



**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΣΙΑ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΚΑΙ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΗΣ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ

ΚΟΥΝΟΥΠΙΩΝ *Culex pipiens* ΣΤΑ ΕΝΤΟΜΟΚΤΟΝΑ ΜΕ ΧΡΗΣΗ

ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ ΤΣΙΑΜΑΝΤΑΣ

ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΒΟΝΤΑΣ ΙΩΑΝΝΗΣ

ΑΘΗΝΑ, 2016

Τριμελής Συμβουλευτική και Εξεταστική επιτροπή:

Βόντας Ιωάννης (Επιβλέπων Καθηγητής)

Μιχαελάκης Αντώνιος (Μέλος)

Φλουρή Φωτεινή (Μέλος)

Ευχαριστίες

Μετά το πέρας της μεταπτυχιακής αυτής μελέτης, η οποία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Μοριακής Εντομολογίας του Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης και σε συνδυασμό με το Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον καθηγητή μου Βόντα Ιωάννη για την δυνατότητα αλλά και την ελευθερία που μου έδωσε να δράσω μέσα στο χώρο του εργαστηρίου, την καθοδήγηση, την καλή συνεργασία που είχαμε όλο αυτό το διάστημα και για τις πολύτιμες συμβουλές και γνώσεις που μου παρείχε, χωρίς τις οποίες θα ήταν αδύνατη η ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας. Θα ήθελα να ευχαριστήσω ακόμα και την κυρία Φωτεινή Φλουρή, μέλος της εξεταστικής επιτροπής για τις πολύτιμες συμβουλές της.

Ακόμα ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στους ανθρώπους από το Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο, κύριους Μιχαελάκη Αντώνη (μέλος εξεταστικής επιτροπής), Κολιόπουλο Γεώργιο και Γιατρόπουλο Αθανάσιο για την άψογη συνεργασία μας αλλά και για τις πολύτιμες γνώσεις και βοήθειες που μου προσέφεραν καθ' όλη τη διάρκεια που βρέθηκα μαζί τους στο χώρο του ινστιτούτου.

Ευχαριστώ θερμά τους φίλους μου, εντός και εκτός του επιστημονικού χώρου οι οποίοι με στήριζαν σε όλη τη διάρκεια του έτους, με άκουγαν και με συμβούλευαν. Το μεγαλύτερο ευχαριστώ χρωστάω στην οικογένειά μου που δε δίστασε ούτε στιγμή να με παροτρύνει να κυνηγήσω τα όνειρά μου και με στηρίζει σε κάθε μου βήμα

Περιεχόμενα

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	3
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	6
ABSTRACT	7
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8
1. ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ	8
1.1 Οικογένεια CULICIDAE.....	8
1.2 Υγειονομική σημασία.....	11
1.3 Κίνδυνος μετάδοσης ασθενειών.....	11
2. Αντιμετώπιση κουνουπιών	12
2.1 Αντιμετώπιση προνυμφών.....	12
2.2 Αντιμετώπιση ενήλικων κουνουπιών.....	13
2.3 Ατομική προστασία.....	13
2.4 Κατηγορίες εντομοκτόνων για τον έλεγχο κουνουπιών.....	13
3 Πυρεθροειδή	14
4 Ανθεκτικότητα των εντόμων στα εντομοκτόνα	14
4.1 Δύο είναι οι κύριοι βιοχημικοί μηχανισμοί ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα.....	15
4.2 Μεταβολική ανθεκτικότητα.....	15
4.3 Συνεργιστές εντομοκτόνων.....	16
4.4 Συνεργιστής PBO.....	17
5. Ανθεκτικότητα στόχου	18
Σκοπός εργασίας	20
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	21
Μοριακή ανάλυση της ανθεκτικότητας στόχου σε πυρεθρινοειδή και οργανοφωσφωρικά εντομοκτόνα καθώς και έλεγχος βιότυπου για τον προσδιορισμό του είδους των κουνουπιών	21
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	21
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	22
1.2.1 ΠΛΗΘΥΣΜΟΙ <i>Cx ripiens</i>	22
1.2.2 Απομόνωση ολικού DNA (genomic DNA extraction) χρησιμοποιώντας DNAzol reagent.....	22
1.2.3 Αντίδραση PCR (Polymerase Chain Reaction: Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης) και έλεγχος συχνότητας της μεταλλαγής Leu1014Phe.....	23
1.2.4 Αντίδραση PCR (Polymerase Chain Reaction: Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης) και έλεγχος συχνότητας της μεταλλαγής G119s.....	25

1.2.5 Αντίδραση PCR (Polymerase Chain Reaction: Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης) και έλεγχος συχνότητας της μεταλλαγής F290V.....	27
1.2.6 Αντίδραση PCR (Polymerase Chain Reaction: Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης) για διαγνωστικά τεστ σε <i>Culex pipiens</i> (αναγνώρισης βιότυπου) (<i>molestus</i> , <i>pipiens</i> , υβριδικό).....	29
1.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	35
1.3.1 Ανάλυση γονοτύπων για τμήματα του γονιδίου στόχου των πυρεθρινοειδών..	35
1.3.2 Συχνότητα μεταλλαγής ανθεκτικότητας στα καρβαμικά και οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα (μεταλλαγή ακετυλοχολινεστεράσης G119S.....	38
1.3.3 Συχνότητα μεταλλαγής ανθεκτικότητας στα καρβαμικά και οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα (μεταλλαγή ακετυλοχολινεστεράσης (F290V)	40
1.3.4 Διαγνωστικά τεστ σε <i>Culex pipiens</i> (αναγνώρισης βιότυπου) (<i>molestus</i> , <i>pipiens</i> , υβριδικό.....	42
1.4 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	45
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2.....	47
Ανάπτυξη συνεργιστών για βελτιωμένα σκευάσματα εντομοκτόνων, με σκοπό την καταπολέμηση της ανθεκτικότητας.....	47
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	47
1.2 ΣΥΝΕΡΓΙΣΤΕΣ.....	47
1.3 ΑΙΘΕΡΙΑ ΕΛΑΙΑ- ΤΕΡΠΕΝΙΑ.....	47
ΣΚΟΠΟΣ ΤΟΥ ΣΥΓΚΕΚΡΙΜΕΝΟΥ ΚΕΦΑΛΑΙΟΥ.....	50
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	51
2.1 ΟΥΣΙΕΣ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ.....	51
2.2 Πειραματικές δοκιμές παρεμπόδισης P450s (μεταβολικής ανθεκτικότητας) <i>in vitro</i>	56
2.3 Πειραματικές δοκιμές παρεμπόδισης P450s (μεταβολικής ανθεκτικότητας) <i>In vivo</i>	57
2.4 Βιοδοκιμές σε προνύμφες.....	58
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	60
3.1 Αποτελέσματα δοκιμών παρεμπόδισης των P450s <i>in vitro</i>	60
3.2 Αποτελέσματα βιοδοκιμών σε προνύμφες από την περιοχή Άγιος Στέφανος Αττικής (αστικό περιβάλλον)	61
3.3 αποτελέσματα βιοδοκιμών σε προνύμφες από το Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο.....	65
3. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	69
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	71
1. Απομόνωση γονιδιωματικού DNA με χρήση του DNAzol Reagent.....	71
2. Ηλεκτοφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης.....	72
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	73

Περίληψη

Οι μοριακές διαγνωστικές μέθοδοι ανθεκτικότητας αποτελούν ένα πολύ χρήσιμο εργαλείο για τη διαχείριση προγραμμάτων χημικής καταπολέμησης των κουνουπιών, τα οποία δημιουργούν τεράστια προβλήματα υγειονομικής σημασίας και όχλησης παγκοσμίως. Στόχος της εργασίας αυτής ήταν η εφαρμογή μοριακών τεχνικών προκειμένου να προσδιοριστεί η παρουσία και η συχνότητα γνωστών μεταλλαγών ανθεκτικότητας στους πληθυσμούς που συλλέχθηκαν από διάφορες περιοχές της Αττικής (Άγιος Στέφανος -αστικό, ρέμα, και Ν. Χαλκηδόνα), καθώς και η διεξαγωγή βιοδοκιμών σε προνύμφες από το πεδίο, που εμφανίζουν ανθεκτικότητα στα πυρεθροειδή για την ανίχνευση συνεργιστικής δράσης μεταξύ των ουσιών deltamethrin και άλλων ουσιών φυσικής προέλευσης, προκειμένου για την αντιμετώπιση της ανθεκτικότητας.

Πραγματοποιήθηκε η εφαρμογή γνωστών μοριακών μεθόδων για τον έλεγχο συγκεκριμένων της μεταλλαγής kdr, L1014F (προσδίδει ανθεκτικότητα στα πυρεθροειδή εντομοκτόνα) και της μεταλλαγής ακετυλοχολινεστεράσης (iAChE, G119S) και F290V (προσδίδει ανθεκτικότητα στα καρβαμικά και οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα) καθώς και για τον έλεγχο βιοτύπου. Η συχνότητα της μεταλλαγής kdr ήταν μεγάλη (το 83,3% των αλληλομόρφων την έφεραν στον πληθυσμό Άγιο Στέφανο αστικό, το 66,6% στον Άγιο Στέφανο ρέμα και το 52,3 % στον πληθυσμό της Ν. Χαλκηδόνας) ενώ η συχνότητα της μεταλλαγής iAChE ήταν μικρή για τους πληθυσμούς που μελετήθηκαν. Παράλληλα στον έλεγχο βιοτύπου βρέθηκαν και οι τρεις φαινότυποι (molestus, mol/rip, υβριδικό).

Από τις βιοδοκιμές που έγιναν η ουσία quercetin φάνηκε να παρεμποδίζει τα ένζυμα των P450s οξειδασών (υπεύθυνα για την ανθεκτικότητα) σε *in vitro* δοκιμές, ενώ αποτελέσματα συνεργιστικής δράσης για τη Deltamethrin *in vivo* έδωσαν οι ουσίες Thymol και Linalool.

Abstract

Molecular diagnostics are a very useful tool for the management of insecticide resistance in mosquitoes. The aim of this study was the application of molecular techniques to determine the presence and frequency of known resistance mutations in populations collected from different parts of Attica (Agios Stefanos -municipal, stream, and N. Chalcedon), while at the same time for to tackle metabolic resistance which is also present in *C. pipiens* populations from Greece, we tested the ability of natural extracts, to synergise Deltamethrin toxicity in vivo, as well as inhibit P450 monooxygenase activity in vitro.

Carried by the application of known molecular methods for the control of specific mutations, the mutation kdr, L1014F (confers resistance to pyrethroid insecticides) and switching acetylcholinesterase (iAChE, G119S) and F290V (confers resistance to carbamates and organophosphates insecticides) and for controlling biotype. The frequency of the pyrethroid resistance mutation L1014F was high (66,6-83,3% of the alleles in the mosquito population from Agios Stefanos and 52,3 % in the population from N. Xalkidona), while the frequency of organophosphatet and carbamate target site resistance mutations in the Acetylcholinestarease gene(*iAChE*, G119S and F290V) were very low. Molecular identification of biotypes showed that all possible cases were present in Attiki (molestus, pipiens, hybrid).

Thymol and Linaool showed a significant synergistic effect in vivo, while quercetin inhibited recombinant P450s – major pyrethroid metabolisers.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Τα φυτά τα οποία παίζουν καθοριστικό ρόλο την τροφική αλυσίδα του ανθρώπου προσβάλλονται από πολλά είδη φυτοπαρασιτικών οργανισμών, όπως είναι τα ζιζάνια, τα έντομα και οι μύκητες. Για την προστασία των γεωργικών προϊόντων η χρησιμοποίηση χημικών σκευασμάτων, που μπορούν να θανατώσουν, παρεμποδίσουν ή να επιβραδύνουν την ανάπτυξη των φυτοπαράσιτων είναι ο συνηθέστερος από όλους τους τρόπους καταπολέμησης τους. (Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2007).

Τα τελευταία χρόνια όλο και αυξάνονται οι περιπτώσεις όπου διάφορα έντομα παρουσιάζουν ανθεκτικότητα σε διάφορα σκευάσματα-εντομοκτόνα.

Το φαινόμενο είναι εντυπωσιακό, αφού σε πολλές περιπτώσεις απαιτείται έως και χιλιάδες φορές μεγαλύτερη ποσότητα εντομοκτόνου, προκειμένου να

Η Ευρωπαϊκή Ένωση και άλλοι αρμόδιοι διεθνείς φορείς επεξεργάζονται τρόπους για τη δραστική μείωση ή και την απαγόρευση των εντομοκτόνων. Για αυτό πολλά εργαστήρια και ερευνητικές ομάδες έχουν αναπτύξει μη τοξικούς-φιλικούς προς το περιβάλλον ενζυμικούς παρεμποδιστές, οι οποίοι ενσωματώνονται στα σκευάσματα και απενεργοποιούν τα ένζυμα ανθεκτικότητας, καθιστώντας τα έντομα εξαιρετικά ευαίσθητα σε πολύ μικρές ποσότητες εντομοκτόνων. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα η χρήση αυτών των βελτιωμένων σκευασμάτων να μπορεί να παρατείνει την αποτελεσματικότητα της χημικής καταπολέμησης των εντόμων με μικρές δόσεις εντομοκτόνων. (Βόντας, 2006).

1.1 Οικογένεια Culicidae

Τα κουνούπια ανήκουν στην οικογένεια Culicidae, η οποία κατατάσσεται ταξινομικά στο φύλο Arthropoda στην κλάση Insecta και στην τάξη Diptera. Η οικογένεια αυτή περιλαμβάνει περίπου 3.500 είδη σε όλο τον κόσμο και τα οποία ταξινομούνται σε 3 υποοικογένειες (*Culicinae*, *Anophelinae* και *Toxorhynchitinae*) και 38 γένη.

Τα κουνούπια βρίσκονται σε κάθε περιοχή του πλανήτη, με τη μεγαλύτερη ποικιλία ειδών να έχει καταγραφεί σε περιοχές με τροπικό και εύκρατο κλίμα. Είδη κουνουπιών υπάρχουν και στις αρκτικές ζώνες, τα οποία αναπτύσσονται ορισμένες εποχές του έτους, προκαλώντας αφόρητη ενόχληση (Becker et al., 2010).

Στην Ελλάδα έχουν καταγραφεί 60 είδη κουνουπιών, τα οποία υπάγονται σε 17 υπογένη, 8 γένη και 2 υποοικογένειες. (Βογιατζόγλου-Σαμανίδου, 2011).

Ο βιολογικός τους κύκλος ολοκληρώνεται σε τέσσερα στάδια, όπως όλα τα είδη των Διπτέρων: του ωού, της προνύμφης, της νύμφης και του τέλειου(ενήλικου ή ώριμου).

Το είδος *Culex pipiens* (κοινό κουνούπι) ανήκει στην υποοικογένεια *Culicinae* (Εικ.1).

Αποτελεί το κοινό κουνούπι που υπάρχει σε κάθε σπίτι και απαντάται σε πάρα πολλές χώρες του κόσμου καθώς έχει την ικανότητα να προσαρμόζεται πάρα πολύ εύκολα στις εκάστοτε συνθήκες κάθε περιοχής, του αστικού περιβάλλοντος και του τρόπου ζωής του ανθρώπου.

Είναι κουνούπι με μεσαίο μέγεθος και καστανό χρώμα, ενώ το είδος περιλαμβάνει έναν αριθμό υποειδών, που διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τον τρόπο διαχείμασης και τους ξενιστές. Τα συγκεκριμένα είδη κουνουπιών συνιστούν και πρόβλημα για τη δημόσια υγεία καθώς είναι φορείς ασθενειών για τον άνθρωπο και τα ζώα.



Εικόνα 1. ενήλικο άτομο *Culex pipiens*.

Το θηλυκό μετά τη γονιμοποίηση από το αρσενικό, και όταν οι περιβαντολογικές συνθήκες είναι κατάλληλες γεννούν τα αυγά τους σε στάσιμα ή λιμνάζοντα νερά.(όχθες ποταμών, έλη, ακόμα και στο εσωτερικό χρησιμοποιημένων λάστιχων αυτοκινήτων όπου μέσα λιμνάζουν νερά. Συνήθως γεννούν 200-300 ωά τα οποία είναι ενωμένα μεταξύ τους.

