισσότερα χρόνια εναντίων των τετρανύχων, μπορεί να εξηγεί την συχνή παρουσία της συγκεκριμένης μεταλλαγής σε σχετικά σύντομο χρονικό διάστημα, μετά την έναρξη της εφαρμογής του.

Στο γονίδιο της ακετυλοχολινεστεράσης οι μεταλλαγές ανθεκτικότητας ήταν οι πιο διαδεδομένες. Η ανίχνευση των μεταλλαγών, όπως προαναφέρθηκε, πραγματοποιήθηκε με γονοτύπηση μεμονωμένων ατόμων. Μεταξύ των πέντε δημοσιευμένων μεταλλαγών, η F331W ήταν η πιο συχνή, είτε μόνη της είτε κυρίως σε συνδυασμό με άλλες μεταλλαγές, όπως η A2101S (αντικατάσταση που έχει επίσης βρεθεί σε συνδυασμό με την S331W στην AChE1 σε ανθεκτικά σε OPs *Aphis gossypii*, (Andrews et al., 2004)) και η G328A (αντικατάσταση που έχει βρεθεί στην AChE2 σε ανθεκτικά σε οργανοφωσφορικά *Musca domestica* (Walsh et al., 2001) και *D. melanogaster* (Menozzi et al., 2004)). Είναι γνωστό ότι διαφορετικές μεταλλαγές καθώς και ο συνδυασμός μεταλλαγών στην ίδια πρωτεΐνη προκαλεί διαφορετικά επίπεδα ανθεκτικότητας (Fournier and Mutero, 1994; Oh et al., 2006). Ο ακριβής ωστόσο ρόλος των F331W, A201S και G328A στην ανθεκτικότητα του *T. urticae* δεν είναι ακόμα πλήρως γνωστός. Οι επιπρόσθετες αντικαταστάσεις μπορεί να έχουν επιλεγεί λόγω της εφαρμογής διαφορετικών OPs και καρβαμιδικών εντομοκτόνων, είτε ως κύριος μηχανισμός ανθεκτικότητας είτε ως ρυθμιστές του κόστους αρμοστικότητας. Το υψηλότερο συγκριτικό πλεονέκτημα των συνδυασμών αυτών μπορεί να εξηγήσει την παρουσία τους σε διαφορετικά υπόβαθρα, γεγονός που υποδεικνύεται από βιοχημικά δεδομένα, όπου η ανθεκτικότητα που προκαλείται από τις μεταλλαγές αυτές εξαρτάται από το εντομοκτόνο, ανεξαρτήτως χημικής κλάσεως (Alout et al., 2007). Είναι πιθανό λοιπόν, ο συνδυασμός τους να “θωρακίζει” τους τετράνυχους εναντίον διαφορετικών παρεμποδιστών της ace.

Η παρουσία των μεταλλαγών ανθεκτικότητας στόχου των πέντε σκευασμάτων που εξετάστηκαν είναι γενικά σε συμφωνία με τις αναφορές ανθεκτικότητας, που υποδηλώνει την διασπορά εντυπωσιακά ανθεκτικών φαινοτύπων του τετράνυχου σε αρκετές χώρες (Van Leewen et al., 2009).

#### **3.4.2 Προέλευση της ανθεκτικότητας στην ace**

Η αλληλούχιση και η φυλογενετική ανάλυση έδειξε ότι το γονίδιο της ace στον τετράνυχο παρουσιάζει υψηλή γενετική παραλλακτικότητα. Συνολικά βρέθηκαν 36 απλότυποι χωρίς να λαμβάνονται υπόψη οι πέντε μεταλλαγές ανθεκτικότητας.

Παραπλήσιος μεγάλος αριθμός απλοτύπων (49) εντοπίστηκε στο AChE2 γονίδιο του δορυφόρου της πατάτας, *Leptinotarsa decemlineata* (Piironen et al., 2013). Πέντε απλότυποι (H1-H5) ήταν οι πιο συχνοί (με συνολική συχνότητα 63%), περιλαμβάνοντας δείγματα από εντελώς διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές. Δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση των απλοτύπων με την γεωγραφική τους κατανομή καθώς σημαντική ποικιλομορφία βρέθηκε σε άτομα από την ίδια χώρα, τα οποία απαντούν σε διαφορετικούς κλάδους του δέντρου. Άτομα από την ίδια χώρα, για παράδειγμα από την Κύπρο, βρέθηκαν να σχετίζονται με 6 διαφορετικούς *ace* απλότυπους.

Στην περίπτωση της πολλαπλής και ανεξάρτητης προέλευσης της ανθεκτικότητας, σημειακές μεταλλαγές στην ακετυλοχολινεστεράση θα λάμβαναν χώρα ανεξάρτητα σε διαφορετικά γενετικά υπόβαθρα. Απουσία μετανάστευσης, η εφαρμογή εντομοκτόνων επιλέγει διαφορετικά ανθεκτικά αλληλόμορφα με διαφορετικό πρόγονο απλότυπο για κάθε πληθυσμό. Η ανάλυση των πολυμορφισμών γύρω από τις μεταλλαγές, σε διαφορετικές συλλογές τετρανύχων, υποστηρίζουν ισχυρά την πολλαπλή καθώς και την ανεξάρτητη προέλευση κάθε ανθεκτικού αλληλόμορφου. Πρώτον, διαφορετικά RNPs εντοπίστηκαν, τα οποία σχετίζονταν με διαφορετικούς απλότυπους. Αυτό ισχύει για την περίπτωση των r1, r2, r3 που δεν εντοπίστηκαν ποτέ στο ίδιο γενετικό υπόβαθρο. Δεύτερον, τα ίδια RNPs μπορούν να υπάρξουν σε διαφορετικά γενετικά υπόβαθρα. Αυτό συμβαίνει στην περίπτωση του r1 που βρέθηκε να σχετίζεται με τους απλότυπους H2, H16, H29 και H30 ή του r3 με τους απλότυπους H5, H6, H8 και H13.

Βρέθηκαν μόλις έξι απλότυποι με αλληλόμορφα αγρίου τύπου σε όλες τις θέσεις των μεταλλαγών, οι οποίοι προήλθαν από 5 διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές. Δύο από αυτούς σχετίστηκαν τόσο με ανθεκτικά όσο και με ευαίσθητα αλληλόμορφα (r3-H5, r9-H5 s-H5; r2-H10 και s-H10), όπως φαίνεται από το δίκτυο (Εικ. 20). Η παρουσία “πρόγονου” αλληλόμορφου σε κλάδο του δέντρου, έχει χρησιμοποιηθεί ως αποδεικτικό στοιχείο ανεξάρτητης προέλευσης της ανθεκτικότητας στο Rdl του *Tribolium castaneum* (Andreev et al., 1999) και στο VGSC του *Myzus persicae* (Anstead et al., 2005).

Αποτυχία στην καταπολέμηση του τετράνυχου με τα οργανοφωσφορικά παρατηρήθηκε για πρώτη φορά στις ΗΠΑ το 1948 και 1949. Στα αμέσως επόμενα χρόνια ανθεκτικότητα εμφανίστηκε σε σημαντικό αριθμό θερμοκηπιακών καλλιεργειών στις ΗΠΑ και την Ευρώπη (Helle, 1962). Στις περισσότερες περιπτώσεις, ειδικά σε θερμοκήπια, η ανθεκτικότητα εμφανίστηκε ταχύτατα μετά την πρώτη επαφή του τετράνυχου με τα OPs, υποδεικνύοντας την δυναμική και ταχύτατη ανάπτυξη της ανθεκτικότητας. Η σύγκριση αλληλουχιών, συμπεριλαμβανομένων ιντρονίων, ανθεκτικών και ευαίσθητων AChE

τετρανύχων, από διάφορες περιοχές του κόσμου, επιβεβαίωσαν την ευρεία εξάπλωση της ανθεκτικότητας. Κάποια ανθεκτικά αλληλόμορφα έχουν παγκόσμια εξάπλωση (r1-H1, r2-H2, r4-H3 και r3-H5) ενώ άλλα είναι περιορισμένα σε συγκεκριμένες χώρες. Για παράδειγμα, το r3-H6 εντοπίστηκε μόνο στο Ιράν, ενώ το r5-H7 βρέθηκε μόνο στην Κένυα. Το συχνότερο RNP (r1) σχετίζεται σχεδόν αποκλειστικά με τον H1 απλότυπο, αποτελώντας το 26% του συνόλου των αλληλομόρφων. Ο H1-r1 απαντά σε χώρες από την Ευρώπη, Ασία, Αφρική και Αμερική όπου συχνά συνυπάρχει μαζί με άλλα ανθεκτικά αλληλόμορφα. Είναι πιθανόν το H1-r1 να είναι το πρώτο ανθεκτικό αλληλόμορφο που εμφανίστηκε, μετά την πρώτη χρήση των OPs και καρβαμιδικών (στις αρχές του 1960). Κατά την διάρκεια των επόμενων 50 χρόνων εξαπλώθηκε σε νέες περιοχές του κόσμου μέσω παθητικής μεταφοράς, όπου και επικράτησε εξαιτίας του επιλεκτικού του πλεονεκτήματος και / ή της απουσίας κόστους αρμοστικότητας. Παρότι τα OPs και τα καρβαμιδικά δεν χρησιμοποιούνται πλέον για τον έλεγχο των τετρανύχων, το είδος συνεχίζει να έρχεται σε επαφή με αυτά εξαιτίας της χρήσης τους για τον έλεγχο άλλων εχθρών των καλλιεργειών. Απουσία υψηλού κόστους αρμοστικότητας μπορεί να εξηγήσει την παρουσία του H1-r1 σε εργαστηριακά στελέχη τετρανύχων (GE\_GSS και JP\_143), που έχουν διατηρηθεί χωρίς πίεση επιλογής με εντομοκτόνα για περισσότερο από 8 χρόνια.