Πολύ μικρές φυσαλίδες τα κρατούν στην επιφάνεια του νερού. Μετά από δυο ημέρες από τα ωά βγαίνουν οι προνύμφες, οι οποίες εισέρχονται κατευθείαν στο νερό.

Οι προνύμφες τρέφονται από οργανικές ουσίες που φιλτράρουν από το νερό και όταν φτάσουν σε μήκος περίπου 1 cm περνούν σε νέο στάδιο.

Από τις προνύμφες βγαίνουν οι νύμφες, που με τη σειρά τους μεταμορφώνονται σε τέλεια άτομα. Οι νύμφες δεν τρέφονται, και αφού σπάσει το δέρμα τους θα βγει το τέλειο άτομο. Αυτή η διαδικασία, ωό-προνύμφη-νύμφη-τέλειο άτομο διαρκεί 2-3 εβδομάδες ανάλογα με τη θερμοκρασία. Ο κύκλος αυτός επαναλαμβάνεται με πολλές γεννεές το έτος.

Ακόμα τα θηλυκά κουνούπια είναι αυτά που χρειάζονται αίμα για να μπορέσουν να ωοτοκήσουν και για αυτό μόνο τα θηλυκά άτομα τσιμπάνε. Πρέπει να πιουν αίμα τουλάχιστον μια φορά για να μπορέσουν να σχηματίσουν τα ωά τους, ενώ αμέσως μετά πηγαίνουν σε σημείο με νερό και γεννούν.

Το είδος *Cx. Piriens* περιλαμβάνει 3 βιότυπους, το *Cx. Piriens piriens* το *Cx. Piriens molestus* και το υβριδικό.

Το είδος *Cx. Piriens* νύσσει κυρίως μετά τη δύση του ηλίου, παράγει δε χαρακτηριστικό, ενοχλητικό και παρατεταμένο «βόμβο». Την ημέρα κρύβεται σε σκοτεινά σημεία (Εμμανουήλ. 1999:, Βογιατζόγλου-Σαμανίδου, 2011: Κολιόπουλος, 2011).



εικόνα 2: ωά Cx. Piriens



εικόνα 3: αρσενικό άτομο κατά την έξοδο



εικόνα 4: προνύμφη



εικόνα 5: ενήλικο θηλοκό

1.2. Υγειονομική σημασία

Τα κουνούπια, είναι ομάδα εντόμων σπουδαίας υγειονομικής σημασίας παγκοσμίως. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι είναι φορείς μερικών από τις πιο επικίνδυνες ασθένειες που προσβάλλουν τον άνθρωπο όπως η ελονοσία, ο κίτρινος πυρετός, ο ιός του Δυτικού Νείλου, ο δάγκειος πυρετός, οι φιλαριάσεις και άλλες αρμοϊϊώσεις.

Για το είδος *Cx. pipiens* υπάρχουν αναφορές ότι παίζει σημαντικό ρόλο στη μετάδοση του ιού του δυτικού νείλου. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η Ρουμανία σύμφωνα με τον (Nicolescu, 1998). Στην Ελλάδα το είδος αυτό είναι ανιχνεύθηκε ότι ήταν υπεύθυνο για τη μετάδοση του ιού του Δυτικού Νείλου το 2010 (Gomes, 2013).

1.3. κίνδυνος μετάδοσης ασθενειών

Τα κουνούπια χάρη στην ικανότητα τους να ρουφούν αίμα, έχει ως αποτέλεσμα να αποκτούν διάφορα παθογόνα ή παράσιτα από διάφορους μολυσμένους ξενιστές (σπονδυλωτά) και να τα μεταφέρουν σε κάποιο άλλο εάν η φυσιολογία του κουνουπιού είναι κατάλληλη για μετάδοση.

Ασθένειες όπως η ελονοσία, η φιλαρίαση και ιώσεις που προκαλούν το δάγκειο πυρετό, τον κίτρινο πυρετό, τον πυρετό του Δυτικού Νείλου και τον Chikungunya οφείλονται σε πρωτόζωα, νηματώδεις και ιούς οι οποίοι προσλαμβάνονται από τα κουνούπια και γίνεται η διασπορά τους σε μεγάλους πληθυσμούς. Οι πιο επικίνδυνοι φορείς, αναφορικά με την ικανότητα μετάδοσης παθογόνων είναι τα είδη των γενών *Anopheles*, *Culex* και *Aedes*.

Εκτός από την μετάδοση διαφόρων ασθενειών τα κουνούπια συμβάλλουν με την παρουσία ή το τσίμπημά τους στην γενικότερη όχληση. Η ενόχληση που προκαλείται από τα κουνούπια μπορεί να επιδράσει στην αγροτική και τουριστική ανάπτυξη μίας περιοχής. Ιδιαίτερα κατά τους θερμούς μήνες οι αποδόσεις των ατόμων και η παραγωγικότητα των οικοσυστημάτων ζώων μπορεί να μειωθούν. Η ύπαρξη μεγάλης πυκνότητας κουνουπιών σε μία περιοχή μπορεί να έχει σαν αποτέλεσμα στη μείωση της τουριστικής ανάπτυξης στην περιοχή αυτή, εξαιτίας της ενόχλησης που προκαλούν στους ανθρώπους.

Το πρόβλημα της όχλησης απαντάται κυρίως στις χώρες της βόρειας εύκρατης ζώνης, ιδιαίτερα στις αγροτικές περιοχές.

Στην Ελλάδα, το πρόβλημα εντοπίζεται στη Β. Ελλάδα λόγω της ύπαρξης μεγάλου αριθμού ορυζώνων και φυσικών υγροτόπων.

Επομένως σύμφωνα με τα παραπάνω απαραίτητη κρίνεται η καταπολέμηση των κουνουπιών στα πλαίσια ενός προγράμματος ολοκληρωμένης αντιμετώπισης.

2. Αντιμετώπιση κουνουπιών

Η αντιμετώπιση των κουνουπιών μπορεί να επιτευχθεί με διάφορες μεθόδους. Ένα πρόγραμμα ολοκληρωμένης αντιμετώπισης μπορεί να περιλαμβάνει τα παρακάτω:

2.1 Αντιμετώπιση προνυμφών.

Η αντιμετώπιση των προνυμφών γίνεται συνήθως με διάφορες μεθόδους, όπως είναι ο περιορισμός ανάπτυξης των εστιών των προνυμφών, όπου περιλαμβάνει αποστράγγιση ή επιχωμάτωση των κοιλοτήτων του εδάφους, καθώς και καθαρισμό των εστιών αυτών από τη βλάστηση, ώστε να υπάρχει συνεχής ροή του νερού (κανάλια, ρυάκια). Ακόμα, αποτελεσματική είναι και η καταστροφή, απομάκρυνση ή κάλυψη των μικρών εστιών.

Στις μεθόδους καταπολέμησης των προνυμφών συμπεριλαμβάνεται και η βιολογική μέθοδος, όπου περιλαμβάνει χρήση προνυμφοφάγων ψαριών (π.χ. *Gambusia affinis*) (Walton, 2007), το είδος *Pelagius marathonicus* (Κολιόπουλος, 2011). Στη βιολογική μέθοδο περιλαμβάνονται και σκευάσματα εντομοπαθογόνων βακτηρίων, όπως (*Bacillus thuringiensis subsp. Israelensis* (B.t.i) ή *Bacillus spaericus* (B.s). Τέλος η χημική καταπολέμηση περιλαμβάνει χρήση βιοκτόνων σκευασμάτων, που παρεμβαίνουν στις φυσιολογικές λειτουργίες του εντόμου και τελικά επιφέρουν το θάνατο.

2.2 Αντιμετώπιση ενήλικων κουνουπιών

Για την καταπολέμηση των ενήλικων κουνουπιών εφαρμόζονται υπολειμματικοί ψεκασμοί σε εξωτερικές επιφάνειες κτιρίων, σε εσωτερικούς τοίχους καλά αεριζόμενων κτιρίων, σε παρακείμενους θάμνους και τέλος γύρω από τις εστίες αναπαραγωγής των κουνουπιών. Ακόμα εφαρμόζονται ψεκασμοί εσωτερικών χώρων καθώς και καπνισμοί με καπνογόνες σπείρες, ηλεκτροθερμαινόμενα πλακίδια και με εντομοαπωθητικά υγρά.

2.3. Ατομική προστασία

Για την ατομική προστασία εφαρμόζεται μηχανική προστασία του χώρου διαβίωσης (λεπτά πλέγματα σε πόρτες και παράθυρα, κουνουπιέρες κτλ.), καθώς και η χρήση απωθητικών ουσιών (σε μορφή γαλακτώματος, λοσιόν, στικ αερολύματος κτλ).

2.4. Κατηγορίες εντομοκτόνων για τον έλεγχο των κουνουπιών

Τα εντομοκτόνα που χρησιμοποιούνται για την καταπολέμηση των κουνουπιών ανήκουν σε πέντε χημικές ομάδες συνθετικών οργανικών εντομοκτόνων. Από αυτά είναι:

Τα οργανοχλωριωμένα, τα οργανοφωσφορικά, τα καρβαμιδικά, τα πυρεθροειδή και οι ρυθμιστές ανάπτυξης. Όλες οι ενώσεις αυτές έχουν ιδιαίτερα εξειδικευμένη δράση, τόσο στις κυτταρικές, όσο και στις φυσιολογικές λειτουργίες του οργανισμού των κουνουπιών. Πιο συγκεκριμένα, τα τέσσερα πρώτα δρουν κατευθείαν στο νευρικό τους σύστημα, αλλά με διαφορετικό μηχανισμό δράσης το καθένα.

Άλλη ομάδα εντομοκτόνων είναι οι ρυθμιστές ανάπτυξης, που έχουν την ικανότητα να παρεμποδίζουν την ανάπτυξη και την εξέλιξη των εντόμων.

3. Πυρεθροειδή

Τα φυσικά πυρεθροειδή είναι χημικές ενώσεις με ιδιότητες εντομοκτόνου που υπάρχουν στο φυτό *Chrysanthemum cinerariaefolium* που αναπτύσσεται στην Κένυα και την Τανζανία. Ο συνδυασμός της πρόκλησης αναισθησίας στα έντομα με την πολύ χαμηλή τοξικότητα τους κάνουν τα πυρεθροειδή ιδανικά οικιακά εντομοκτόνα παρ'ότι η αναισθησία στα έντομα δεν σημαίνει και θάνατο. Συνήθως χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό με κάποιο άλλο εντομοκτόνο (οργανοφωσφορικό, καρβαμικό) για μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα. Στα πυρεθροειδή φυτά υπάρχουν τέσσερες ενεργές ουσίες. Οι πυρεθρίνες I και II και οι σινερίνες I και II. Είναι όλες εστερικές ενώσεις που συνδέουν ένα οξύ με τριγωνικό δακτύλιο υδρογονάνθρακα, με έναν πενταμελή δακτύλιο αλκοόλης. Οι πυρεθροειδείς εστέρες είναι έλαια διαλυτά σε αλκοόλες, ακετόνη και πετρελαιοειδή αλλά αδιάλυτα στο νερό.

Υδρολύονται εύκολα από ένζυμα με αποτέλεσμα να μην μπορούν να σκοτώσουν τα έντομα σαν στομαχικά δηλητήρια αλλά να δρουν σαν εφήμερα δηλητήρια επαφής.

Στην Ελλάδα τα πυρεθροειδή χρησιμοποιούνται πολύ και στην ακμαιοκτονία των κουνουπιών (συσκευές οικιακής χρήσης κλπ), ενώ τα κουνούπια επίσης εκτίθενται σε πυρεθροειδή μέσω των υπολειμμάτων της γεωργίας καθώς εντομοκτόνο μεταφέρεται και στις θέσεις αναπαραγωγής των κουνουπιών. (<http://biotech.aua.gr/>)

4. Ανθεκτικότητα των εντόμων στα εντομοκτόνα

Παρόλο που τα τελευταία χρόνια έχουν δοκιμαστεί με επιτυχία πολλές μη-χημικές μέθοδοι αντιμετώπισης, τα εντομοκτόνα συνεχίζουν να αποτελούν το σημαντικότερο μέσο για την αντιμετώπιση των κουνουπιών και τη μείωση της μετάδοσης των σχετιζόμενων με αυτά ανθρώπινων νόσων. Ωστόσο, η συνεχής χρήση των εντομοκτόνων έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη ανθεκτικών πληθυσμών, για διάφορα είδη κουνουπιών, σε διάφορα μέρη του κόσμου.

Ως ανθεκτικότητα ορίζεται “η αναπτυχθείσα ικανότητα μιας φυλής εντόμων να ανέχεται δόσεις τοξικών ουσιών που θα αποδεικνύονταν θανάσιμες για την πλειονότητα των ατόμων ενός φυσιολογικού πληθυσμού του ίδιου είδους” (Βόντας κ.α., 2007).

Σε ένα ευπαθή πληθυσμό, τα άτομα που φέρουν γονίδια ανθεκτικότητας σε ένα εντομοκτόνο είναι σπάνια, της τάξης του 10 με 10⁻² [2 και πηγές που αναφέρονται], ωστόσο η εκτεταμένη χρήση μιας τοξικής ουσίας ευνοεί την επικράτηση των ανθεκτικών ατόμων.

Τα άτομα αυτά, υπό την έλλειψη ενδοειδικού ανταγωνισμού πολλαπλασιάζονται γρήγορα και μετά από ένα αριθμό γενεών σύντομα καθίστανται το κυρίαρχο ποσοστό του πληθυσμού, «νοθεύοντας» ακόμα και τα γονίδια ευαισθησίας στα διάφορα εντομοκτόνα. Κατά συνέπεια, το εντομοκτόνο παύει πλέον να είναι αποτελεσματικό και τα έντομα θεωρούνται ανθεκτικά.

4.1. Δύο είναι οι κύριοι βιοχημικοί μηχανισμοί ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα:

- **Μεταβολική ανθεκτικότητα**
- **Ανθεκτικότητα στόχου**

Άλλοι μηχανισμοί που είναι υπεύθυνοι για την ανθεκτικότητα των κουνουπιών στα εντομοκτόνα περιλαμβάνουν έντομα τα οποία έχουν την ικανότητα μέσω της επιδερμίδας τους να μην απορροφούν ικανοποιητικές ποσότητες εντομοκτόνου, αλλά να είναι ακόμα και ικανά να αλλάζουν την συμπεριφορά τους για να αποφευχθεί η έκθεση τους σε τοξικούς παράγοντες.

4.2. Μεταβολική ανθεκτικότητα

Είναι από τους πιο κοινούς μηχανισμούς ανθεκτικότητας που απαντάται στα έντομα.

Τα έντομα έχουν αναπτυγμένους μηχανισμούς ενζυμικών συστημάτων που τους δίνουν τη δυνατότητα να αποτοξικοποιούν φυσικούς τοξικούς παράγοντες. Τρεις κύριες κατηγορίες ενζύμων είναι υπεύθυνες για τη μεταβολική ανθεκτικότητα, οι εστεράσες (esterases), οι μονοοξυγενάσες (monooxygenases) και οι μεταφοράσες της γλουταθειόνης (glutathione-S-transferases, GSTs). Τα ενζυμικά αυτά συστήματα ενεργοποιούνται κυρίως στα ανθεκτικά έντομα για να μπορέσουν να μεταβολίσουν το εντομοκτόνο πριν εμφανιστεί κάποια τοξική επίδραση.

Οι εστεράσες εμπλέκονται κυρίως στην ανθεκτικότητα στα οργανοφωσφορικά και καρβαμιδικά ενώ σε πολύ λιγότερο βαθμό εμπλέκονται στα πυρεθροειδή εντομοκτόνα.

Τα ένζυμα αυτά έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν πολύ γρήγορα τη χημική ουσία και να την απελευθερώνουν αργά, ή ακόμα και να την μεταβολίζουν σε περιπτώσεις που υπάρχει κοινός εστερικός δεσμός.

Οι μεταφοράσες της γλουταθειόνης είναι υπεύθυνες για την ανθεκτικότητα κυρίως στα οργανοχλωριωμένα, στα οργανοφωσφορικά και στα πυρεθροειδή εντομοκτόνα. Τα ένζυμα αυτά ανήκουν σε μία υπεροικογένεια η οποία περιέχει τουλάχιστον 25 οικογένειες GST-like πρωτεϊνών. Τα ένζυμα αυτά έχουν την ικανότητα να καταλύουν την προσθήκη γλουταθειόνης στο λιπόφιλο μόριο των εντομοκτόνων με σκοπό την αύξηση της υδατοδιαλυτότητας τους και την αποβολή τους από τον οργανισμό. (Vontas et al., 2001; Stumpf and Nauen, 2002; Vontas et al., 2002).

Οι P450 κυτοχρωμικές μονοοξυγενάσες αποτελούν μια σημαντική οικογένεια υδροφοβικών ενζύμων που περιέχουν μια ομάδα αίμης στο μόριό τους και συμμετέχουν στο μεταβολισμό πολυάριθμων ενδογενών και εξωγενών συστατικών. Οι P450 κυτοχρωμικές μονοοξυγενάσες βρίσκονται σχεδόν σε όλους τους ιστούς των εντόμων και είναι τα πιο σημαντικά ένζυμα της φάσης I του μεταβολισμού, καθώς ολοκληρώνουν πολλές ουσιώδεις λειτουργίες από το μεταβολισμό ορμονών έως και το μεταβολισμό ξένων ουσιών φυσικής ή συνθετικής προέλευσης. Ανθεκτικότητα έχει αναφερθεί σε όλες τις ομάδες εντομοκτόνων. Σύμφωνα με αναφορές ορισμένες P450s οξειδάσες μπορούν να μεταβολίζουν πολύ διαφορετικά τοξικά μόρια. (Daborn et al., 2002).

4.3. Συνεργιστές εντομοκτόνων

Συνεργισμός ονομάζεται το φαινόμενο κατά το οποίο ο συνδυασμός δύο ή περισσότερων δραστικών ουσιών έχει σαν αποτέλεσμα να αυξάνεται η βιοκτόνος δράση τους και μάλιστα σε πολύ μεγαλύτερο βαθμό από το άθροισμα της τοξικής δράσης των επιμέρους συστατικών του δείγματος. Χαρακτηριστικό παράδειγμα συνεργισμού είναι η αύξηση ή η διατήρηση της αποτελεσματικότητας μιας ένωσης με την προσθήκη μιας μη τοξικής ουσίας. Οι μη τοξικές αυτές ουσίες ονομάζονται συνεργιστές ή συνεργιστικοί παράγοντες και εφαρμόζονται κυρίως στις περιπτώσεις των εντομοκτόνων και ακαρεοκτόνων για τη μείωση εμφάνισης της ανθεκτικότητας. (Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2007).

4.4. Συνεργιστής Piperonyl Butoxide (PBO)

Το PBO είναι ένα εντομοκτόνο το οποίο αναστέλλει το μηχανισμό φυσικής άμυνας των εντόμων. Ο πιο γνωστός μηχανισμός άμυνας των εντόμων αποτελεί το MFOs σύστημα η αλλιώς όπως είναι γνωστό το P450s σύστημα του κυτοχρώματος.

Επίσης είναι μια οργανική ένωση που χρησιμοποιείται ως συστατικό για τη σύνθεση φυτοφαρμάκων. Είναι ένα λευκό κηρώδες στερεό. Αποτελεί έναν από τους κύριους συνεργιστές φυτοφαρμάκων.

Δηλαδή, παρά το γεγονός ότι δεν έχει παρασιτοκτόνο δραστηριότητα, ενισχύει τη δραστηριότητα ορισμένων φυτοφαρμάκων, όπως είναι τα καρβαμικά, οι πυρεθρίνες, τα πυρεθροειδή, και ροτενοειδή. Παράλληλα είναι ένα ημισυνθετικό παράγωγο της σαφρόλης.

Παράλληλα, διάφορα άλλα φυτικά εκχυλίσματα έχουν δοκιμαστεί ως πιθανοί συνεργιστές με αρκετά ικανοποιητικά αποτελέσματα.

Table 3

LC₅₀ of *Citrus sinensis*, (4R)(+)-limonene, and deltamethrin^a with or without PBO against *Musca domestica* in fumigant bioassay.

Essential oil or terpene	Mean LC ₅₀ in mg/dm ³ (95% CI)	Slope	χ ²
<i>C. sinensis</i>	3.9 (1.2–13)	2.5	6.532
<i>C. sinensis</i> + PBO	2.4 (0.9–6.6)	3.1	1.746
(4R)(+)-Limonene	6.2 (1.7–23)	6.4	0.404
(4R)(+)-Limonene+PBO	3.6 (1.4–9.8)	2.2	1.432
Deltamethrin ^{a,b}	9.2 (2.8–29.5)	1.1	0.920
Deltamethrin + PBO ^{a,b}	1.5 (0.2–11.4)	0.7	0.168

χ²: chi-square value, significant at $P < 0.05$ level.

^a Applied topically and LC₅₀ expressed in μg/fly.

^b Taken from Rossi et al. (2012).

Εικόνα 6. χαρακτηριστικό παράδειγμα συνεργισμού του PBO με διάφορες ουσίες (C.sinensis, 4R+ Limonene και deltamethrin) στη Musca domestica (Rossi and Palacios 2013).

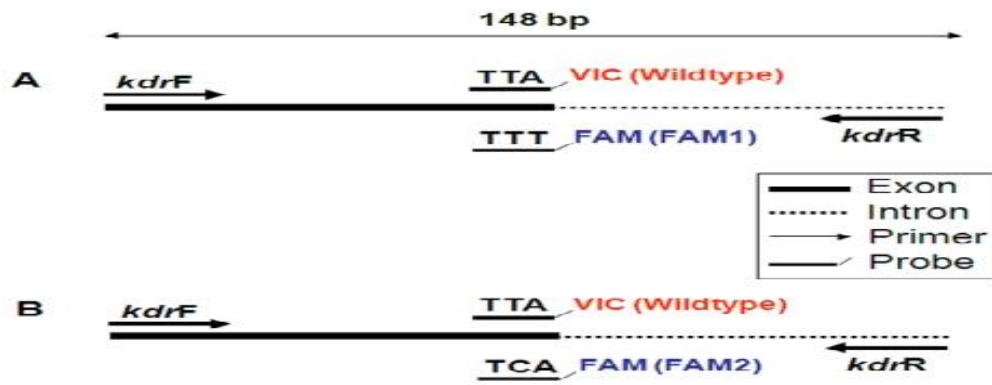
5. Ανθεκτικότητα στόχου

Είναι και αυτός ένας από τους πιο κοινούς μηχανισμούς ανθεκτικότητας που συναντάται στα έντομα. Όπως έχει αναφερθεί, οι χημικές ενώσεις των εντομοκτόνων δρουν σε συγκεκριμένες θέσεις στον οργανισμό του εντόμου (στόχος) (στο νευρικό σύστημα). Ο στόχος τους μπορεί να διαφοροποιηθεί όταν έχουμε να κάνουμε με ανθεκτικά στελέχη, έτσι ώστε τα εντομοκτόνα να είναι αδύνατον να δεσμευτούν αποτελεσματικά σε αυτόν. Με αυτόν τον τρόπο αποφεύγεται ή μειώνεται η επίδραση των εντομοκτόνων.

Η ανθεκτικότητα αυτή οφείλεται από διαφοροποιήσεις σε σημειακές μεταλλαγές στα διαμεμβρανικά κανάλια μεταφοράς ιόντων νατρίου (KMIN). Σε αυτό στοχεύουν κυρίως τα πυρεθρινοειδή. Η ύπαρξη αυτής της μεταλλαγής έχει ως συνέπεια να χάνεται η συνάφεια μεταξύ εντομοκτόνου-πρωτεϊνών με αποτέλεσμα να προκαλούνται σημαντικά επίπεδα ανθεκτικότητας. Η ανθεκτικότητα αυτή είναι γνωστή ως Knock down resistance (kdr) και έχει σαν αποτέλεσμα τα έντομα να μην θανατώνονται, αλλά να παραλύουν και να επανέρχονται στην αρχική τους κατάσταση μετά από λίγες ώρες. Για τα πυρεθρινοειδή οι πιο συνηθισμένες μεταλλαγές αφορούν αντικαταστάσεις στην αλληλουχία των πρωτεϊνών στη θέση 1014.

Στο είδος *Cx. Pipiens* αναφέρεται αντικατάσταση από λευκίνη σε φαινυλαλανίνη (L1014F) (Martinez-Torres et.a. 1999). Αναφορές υπάρχουν για αντικατάσταση από λευκίνη και σε σερίνη (L1014S) (Ranson et al., 2000).

Η ανίχνευση και παρακολούθηση ανθεκτικότητας γίνεται με βιοδοκιμές, βιοχημικά ή με μοριακά διαγνωστικά. Τα μοριακά διαγνωστικά είναι πολύ σημαντικά, διότι αν είναι γνωστός ο μηχανισμός ανθεκτικότητας και η μεταλλαγή που λαμβάνει χώρα, τότε μπορούμε να σχεδιάσουμε εύκολα διαγνωστικά μοριακά όπως φαίνεται και στην εικόνα 8. Τα διαγνωστικά έχουν πλεονεκτήματα έγκαιρης και ασφαλούς ανίχνευσης της ανθεκτικότητας.



Εικόνα 8: σχηματική απεικόνιση του διαγνωστικού για την ανίχνευση των των μεταλλαγών ανθεκτικότητας στόχου στα πυρεθροειδή L1014F και L1014S (πηγή διαδίκτυο).

Σκοπός εργασίας

Το αντικείμενο της εργασίας ήταν η εφαρμογή γνωστών μοριακών διαγνωστικών μεθόδων για την ανίχνευση και παρακολούθηση της ανθεκτικότητας στόχου σε πυρεθροειδή (μεταλλαγή kdr, L1014F) και οργανοφωσφορικά και καρβαμιδικά εντομοκτόνα (μεταλλαγή Ace-1, G119S, μεταλλαγή F290v), σε κουνούπια *Culex pipiens* από διάφορες περιοχές της Ελλάδος και οικοσυστήματα, καθώς και την αναγνώριση του βióτυπου σε πληθυσμούς *Culex pipiens* από την Ελλάδα. Παράλληλα σκοπός της εργασίας ήταν η αξιολόγηση του δυναμικού ουσιών φυσικής προέλευσης για να διαπιστωθεί εάν είναι ικανές να παρεμποδίζουν τα ένζυμα αποτοξικοποίησης, να αναστείλουν τη μεταβολική ανθεκτικότητα και εάν μπορούν να αυξήσουν την αποτελεσματικότητα των πυρεθροειδών, δηλαδή, αν είναι ικανές να προκαλέσουν συνεργιστική δράση σε ανθεκτικούς στα πυρεθροειδή πληθυσμούς *Culex* από την Ελλάδα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

Μοριακή ανάλυση της ανθεκτικότητας στόχου σε πυρεθροειδή και οργανοφωσφωρικά εντομοκτόνα καθώς και έλεγχος βιότυπου για τον προσδιορισμό του είδους των κουνουπιών.

1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Με σκοπό τη διερεύνηση της ανθεκτικότητας στους πληθυσμούς κουνουπιών (*Culex ripiens*) από διάφορες περιοχές της Ελλάδας, στα πυρεθροειδή και οργανοφωσφωρικά, εφαρμόστηκαν μοριακές τεχνικές προκειμένου να προσδιοριστεί η παρουσία και η συχνότητα γνωστών μεταλλαγών ανθεκτικότητας στους πληθυσμούς αυτούς.

Όπως είναι γνωστό, τα πυρεθροειδή εντομοκτόνα και τα οργανοχλωριωμένα (DDT), πλην των κυκλοδιενίων, στοχεύουν στους διαύλους των ιόντων νατρίου στους νευρώνες των εντόμων.

Το αμινοξύ στη θέση 1014 δεν φαίνεται να αλληλεπιδρά άμεσα με το εντομοκτόνο αλλά θεωρείται ότι αλλάζει την κινητική της ενεργοποίησης του καναλιού (O'Reilly et al., 2006).

Όσο αναφορά στα οργανοφωσφωρικά έχουν εντοπιστεί δυο μεταλλαγές, η G119s και η F290V. Δύο υποκαταστάσεις αμινοξέων στην ακετυλοχολινεστεράση 1 (AChE1 G119S και F290V) είναι υπεύθυνες για την ανθεκτικότητα σε οργανοφωσφωρικά και καρβαμιδικά εντομοκτόνα σε *Culex ripiens* κουνούπια. Αυτές οι μεταλλάξεις παράγουν πολύ διαφορετικά επίπεδα ευαισθησίας για τα ανασταλτικά εντομοκτόνα.

1.2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1.2.1 ΠΛΗΘΥΣΜΟΙ *Cx. pipiens*

Για την διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν άτομα *Cx. pipiens* από διάφορες περιοχές της Αττικής, αλλά και από άλλα μέρη της Ελλάδας για να γίνει σύγκριση αποτελεσμάτων. Πιο συγκεκριμένα μελετήθηκαν οι εξής πληθυσμοί:

Lab (εργαστηριακός πληθυσμός από το Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο) (Ben) 24 άτομα, Άγιος Στέφανος Αττικής (αστικό περιβάλλον) (Asa) 24 άτομα, Άγιος Στέφανος Αττικής (ρέμα) (Asp) 18 άτομα, Νέα Χαλκηδόνα Αττικής (N.χαλ) 24 άτομα.

1.2.2 Απομόνωση ολικού DNA (genomic DNA extraction) χρησιμοποιώντας DNAzol reagent.

Απομονώθηκε genomic DNA από ακμαία θηλυκά άτομα όλων των προαναφερθέντων πληθυσμών.

Για την απομόνωση του ολικού γονιδιωματικού DNA από κάθε ενήλικο άτομο *Culex pipiens*, χρησιμοποιήθηκε το DNAzol reagent της εταιρίας Invitrogen. Η διαδικασία απομόνωσης αναλυτικά δίνεται στην Παράγραφο 1 του Παραρτήματος I.

Συσκευή Nanodrop.

Το nanodrop είναι η συσκευή που μετρά την περιεκτικότητα του DNA σε κάθε δείγμα.

Έτσι μετά το extraction δείγματα μεταφέρθηκαν στη συσκευή nanodrop για την μέτρηση του DNA που περιείχε το καθένα.



εικόνα 1. Nanodrop

1.2.3 Αντίδραση PCR (Polymerase Chain Reaction: Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης) και έλεγχος συχνότητας της μεταλλαγής Leu1014Phe.

Με χρήση κατάλληλων εκκινητών (Cgd1, Cgd2, Cgd3, Cgd4), των οποίων οι αλληλουχίες δίνονται στον Πίνακα 1 του Παραρτήματος I, ενισχύθηκε η περιοχή όπου εντοπίζεται η μεταλλαγή ανθεκτικότητας L1014F. Για κάθε κουνούπι πραγματοποιήθηκαν δύο αντιδράσεις PCR με την ταυτόχρονη παρουσία τριών εκκινητών ώστε να προκύψουν οι διαγνωστικές ζώνες προϊόντων της PCR.