Ο r1 (280A, 328A, 331W) βρέθηκε να σχετίζεται σχεδόν αποκλειστικά με τον απλότυπο H1. Φαίνεται ότι ο συνδυασμός αυτός έχει βρει το “κατάλληλο όχημα” υποδηλώνοντας την σημασία της αλληλεπίδρασης μεταξύ των μεταλλαγών ανθεκτικότητας και του γενετικού υπόβαθρου. Από την άλλη, ο δεύτερος πιο συχνός συνδυασμός r2 (119S και 331W) δεν φαίνεται να έχει παρόμοια “προτίμηση”. Βρέθηκε να σχετίζεται, σε παρόμοια συχνότητα, με δύο διαφορετικούς αλλά κοντινούς γενετικά απλότυπους, τους H4 και H2.

Τα τρία συχνότερα ανθεκτικά αλληλόμορφα (H1-r1, H2-r2 και H4-r2), παρά την μεγάλη τους συχνότητα, δεν φαίνεται να αντικατέστησαν άλλα αλληλόμορφα σε τοπική κλίμακα και η επικράτηση τους δεν οφείλεται σε γενετική παρέκκλιση, παρότι ο αριθμός των μεμονωμένων ατόμων που εξετάστηκαν δεν ήταν υψηλός για να εξαχθεί ασφαλές συμπέρασμα. Πάντως, δεδομένου ότι χρονολογικά δεδομένα εμφάνισης των ανθεκτικών αλληλόμορφων σε κάθε περιοχή λείπουν καθώς επίσης και δεδομένα για την δυναμική τους σε τοπική κλίμακα απουσιάζουν η σχετική σημασία της μετανάστευσης, της επιλογής και της γενετικής παρέκκλισης δεν μπορεί, παρά μόνο υποθετικά να αναπτυχθεί για να εξηγήσει την γεωγραφική κατανομή των γονιδίων ανθεκτικότητας (Labbé et al., 2005).

Η γεωγραφική εξάπλωση των αλληλομόρφων σχετίζεται με παράγοντες που έχουν

να κάνουν με τη μετανάστευση, τη γονιδιακή ροή, την τοπική επιλογή και το κόστος αρμοστικότητας. Η διασπορά του τετράνυχου γίνεται ενεργά σε κοντινές αποστάσεις (Hussey and Parr, 1963), ενώ σε μεγαλύτερες παθητικά με τον αέρα (Kennedy and Smitley, 1985) ή, όπως και στα περισσότερα έντομα γεωπονικού ενδιαφέροντος, με ανθρωπογενείς δραστηριότητες, όπως διεθνές εμπόριο. Ωστόσο, η παρουσία γενετικά δομημένων πληθυσμών (Tsagkaraku et al., 1998; 1999) και οι συχνές αναφορές αναπαραγωγικής ασυμβατότητας μεταξύ διαφορετικών πληθυσμών τετρανύχου (De Boer, 1985) υποδεικνύουν την μειωμένη γονιδιακή ροή και την ύπαρξη ενός “γενετικού μωσαϊκού” εντός του είδους, το οποίο αντικατοπτρίζεται από την ύπαρξη και την γεωγραφική εξάπλωση πολύ διαφορετικών αλληλομόρφων ανθεκτικότητας.



## ΣΥΝΟΨΗ

Ο τετράνυχος και ο αλευρώδης αποτελούν δύο από τους σημαντικότερους εχθρούς των καλλιεργούμενων φυτών, προκαλώντας ζημιές στην παραγωγή είτε μέσω απευθείας μύζησης των φυτικών χυμών είτε μέσω μετάδοσης σημαντικών ιώσεων και ανάπτυξη δευτερογενών μολύνσεων (αλευρώδης). Τα δύο είδη έχουν καταταγεί μεταξύ των “πιο ανθεκτικών” βάσει του αριθμού των δραστικών ουσιών που έχουν αναπτύξει ανθεκτικότητα. Στην χώρα μας έχουν εντοπιστεί στο παρελθόν πληθυσμοί με εξαιρετικά υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας, και από τα δύο είδη, σε όλες σχεδόν τις ομάδες σκευασμάτων.

Σήμερα, ο αριθμός των διαθέσιμων δραστικών ουσιών για τον έλεγχο των εχθρών των φυτών μειώνεται συνεχώς. Η κατακόρυφη αύξηση των απαιτήσεων για την ανάπτυξη νέων φυτοπροστατευτικών ουσιών έχει ως αποτέλεσμα το συνεχώς αυξανόμενο κόστος για την ανάπτυξη νέων δραστικών ουσιών. Επιπλέον, η απόσυρση των παλαιών δραστικών μορίων λόγω ελλιπούς αποτελεσματικότητας, εξαιτίας ανάπτυξης ανθεκτικότητας, επιδεινώνει ακόμα περισσότερο το ήδη υπάρχον πρόβλημα. Για τους λόγους αυτούς το πρόβλημα της ανθεκτικότητας δεν μπορεί να βασιστεί στην παραγωγή νέων δραστικών ουσιών, ενώ η εναλλαγή εντομοκτόνων δεν αποτελεί πάντα λύση. Η γνώση και ανάλυση των μηχανισμών ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα μπορεί να βρει εφαρμογές στον σχεδιασμό απλών βιοχημικών και μοριακών διαγνωστικών, καθώς στην δημιουργία βελτιωμένων σκευασμάτων εντομοκτόνων (add-ons), τα οποία να συμβάλλουν στην ορθολογική διαχείριση και διάσωση των διαθέσιμων φυτοπροστατευτικών προϊόντων.

Στο Κεφάλαιο 1 παρουσιάστηκαν αναλυτικά τα υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας πληθυσμών τετράνυχου, από διαφορετικές περιοχές της Ελλάδας, σε μεγάλο εύρος δραστικών ουσιών. Επίσης, σε πληθυσμό που συλλέχθηκε από τον Μαραθώνα εντοπίστηκαν πολύ υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας στο ακαρεοκτόνο abamectin, από τα υψηλότερα παγκοσμίως, και πολύ υψηλή διασταυρωτή ανθεκτικότητα σε πολλά σκευάσματα εντελώς διαφορετικού τρόπου δράσης. Εστίασαμε περαιτέρω στην διερεύνηση των μηχανισμών ανθεκτικότητας του abamectin με κλασικές μεθόδους γενετικής και μοριακή ανάλυση του στόχου του abamectin. Εκτός από την ήδη δημοσιευμένη μεταλλαγή στο πρώτο κανάλι χλωρίου, βρήκαμε στο ανθεκτικό στέλεχος και μια καινούρια μεταλλαγή στο τρίτο κανάλι που σχετίστηκε ισχυρά με την ανθεκτικότητα στο abamectin. Η συγκεκριμένη μεταλλαγή βρέθηκε ότι ήταν απαραίτητη για την επιβίωση σε υψηλές συγκεντρώσεις του σκευάματος.

Στο ίδιο κεφάλαιο αναπτύχθηκαν, για πρώτη φορά στον τετράνυχο μοριακά διαγνωστικά Taqman, για τις δύο μεταλλαγές στους διαύλους χλωρίου, και εφαρμόστηκαν (πιλοτικά) σε Ελληνικούς πληθυσμούς. Τα μοριακά διαγνωστικά πλεονεκτούν σημαντικά έναντι άλλων μεθόδων παρακολούθησης της ανθεκτικότητας, όπως οι βιοδοκιμές. Αποτελούν εξαιρετικά χρήσιμα εργαλεία για την έγκαιρη, ασφαλή και εύκολη διάγνωση της ανθεκτικότητας. Επιπλέον, η έγκαιρη διάγνωση καθώς και η παρακολούθηση της συχνότητας των ανθεκτικών αλληλόμορφων σε ένα πληθυσμό, είναι αναγκαία προϋπόθεση για την αντιμετώπιση της ανθεκτικότητας. Εν αντιθέσει με τις βιοδοκιμές, που απαιτούν χρόνο και συχνά αποτυγχάνουν να προσδιορίσουν με ασφάλεια το πρόβλημα, τα διαγνωστικά αναγνωρίζουν με ασφάλεια και ταχύτητα τις μεταλλαγές ανθεκτικότητας, ακόμα και σε πολύ μικρές συχνότητες, συμβάλλοντας έτσι σε πιθανές διορθωτικές κινήσεις σε προγράμματα φυτοπροστασίας.

Στον αλευρώδη (Κεφάλαιο 2) εντοπίστηκε σε πληθυσμούς από την Κρήτη υψηλή ανθεκτικότητα σε διαφορετικά σκευάσματα νεονικοτινοειδών και στο εντομοκτόνο pymetrozine. Στην συνέχεια μελετήθηκαν οι μηχανισμοί ανθεκτικότητας στα νεονικοτινοειδή σε βιοχημικό επίπεδο, μετά από εργαστηριακή επιλογή σε δύο σκευάσματα νεονικοτινοειδών (imidacloprid και acetamiprid). Εντοπίστηκε αυξημένη ενεργότητα των P450s οξειδασών (και δευτερευόντως των εστερασών) σε όλα τα ανθεκτικά στελέχη, και βρέθηκε ότι η συμμετοχή της γνωστής P450, CYP6CM1, να σχετίζεται με τον φαινότυπο της ανθεκτικότητας. Ωστόσο, η συγκεκριμένη P450 έχει δειχθεί ότι μεταβολίζει το imidacloprid και όχι το acetamiprid. Η ύπαρξη επιπρόσθετου μηχανισμού ανθεκτικότητας στα νεονικοτινοειδή δεν μπορεί να αποκλειστεί.