Για τον σκοπό αυτό διεξήχθησαν αντιδράσεις PCR με τη χρήση κατάλληλων εκκινητών (μόρια έναρξης):

Cgd1 (5' GTGGAACTTCACCGACTTC 3')

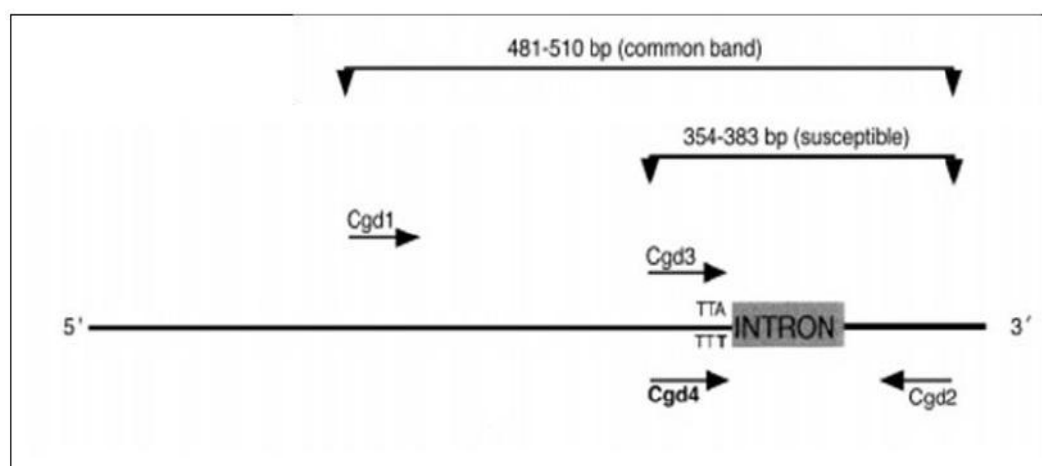
Cgd2 (5' GCAAGGCTAAGAAAAGGTTAAG 3')

Cgd3 (5' CCACCGTAGTGATAGGAAATTTA 3')

Cgd4 (5' CCACCGTAGTGATAGGAAATTTT 3')

και ενισχύθηκε η περιοχή όπου εντοπίζεται η μεταλλαγή ανθεκτικότητας L1014F.

Για κάθε κουνούπι πραγματοποιήθηκαν δύο αντιδράσεις PCR με την ταυτόχρονη παρουσία τριών εκκινητών ώστε να προκύψουν οι διαγνωστικές ζώνες προϊόντων της PCR.

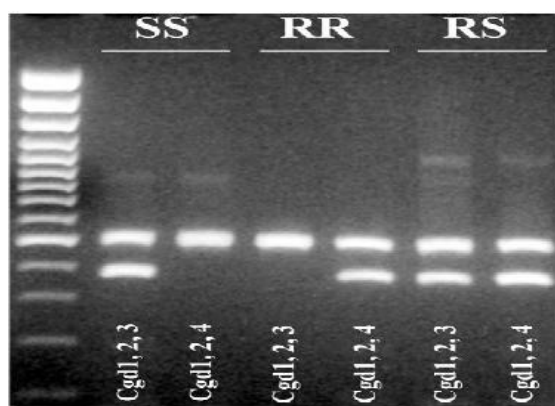


Εικόνα 2: Σχηματική απεικόνιση του διπλού διαγνωστικού PCR, των περιοχών που υβριδίζουν σε εκκινητές στο para voltage-gated channel locus και των μεγεθών των αναμενόμενων προϊόντων. (Martinez-Torres et al., 1998, 1999).

Στο κάτω μέρος της εικόνας δίνονται οι συνδυασμοί των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε ζεύγος αντιδράσεων που έγιναν για κάθε άτομο.

Άτομα ομόζυγα για το φυσιολογικό-ευαίσθητο αλληλόμορφο L1014, συμβολίζεται ως SS, δίνουν δύο ζώνες με τους εκκινητές Cgd1, Cgd2, Cgd3 και μια ζώνη με τους εκκινητές Cgd1, Cgd2, Cgd4.

Άτομα ομόζυγα για το ανθεκτικό αλληλόμορφο F1014, συμβολίζονται ως RR, δίνουν μια ζώνη με τους εκκινητές Cgd1, Cgd2, Cgd3 και δυο ζώνες με τους εκκινητές Cgd1, Cgd2, Cgd4. Άτομα ετερόζυγα για τα δυο αλληλόμορφα, συμβολίζονται ως RS, δίνουν δυο ζώνες τόσο με τους εκκινητές Cgd1, Cgd2, Cgd3 όσο και με τους Cgd1, Cgd2, Cgd4.



Εικόνα 3: Απεικόνιση των αναμενόμενων προϊόντων των PCR διαγνωστικών αντιδράσεων (πρώτη στήλη: μάρτυρας μοριακού βάρους)(τροποποιημένη από Martinez-Torres et al., 1999)

Όπως φαίνεται στην εικόνα το μέγεθος του αναμενόμενου προϊόντος με το συνδυασμό των εκκινητών Cgd1, και Cgd2 είναι 481-510 bp, με τους Cgd2 και Cgd3 είναι στις 354-383 bp και με τους Cgd2 και Cgd4 είναι στις 354-383 bp. Η διαφορά του εκκινητή Cgd3 από τον Cgd4 έγκειται στο γεγονός ότι ο Cgd3 είναι συμπληρωματικός του άκρου TTA (**αμινοξύ λευκίνη**) της αλληλουχίας του DNA που θα πολλαπλασιαστεί, ενώ ο Cgd4 είναι συμπληρωματικός του άκρου TTT (**αμινοξύ φαινυλαλανίνη**).

Για κάθε αντίδραση PCR έγινε προετοιμασία ενός μεγάλου διαλύματος (master mix) που περιείχε τα πάντα εκτός από το Gdna (genomic DNA).

Χρησιμοποιήθηκε αρνητικό control για να είναι βέβαιο ότι δεν υπήρχε κάποια μόλυνση από (gDNA ή DNA) και θετικό control το οποίο είναι συνήθως πλασμίδιο και είναι γνωστό ότι δίνει σωστό αποτέλεσμα.

Στο master mix εισήχθη τελική ποσότητα α+β μl, όπου α ο αριθμός των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν και β είναι το θετικό, το αρνητικό control και ένα επιπλέον για αποφυγή σφάλματος του όγκου λόγω των πιπετών. Ο υπολογισμός των συγκεντρώσεων βρίσκεται από τον τύπο:

$$C_{αρχ} \times V_{αρχ} = C_{τελ} \times V_{τελ}$$

Για κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκαν δυο αντιδράσεις PCR στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν αναλογίες όπως παρατίθενται αναλυτικά στο παράρτημα 1.

Τα προϊόντα των αντιδράσεων ελέγχθησαν με ηλεκτροφόρηση σε gel αгарόζης σύμφωνα με το παράρτημα I παράγραφος 2.

1.2.4 Αντίδραση PCR (Polymerase Chain Reaction: Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης) και έλεγχος συχνότητας της μεταλλαγής G119s.

Για τον σκοπό αυτό διεξήχθησαν αντιδράσεις PCR με τη χρήση κατάλληλων εκκινητών (μόρια έναρξης):

Εκκινητής	Αλληλουχία
CxEx3dir	5'CGACTCGGACCCACTGGT 3'
CxEx3rev	5'GTTCTGATCAAACAGCCCCGC 3'

Πίνακας 1: Νουκλεοτιδικές αλυσίδες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ταυτοποίηση της μεταλλαγής ανθεκτικότητας τύπου ακετυλοχολινεστεράση (G119s) στα καρβαμικά και οργανοφωσφωρικά εντομοκτόνα.



*Εικόνα 4: Τμήμα της αλληλουχίας του Ace-1 γονιδίου στο είδος *Cx. Piriens* που ενισχύεται με την PCR αντίδραση. Με σκούρα γράμματα είναι το κωδικόνιο 119 το οποίο αποτελεί τμήμα της θέσης αναγνώρισης του ενζύμου AluI. Κάτω δεξιά η θέση αναγνώρισης του ενζύμου. (Weill et al., 2004).*

Για κάθε άτομο πραγματοποιήθηκε μια αντίδραση με τους εκκινητές CxEx3dir και CxEx3rev. Ακολούθησε πέψη του προϊόντος με το ένζυμο AluI. Άτομα ομόζυγα για το φυσιολογικό-ευαίσθητο αλληλόμορφο G119 (συμβολίζονται ως SS) έδωσαν μια ζώνη, δεδομένου ότι το προϊόν της PCR δεν πέπτεται (εικόνα). Άτομα ομόζυγα για το ανθεκτικό αλληλόμορφο S119 (συμβολίζονται ως RR) έδωσαν δυο ζώνες δεδομένου ότι το προϊόν πέπτεται καθώς η μεταλλαγή δημιουργεί μία θέση αναγνώρισης του ενζύμου. Άτομα ετερόζυγα για τα δυο αλληλόμορφα (συμβολίζονται ως RS) έδωσαν τρεις ζώνες δεδομένου ότι το προϊόν της PCR πέπτεται μερικά (ο ένας είναι ενισχυμένος αλληλόμορφος μόνο).

Το μέγεθος του αναμενόμενου προϊόντος με τον συνδυασμό των εκκινητών CxEx3dir και CxEx3rev ήταν στις 520 bp. Μετά την επεξεργασία με το ένζυμο AluI το μέγεθος του αναμενόμενου προϊόντος για τα ομόζυγα ευαίσθητα άτομα (SS) ήταν στις 520 bp, για τα ομόζυγα ανθεκτικά (RR) ήταν στις 357 bp και για τα ετερόζυγα άτομα (RS) ήταν στις 520, 357 και 163 bp.



Εικόνα 5: Απεικόνιση των αναμενόμενων προϊόντων των PCR διαγνωστικών αντιδράσεων για τη μεταλλαγή G119s. (πρώτη στήλη μάρτυρας μοριακού βάρους). (Weill et al., 2004)

Για κάθε αντίδραση PCR έγινε προετοιμασία ενός μεγάλου διαλύματος (master mix) που περιείχε τα πάντα εκτός από το gDNA (genomic DNA).

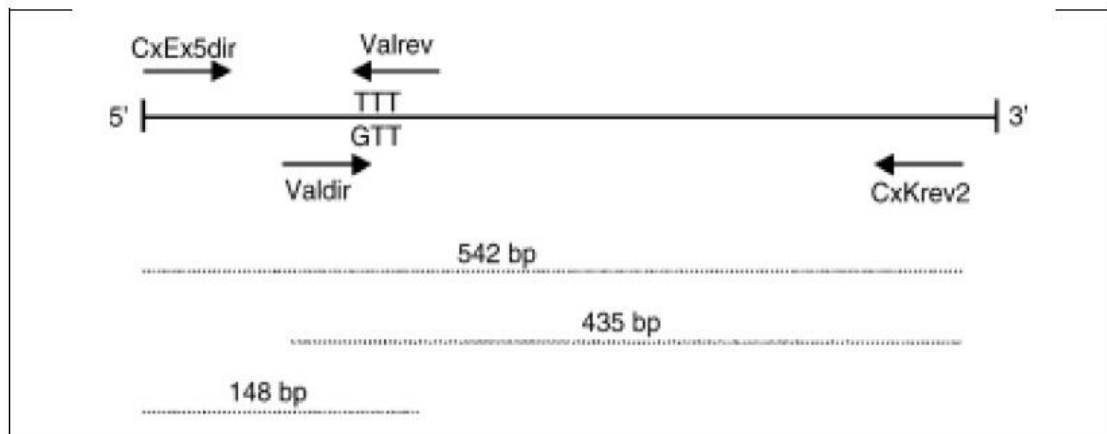
Χρησιμοποιήθηκε αρνητικό control για να είναι βέβαιο ότι δεν υπήρχε κάποια μόλυνση από (gDNA ή DNA) και θετικό control το οποίο είναι συνήθως πλασμίδιο και είναι γνωστό ότι δίνει σωστό αποτέλεσμα.

Στο master mix εισήχθη τελική ποσότητα α+β μl όπως αναφέρθηκε και πιο πάνω. Ακολούθησε πέψη των δειγμάτων.

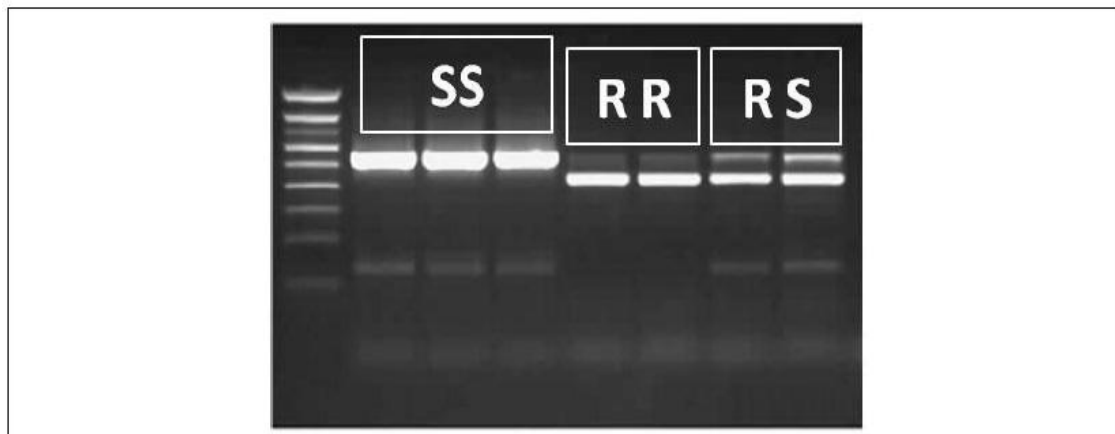
Τα προϊόντα της πέψης ελέχθησαν με ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης σύμφωνα με το παράρτημα I παράγραφος 2.

1.2.5 Αντίδραση PCR (Polymerase Chain Reaction: Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης) και έλεγχος συχνότητας της μεταλλαγής F290V.

Με χρήση κατάλληλων εκκινητών (CxE5dir/Valrev & Valdir/CxKrev2) ενισχύθηκε η περιοχή όπου εντοπίζεται η μεταλλαγή ανθεκτικότητας F290V. Στην εικόνα 6 και εικόνα 7 επιδεικνύεται η αρχή της μεθόδου που χρησιμοποιήθηκε.



Εικόνα 6: τμήμα της αλληλουχίας του Ache-1 γονιδίου στο είδος Cx. Piriens που ενισχύεται με την PCR αντίδραση (Alout et al., 2007b).



Εικόνα 7: Απεικόνιση των αναμενόμενων προϊόντων των PCR διαγνωστικών αντιδράσεων για τη μεταλλαγή F290V (Alout et al., 2007b).

Σε όλα τα άτομα έχουμε προϊόν 542 bp που προέρχεται από τους εκκινητές CxEx5dir και CxKrev2. Για τα ομόζυγα ευαίσθητα άτομα (SS) παίρνουμε επιπλέον προϊόν μόνο 148 bp που προέρχεται από τους εκκινητές CxEx5dir και Valrev και δηλώνει την παρουσία φαινυλαλανίνης.

Στην περίπτωση αυτή των ομόζυγων ανθεκτικών ατόμων (RR) παίρνουμε επιπλέον προϊόν μόνο 435 bp που προέρχεται από τους εκκινητές Valdir και CxKrev2 και δηλώνει την ύπαρξη βαλίνης αποκλειστικά. Στην περίπτωση των ετερόζυγων ατόμων (RS) παρατηρούνται και τα δυο παραπάνω προϊόντα, τα οποία δηλώνουν την ύπαρξη και των δυο αμινοξέων.

Τα προϊόντα των αντιδράσεων ελέγχθησαν με ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης σύμφωνα με το παράρτημα I παράγραφος 2.

ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ:

CxEx5dir: 5' – GTCTGGCCGAGGCCGTCA – 3'	Valdir: 5' – ACGCTGGGGATCTGCGAGG – 3'
Valrev: 5' – TCCACAACCGGAACGAACGGAAA -3'	CxKrev2: 5' – TGCTTCTGTGCGTGTACAGG – 3'

1.2.6 Αντίδραση PCR (Polymerase Chain Reaction: Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης) για διαγνωστικά τεστ σε *Culex pipiens* (αναγνώρισης βιότυπου) (*molestus*, *pipiens*, υβριδικό).

Αυτή η δοκιμασία βασίζεται σε πολυμορφισμούς (indels) σε 5 'πλευρική περιοχή του τόπου μικροδορυφόρων CQ11 που είναι ειδικά για *pipiens* και αλληλόμορφα για *molestus*. Μία αντίδραση PCR τριών εκκινητών διεξάγεται των οποίων το ένα είναι ειδικό για τον *molestus* και ένα για τη μορφή *pipiens* (και τα δύο είναι αντίστροφοι εκκινητές, ο πρόσθιος εκκινητής είναι κοινός).

Αλληλουχία εκκινητών:

pipiens reverse : 5' CATGTTGAGCTTCGGTGAA 3'
molestus reverse : 5' CCCTCCAGTAAGGTATCAAC 3'
forward : 5' GATCCTAGCAAGCGAGAAC 3'

Τα προϊόντα των αντιδράσεων ελέγχθησαν με ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης σύμφωνα με το παράρτημα I παράγραφος 2.