Τα τελευταία πέντε χρόνια στον τετράνυχο έχουν προσδιοριστεί σε μοριακό επίπεδο μεταλλαγές ανθεκτικότητας στόχου, σε σκευάσματα με διαφορετικό ιστορικό εισαγωγής στην καταπολέμηση του είδους. Στο κεφάλαιο 3 εξετάστηκε η διασπορά και η συχνότητα των μεταλλαγών σε μεγάλο αριθμό συλλογών από διαφορετικές περιοχές του κόσμου. Πιο συγκεκριμένα οι μεταλλαγές που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα στα οργανοφωσφορικά και τα πυρεθρινοειδή εντομοκτόνα βρέθηκαν στις υψηλότερες συχνότητες. Οι δύο μεταλλαγές του abamectin δεν εντοπίστηκαν σε μεγάλη συχνότητα, παρότι το συγκεκριμένο σκεύασμα έχει εισαχθεί στα προγράμματα καταπολέμησης την ίδια περίοδο με τα πυρεθρινοειδή. Στα πιο πρόσφατα ακαρεοκτόνα, bifenazate και etoxazole, οι μεταλλαγές που σχετίζονται με αυτά βρέθηκαν σε διαφορετική συχνότητα και διασπορά. Στο bifenazate εντοπίστηκαν κυρίως σε λίγα δείγματα από την Βόρεια Ευρώπη, ενώ στο etoxazole η μεταλλαγή εντοπίστηκε σε μεγαλύτερη συχνότητα και αρκετά διαδεδομένη ανά τον κόσμο,

παρότι είναι σχετικά καινούριο στον έλεγχο του είδους. Εκτός από λίγες περιπτώσεις, για τις περισσότερες συλλογές τετρανύχων είχαμε γνώση ύπαρξης ή μη ανθεκτικότητας σε σκευάσματα. Ωστόσο, σε γενικές γραμμές οι συχνότητες των μεταλλαγών βρέθηκε σε συμφωνία με τις αναφορές ανθεκτικότητας προηγούμενων εργασιών και τον χρόνο εισαγωγής των σκευασμάτων στα προγράμματα καταπολέμησης. Η συχνότητα και η διασπορά της κάθε μεταλλαγής διέφερε μεταξύ των συλλογών από διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές. Οι διαφορετικές συχνότητες μπορεί να οφείλονται στα διαφορετικά εγκεκριμένα σκευάσματα κάθε χώρας, στο ιστορικό των επεμβάσεων, στην τοπική επιλογή, στο κόστος αρμοστικότητας της κάθε μεταλλαγής και στον τρόπο κληρονόμησης της ανθεκτικότητας. Η διασπορά μπορεί να επηρεάζεται από ανθρωπογενείς δραστηριότητες που έχουν να κάνουν με το διεθνές εμπόριο και την μεταφορά πολλαπλασιαστικού υλικού.

Στην συνέχεια (Κεφάλαιο 3) εξετάστηκε η εξελικτική προέλευση των μεταλλαγών της ακετυλοχολινεστεράσης. Τα οργανοφωσφορικά και καρβαμιδικά είναι τα παλαιότερα εντομοκτόνα που χρησιμοποιήθηκαν εναντίων του είδους και η μειωμένη ευαισθησία της *ace* ο πρώτος μηχανισμός ανθεκτικότητας που εντοπίστηκε στον τετράνυχου. Με αλληλούχιση κωδικών και μη κωδικών περιοχών του γονιδίου της *ace* προσπαθήσαμε να απαντήσουμε στο ερώτημα αν η ανθεκτικότητα εμφανίστηκε σε μια περιοχή και εξαπλώθηκε παγκοσμίως ή εμφανίστηκε σε διαφορετικές περιοχές ανεξάρτητα. Εντοπίστηκαν σημαντική γενετική παραλλακτικότητα στο γονίδιο της *ace*, η οποία δεν σχετίστηκε με την γεωγραφική της προέλευση. Οι μεταλλαγές ή συνδυασμός μεταλλαγών ανθεκτικότητας βρέθηκαν σε πολύ υψηλές συχνότητες στα δείγματα μας. Συνολικά εντοπίστηκαν 13 διαφορετικοί νουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί ανθεκτικότητας, αρκετά εκ των οποίων σχετίστηκαν με περισσότερους από έναν απλότυπους, από διαφορετικές χώρες. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι μεταλλαγές της *ace* συνέβησαν τουλάχιστον τρεις ανεξάρτητες φορές στο είδος. Επίσης στο κεφάλαιο 3 αναλύεται η πιθανή συμβολή του εμπορίου, της τοπικής επιλογής και του κόστους αρμοστικότητας στην μεγάλη εξάπλωση συγκεκριμένων ανθεκτικών αλληλόμορφων σε πολύ διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές.

Τέλος, αναπτύχθηκε μεθοδολογία διατήρησης του τετράνυχου και του αλευρώδη τρεφόμενων αποκλειστικά σε τεχνητή τροφή με απώτερο στόχο την σίγηση σημαντικών γονιδίων μέσω της τεχνολογίας RNAi. Έγινε προσπάθεια σίγησης του γονιδίου της CPR και στα δύο είδη, χωρίς ωστόσο επιτυχία. Η CPR ελέγχει το μεταβολικό μονοπάτι των P450s, οι οποίες όπως προαναφέρθηκε διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην αποτοξικοποίηση τοξικών ουσιών. Στο γεγονός ότι η CPR εκφράζεται σε διάφορους ιστούς του εντόμου μπορεί να οφείλεται η μη αποτελεσματική σίγηση. Επίσης, η τελική ποσότητα dsRNA που

καταναλώθηκε καθώς και η αποδόμηση του dsRNA από το περιβάλλον του στομάχου των οργανισμών ενδέχεται να διαδραμάτισαν σημαντικό ρόλο. Εναλλακτικά θα μπορούσε να γίνει προσπάθεια σίγησης μέσω μικροενέσεων, μέθοδος που έχει επιτευχθεί σε μεγαλύτερα είδη εντόμων, είναι πιθανή όμως η αυξημένη θνησιμότητα εξαιτίας του μικρού μεγέθους και της δυσκολίας διαχείρισης. Η διάρκεια χορήγησης του dsRNA μπορεί να μην ήταν επίσης αρκετή για της σίγηση των γονιδίων στόχων. Σε εξέλιξη βρίσκεται η δημιουργία διαγονιδιακών φυτών καπνού και τομάτας, τα οποία θα εξασφαλίσουν μεγαλύτερη διάρκεια χορήγησης dsRNA, και πιθανόν επιτυχή σίγηση.

## ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΑ ΣΧΕΔΙΑ

Έχοντας φτάσει στο τέλος της διδακτορικής μου διατριβής, αναπόφευκτα μένουν αναπάντητα ερωτήματα καθώς και ιδέες που δεν έχουν τεθεί ακόμη σε εφαρμογή. Στο παρακάτω κείμενο αναφέρονται εν συντομία μερικοί προβληματισμοί και συζητούνται κάποιες πειραματικές προσεγγίσεις που θα ήθελα να τεθούν σε εφαρμογή μελλοντικά.

Η ανακάλυψη της νέας μεταλλαγής στο τετράνυχο ανοίγει ερωτήματα όσον αφορά την συνεισφορά της στο συνολικό φαινότυπο της ανθεκτικότητας. Οι Kwon et al. (2010c) αναφέρουν την παρουσία μιας μεταλλαγής στο πρώτο κανάλι χλωρίου (GluCl1) η οποία ευθύνεται για μέτρια επίπεδα ανθεκτικότητας (18x). Όπως αναφέρθηκε και στο κεφάλαιο 1, εντοπίσαμε μια νέα μεταλλαγή (G326E) στο τρίτο κανάλι χλωρίου. Ο ανθεκτικός πληθυσμός του Μαραθώνα έφερε και τις μεταλλαγές ενώ τα επίπεδα ανθεκτικότητας υπολογιστήκαν σε 1980 φορές. Το ερώτημα που αφορά στη συνεισφορά της νέας μεταλλαγής μεμονωμένα στο φαινότυπο της ανθεκτικότητας μένει ανοικτό. Η εισαγωγή των μεταλλαγών σε ευαίσθητο γενετικό υπόβαθρο μέσω επαναλαμβανόμενων ανάδρομων διασταυρώσεων (6-7x) θα έδινε την δυνατότητα να μελετηθεί η επίδραση της κάθε μεταλλαγής ανεξάρτητα, χωρίς την επίδραση επιπρόσθετων παραγόντων ανθεκτικότητας. Η λειτουργική έκφραση των καναλιών σε ετερόλογο σύστημα (συνήθως ενδείκνυται η υπερεκφραση σε *ωκοπταρα Χεπορυσ*) όπου πειράματα ηλεκτροφυσιολογίας θα μας επέτρεπαν επίσης να μελετήσουμε το ρόλο των μεταλλαγών στη μοριακή αλληλεπίδραση με το εντομοκτόνο.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει και η παρατήρηση ότι η ανθεκτικότητα στο abamectin σε εργαστηριακά ανθεκτικά στελέχη μειώνεται με τον χρόνο, απουσία επιλεκτικής πίεσης. Η μη σταθερότητα της ανθεκτικότητας ίσως σχετίζεται με την παρουσία κόστους αρμοστικότητας (Sato et al. 2005). Σε άλλες αναφορές παρατηρήθηκε ότι η ανθεκτικότητα στο abamectin παρέμεινε σταθερή για τουλάχιστον έξι μήνες απουσία επιλεκτικής πίεσης (Stumpf and Nauen 2002). Η σταθερότητα ή μη της ανθεκτικότητας στο abamectin δεν είναι εξακριβωμένη και πιθανότατα σχετίζεται με τους διακριτούς μηχανισμούς ανθεκτικότητας που είναι παρόντες σε κάθε ανθεκτικό στέλεχος. Στο συγκεκριμένο ανθεκτικό στέλεχος του Μαραθώνα θα είχε ενδιαφέρον να εξετάσουμε το κόστος αρμονικότητας (ωσοκία, διάρκεια βιολογικού κύκλου κτλ) και την σταθερότητα της ανθεκτικότητας απουσία επιλεκτικής πίεσης.