1.2.7 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

Στην παρούσα εργασία το ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε για τις αντιδράσεις PCR ήταν η KapaTaq DNA polymerase της εταιρίας BioSystems. Η συσκευή θερμοκύκλων που χρησιμοποιήθηκε ήταν η BioRad DNA Engine-Peltier Thermal Cycler. Περισσότερες πληροφορίες για την Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης δίνονται στην Παράγραφο 4 του Παραρτήματος Ι. Ο τελικός όγκος κάθε αντίδρασης ήταν στα 50 25μl. Στη μία αντίδραση ταυτοποίησης της μεταλλαγής kdr η τελική συγκέντρωση των Cgd1, Cgd2 και Cgd3 ήταν 1.0,2.0 και 1.0 μl αντίστοιχα.

Στην άλλη αντίδραση η τελική συγκέντρωση των εκκινητών Cgd1, Cgd2, Cgd4 ήταν 1.0, 2.0, 2.0 μl αντίστοιχα. Στην αντίδραση ταυτοποίησης της μεταλλαγής ακετυλοχολινεστεράσης Ache, οι τελικές συγκεντρώσεις των εκκινητών ήταν 1.0 μl για τον καθένα. Στην αντίδραση ταυτοποίησης της μεταλλαγής ακετυλοχολινεστεράσης F290V οι τελικές συγκεντρώσεις των εκκινητών ήταν: CxEx5dir 1.0 μl, Valdir 2.0 μl, Valrev 1.0 μl, CxKrev2 2.0 μl, ενώ για το biotype ήταν: Molestus pr. 1.5 μl, Piriens pr. 1.0 μl, και Forward 1.5 μl.



Εικόνα 8: προετοιμασία δειγμάτων για την διεξαγωγή της PCR

Αντιδράσεις PCR για κάθε μεταλλαγή

KDR

Αντίδραση 1		Αντίδραση 2	
Template	1,5 μ l	Template	1,5 μ l
10 \times buffer	2,5 μ l	10 \times buffer	2,5 μ l
5 mM dNTPs	0,5 μ l	5 mM dNTPs	0,5 μ l
10 μ M Cgd1	1 μ l	10 μ M Cgd1	1 μ l
10 μ M Cgd2	2 μ l	10 μ M Cgd2	2 μ l
10 μ M Cgd3	1 μ l	10 μ M Cgd4	2 μ l
Kappa-taq polymerase	0,2 μ l	Kappa-taq polymerase	0,2 μ l
H2O V _{τελ} =25 μ l	16,3 μ l	H2O V _{τελ} =25 μ l	15,3 μ l

G119s

Template	1,5 μ l
10 \times buffer	2,5 μ l
5 mM dNTPs	0,5 μ l
10 μ M CxEx3dir	1 μ l
10 μ M CxEx3rev	1 μ l
Kappa-taq polymerase	0,2 μ l
H2O V _{τελ} =25 μ l	18,3 μ l

Πέψη G119s

PCR product	10 μ l
10x buffer AluI	1,5 μ l
BSA	0,5 μ l
AluI	0,6 μ l
dd h20	2,4 μ l

F290V

Template:	1,5 µl
10x buffer:	2,5 µl
5 mM dNTPS:	0,5 µl
10 µM CxEx5dir:	1 µl
10 µM CxExKrev2:	1 µl
10 µM Valdir:	2 µl
10 µM Valrev:	1 µl
Kappa Taq:	0,3 µl
dd h20:	14,2 µl

BIOTYPE

Template:	1,5 µl
10x buffer Taq:	2 µl
5 mM dNTPS:	0,4 µl
10 µM Molestus pr.:	1,5 µl
10 µM Pipiens pr.:	1 µl
10 µM Forward:	1,5 µl
BSA:	0,3 µl
MgCl₂	1,6 µl
Taq polymerase	0,2 µl
ddh20	10 µl

Συνθήκες αντίδρασης PCR

KDR

1. T= 95 °C επί 5 λεπτά, για να ενεργοποιηθεί το ένζυμο kappa Taq Polymerase.
2. T= 94 °C επί 30 sec, για να γίνει ο αποχωρισμός των δύο αλυσίδων του DNA
3. T= 48 °C επί 30 sec, για να γίνει η προσκόλληση των εκκινητών στο συγκεκριμένο τμήμα του DNA.
4. T= 72 °C επί 1 λεπτό για να γίνει η σύνθεση των δυο αλυσίδων του DNA.
5. Επιστροφή στο βήμα 2 και επανάληψη των βημάτων 2-4 επί 39 φορές.
6. T= 72 °C επί 10 λεπτά, για να γίνει η τελική επιμήκυνση των νέων μορίων DNA.
7. Παραμονή στους 10 °C, για όσο χρειαστεί.

G119s

1. T= 95 °C επί 5 λεπτά,
2. T= 95 °C επί 30 sec,
3. T= 54 °C επί 30 sec
4. T= 72 °C επί 1 λεπτό
5. Επιστροφή στο βήμα 2 και επανάληψη των βημάτων 2-4 επί 34 φορές.
6. T= 72 °C επί 10 λεπτά
7. Παραμονή στους 10 °C, για όσο χρειαστεί.

F290V

1. T= 95 °C επί 5 λεπτά,
2. T= 94 °C επί 30 sec
3. T= 51 °C επί 30 sec
4. T= 72 °C επί 40 sec
5. Επιστροφή στο βήμα 2 και επανάληψη των βημάτων 2-4 επί 29 φορές.
6. T= 72 °C επί 5 λεπτά,
7. Παραμονή στους 10 °C, για όσο χρειαστεί.

Biotype

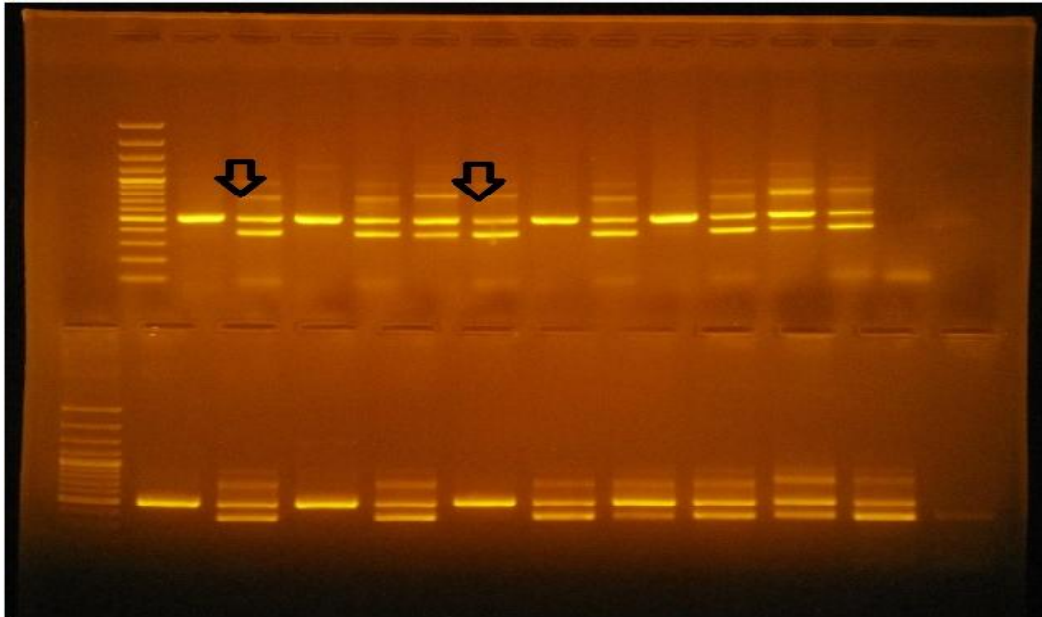
1. $T=94^{\circ}\text{C}$ επί 5 λεπτά
2. $T=94^{\circ}\text{C}$ επί 30 sec
3. $T=54^{\circ}\text{C}$ επί 30 sec
4. $T=72^{\circ}\text{C}$ επί 40 sec
5. Επιστροφή στο βήμα 2 και επανάληψη των βημάτων 2-4 επί 39 φορές.
6. $T=72^{\circ}\text{C}$ επί 5 λεπτά
7. Παραμονή στους 10°C , για όσο χρειαστεί.

1.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

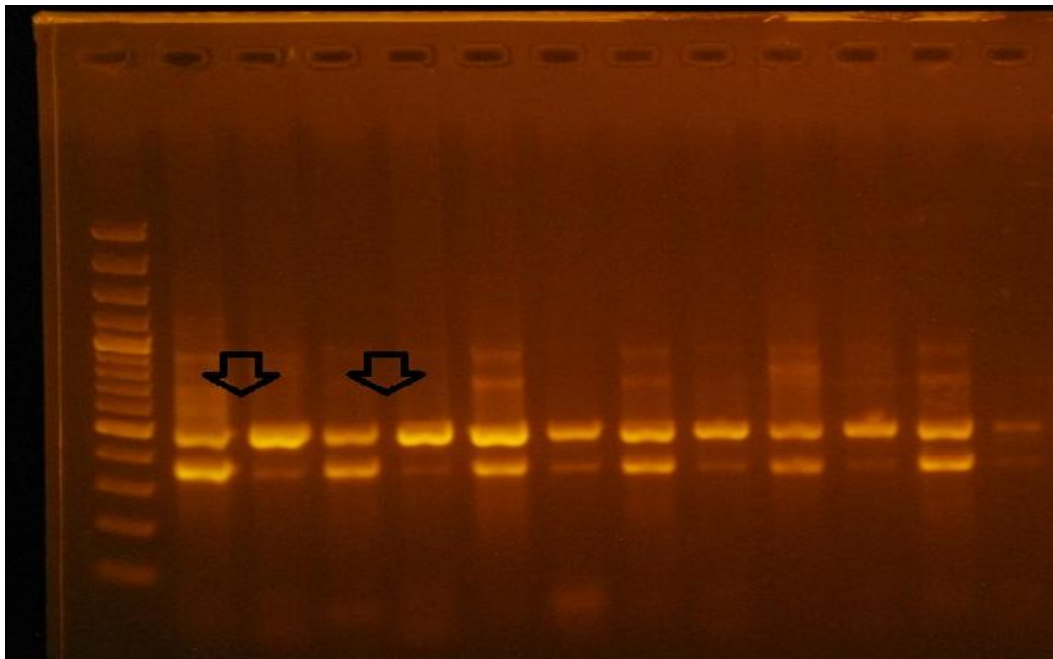
1.3.1 Ανάλυση γονοτύπων για τμήματα του γονιδίου στόχου των πυρεθρινοειδών

Οι ζώνες του DNA που προέκυψαν είχαν το αναμενόμενο μέγεθος και κωδικοποιούσαν το γονίδιο που μελετήθηκε. Μετά την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης φωτογραφήθηκαν οι ζώνες των δειγμάτων των kdr διαγνωστικών στους πληθυσμούς των κουνουπιών που προαναφέρθηκε. Στις παρακάτω φωτογραφίες που ακολουθούν ανάλογα με τους εκκινήτες που χρησιμοποιήθηκαν δηλαδή Cgd1, Cgd2, Cgd3 και Cgd4, εμφανίζονται οι ζώνες που γνωστοποιούν εάν το κάθε δείγμα είναι ευαίσθητο (Cgd1, Cgd2, Cgd3), ανθεκτικό (Cgd1, Cgd2, Cgd4), ομόζυγο ή ετερόζυγο ως προς το τμήμα του γονιδίου που φέρει την μεταλλαγή L1014F. Όταν το δείγμα βρίσκεται σε ετερόζυγη μορφή εμφανίζονται δυο ζεύγη παράλληλων ζωνών, διαφορετικά εάν είναι ομοζυγώτο ανθεκτικό ή ευαίσθητο τότε παρατηρείται ένα ζεύγος και μια μόνο ζώνη.

Στη συνέχεια ακολουθεί ο πίνακας στον οποίο παρουσιάζονται συγκεντρωτικά όλα τα αποτελέσματα των δειγμάτων των κουνουπιών στα οποία έγιναν PCR αντιδράσεις για να εντοπιστεί η kdr μεταλλαγή.



Εικόνα 1: ηλεκτροφόρηση προϊόντος PCR με εκκινητές Cgd1, Cgd2, Cgd3, και Cgd4. στο πάνω αριστερά βελάκι εμφανίζεται ένα ομοζυγωτό ανθεκτικό άτομο (RR), ενώ στο δεξιό βελάκι χαρακτηριστική είναι η ύπαρξη ενός ετερόζυγου ατόμου (RS).(τα δείγματα είναι από την περιοχή του Αγίου Στεφάνου Αττικής αστικό περιβάλλον)



Εικόνα 2: ηλεκτροφόρηση προϊόντος PCR με εκκινητές Cgd1, Cgd2, Cgd3, και Cgd4. στα βελάκια διακρίνονται ομόζυγα ευαίσθητα άτομα(SS) από δείγματα εργαστηρίου (Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο).

KDR

City or Town	SUSCEPTIBLE SS	RESISTANT RR	ETEROZUGO RS	SUNOLO	Sunolo resistant(%)
Mpenakeio	23	0	1	24	0%
	95,8%	0%	4,2%		
Agios stefanos	0	20	4	24	83.3%
	0%	83,3%	16,6%		
A.stefanos(rema)	0	12	6	18	66.6%
	0%	66,6%	33,3%		
Nea xalkidona	5	11	5	21	52.3%
	23,8%	52,3%	23,8%		

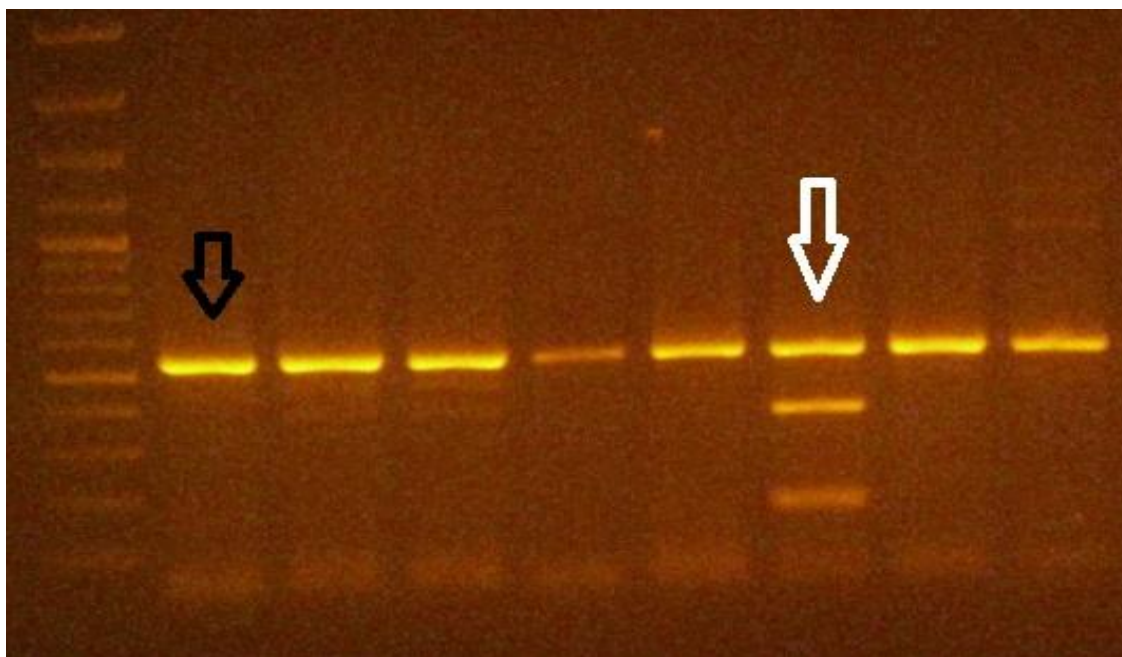
Πίνακας 1: πίνακας αποτελεσμάτων μοριακών.

SS: ευαίσθητα κουνούπια, RS: ετερόζυγα κουνούπια, RR: ανθεκτικά κουνούπια, σύνολο resistance %: σύνολο ανθεκτικότητας επί της % στον πληθυσμό.

Τα αποτελέσματα που πήραμε (Εικόνα , Πίνακας 1) δείχνουν την παρουσία και των τριών διαφορετικών γονοτύπων για την kdr μεταλλαγή στον πληθυσμό Cx. pipiens που ελέγχθηκε. Ανιχνεύθηκαν ομόζυγα ευαίσθητα άτομα, ομόζυγα ανθεκτικά άτομα και ετερόζυγα άτομα για τον ανθεκτικό και τον ευαίσθητο αλληλόμορφο.

1.3.2 Συχνότητα μεταλλαγής ανθεκτικότητας στα καρβαμικά και οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα (μεταλλαγή ακετυλοχολινεστεράσης G119S)

Εκτός από τη μεταλλαγή kdr, στα ίδια δείγματα *Cx. pipiens* ελέγχθηκε και η συχνότητα μεταλλαγής ανθεκτικότητας τύπου ακετυλοχολινεστεράσης (G119S). Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε η διαγνωστική μέθοδος που αναφέρεται στην παρ. 1.2.4. Στην Εικόνα παρουσιάζονται ενδεικτικά κάποια από τα αποτελέσματα που πήραμε από την εφαρμογή της.



*Εικόνα 3: Επεξεργασμένα με το ένζυμο AluI προϊόντα της PCR αντίδρασης για την ανίχνευση της μεταλλαγής ανθεκτικότητας τύπου ακετυλοχολινεστεράσης (Ache) σε δείγματα *Cx. pipiens*. Το μαύρο βελάκι απεικονίζει ομόζυγο ευαίσθητο άτομο (SS), ενώ το άσπρο βελάκι ετερόζυγο άτομο (RS). Τα δείγματα είναι από την περιοχή του Αγίου Στεφάνου (αστικό περιβάλλον).*

G119S

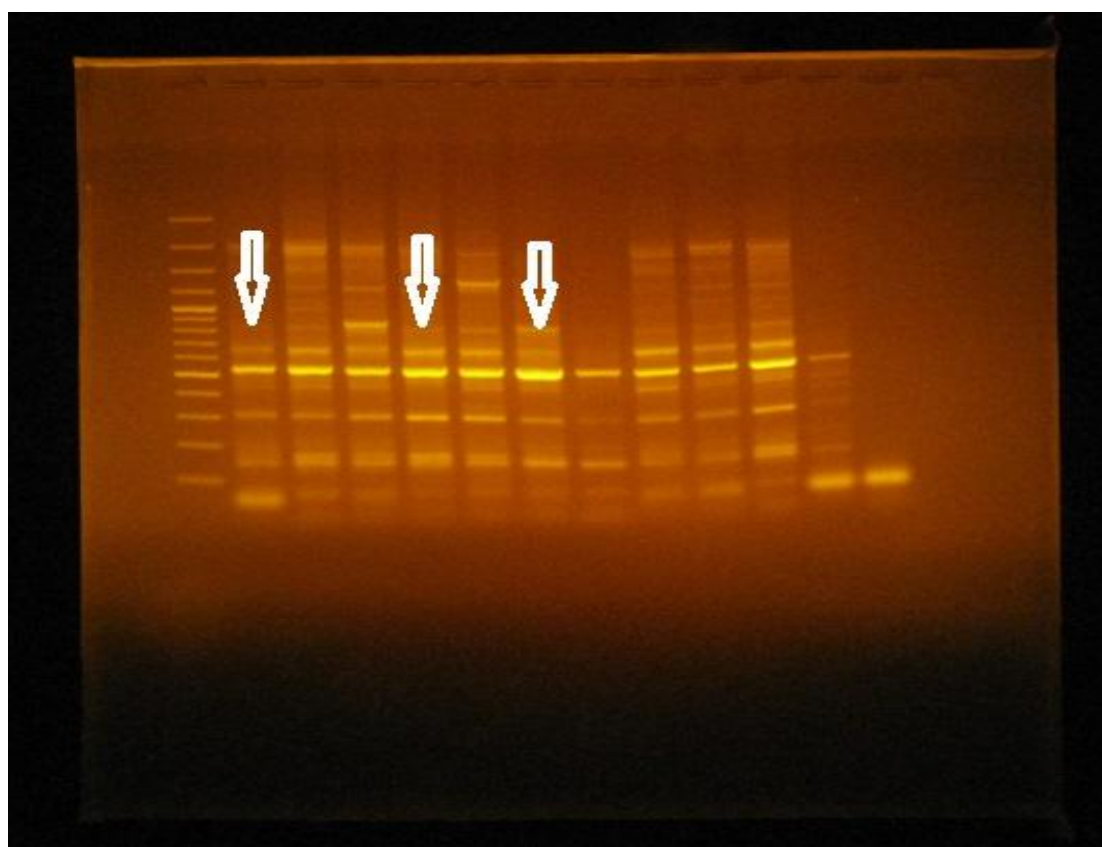
City or Town	SUSCEPTIBLE	RESISTANT	ETEROZUGO	SUNOLO	SUNOLO RESISTANT(%)
MPENAKEIO	22	0	2	24	0%
	91,6%	0%	8,3%		
AGIOS STEFANOS	23	0	1	24	0%
	95,8%	0%	4,1%		
A.STEFANOS(REMA)	17	0	1	18	0%
	94,4%	0%	5,5%		
NEA XALKIDONA	18	0	6	24	0%
	75%	0%	25%		

Πίνακας 2: Γονοτυπικές συχνότητες και συχνότητες αλληλομόρφων για τον πληθυσμό Cx. pipiens που ελέγχθηκε για την παρουσία της μεταλλαγής Ace1 (G119S).

Τα αποτελέσματα που πήραμε (Εικόνα 6, Πίνακας 2) δείχνουν την παρουσία δύο μόνο γονοτύπων για την μεταλλαγή iAChE στον πληθυσμό Cx. pipiens που ελέγχθηκε. Ανιχνεύθηκαν ομόζυγα ευαίσθητα άτομα και ετερόζυγα άτομα για τον ανθεκτικό και τον ευαίσθητο αλληλόμορφο. Κανένα άτομο ομόζυγο για τη μεταλλαγή ανθεκτικότητας iAChE δεν ανιχνεύθηκε.

1.3.3 Συχνότητα μεταλλαγής ανθεκτικότητας στα καρβαμικά και οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα (μεταλλαγή ακετυλοχολινεστεράσης (F290V)).

Εκτός από τη G119s, στα ίδια δείγματα *Cx. pipiens* ελέγχθηκε και η συχνότητα μεταλλαγής ανθεκτικότητας τύπου ακετυλοχολινεστεράσης (F290V). Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε η διαγνωστική μέθοδος που αναφέρεται στην παρ. 1.2.5. Στην Εικόνα παρουσιάζονται ενδεικτικά κάποια από τα αποτελέσματα που πήραμε από την εφαρμογή της.



*Εικόνα 4: Προϊόντα της PCR αντίδρασης για την ανίχνευση της μεταλλαγής ανθεκτικότητας τύπου ακετυλοχολινεστεράσης (F290V) σε δείγματα *Cx. pipiens*. Τα άσπρα βελάκια απεικονίζουν ομόζυγα ευαίσθητα άτομα (SS). Τα δείγματα είναι από την περιοχή του Αγίου Στεφάνου (αστικό περιβάλλον). Σε όλους τους πληθυσμούς που μελετήθηκαν δεν εμφανίστηκε το αλληλόμορφο ανθεκτικότητας.*

F290V

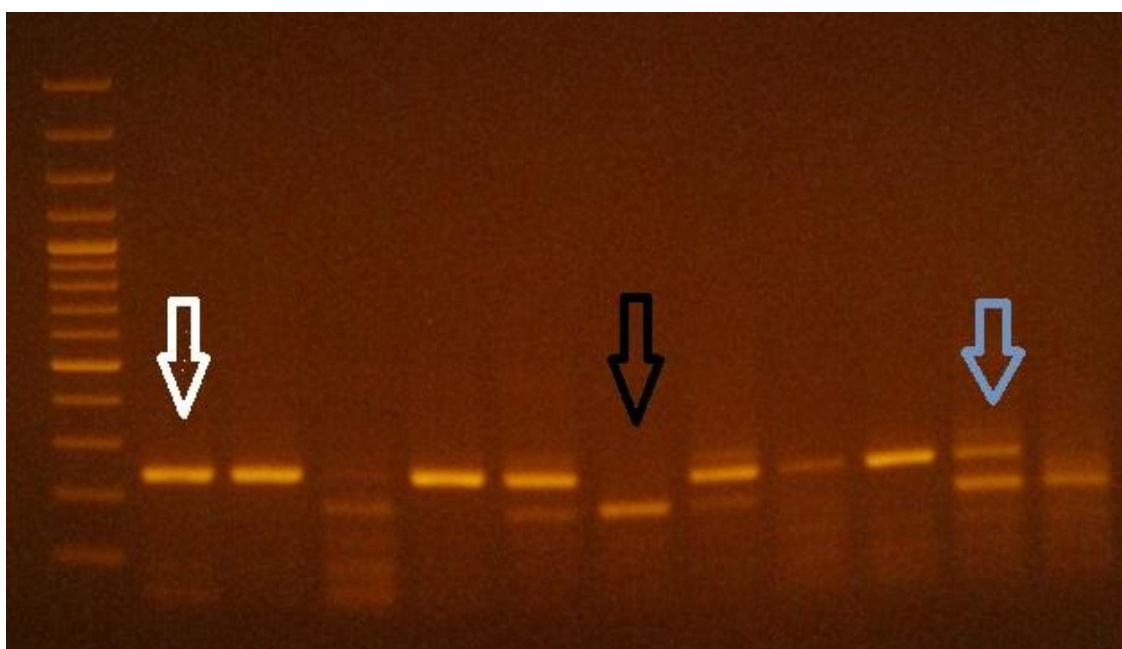
City or Town	SUSCEPTIBLE	RESISTANT	ETEROZUGO	SUNOLO	SUNOLO RESISTANT(%)
MPENAKEIO	24	0	0	24	0%
	100%	0%	0%		
AGIOS STEFANOS	24	0	0	24	0%
	100%	0%	0%		
A.STEFANOS(REMA)	18	0	0	18	0%
	100%	0%	0%		
NEA XALKIDONA	24	0	0	24	0%
	100%	0%	0%		

Πίνακας 3: Γονοτυπικές συχνότητες και συχνότητες αλληλομόρφων για τον πληθυσμό Cx. pipiens που ελέγχθηκε για την παρουσία της μεταλλαγής AceI (F290V).

Τα αποτελέσματα που πήραμε (Εικόνα , Πίνακας) δείχνουν την παρουσία μόνο ευαίσθητων γονοτύπων (SS) για την μεταλλαγή F290V στον πληθυσμό Cx. pipiens που ελέγχθηκε. Ανιχνεύθηκαν ομόζυγα ευαίσθητα άτομα και κανένα άτομο ομόζυγο ή ετερόζυγο για τη μεταλλαγή ανθεκτικότητας F290V.

1.3.4 Διαγνωστικά τεστ σε *Culex pipiens* (αναγνώρισης βιότυπου) (*molestus*, *pipiens*, υβριδικό).

Εκτός από τις μελέτες που πραγματοποιήθηκαν για την εύρεση ανθεκτικότητας τόσο σε πυρεθροειδή, όσο και σε οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα, παράλληλα έγιναν διαγνωστικά τεστ για την αναγνώριση του βιότυπου των *Cx. Pipiens*.



*Εικόνα 5: απεικόνιση των διαγνωστικών τεστ για την αναγνώριση του βιότυπου (*molestus*, *pipiens*, υβριδικό). Το άσπρο βελάκι δείχνει ένα *molestus*, το μαύρο βελάκι ένα *pipiens*, ενώ το γκρι βελάκι ένα υβριδικό. Τα δείγματα από την περιοχή του Αγίου Στεφάνου(αστικό περιβάλλον).*

BIOTYPE

City or Town MOLESTUS MOL/PIP PIPIENS SUNOLO SUNOLO
PIPIENS(%)

MPENAKEIO	24	0	0	24	0%
	100%	0%	0%		
AGIOS STEFANOS	19	4	1	24	4.1%
	79,2%	16,6	4,1%		
A.STEFANOS(REMA)	16?	0	2	18	11.1%
	88,9%	0%	11,1%		
NEA XALKIDONA	24	0	0	24	0%
	100%	0%	0%		

Πίνακας 4: φαινοτυπικές συχνότητες για τον πληθυσμό Cx. Piriens που ελέγχθησαν.

Τα αποτελέσματα που πήραμε δείχνουν την εμφάνιση και των τριών φαινοτύπων (molestus, ririens, υβριδικό), με την μεγαλύτερη εμφάνιση του ririens να παρατηρείται στην περιοχή του Αγίου Στεφάνου(ρέμα). Η μεγαλύτερη εμφάνιση του υβριδίου παρατηρήθηκε στην περιοχή του Αγίου Στεφάνου (αστικό περιβάλλον).

1.4 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από τα αποτελέσματα των πειραμάτων που πήραμε παρατηρείται ότι:

- υπάρχει πρόβλημα ανθεκτικότητας στόχου στα πυρεθροειδή στους πληθυσμούς Αγίου Στεφάνου (αστικό) 83.3%, Αγίου Στεφάνου (ρέμα) 66.6%, Ν. Χαλκηδόνα 52.3% που μελετήθηκαν εκτός από τους πληθυσμούς του εργαστηρίου, καθώς εμφανίζονται μεγάλα σχετικά ποσοστά.
- παρατηρούνται διαφορές ως προς την ανθεκτικότητα στόχου ως προς τα πυρεθροειδή μεταξύ των πληθυσμών που συλλέχθησαν από αστικό περιβάλλον σε σχέση με αυτού που συλλέχθησαν από ρέματα, καθώς τα κουνούπια του αστικού εμφανίζουν πολύ αυξημένα επίπεδα ανθεκτικότητας στόχου σε σχέση με τους άλλους πληθυσμούς.
- Όσο αναφορά τα οργανοφωσφωρικά εντομοκτόνα δεν παρατηρείται κάποια αξιολογη συχνότητα μεταλλαγών, με τους πληθυσμούς να εμφανίζονται άκρως ευαίσθητοι, (παρατηρείται μικρή συχνότητα που πιθανόν οφείλεται και στο γεγονός ότι το temephos έχει σταματήσει να χρησιμοποιείται εδώ και αρκετά χρόνια).
- Στον έλεγχο βιοτύπου τα αποτελέσματα είναι ποικίλα καθώς από το σύνολο των πληθυσμών που μελετήθηκαν τα περισσότερα κουνούπια κάθε πληθυσμού είναι *Molestus*, ενώ παρατηρούνται και αυξημένα επίπεδα των ειδών *Mol/rip* και υβριδικού σε πληθυσμούς του Αγίου Στεφάνου Αττικής (αστικό περιβάλλον) και της Ν. Χαλκηδόνας αντίστοιχα.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 24 άτομα *Culex ripiens* που συλλέχθηκαν από τις περιοχές της Αττικής τους μήνες Ιούνιο και οκτώβριο του 2015. Οι περιοχές του νομού Αττικής ήταν: Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο, Άγιος Στέφανος(αστικό περιβάλλον), Άγιος Στέφανος (ρέμα), Να Χαλκηδόνα. Σκοπός της μελέτης ήταν ο έλεγχος της ανάπτυξης ανθεκτικότητας στα πυρεθροειδή, και οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα, καθώς και ο έλεγχος βιοτύπου στους παραπάνω πληθυσμούς..

Με την εφαρμογή των κατάλληλων διαγνωστικών μεθόδων ελέγχθηκε η συχνότητα της μεταλλαγής ανθεκτικότητας στα πυρεθροειδή εντομοκτόνα τύπου kdr (knock down resistance) L1014F και αυτής στα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα τύπου ακετυλοχολινεστεράση Ache G119S.