Από πειράματα μικροσυστοιχειών για το συγκεκριμένο ανθεκτικό στέλεχος φαίνεται ότι ο φαινότυπος της ανθεκτικότητας σχετίζεται και με την παρουσία μεταβολικών ενζύμων (P450s, CCEs, GSTs). Κάποια από τα ενζυμα αυτά που έδειξαν αυξημένα επίπεδα έκφρασης θα μπορούσαν να εκφραστούν ετερόλογα σε βακτηριακά συστήματα έκφρασης, σε μύκητες ή ακόμη και σε κυτταρικές σειρές εντόμων προκειμένου να διαπιστωθεί η μεταβολική τους δραστηριότητα ενάντια στο abamectin. Αυτό θα μπορούσε να γίνει με ποσοτικοποίηση του μεταβολίτη που παράγεται, σε μια αντίδραση μεταβολισμού, παρουσία του «υποψήφιου» ενζύμου αποτοξικοποίησης και του εντομοκτόνου (HPLC). Ένα εύχρηστο πειραματικό μοντέλο αποτελεί η ετερολογη υπερέκφραση πρωτεϊνών στη *D. melanogaster* που δίνει, εκτός των άλλων, τη δυνατότητα ιστοειδικής έκφρασης της εκάστοτε πρωτεΐνης καθώς και τη συνέκφραση δυο ή περισσότερων πρωτεϊνών.

Κατά τη διάρκεια διεξαγωγής των βιοδοκιμών στο πληθυσμό του Μαραθώνα, μας απασχόλησε η ευρεία διασταυρωτή ανθεκτικότητα που διαπιστώθηκε. Δοκιμάστηκε ένα μεγάλο εύρος σκευασμάτων, για μερικά εκ των οποίων ο ακριβής τρόπος και στόχος δράσης είναι άγνωστος. Η ολοκλήρωση της αποκωδικοποίησης του γονιδιώματος του τετράνυχου σε συνδυασμό με τα πλεονεκτήματα των νέων high-throughput τεχνολογιών (RNA-sequencing), μας δίνει την δυνατότητα να εξετάσουμε τους μηχανισμούς ανθεκτικότητας, που ενδεχομένως να μας οδηγήσουν και στη διαλεύκανση του τρόπου δράσης ορισμένων δραστικών.

Κατά τη διάρκεια διεξαγωγής της πληθυσμιακής μελέτης (κεφάλαιο 3) στις θέσεις των μεταλλαγών της ακετυλοχολινεστεράσης παρατηρήθηκαν διπλές κορυφές σε απλοειδή αρσενικά άτομα, γεγονός που παραπέμπει σε γονιδιακή ενίσχυση. Επιλεγμένα δείγματα εστάλησαν για περαιτέρω αλληλούχηση όπου διαπιστώθηκε η παρουσία περισσότερων του ενός απλότυπου στο ίδιο άτομο. Παρόλα αυτά δεν γνωρίζουμε πόσα αντίγραφα του γονιδίου υπάρχουν στον ανθεκτικό πληθυσμό σε σχέση με τον ευαίσθητο, ποιους από τους απλότυπους (πολυμορφισμούς) έχει εγκαθιδρυθεί πρώτα στους ανθεκτικούς πληθυσμούς και από ποιο από τα γονίδια αυτά παράγεται «ανθεκτική» πρωτεΐνη. Δεν γνωρίζουμε επίσης αν τα γονίδια αυτά είναι τοποθετημένα κατά σειρά (tandemly) ή βρίσκονται σε διαφορετικές γενωμικές περιοχές.

Στον αλευρώδη (κεφάλαιο 2) βρήκαμε υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας σε διαφορετικά σκευάσματα νεονικοτινοειδών, σε πληθυσμούς από την Κρήτη. Μετά από εργαστηριακή επιλογή τριών στελεχών με δύο νεονικοτινοειδή, imidacloprid και acetamiprid, εντοπίστηκε η υπερέκφραση της γνωστής P450, CYP6CM1, και στα τρία στελέχη. Η CYP6CM1 έχει δειχθεί στο παρελθόν ότι μπορεί να μεταβολίσει το imidacloprid

αλλά όχι το acetamiprid. Το ανθεκτικό στο acetamiprid στέλεχος εμφάνισε τα υψηλότερα επίπεδα ανθεκτικότητας στο imidacloprid, γεγονός που μπορεί να εξηγηθεί από την υπερέκφραση της γνωστής P450. Το γονιδίωμα του αλευρώδη δεν είναι ακόμα γνωστό, ωστόσο τα τελευταία χρόνια πειράματα RNA-seq έχουν υποδείξει αρκετά ένζυμα αποτοξικοποίησης, κυρίως P450s, να υπερεκφράζονται σε ανθεκτικά σε νεονικοτινοειδή στελέχη. Τα αποτελέσματα μας υποδεικνύουν ότι πιθανότατα υπάρχει επιπρόσθετος μηχανισμός ανθεκτικότητας στα νεονικοτινοειδή, και συγκεκριμένα στο acetamiprid. Χρησιμοποιώντας την RNA-seq τεχνολογία, στα ανθεκτικά στα imidacloprid και acetamiprid στελέχη, εντοπίστηκαν ήδη αρκετά ένζυμα αποτοξικοποίησης τα οποία υπερεκφράζονταν από κοινού ή σε ένα από τα δύο στελέχη (Τσαγκαράκου, προσωπική επικοινωνία). Η συγκριτική ανάλυση των αλληλουχιών μεταξύ ανθεκτικού και ευαίσθητου πληθυσμού, ίσως υποδείξει σημειακούς πολυμορφισμούς (SNPs) σε γονίδια που πιθανά σχετίζονται με την ανθεκτικότητα.

Ένα επόμενο βήμα στη μελέτη μεταβολικής ανθεκτικότητας σε νεονικοτινοειδή θα ήταν η έκφραση των υποψήφιων ανασυνδυασμένων ενζύμων αποτοξικοποίησης και η διερεύνηση της πιθανής μεταβολικής τους δραστηριότητας. Ενδιαφέρον ακόμη θα ήταν να στραφούμε και σε νέες λειτουργικές ομάδες γονιδίων, των οποίων οι δράσεις δεν είναι ακόμη γνωστές, παρότι εμφανίζουν συστηματικά αυξημένα επίπεδα έκφρασης σε ανθεκτικούς πληθυσμούς.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Ali, Z.B., Boursot, P., Said, K., Lagnel, J., Chatti, N., and Navajas, M. (2000). Comparison of Ribosomal ITS Regions Among *Androctonus* spp. Scorpions (Scorpionida: Buthidae) from Tunisia. *Journal of medical entomology* 37, 787-790.
- Alon, M., Alon, F., Nauen, R., and Morin, S. (2008). Organophosphates' resistance in the B-biotype of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) is associated with a point mutation in an ace1-type acetylcholinesterase and overexpression of carboxylesterase. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 38, 940-949.
- Alon, M., Benting, J., Lueke, B., Ponge, T., Alon, F., and Morin, S. (2006). Multiple origins of pyrethroid resistance in sympatric biotypes of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 36, 71-79.
- Alout, H., Berthomieu, A., Cui, F., Tan, Y., Berticat, C., Qiao, C., and Weill, M. (2007). Different amino-acid substitutions confer insecticide resistance through acetylcholinesterase 1 insensitivity in *Culex vishnui* and *Culex tritaeniorhynchus* (Diptera: Culicidae) from China. *Journal of medical entomology* 44, 463-469.
- Andreev, D., Kreitman, M., Phillips, T.W., Beeman, R.W., and French-Constant, R.H. (1999). Multiple Origins of Cyclodiene Insecticide Resistance in *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). *J Mol Evol* 48, 615-624.
- Andrews, M.C., Callaghan, A., Field, L.M., Williamson, M.S., and Moores, G.D. (2004). Identification of mutations conferring insecticide-insensitive AChE in the cotton-melon aphid, *Aphis gossypii* Glover. *Insect Molecular Biology* 13, 555-561.
- Anstead, J.A., Williamson, M.S., and Denholm, I. (2005). Evidence for multiple origins of identical insecticide resistance mutations in the aphid *Myzus persicae*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 35, 249-256.
- Arnó, J., Gabarra, R., Liu, T.-X., Simmons, A., and Gerling, D. (2010). Natural Enemies of *Bemisia tabaci*: Predators and Parasitoids. In *Bemisia: Bionomics and Management of a Global Pest*, P.A. Stansly, and S.E. Naranjo, eds. (Springer Netherlands), pp. 385-421.
- Asahara, M., Uesugi, R., and Osakabe, M. (2008). Linkage Between One of the Polygenic Hexythiazox Resistance Genes and an Etoxazole Resistance Gene in the Twospotted Spider Mite (Acari: Tetranychidae). *Journal of Economic Entomology* 101, 1704-1710.
- Blackman, R.L., and Cahill, M. (1998). The karyotype of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Bulletin of Entomological Research* 88, 213-215.
- Beers, E.H., Riedl, H., and Dunley, J.E. (1998). Resistance to abamectin and reversion to susceptibility to fenbutatin oxide in spider mite (Acari: Tetranychidae) populations in the Pacific Northwest. *Journal of Economic entomology*. 91: 352–360.
- Bloomquist, J.R. (2000). GABA and glutamate receptors as biochemical sites for insecticide action. In: Ishaaya I (ed) *Biochemical sites of insecticide action and resistance*. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg/New York, pp. 17–41.



- Bloomquist, J.R. (1993). Toxicology, mode of action and target site-mediated resistance to insecticides acting on chloride channels. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* 106, 301-314.
- Bolland, H.R., Gutierrez, J., and Flechtmann, C.H.W. (1998). *World Catalogue of the Spider Mite Family (Acari: Tetranychidae)*. Brill, Leiden.
- Bounfour, M., and Tanigoshi, L.K. (2001). Effect of Temperature on Development and Demographic Parameters of *Tetranychus urticae* and *Eotetranychus carpini borealis* (Acari: Tetranychidae). *Annals of the Entomological Society of America* 94, 400-404.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.
- Brown, J.K., Frohlich, D.R., and Rosell, R.C. (1995). The Sweetpotato or Silverleaf Whiteflies: Biotypes of *Bemisia tabaci* or a Species Complex? *Annual Review of Entomology* 40, 511-534.
- Buckingham, S.D., and Sattelle, D.B. (2010). GABA receptors of insects. In *Insect Pharmacology: Channels, Receptors, Toxins and Enzymes*, ed. LI Gilbert, SS Gill, pp. 29–64. London: Academic.
- Busvine, J.R. (1971). A critical review of the techniques for testing insecticides (Commonwealth Agricultural Bureaux).
- Byrne, F.J., Castle, S., Prabhaker, N., and Toscano, N.C. (2003). Biochemical study of resistance to imidacloprid in B biotype *Bemisia tabaci* from Guatemala. *Pest Management Science* 59, 347-352.
- Byrne, D.N. and Bellows, T.S. (1991). Whitefly biology. *Annual Review of Entomology* 36: 431-457.
- Cahill, M., Gorman, K., Day, S., Denholm, I., Elbert, A., and Nauen, R. (1996). Baseline determination and detection of resistance to imidacloprid in *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). *Bulletin of Entomological Research* 86, 343-349.
- Campbell, B.C., Steffen-Campbell, J.D., and Gill, R.J. (1994). Evolutionary origin of whiteflies (Hemiptera: Sternorrhyncha: Aleyrodidae) inferred from 18S rDNA sequences. *Insect Molecular Biology* 3, 73-88.
- Campos, F., Krupa, D.A., and Dubas, R.A. (1996). Susceptibility of populations of twospotted spider mites (Acari: Tetranychidae) from Florida, Holland and the Canary Island to Abamectin and characterization of abamectin resistance. *Journal of Economic entomology*. 89: 594–601.
- Campos, F., Dybas, R.D., and Krupa, D.A. (1995). Susceptibility of twospotted spider mite (Acari: Tetranychidae) populations in California to abamectin. *Journal of Economic entomology* . 88: 225–231.
- Carbonnelle, S., Hance, T., Migeon, A., Baret, P., Cros-Arteil, S., and Navajas, M. (2007). Microsatellite markers reveal spatial genetic structure of *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) populations along a latitudinal gradient in Europe. *Experimental and Applied Acarology* 41, 225-241.
- Carthew, R.W., and Sontheimer, E.J. (2009). Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* 136, 642-655.

- Casida, J.E., and Durkin, K.A. (2013). Neuroactive Insecticides: Targets, Selectivity, Resistance, and Secondary Effects. *Annual Review of Entomology* 58, 99-117.
- Chevenet, F., Brun, C., Banuls, A.-L., Jacq, B., and Christen, R. (2006). TreeDyn: towards dynamic graphics and annotations for analyses of trees. *BMC Bioinformatics* 7, 439.
- Clark, J.K., Scott, J.G., Campos, F., and Bloomquist, J.R. (1995). Resistance to Avermectins: Extent, Mechanisms, and Management Implications. *Annual Review of Entomology* 40, 1-30.
- Clement, M., Posada, D., and Crandall, K.A. (2000). TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9, 1657-1659.
- Crooker, A. (1985). Embryonic and juvenile development, pp. 149-163. In: Helle W, Sabelis MW [eds.], *Spider Mites: Their Biology, Natural Enemies and Control*. Elsevier, Amsterdam.
- Daborn, P.J., Yen, J.L., Bogwitz, M.R., Le Goff, G., Feil, E., Jeffers, S., Tijet, N., Perry, T., Heckel, D., Batterham, P., *et al.* (2002). A Single P450 Allele Associated with Insecticide Resistance in *Drosophila*. *Science* 297, 2253-2256.
- De Barro, P.J., Liu, S.-S., Boykin, L.M., and Dinsdale, A.B. (2011). *Bemisia tabaci*: A Statement of Species Status. *Annual Review of Entomology* 56, 1-19.
- De Boer, R. 1985. Reproductive barriers. In: Helle, W. and Sabelis, M. W. (eds), *Spider Mites: Their Biology, Natural Enemies and Control*, vol. 1 A, pp. 193-199. Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
- Demaeght, P., Dermauw, W., Tsakireli, D., Khajehali, J., Nauen, R., Tirry, L., Vontas, J., Lümmer, P., and Van Leeuwen, T. (2013). Molecular analysis of resistance to acaricidal spirocyclic tetrone acids in *Tetranychus urticae*: CYP392E10 metabolizes spirodiclofen, but not its corresponding enol. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 43, 544-554.
- Denholm, I. and Devine, G. (2001) Insecticide resistance. In: Levin SA [ed.], *Encyclopedia of Biodiversity*. Academic Press, San Diego, pp. 465–477.
- Denholm, I., Cahill, M., Dennehy, T.J., and Horowitz, A.R. (1998). Challenges with managing insecticide resistance in agricultural pests, exemplified by the whitefly *Bemisia tabaci*. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences* 353, 1757-1767.
- Dennehy, T.J., and Williams, L. (1997). Management of resistance in *Bemisia* in Arizona cotton. *Pesticide Science* 51, 398-406.
- Dereeper, A., Guignon, V., Blanc, G., Audic, S., Buffet, S., Chevenet, F., Dufayard, J.-F., Guindon, S., Lefort, V., Lescot, M., *et al.* (2008). Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Research* 36, W465-W469.
- Dermauw, W., Wybouw, N., Rombauts, S., Menten, B., Vontas, J., Grbić, M., Clark, R.M., Feyereisen, R., and Van Leeuwen, T. (2013). A link between host plant adaptation and pesticide resistance in the polyphagous spider mite *Tetranychus urticae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110, E113–E122.
- Dermauw, W., Ilias, A., Riga, M., Tsagkarakou, A., Grbić, M., Tirry, L., Van Leeuwen, T., and Vontas, J. (2012). The cys-loop ligand-gated ion channel gene family of *Tetranychus urticae*:

- Implications for acaricide toxicology and a novel mutation associated with abamectin resistance. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 42, 455-465.
- Devine, G.J., Barber, M., and Denholm, I. (2001). Incidence and inheritance of resistance to METI-acaricides in European strains of the two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae*) (Acari: Tetranychidae). *Pest Management Science* 57, 443-448.
- Devorshak, C., and Roe, R.M. (1998). The role of esterases in insecticide resistance. *Reviews in Toxicology*. 2: 501–537.
- Devonshire, A.L., and Field, L.M. (1991). Gene Amplification and Insecticide Resistance. *Annual Review of Entomology* 36, 1-21.
- Dinsdale, A., Cook, L., Riginos, C., Buckley, Y.M., and Barro, P.D. (2010). Refined Global Analysis of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Sternorrhyncha: Aleyrodoidea: Aleyrodidae) Mitochondrial Cytochrome Oxidase 1 to Identify Species Level Genetic Boundaries. *Annals of the Entomological Society of America* 103, 196-208.
- Edgar, R.C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32, 1792-1797.
- Edgecomb, R.S., Harth, C.E., and Schneiderman, A.M. (1994). Regulation of feeding behavior in adult *Drosophila melanogaster* varies with feeding regime and nutritional state. *Journal of Experimental Biology* 197, 215-235.
- Ellsworth, P.C., and Martinez-Carrillo, J.L. (2001). IPM for *Bemisia tabaci*: a case study from North America. *Crop Protection* 20, 853-869.
- Febvay, G., Delobel, B., and Rahbé, Y. (1988). Influence of the amino acid balance on the improvement of an artificial diet for a biotype of *Acyrtosiphon pisum* (Homoptera: Aphididae). *Canadian Journal of Zoology* 66, 2449-2453.
- Feng, Y., Wu, Q., Wang, S., Chang, X., Xie, W., Xu, B., and Zhang, Y. (2010). Cross-resistance study and biochemical mechanisms of thiamethoxam resistance in B-biotype *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Pest Management Science* 66, 313-318.
- Feyereisen, R. (1995). Molecular biology of insecticide resistance. *Toxicology Letters* 82–83, 83-90.
- French-Constant, R.H., Anthony, N., Aronstein, K., Rocheleau, T., and Stilwell, G. (2000). Cyclodiene Insecticide Resistance: From Molecular to Population Genetics. *Annual Review of Entomology* 45, 449-466.
- Field, L.M., Devonshire, A.L., and Forde, B.G. (1988). Molecular evidence that insecticide resistance in peach-potato aphids (*Myzus persicae* Sulz.) results from amplification of an esterase gene. *Biochemical Journal*. 251: 309–312.
- Fournier, D., and Mutero, A. (1994). Modification of acetylcholinesterase as a mechanism of resistance to insecticides. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* 108, 19-31.
- Fournier, D., Cuany, A., Pralavorio, M., Bride, J.M., and Berge, J.B. (1987). Analysis of methidathion resistance mechanisms in *Phytoseiulus persimilis* A.H. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 28, 271-278.