Όσον αφορά τη μεταλλαγή ανθεκτικότητας kdr (L1014), το 83,3% των ατόμων σε ομοζυγωτία RR) για τον Άγιο Στέφανο (αστικό περιβάλλον), το 66,6%για τον πληθυσμό Άγιος Στέφανος (ρέμα), και το 53,4% για τον πληθυσμό της Ν.Χαλκηδόνας. Δεδομένου ότι ο αλληλόμορφος ανθεκτικότητας 1014F, εκδηλώνεται σε ομόζυγα για τη μεταλλαγή άτομα, (Halliday & Georghiou, 1985, Lynd et al., 2010) τα επίπεδα ανθεκτικότητας στα πυρεθροειδή εντομοκτόνα είναι πολύ έντονα στην περιοχή του Αγίου Στεφάνου τόσο στο αστικό, όσο και στο ρέμα της ίδιας περιοχής. Το συμπέρασμα αυτό, δηλαδή το αυξημένο ποσοστό των αλληλομόρφων ανθεκτικότητας δείχνει ξεκάθαρα την ύπαρξη δυναμικού ανθεκτικότητας η οποία ανάλογα με τη ποσότητα και τη συχνότητα των ψεκασμών με πυρεθροειδή εντομοκτόνα μπορεί να οδηγήσει σε ανάπτυξη ανθεκτικότητας στον πληθυσμό. Συνεπώς κρίνεται απαραίτητη η συνεχής παρακολούθηση των πληθυσμών όλης της Ελλάδας, ώστε να γίνεται και κατάλληλη αντιμετώπιση των ενήλικων ατόμων.

Αναφορικά με τη μεταλλαγή ανθεκτικότητας Ache (G119S) και (F290V) , κανένα άτομο από τους πληθυσμούς που μελετήθηκαν δεν εμφάνισε ομοζυγωτία ως προς τον ανθεκτικό αλληλόμορφο. Στην περίπτωση της (G119s) μεταλλαγής εμφανίστηκαν ορισμένα άτομα με ετεροζυγωτία και μάλιστα το ποσοστό στην περιοχή της Ν.Χαλκηδόνας έφτασε το 25%.

Αυτό μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι δεν θα πρέπει να υπάρχει εφησυχασμός όσο αναφορά την ανθεκτικότητα στα οργανοφωσφωρικά ,καθώς η παρουσία ετερόζυγων ατόμων μας δίνει το μήνυμα ότι υπάρχουν και ανθεκτικοί πληθυσμοί με αποτέλεσμα ο περαιτέρω έλεγχος για την συγκεκριμένη μεταλλαγή σε διάφορους πληθυσμούς να κρίνεται αναγκαία.

Στο σημείο αυτό αξίζει να σημειωθεί ότι με βάση αποτελέσματα παράλληλων βιοχημικών αναλύσεων του μεταπτυχιακού φοιτητή (Max Fotakis μεταπτυχιακή εργασία στο Πανεπιστήμιο Κρήτης), σημαντικό είναι και το πρόβλημα και της μεταβολικής ανθεκτικότητας στα πυρεθροειδή σε διάφορους πληθυσμούς της Βόρειας Ελλάδας.

Τέλος αναφορικά με τον έλεγχο βιοτύπου όπου έγινε για όλους τους πληθυσμούς, είχε ως αποτέλεσμα να παρθούν αποτελέσματα και των τριών βιοτύπων σε όλους σχεδόν τους πληθυσμούς που μελετήθηκαν γεγονός που υποδηλώνει την μεγάλη ποικιλομορφία των ατόμων μέσα σε έναν πληθυσμό.

Σημειώνεται ότι η παρουσία υβριδικών, είναι πολύ σημαντική επιδημιολογικά, γιατί τα κουνούπια αυτά είναι ικανά να μεταδώσουν ασθένειες όπως ο ιός του δυτικού Νείλου, κατ ευθείαν από τα πουλιά στον άνθρωπο.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

Ανάπτυξη συνεργιστών για βελτιωμένα σκευάσματα εντομοκτόνων, με σκοπό την καταπολέμηση της ανθεκτικότητας.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η Ευρωπαϊκή Ένωση και άλλοι αρμόδιοι διεθνείς φορείς επεξεργάζονται τρόπους για τη δραστική μείωση ή και την απαγόρευση των εντομοκτόνων. Για αυτό πολλά εργαστήρια και ερευνητικές ομάδες έχουν αναπτύξει μη τοξικούς-φιλικούς προς το περιβάλλον ενζυμικούς παρεμποδιστές, οι οποίοι ενσωματώνονται στα σκευάσματα και απενεργοποιούν τα ένζυμα ανθεκτικότητας, καθιστώντας τα έντομα εξαιρετικά ευαίσθητα σε πολύ μικρές ποσότητες εντομοκτόνων. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα η χρήση αυτών των βελτιωμένων σκευασμάτων να μπορεί να παρατείνει την αποτελεσματικότητα της χημικής καταπολέμησης των εντόμων με μικρές δόσεις εντομοκτόνων. (Βόντας, 2006).

1.2 ΣΥΝΕΡΓΙΣΤΕΣ

Ως συνεργιστές όπως αναφέρθηκε χρησιμοποιούνται μη τοξικές ουσίες οι οποίες ονομάζονται συνεργιστές ή συνεργιστικοί παράγοντες και εφαρμόζονται κυρίως στις περιπτώσεις των εντομοκτόνων και ακαρεοκτόνων για τη μείωση εμφάνισης της ανθεκτικότητας. (Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2007). Στο συγκεκριμένο πείραμα ως συνεργιστές χρησιμοποιήθηκαν διάφορα αιθέρια έλαια και τερπένια.

1.3 ΑΙΘΕΡΙΑ ΕΛΑΙΑ-ΤΕΡΠΕΝΙΑ

Τον τελευταίο καιρό όλο και περισσότερο χρησιμοποιούνται διάφορα αιθέρια έλαια ή διάφορα τερπένια σε συνδυασμό με εκλεκτικά εντομοκτόνα τα οποία μπορούν να διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο στα προγράμματα διαχείρισης επιβλαβών οργανισμών. Πραγματοποιούνται συνεχώς βιοδοκιμές τόσο για την βελτίωση των ήδη υπαρχόντων σκευασμάτων (μείωση χημικών), όσο και για την παραγωγή φαρμάκων στα οποία τα έντομα δεν θα εμφανίζονται ανθεκτικά.

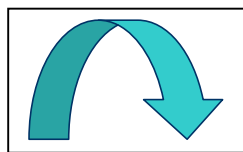
Σε αρκετά πειράματα που γίνονται χρησιμοποιούνται αιθέρια έλαια-τερπένια είτε ως αποθητικά εναντίων κάποιων εντόμων, είτε το ότι όταν συνδυαστούν αυτές οι ουσίες με διάφορα εντομοκτόνα έχοντας συνεργιστική δράση, τα αποτελέσματα είναι άκρως ικανοποιητικά προσφέροντας λύσεις, τόσο για την αναστολή της ανθεκτικότητας των εντόμων, όσο και για την καταπολέμηση παρασίτων στις γεωργικές καλλιέργειες.



Εικόνα 4: εντομοκτόνο



εικόνα 5: συνεργιστής



ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ

- ΑΙΘΕΡΙΑ ΕΛΑΙΑ**

Από πειράματα που πραγματοποιούνται έχει διαπιστωθεί ότι έλαια όπως (thymol, eugenol, pulegone, trans-anethole, rosemary oil) έχουν εξαιρετικά μεγάλο βαθμό θνησιμότητας εναντίων κάποιων εντόμων (Aedes aegypti L.) αν χρησιμοποιηθούν ως καθαρές ουσίες, ενώ παράλληλα ορισμένες ουσίες από αυτές όταν χρησιμοποιηθούν με εκλεκτικό εντομοκτόνο-συνεργιστή (PBO) έχει αποδειχθεί ότι μπορούν να αποτοξικοποιούν τα ένζυμα που είναι υπεύθυνα για την ανθεκτικότητα. Σε μελέτες έχει χρησιμοποιηθεί μεγάλο εύρος μη τοξικών ουσιών από αιθέρια έλαια, δείχνοντας ικανοποιητικά αποτελέσματα όσο αναφορά το συνεργισμό, αλλά και αποτελέσματα που δείχνουν ότι ναι μεν μπορεί να λειτουργήσουν συνεργιστικά, αλλά από την άλλη δρουν ανταγωνιστικά με κάποιο άλλο εκλεκτικό εντομοκτόνο

- **ΤΕΡΠΗΝΙΑ**

Αντίστοιχη περίπτωση με ικανοποιητικά αποτελέσματα όσο αναφορά το συνεργισμό παρουσιάζουν και διάφορα τερπένια. (4R)(+)-limonene, α-pinene, β-pinene, carveol, carvone σε πειράματα που έγιναν στη *Musca domestica* και σε άλλα έντομα, έδειξαν ότι λειτούργησαν συνεργιστικά με το PBO μειώνοντας σημαντικά το LC50 όπως φαίνεται στις εικόνες 6 και 7 της εισαγωγής.



Εικόνα 7: αιθέριο έλαιο C.sinensis (πηγή διαδύκτιο)

ΣΚΟΠΟΣ ΤΟΥ ΣΥΓΚΕΚΡΙΜΕΝΟΥ ΚΕΦΑΛΑΙΟΥ.

Ο σκοπός του συγκεκριμένου κεφαλαίου ήταν η διεξαγωγή βιοδοκιμών σε προνύμφες από το πεδίο, που εμφανίζουν ανθεκτικότητα στα πυρεθροειδή (τόσο ανθεκτικότητα στόχου, όσο και μεταβολική) για την ανίχνευση συνεργιστικής δράσης μεταξύ των ουσιών deltamethrin (κύριο εντομοκτόνο) και όλων των άλλων ουσιών που αναφέρθηκαν παραπάνω.

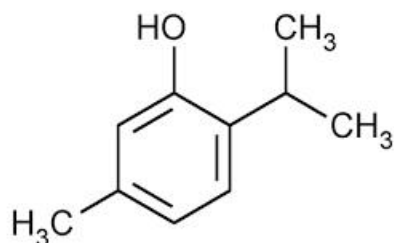
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. ΟΥΣΙΕΣ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ

Για την εφαρμογή των πειραμάτων μας επιλέχθηκαν ορισμένες ουσίες(αιθέρια έλαια-τερπένια), σύμφωνα με κάποια χαρακτηριστικά που έπρεπε να καλύπτουν οι ουσίες αυτές για να μπορούν τα αποτελέσματα να είναι αξιόπιστα. Τα απαραίτητα χαρακτηριστικά που έπρεπε να καλύπτουν οι ουσίες αυτές είναι: α) χαμηλή απωθητικότητα στα κουνούπια, β) αλληλεπίδραση με τα ένζυμα αποτοξικοποίησης, γ) χαμηλή τοξικότητα, δ) σταθερότητα, ε) βιβλιογραφικές αναφορές για συνεργισμό. Έτσι σύμφωνα με τα παραπάνω κριτήρια επιλέχθηκαν οι παρακάτω ουσίες.

- **Thymol (θυμόλη)**

η θυμόλη είναι ένα φυσικό παράγωγο της φαινόλης του μονοτερπενίου, που βρίσκεται στο έλαιο του θυμαριού και εκχυλίζεται από το κοινό θυμάρι (*Thymus vulgaris*) και διάφορα άλλα είδη φυτών ως λευκή κρυσταλλική ουσία με μια ευχάριστη αρωματική οσμή και ισχυρές αντισηπτικές ιδιότητες. Έχει μοριακό τύπο:



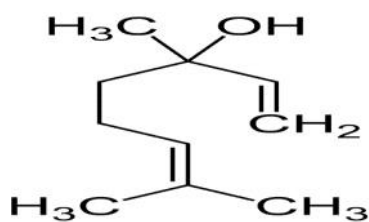
Εικόνα 8: μοριακός τύπος θυμόλης

Επιλέχθηκε διότι:

- Δρα συνεργιστικά με το imidacloprid με απευθείας ψεκάσμο εναντίον του *Myzus persicae*. (Faraone et al. 2015).
- 5-25% μείωση των ενζύμων P450s του κυτοχρώματος(EROD) και 3-20% μείωση της γλουταθειόνης S-τρανσφοράσης σε προνύμφες του είδους *Aegypti* σε in vitro βιοδοκιμές.

- **Linalool (λιναλοόλη)**

Η λιναλοόλη είναι μια φυσική χημική ουσία τερπενίων αλκοόλ που βρέθηκαν σε πολλά λουλούδια και φυτά μπαχαρικών με πολλές εμπορικές εφαρμογές, η πλειοψηφία των οποίων βασίζονται σε ευχάριστο άρωμα (floral, με ένα άγγιγμα του πικάντικη γεύση). Έχει άλλα ονόματα, όπως β-λιναλοόλη, λιναλυλεστέρα αλκοόλη, οξείδιο linaloyl, ρ-λιναλοόλη, αλλο-ocimenoI, και 3,7-διμεθυλο-1,6-οκταδιεν-3-όλη. Ο μοριακός της τύπος είναι:



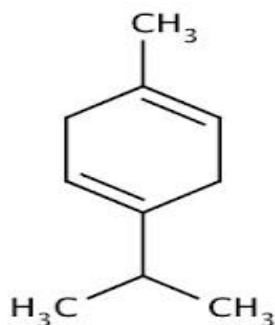
Εικόνα 9: μοριακός τύπος λιναλοόλης

Επιλέχθηκε διότι:

- Δρα συνεργιστικά με το imidacloprid με απευθείας ψεκασμό εναντίον του *Myzus persicae*. (Faraone et al. 2015).
- Έχει πολύ καλή σταθερότητα σαν ουσία, χαμηλή τοξικότητα και μεγάλη καθαρότητα.

- **γ-terpinene**

Τα **τερπινένια** είναι μια ομάδα ισομερών υδρογονανθράκων που έχουν ταξινομηθεί ως **τερπένια**. Το καθένα έχει το ίδιο μοριακό τύπο και πλαίσιο του άνθρακα, αλλά διαφέρουν στη θέση των διπλών δεσμών άνθρακα-άνθρακα. Το **γ-τερπινένιο** (επίσης γνωστή ως **τερπινολένιο**) είναι φυσικό και έχει απομονωθεί από μια ποικιλία από φυτικές πηγές. Ο μοριακός τύπος είναι.



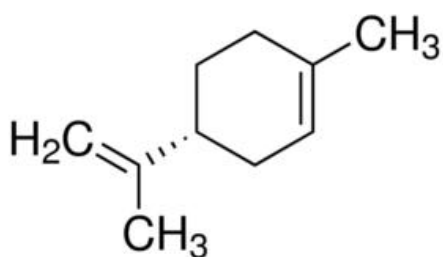
Εικόνα 10: μοριακός τύπος γ-terpinene

Επιλέχθηκε διότι:

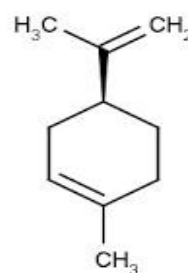
- δρα **συνεργιστικά** με το Profenofos και το methomyl εναντίον προνυμφών του *Sporoptera littoralis* και εναντίον ενηλίκων του *Aphis fabae*. 2 έως 3 φορές αύξηση της τοξικότητας. (Abbassy et al. 2009).
- Χαμηλή αποθητικότητα έναντι σε διάφορα είδη κουνουπιών και ιδιαίτερα στο *Albopictus*.

- **R-(+)- limonene , (S)-(-) limonene**

Το λιμονένιο είναι ένα άχρωμο υγρό υδρογονάνθρακα που ταξινομείται ως ένα κυκλικό τερπένιο. Το πιο κοινό d-ισομερές έχει μια ισχυρή οσμή των πορτοκαλιών. Χρησιμοποιείται στην χημική σύνθεση ως πρόδρομος της καρβόνης και ως ανανεώσιμες πηγές ενέργειας που βασίζονται σε διαλύτη σε προϊόντα καθαρισμού. Ο μοριακός τύπος είναι.