- Fritz, L.C., Wang, C.C., and Gorio, A. (1979). Avermectin B1A irreversibly blocks postsynaptic potentials at the lobster neuromuscular junction by reducing muscle membrane resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences . USA* 76: 2062–2066.
- Gerling, D. (1986). Natural enemies of *Bemisia tabaci*, biological characteristics and potential as biological control agents: A review. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 17, 99-110.
- Grbic, M., Van Leeuwen, T., Clark, R.M., Rombauts, S., Rouze, P., Grbic, V., Osborne, E.J., Dermauw, W., Thi Ngoc, P.C., Ortego, F., *et al.* (2011). The genome of *Tetranychus urticae* reveals herbivorous pest adaptations. *Nature* 479, 487-492.
- Gennadius, P. (1889). Disease of tobacco plantations in the Trikonía. The aleurodid of tobacco. [In Greek]. *Ellenike Georgia*, 5: 1-3.
- Georghiou, G.P. (1986). The magnitude of the resistance problem, *Pesticide Resistance: Strategies and Tactics for Management*. National Academy Press, Washington, D.C., pp. 14-43.
- Georghiou, G.P. (1969). Parasitological review. Genetics of resistance to insecticides in houseflies and mosquitoes. *Experimental Parasitology*. 26 (2): 224-255.
- Guillemaud, T., Rooker, S., Pasteur, N., and Raymond, M. (1996). Testing the unique amplification event and the worldwide migration hypothesis of insecticide resistance genes with sequence data. *Heredity* 77, 535-543.
- Guindon, S., and Gascuel, O. (2003). A Simple, Fast, and Accurate Algorithm to Estimate Large Phylogenies by Maximum Likelihood. *Systematic Biology* 52, 696-704.
- He, L., Gao, X., Wang, J., Zhao, Z., and Liu, N. (2009). Genetic analysis of abamectin resistance in *Tetranychus cinnabarinus*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 95, 147-151.
- He, H., Chen, A.C., Davey, R.B., Ivie, G.W., and George, J.E. (1999). Identification of a Point Mutation in the para-Type Sodium Channel Gene from a Pyrethroid-Resistant Cattle Tick. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 261, 558-561.
- Helle, W., and Sabelis, M.W. (1985). *World Crop Pests, 1A-B: Spider mites, their biology, natural enemies and control*. Elsevier, Amsterdam.
- Helle, W. (1962). Genetics of resistance to organophosphorus compounds and its relation to diapause in *Tetranychus urticae* Koch (Acari). *Tijdschrift Over Planteziekten* 68, 155-195.
- Hemingway, J., Hawkes, N., Prapanthadara, L., Jayawardena, K.G.I., and Ranson, H. (1998). The role of gene splicing, gene amplification and regulation in mosquito insecticide resistance. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences* 353, 1695-1699.
- Horowitz, A.R., Kontsedalov, S., and Ishaaya, I. (2004). Dynamics of Resistance to the Neonicotinoids Acetamiprid and Thiamethoxam in *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). *Journal of Economic Entomology* 97, 2051-2056.
- Horowitz, A.R., Denholm, I., Gorman, K., Cenis, J.L., Kontsedalov, S., and Ishaaya, I. (2003). Biotype Q of *Bemisia tabaci* identified in Israel. *Phytoparasitica* 31, 94-98.
- Horowitz, A.R., Forer, G., and Ishaaya, I. (1994). Managing resistance in *Bemisia tabaci* in Israel with emphasis on cotton. *Pesticide Science* 42, 113-122.

- Hurtado, M.A., Ansaloni, T., Cros-Arteil, S., Jacas, J.A., and Navajas, M. (2008). Sequence analysis of the ribosomal internal transcribed spacers region in spider mites (Prostigmata: Tetranychidae) occurring in citrus orchards in Eastern Spain: use for species discrimination. *Annals of Applied Biology* *153*, 167-174.
- Huvenne, H., and Smagghe, G. (2010). Mechanisms of dsRNA uptake in insects and potential of RNAi for pest control: A review. *Journal of Insect Physiology* *56*, 227-235.
- Ilias, A., Roditakis, E., Grispou, M., Nauen, R., Vontas, J., and Tsagkarakou, A. (2012). Efficacy of ketoenols on insecticide resistant field populations of two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* and sweet potato whitefly *Bemisia tabaci* from Greece. *Crop Protection* *42*, 305-311.
- Inbar, M., and Gerling, D. (2008). Plant-Mediated Interactions Between Whiteflies, Herbivores, and Natural Enemies. *Annual Review of Entomology* *53*, 431-448.
- Jeppson, L.R., Keifer, H.H., and Baker, E.W. (1975). *Mites Injurious to Economic Plants*. University of California Press, Berkeley, CA, USA.
- Jones, D. (2003). Plant Viruses Transmitted by Whiteflies. *European Journal of Plant Pathology* *109*, 195-219.
- Karunker, I., Morou, E., Nikou, D., Nauen, R., Sertchook, R., Stevenson, B.J., Paine, M.J.I., Morin, S., and Vontas, J. (2009). Structural model and functional characterization of the *Bemisia tabaci* CYP6CM1vQ, a cytochrome P450 associated with high levels of imidacloprid resistance. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* *39*, 697-706.
- Karunker, I., Benting, J., Lueke, B., Ponge, T., Nauen, R., Roditakis, E., Vontas, J., Gorman, K., Denholm, I., and Morin, S. (2008). Over-expression of cytochrome P450 CYP6CM1 is associated with high resistance to imidacloprid in the B and Q biotypes of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* *38*, 634-644.
- Kennedy, G.G. and Smitley, D.R. (1985). Dispersal. In: Helle, W. and Sabelis, M. W. (eds), *Spider Mites: Their Biology, Natural Enemies and Control*, vol. 1 A, pp. 233 - 242. Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
- Khajehali, J., Van Nieuwenhuysse, P., Demaeght, P., Tirry, L., and Van Leeuwen, T. (2011). Acaricide resistance and resistance mechanisms in *Tetranychus urticae* populations from rose greenhouses in the Netherlands. *Pest Management Science* *67*, 1424-1433.
- Khajehali, J., Van Leeuwen, T., Grispou, M., Morou, E., Alout, H., Weill, M., Tirry, L., Vontas, J., and Tsagkarakou, A. (2010). Acetylcholinesterase point mutations in European strains of *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) resistant to organophosphates. *Pest Management Science* *66*, 220-228.
- Krantz, G.W. (2009). Introduction, pp. 1-2. In: Krantz GW, Walter DE [eds.], *A manual of acarology*, Third Edition ed. Texas Tech University Press, Lubbock.
- Kwon, D.H., Park, J.H., and Lee, S.H. (2013). Screening of lethal genes for feeding RNAi by leaf disc-mediated systematic delivery of dsRNA in *Tetranychus urticae*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* *105*, 69-75.

- Kwon, D.H., Im, J.S., Ahn, J.J., Lee, J.-H., Marshall Clark, J., and Lee, S.H. (2010a). Acetylcholinesterase point mutations putatively associated with monocrotophos resistance in the two-spotted spider mite. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 96, 36-42.
- Kwon, D.H., Clark, J.M., and Lee, S.H. (2010b). Cloning of a sodium channel gene and identification of mutations putatively associated with fenpropathrin resistance in *Tetranychus urticae*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 97, 93-100.
- Kwon, D.H., Yoon, K.S., Clark, J.M., and Lee, S.H. (2010c). A point mutation in a glutamate-gated chloride channel confers abamectin resistance in the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch. *Insect Molecular Biology* 19, 583-591.
- Labbé, P., Berthomieu, A., Berticat, C., Alout, H., Raymond, M., Lenormand, T., and Weill, M. (2007). Independent Duplications of the Acetylcholinesterase Gene Conferring Insecticide Resistance in the Mosquito *Culex pipiens*. *Molecular Biology and Evolution* 24, 1056-1067.
- Labbé, P., Lenormand, T., and Raymond, M. (2005). On the worldwide spread of an insecticide resistance gene: a role for local selection. *Journal of Evolutionary Biology* 18, 1471-1484.
- Lindquist, E.E., Krantz, G.W., and Walter, D.E. (2009). Classification, pp. 97-103. In: Krantz GW, Walter DE [eds.], *A manual of acarology*, Third Edition ed. Texas Tech University Press, Lubbock.
- Luo, C., Jones, C.M., Devine, G., Zhang, F., Denholm, I., and Gorman, K. (2010). Insecticide resistance in *Bemisia tabaci* biotype Q (Hemiptera: Aleyrodidae) from China. *Crop Protection* 29, 429-434.
- Marčić, D., Perić, P. and Milenković, S. (2011). *Acaricides - Biological Profiles, Effects and Uses in Modern Crop Protection, Pesticides - Formulations, Effects, Fate*, Prof. Margarita Stoytcheva (Ed.), ISBN: 978-953-307-532-7, InTech, DOI: 10.5772/13984. Available from: <http://www.intechopen.com/books/pesticides-formulations-effects-fate/acaricides-biological-profiles-effects-and-uses-in-modern-crop-protection>
- Martin, J.H., Mifsud, D., and Rapisarda, C. (2000a). The whiteflies (Hemiptera: Aleyrodidae) of Europe and the Mediterranean Basin. *Bulletin of Entomological Research* 90, 407-448.
- Martin, R.L., Pittendrigh, B., Liu, J., Reenan, R., French-Constant, R., and Hanck, D.A. (2000b). Point mutations in domain III of a *Drosophila* neuronal Na channel confer resistance to allethrin. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 30, 1051-1059.
- Maynard, D.N. and Cantliffe, D.J. 1989. Squash silverleaf and tomato irregular ripening: new vegetable disorders in Florida. *Vegetable Crops Fact Sheet* , VC-37, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, Gainesville, Florida.
- Matsuda, K., Kanaoka, S., Akamatsu, M., and Sattelle, D.B. (2009). Diverse Actions and Target-Site Selectivity of Neonicotinoids: Structural Insights. *Molecular Pharmacology* 76, 1-10.
- Menozi, P., Shi, M., Lougarre, A., Tang, Z., and Fournier, D. (2004). Mutations of acetylcholinesterase which confer insecticide resistance in *Drosophila melanogaster* populations. *BMC Evol Biol* 4, 1-7.
- Migeon, A., and Dorkeld, F. (2010). Spider Mites Web: a comprehensive database for the Tetranychidae. <http://www.montpellier.inra.fr/CBGP/spmweb>.

- Mitchell, R. (1973). Growth and Population Dynamics of a Spider Mite (*Tetranychus Urticae* K., Acarina: Tetranychidae). *Ecology* *54*, 1349-1355.
- Morin, S., Williamson, M.S., Goodson, S.J., Brown, J.K., Tabashnik, B.E., and Dennehy, T.J. (2002). Mutations in the *Bemisia tabaci* para sodium channel gene associated with resistance to a pyrethroid plus organophosphate mixture. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* *32*, 1781-1791.
- Mound, L.A., and Halsey, S.H. (1978). *Whiteflies of the World: A Systematic Catalogue of the Aleyrodidae (Homoptera) with Host Plant and Natural Enemy Data*. British Museum (Natural History), London, UK, John Wiley & Sons, Chichester, 329 pp.
- Mutero, A., Pralavorio, M., Bride, J.M., and Fournier, D. (1994). Resistance-associated point mutations in insecticide-insensitive acetylcholinesterase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *91*, 5922-5926.
- Naranjo, S.E., and Ellsworth, P.C. (2009). Fifty years of the integrated control concept: moving the model and implementation forward in Arizona. *Pest Management Science* *65*, 1267-1286.
- Nauen, R., Vontas, J., Kausmann, M., and Wölfel, K. (2013). Pymetrozine is hydroxylated by CYP6CM1, a cytochrome P450 conferring neonicotinoid resistance in *Bemisia tabaci*. *Pest Management Science* *69*, 457-461.
- Nauen, R., and Smagghe, G. (2006). Mode of action of etoxazole. *Pest Management Science* *62*, 379-382.
- Nauen, R., and Denholm, I. (2005). Resistance of insect pests to neonicotinoid insecticides: Current status and future prospects. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* *58*, 200-215.
- Nauen, R., Stumpf, N., and Elbert, A. (2002). Toxicological and mechanistic studies on neonicotinoid cross resistance in Q-type *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Pest Management Science* *58*, 868-875.
- Navajas, M., Perrot-Minnot, M.J., Lagnel, J., Migeon, A., Bourse, T., and Cornuet, J.M. (2002). Genetic structure of a greenhouse population of the spider mite *Tetranychus urticae*: spatio-temporal analysis with microsatellite markers. *Insect Molecular Biology* *11*, 157-165.
- Navajas, M., Lagnel, J., Fauvel, G., and De Moraes, G. (1999). Sequence Variation of Ribosomal Internal Transcribed Spacers (ITS) in Commercially Important Phytoseiid Mites. *Exp Appl Acarol* *23*, 851-859.
- Navia, D., de Moraes, G.J., Roderick, G., and Navajas, M. (2005). The invasive coconut mite *Aceria guerreronis* (Acari: Eriophyidae): origin and invasion sources inferred from mitochondrial (16S) and nuclear (ITS) sequences. *Bulletin of Entomological Research* *95*, 505-516.
- Newcomb, R., Gleeson, D., Yong, C., Russell, R., and Oakeshott, J. (2005). Multiple Mutations and Gene Duplications Conferring Organophosphorus Insecticide Resistance Have Been Selected at the Rop-1 Locus of the Sheep Blowfly, *Lucilia cuprina*. *J Mol Evol* *60*, 207-220.
- Oh, S.H., Kozaki, T., Mizuno, H., Tomita, T., and Kono, Y. (2006). Expression of Ace-paralogous acetylcholinesterase of *Culex tritaeniorhynchus* with an amino acid substitution conferring insecticide insensitivity in baculovirus-insect cell system. *Pesticide Biochemistry and Physiology* *85*, 46-51.

- Ortelli, F., Rossiter, L.C., Vontas, J., Ranson, H., and Hemingway, J. (2003). Heterologous expression of four glutathione transferase genes genetically linked to a major insecticide-resistance locus from the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Biochem J* 373, 957-963.
- Palumbo, J.C., Horowitz, A.R., and Prabhaker, N. (2001). Insecticidal control and resistance management for *Bemisia tabaci*. *Crop Protection* 20, 739-765.
- Perring, T.M. (2001). The *Bemisia tabaci* species complex. *Crop Protection* 20, 725-737.
- Pfaffl, M.W., Horgan, G.W., and Dempfle, L. (2002). Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research* 30, e36.
- Piironen, S., Lindstrom, L., Lyytinen, A., Mappes, J., Chen, Y., Izzo, V., and Grapputo, A. (2013). Pre-invasion history and demography shape the genetic variation in the insecticide resistance-related acetylcholinesterase 2 gene in the invasive Colorado potato beetle. *BMC Evol Biol* 13, 13.
- Pinto, J., Lynd, A., Vicente, J.L., Santolamazza, F., Randle, N.P., Gentile, G., Moreno, M., Simard, F., Charlwood, J.D., do Rosário, V.E., *et al.* (2007). Multiple Origins of Knockdown Resistance Mutations in the Afrotropical Mosquito Vector *Anopheles gambiae*. *PLoS ONE* 2, e1243.
- Potter, D.A., Wrensch, D.L., and Johnston, D.E. (1976). Guarding, aggressive- behaviour, and mating success in male twospotted spider mites (Acari, Tetranychidae). *Annals of the Entomological Society of America* 69: 707-711.
- Rauch, N., and Nauen, R. (2003). Identification of biochemical markers linked to neonicotinoid cross resistance in *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 54, 165-176.
- Raymond, M., Callaghan, A., Fort, P., and Pasteur, N. (1991). Worldwide migration of amplified insecticide resistance genes in mosquitoes. *Nature* 350, 151-153.
- Riga, M., Tsakireli D., Ilias A., Morou E., Myridakis A., Stephanou E.G., Nauen R., Van Leeuwen T., Paine M., and Vontas. J. Abamectin is metabolized by the CYP392A16, a cytochrome P450 associated with high levels of acaricide resistance in *Tetranychus urticae*. submitted in *Insect Biochemistry and Molecular Biology*.
- Rinkevich, F.D., Du, Y., and Dong, K. (2013). Diversity and convergence of sodium channel mutations involved in resistance to pyrethroids. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 106, 93-100.
- Rinkevich, F.D., Hedtke, S.M., Leichter, C.A., Harris, S.A., Su, C., Brady, S.G., Taskin, V., Qiu, X., and Scott, J.G. (2012). Multiple Origins of *kdr-type* Resistance in the House Fly, *Musca domestica*. *PLoS ONE* 7, e52761.
- Roditakis, E., Morou, E., Tsagkarakou, A., Riga, M., Nauen, R., Paine, M., Morin, S., and Vontas, J. (2011). Assessment of the *Bemisia tabaci* CYP6CM1vQ transcript and protein levels in laboratory and field-derived imidacloprid-resistant insects and cross-metabolism potential of the recombinant enzyme. *Insect Science* 18, 23-29.



- Roditakis, E., Grispou, M., Morou, E., Kristoffersen, J.B., Roditakis, N., Nauen, R., Vontas, J., and Tsagkarakou, A. (2009). Current status of insecticide resistance in Q biotype *Bemisia tabaci* populations from Crete. *Pest Management Science* 65, 313-322.
- Roditakis, E., Tsagkarakou, A., and Vontas, J. (2006). Identification of mutations in the para sodium channel of *Bemisia tabaci* from Crete, associated with resistance to pyrethroids. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 85, 161-166.
- Roditakis, E., Roditakis, N.E., and Tsagkarakou, A. (2005). Insecticide resistance in *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) populations from Crete. *Pest Management Science* 61, 577-582.
- Roush, R.T., and Tabashnik, B. (1990). *Pesticide resistance in arthropods*. Chapman & Hall, New York, 303 p.
- Sato, M.E., Silva, M.Z.d., Raga, A., and Souza Filho, M.F.d. (2005). Abamectin resistance in *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae): selection, cross-resistance and stability of resistance. *Neotropical Entomology* 34, 991-998.
- Scott, J.G. (1999). Cytochromes P450 and insecticide resistance. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 29, 757-777.
- Simmons, A.M., Harrison, H.F., and Ling, K.-S. (2008). Forty-nine new host plant species for *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Entomological Science* 11, 385-390.
- Stone, B.F. (1968). A formula for determining degree of dominance in cases of monofactorial inheritance of resistance to chemicals. *Bulletin of the World Health Organization* 38, 325-326.
- Stumpf, N., and Nauen, R. (2002). Biochemical Markers Linked to Abamectin Resistance in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *Pesticide Biochemistry and Physiology* 72, 111-121.
- Tan, J., Liu, Z., Wang, R., Huang, Z.Y., Chen, A.C., Gurevitz, M., and Dong, K. (2005). Identification of Amino Acid Residues in the Insect Sodium Channel Critical for Pyrethroid Binding. *Molecular Pharmacology* 67, 513-522.
- Templeton, A.R., Crandall, K.A., and Sing, C.F. (1992). A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. *Genetics* 132: 619-633.
- Tsagkarakou, A., Nikou, D., Roditakis, E., Sharvit, M., Morin, S., and Vontas, J. (2009a). Molecular diagnostics for detecting pyrethroid and organophosphate resistance mutations in the Q biotype of the whitefly *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Pesticide Biochemistry and Physiology* 94, 49-54.
- Tsagkarakou, A., Van Leeuwen, T., Khajehali, J., Ilias, A., Grispou, M., Williamson, M.S., Tirry, L., and Vontas, J. (2009b). Identification of pyrethroid resistance associated mutations in the para sodium channel of the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *Insect Molecular Biology* 18, 583-593.
- Tsagkarakou, A., Navajas, M., Rousset, F., and Pasteur, N. (1999). Genetic Differentiation in *Tetranychus Urticae* (Acari: Tetranychidae) from greenhouses in France. *Exp Appl Acarol* 23, 365-378.

- Tsagkarakou, A., Navajas, M., and Papaioannou-Souliotis, P. (1998). Gene flow among *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) populations in Greece. *Molecular Ecology* 7, 71-79.
- Upadhyay, S., Chandrashekar, K., Thakur, N., Verma, P., Borgio, J., Singh, P., and Tuli, R. (2011). RNA interference for the control of whiteflies (*Bemisia tabaci*) by oral route, *Journal of Biosciences*. 36 153–161.
- Vacante, V. (2010). *Citrus Mites: Identification, Bionomy and Control*. CABI Publishing, Oxfordshire, UK.
- Van Der Geest, L.P.S., Bosse, T.C., and Veerman, A. (1983). DEVELOPMENT OF A MERIDIC DIET FOR THE TWO-SPOTTED SPIDER MITE *TETRANYCHUS URTICAE*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 33, 297-302.
- Van Leeuwen, T., Demaeght, P., Osborne, E.J., Dermauw, W., Gohlke, S., Nauen, R., Grbić, M., Tirry, L., Merzendorfer, H., and Clark, R.M. (2012). Population bulk segregant mapping uncovers resistance mutations and the mode of action of a chitin synthesis inhibitor in arthropods. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, 4407-4412.
- Van Leeuwen, T., Vontas, J., Tsagkarakou, A., Dermauw, W., and Tirry, L. (2010). Acaricide resistance mechanisms in the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* and other important Acari: A review. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 40, 563-572.
- Van Leeuwen, T., Vontas, J., Tsagkarakou, A., and Tirry, L. (2009). Mechanisms of acaricide resistance in the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* pp. 347-393. In: Ishaaya I, Horowitz AR [eds.], *Biorational Control of Arthropod Pests*. Springer Netherlands.
- Van Leeuwen, T., Vanholme, B., Van Pottelberge, S., Van Nieuwenhuyse, P., Nauen, R., Tirry, L., and Denholm, I. (2008). Mitochondrial heteroplasmy and the evolution of insecticide resistance: Non-Mendelian inheritance in action. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 5980-5985.
- Van Leeuwen, T., Van Pottelberge, S., and Tirry, L. (2005). Comparative acaricide susceptibility and detoxifying enzyme activities in field-collected resistant and susceptible strains of *Tetranychus urticae*. *Pest Management Science* 61, 499-507.
- Van Nieuwenhuyse, P., Van Leeuwen, T., Khajehali, J., Vanholme, B., and Tirry, L. (2009). Mutations in the mitochondrial cytochrome b of *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) confer cross-resistance between bifenazate and acequinocyl. *Pest Management Science* 65, 404-412.
- Vassiliou, V., Emmanouilidou, M., Perrakis, A., Morou, E., Vontas, J., Tsagkarakou, A., and Roditakis, E. (2011). Insecticide resistance in *Bemisia tabaci* from Cyprus. *Insect Science* 18, 30-39.
- Vaughan, A., Rocheleau, T., and French-Constant, R. (1997). Site-Directed Mutagenesis of an Acetylcholinesterase Gene from the Yellow Fever Mosquito *Aedes aegypti* Confers Insecticide Insensitivity. *Experimental Parasitology* 87, 237-244.
- Vontas, J.G., Small, G.J., Nikou, D.C., Ranson, H., and Hemingway, J. (2002). Purification, molecular cloning and heterologous expression of a glutathione S-transferase involved in insecticide resistance from the rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *Biochem J* 362, 329-337.

- Vontas, J.G., Small, G.J., and Hemingway, J. (2001). Glutathione S-transferases as antioxidant defence agents confer pyrethroid resistance in *Nilaparvata lugens*. *Biochem J* 357, 65-72.
- Walsh, S.B., Dolden, T.A., Moores, G.D., Kristensen, M., Lewis, T., Devonshire, A.L., and Williamson, M.S. (2001). Identification and characterization of mutations in housefly (*Musca domestica*) acetylcholinesterase involved in insecticide resistance. *Biochem J* 359, 175-181.
- Walter, D.E., Lindquist, E.E., Smith, I.M., R, C.D., and Krantz, G.W. (2009). Order Trombidiformes, pp. 233-420. In: Krantz GW, Walter DE [eds.], *A manual of acarology*, Third Edition ed. Texas Tech University Press, Lubbock.
- Wang, X.-W., Zhao, Q.-Y., Luan, J.-B., Wang, Y.-J., Yan, G.-H., and Liu, S.-S. (2012). Analysis of a native whitefly transcriptome and its sequence divergence with two invasive whitefly species. *BMC Genomics* 13, 529.
- Wang, X.-W., Luan, J.-B., Li, J.-M., Su, Y.-L., Xia, J., and Liu, S.-S. (2011). Transcriptome analysis and comparison reveal divergence between two invasive whitefly cryptic species. *BMC Genomics* 12, 458.
- Wang, X.-W., Luan, J.-B., Li, J.-M., Bao, Y.-Y., Zhang, C.-X., and Liu, S.-S. (2010). De novo characterization of a whitefly transcriptome and analysis of its gene expression during development. *BMC Genomics* 11, 400.
- Weidhaas, J.A. (1979). Spider mites and other Acarina on trees and shrubs. *Journal of Arboriculture* 5: 9-15.
- Williamson, M., Martinez-Torres, D., Hick, C., and Devonshire, A. (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.
- Xie, W., Meng, Q.-s., Wu, Q.-j., Wang, S.-l., Yang, X., Yang, N.-n., Li, R.-m., Jiao, X.-g., Pan, H.-p., Liu, B.-m., *et al.* (2012). Pyrosequencing the *Bemisia tabaci* Transcriptome Reveals a Highly Diverse Bacterial Community and a Robust System for Insecticide Resistance. *PLoS ONE* 7, e35181.
- Yamamoto, S., and Nishida, A. (1981). Acaricidal studies on milbemycins, a new family of macrolide antibiotics II. Studies on a milbemycins-resistant strain of the twospotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch (Acarina: Tetranychidae) developed in the laboratory. *Japanese Journal of Applied Entomology and Zoology*. 25: 286-291.
- Yang, N., Xie, W., Jones, C.M., Bass, C., Jiao, X., Yang, X., Liu, B., Li, R., and Zhang, Y. (2013a). Transcriptome profiling of the whitefly *Bemisia tabaci* reveals stage-specific gene expression signatures for thiamethoxam resistance. *Insect Molecular Biology* 22, 485-496.
- Yang, X., Xie, W., Wang, S.-l., Wu, Q.-j., Pan, H.-p., Li, R.-m., Yang, N.-n., Liu, B.-m., Xu, B.-y., Zhou, X., *et al.* (2013b). Two cytochrome P450 genes are involved in imidacloprid resistance in field populations of the whitefly, *Bemisia tabaci*, in China. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 107, 343-350.
- Yokomi, R.K., Hoelmer, K.A. and Osborne, L.S. 1990. Relationships between the sweetpotato whitefly and the squash silverleaf disorder. *Phytopathology* 80:895–900.

- Zhang, Z. (2003). *Mites of greenhouses: identification, biology and control*. CABI International, Wallingford, United Kingdom.
- Ζιώγας, Β. Ν., και Μάρκογλου, Α. Ν. (2007). Γεωργική φαρμακολογία eds. Ζιώγας, Β. Ν. και Α. Ν. Μάρκογλου. Ελληνικής Έκδοσης.
- Τζανακακης, Μ. Ε. (1995). Εντομολογία eds. Τζανακακης, Μ. Ε.. Ελληνικής έκδοσης.
- Σιώζιου, Ε. (2013). Ανάπτυξη μεθόδων καταπολέμησης εχθρών των καλλιεργειών με RNA σίγηση (πειράματα με αλευρώδη και σίγηση μονοπατιού για αποτοξικοποίηση. Μεταπτυχιακή εργασία, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα Βιολογίας.
- Ρήγα, Μ. (2011). Γενετική και μοριακή ανάλυση της ανθεκτικότητας του τετρανύχου, *Tetranychus urticae* στις αβερμεκτίνες. Μεταπτυχιακή εργασία, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα Βιολογίας