R-(+)- limonene



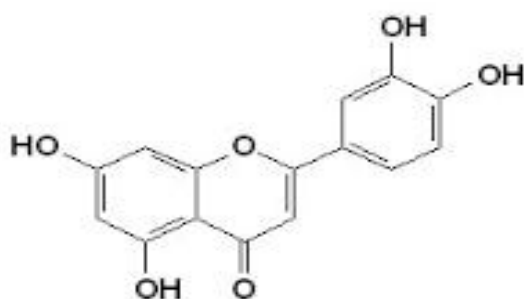
(S)-(-) limonene

Επιλέχθηκε διότι:

- Δρουν συνεργιστικά με το PBO εναντίον της *Musca domestica*. (Yanina Estefania Rossi 2013).
- Χαμηλή αποθητικότητα έναντι σε διάφορα είδη κουνουπιών και ιδιαίτερα στο *Albopictus*.

- **Quercetin**

Η κερσετίνη είναι ένα αντιοξειδωτικό, της οικογένειας των φλαβονοειδών και πιο συγκεκριμένα των φλαβονολών. Είναι το φλαβονοειδές που απαντάται περισσότερο από κάθε άλλο σε διάφορα τρόφιμα. Στο μόριό της έχει 3 δακτυλίους και 5 υδροξυλικές ομάδες. Η κερσετίνη αποτελεί παράλληλα δομικό στοιχείο και για άλλα φλαβονοειδή. Ο μοριακός τύπος είναι:



Εικόνα 13: μοριακός τύπος Quercetin

- **Grapefruit seed extract (GSE) - citricidal**

Είναι ένα υγρό εκχύλισμα που προέρχεται από τους σπόρους, πολτό, και τις λευκές μεμβράνες του γκρέιπφρουτ.



- **Deltamethrin**

Εντομοκτόνο επαφής και στομάχου. Καταπολεμά ευρύ φάσμα εντόμων, όπως ψύλλες σε μηλιά και αχλαδιά, αφίδες σε μηλιά και δαμασκηνιά, καρπόκαψα και φυλλοδέτες στη μηλιά, κάμπιες στα σταυρανθή. Επίσης καταπολεμά αφίδες, κοκκοειδή και αλευρώδη σε θερμοκήπια με αγγουριές, τομάτες, πιπεριές και καλλωπιστικά. (<http://www.lib.teiher.gr/>)

2.2 Πειραματικές δοκιμές παρεμπόδισης P450s (μεταβολικής ανθεκτικότητας) *in vitro*.

Με σκοπό την εφαρμογή του πειράματος έπρεπε να ελεγχθούν οι ουσίες που επιλέχθηκαν με σκοπό να διαπιστωθεί το εάν είναι ικανές να αποτοξικοποιούν τα ένζυμα P450s, έτσι ώστε να δώσουν δεδομένα εάν θα μπορούσαν να είναι υποψήφιοι συνεργιστές.

Για τις πειραματικές μας διαδικασίες επιλέχθηκε η πρωτεΐνη CYPJ32 που είχε παρασκευαστεί στο εργαστήριο και περιείχε το ένζυμο των P450s και ήταν καταλυτικά ενεργό. Η πειραματικές δοκιμές έγιναν σύμφωνα με το ενζυμικό υπόστρωμα 7-Ethoxycoumarin (protocol assay P450s with 7-Ethoxycoumarin).

- Σε κάθε πηγαδάκι τοποθετήθηκαν 40 μl της πρωτεΐνης CYPJ32 από αρχικό stock 1 μM μαζί με 50 μl (0,1 M) sodium phosphate buffer pH=7 έτσι ώστε ο τελικός όγκος να είναι 90 μl.
- Στη συνέχεια τοποθετήθηκε σε κάθε πηγαδάκι 5 μl(20 mM) 7-Ethoxycoumarin.
- Έπειτα σε κάθε πηγαδάκι τοποθετήθηκαν 10μl από διαφορετικές συγκεντρώσεις κάθε ουσίας. Οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν ήταν (500, 200, 100, 50, 5 μM). Όλες οι ουσίες διαλύθηκαν σε μεθανόλη (Me-OH), ενώ παράλληλα υπήρχε και μάρτυρας, δηλαδή σκέτη (Me-OH).
- Τα δείγματα επώαστηκαν για 10 λεπτά στους 30 0C με την κάθε ουσία-υποψήφιο συνεργιστή.
- Στη συνέχεια προστέθηκε 15 μl +NADPH και 15 μl –NADPH και επώαστηκαν για 30 λεπτά στους 30 0C.
- Έπειτα για να σταματήσει ο φθορισμός του NADPH προστέθηκαν 0,5 μl Glutathione reductase, 10 μl(30mM) GS-SG και 9,5 μl νερό.

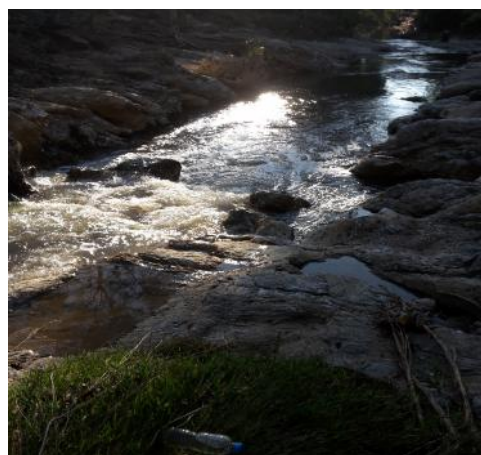
Μετά από 10 λεπτά επώασης σε RT, η αντίδραση τερματίζεται με την προσθήκη διαλύματος ακετονιτριλίου σε αναλογία (1:1) pH=8,5 και ο φθορισμός μετράται με διέγερση στα 390nm κι εκπομπή στα 465nm.

2.3 Πειραματικές δοκιμές παρεμπόδισης P450s (μεταβολικής ανθεκτικότητας) *in vivo*.

Για τις δοκιμασίες των πειραμάτων μας απαραίτητη ήταν η συλλογή πληθυσμών κουνουπιών. Η συλλογή των κουνουπιών έγινε από διάφορες περιοχές του νομού Αττικής(ρέματα, παραπόταμους) στο στάδιο της προνύμφης με ειδικά εργαλεία. Οι περιοχές από όπου έγινε η συλλογή ήταν (Άγιος Στέφανος Αττικής ρέμα, Άγιος Στέφανος Αττικής αστικό περιβάλλον, Νέα Χαλκηδόνα και από το Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο). Κατά τη συλλογή των δειγμάτων ιδιαίτερη προσοχή δινόταν στη συλλογή προνυμφών νεαρής ηλικίας (1ης και 2ης και σχεδίες ωών). Μετά τη συλλογή των δειγμάτων οι προνύμφες μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο μοριακής εντομολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης όπου έγινε ο διαχωρισμός τους ανάλογα με το στάδιο της προνύμφης. Η εκτροφή των προνυμφών πραγματοποιήθηκε σε ανοιχτά πλαστικά μπολάκια (εικόνα 16). Η κάθε λεκάνη περιείχε σχεδόν 500 ml νερό και 150 προνύμφες, ενώ ανά δύο μέρες γινόταν προσθήκη τροφής. Όσες προνύμφες δεν χρησιμοποιούνταν για βιοδοκιμές, εκτρέφονταν έως το στάδιο του ακμαίου όπου και πραγματοποιούνταν μοριακά διαγνωστικά για τα τέλεια άτομα. Επιπλέον τέλεια άτομα αποθηκεύτηκαν στους -80 0C για περαιτέρω διεξαγωγή πειραμάτων.



*Εικόνα 14: προνυμφοσυλλέκτης
(N. χαλκηδόνα)
(Φωτ. Αλέξανδρου Τσιαμαντά)*



*Εικόνα 15: ρέμα Αττικής
(Φωτ. Αλέξανδρου Τσιαμαντά)*



*Εικόνα 16: δοχεία εκτροφής
προνύμφων
(Φωτ. Αλέξανδρου Τσιαμαντά)*



*Εικόνα 17: κλωβοί εκτροφής
(Φωτ. Αλέξανδρου Τσιαμαντά)*

2.4 Βιοδοκιμές σε προνύμφες

Τα σκευάσματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία ήταν το deltamethrin, όπου πραγματοποιήθηκαν δοκιμές για την εύρεση του LC10, καθώς και όλες οι ουσίες που αναφέρθηκαν προηγουμένως σε συνδυασμό με το deltamethrin για την εύρεση συνεργιστικής δράσης. Για κάθε μεταχείριση έγιναν 2 επαναλήψεις με 10 προνύμφες 3ου ή αρχές 4ου σταδίου σύμφωνα με τον Π.Ο.Υ και τα ποσοστά θνησιμότητας καταγράφονταν μετά από 24 ώρες, ενώ παράλληλα υπήρχε μάρτυρας χωρίς την προσθήκη προνυμοκτόνου. Ως μάρτυρας στην συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιήθηκε η ακετόνη ή ο συνδυασμός ακετόνης μεθανόλης.

Αρχικά έγιναν δοκιμές στην ουσία deltamethrin, τόσο σε προνύμφες από τον Άγιο Στέφανο Αττικής αστικό περιβάλλον που σύμφωνα με τα μοριακά διαγνωστικά εμφάνισαν υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας, όσο και σε προνύμφες από το Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο, οι οποίες βρίσκονταν σε εργαστηριακό χώρο και λειτουργούσαν σαν μάρτυρας στα πειράματα μας, για την εύρεση του Lc10. Παράλληλα δοκιμάστηκαν όλες οι άλλες ουσίες σε συνδυασμό με τη συγκέντρωση του Lc10 της deltamethrin για την ανίχνευση πιθανού συνεργισμού. Οι συγκεντρώσεις των ουσιών ήταν 10 και 100 ppm.

Διαγνωστικές δόσεις που χρησιμοποιήθηκαν προετοιμάστικαν με διαδοχικές αραιώσεις από τα διαθέσιμα εμπορικά σκευάσματα σύμφωνα με τη μεθοδολογία του Π.Ο.Υ στις ίδιες συνθήκες στις οποίες γίνονταν η εκτροφή.

Τέλος στον τελικό όγκο, όπου μεταφέρονταν οι προνύμφες γίνονταν προσθήκη 100 ml νερού και 1ml από το διάλυμα που είχε προκύψει από τις διαδοχικές αραιώσεις από τα εμπορικά σκευάσματα, έτσι ώστε να προκύψει η επιθυμητή συγκέντρωση για κάθε περίπτωση. (εικόνες 18 και 19) (φωτογραφίες Αλέξανδρος Τσιαμαντάς)



Εικόνα 1: εκτέλεση βιοδοκιμής



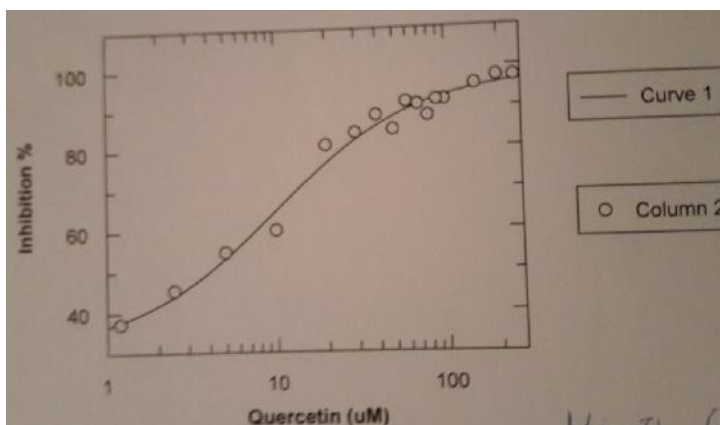
Εικόνα 2: εκτέλεση βιοδοκιμής

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Αποτελέσματα δοκιμών παρεμπόδισης των P450s in vitro

Από τις ουσίες που επιλέχθηκαν, μόνο η ουσία *Quercetin* έδειξε σημαντικά αποτελέσματα. Όλες οι άλλες ουσίες δεν έδειξαν παρεμποδιστική δράση, με τη μέθοδο που δοκιμάστηκε.

Ύστερα από δοκιμές φάνηκε ότι η συγκεκριμένη ουσία είναι ικανή να παρεμποδίζει τις P450s σε ικανοποιητικό βαθμό. Το LC50 της συγκεκριμένης προσδιορίστηκε σε 9.92 mg/L ουσίας όπως φαίνεται και στην παρακάτω εικόνα, που είναι σχετικά χαμηλό.



variable	Valur Std. Err.	
Y Range	67,2146	8,6022
LC 50	9,9280	2,1912
Slope factor	-1,0464	0,2128
Background	31,2233	6,4419

Πίνακας 1: αποτέλεσμα δοκιμής με την ουσία quercetin με τη χρήση του υποστρώματος 7-Ethoxycoumarin που υποδεικνύει την εύρεση του LC 50.

3.2 Αποτελέσματα βιοδοκιμών σε προνύμφες από την περιοχή Άγιος Στέφανος Αττικής (αστικό περιβάλλον)

Είδος: Culex pipiens				
Στέλεχος: Αγ. Στέφανος-αστικό				
Εντομοκτόνο: Δελταμεθρίνη				
Δόση (ppm)	Σύνολο ατόμων	Νεκρά άτομα	Ζωντανά άτομα	Ποσοστό % νεκρών ατόμων
Control (acetone)	10	0	10	0
0,001	10	0	10	0
0,003	10	0	10	0
0,01	10	1	9	10
0,03	10	6	4	60
0,1	10	8	2	80

Πίνακας 1: αποτελέσματα βιοδοκιμής με το εντομοκτόνο deltamethrin για την εύρεση του LC 50 της ουσίας σε δείγματα της περιοχής Αγίου Στεφάνου Αττικής(αστικό περιβάλλον) που εμφάνισαν τη μεγαλύτερη ανθεκτικότητα σύμφωνα με τα μοριακά διαγνωστικά.

Όπως παρατηρούμε και από τον πίνακα από τις διάφορες συγκεντρώσεις που δοκιμάστηκαν το LC 50 της ουσίας κυμάνθηκε στη περιοχή της 0.01 συγκέντρωσης με το ποσοστό των νεκρών ατόμων να κυμαίνεται στο 10% του συνολικού πληθυσμού. Η συγκεκριμένη δοκιμή εφαρμόστηκε τουλάχιστον τρεις φορές για να είναι τα αποτελέσματα αξιόπιστα.

Είδος: Culex pipiens				
Στέλεχος: Αγ. Στέφανος-αστικό				
Εντομοκτόνο: deltamethrin – quercetin				
Δόση (ppm)	Σύνολο ατόμων	Νεκρά άτομα	Ζωντανά άτομα	Ποσοστό % νεκρών ατόμων
Control (acetone + methanol)	10	0	10	0
Deltamethrin 0,01 quercetin 10	10	0	10	0
Deltamethrin 0,01 quercetin 100	10	0	10	0
Quercetin 100	10	0	10	0

Πίνακας 2: αποτελέσματα βιοδοκιμής deltamethrin με quercetin για την ανίχνευση συνεργιστικής δράσης σε δείγματα της περιοχής Αγίου Στεφάνου Αττικής(αστικό περιβάλλον) που εμφάνισαν τη μεγαλύτερη ανθεκτικότητα σύμφωνα με τα μοριακά διαγνωστικά.

** Η quercetin διαλύθηκε σε μεθανόλη, όμως μόλις έμπαινε στο δοχείο με το νερό έχανε τη διαλυτότητά της, οπότε η παραπάνω βιοδοκιμή μάλλον δεν είναι αξιόπιστη. Το ίδιο συνέβη και με την ακετόνη. Σε 2% DMSO φάνηκε να μη διαλύεται καλά.*

Είδος: Culex pipiens				
Στέλεχος: Αγ. Στέφανος-αστικό				
Εντομοκτόνο: Δελταμεθρίνη – υποψήφιος συνεργιστής				
Δόση (ppm)	Σύνολο ατόμων	Νεκρά άτομα	Ζωντανά άτομα	Ποσοστό % νεκρών ατόμων
Control (acetone)	10	0	10	0
Deltamethrin 0,01	10	0	10	0
Deltamethrin 0,01 γ-terpinene 10	9	5	4	55,5
γ-terpinene 10	10	7	3	70
Deltamethrin 0,01 S limonene 10	10	2	8	20
S limonene 10	10	1	9	10
Deltamethrin 0,01 R limonene 10	10	1	9	10
R limonene 10	10	2	8	20

Πίνακας 3: αποτελέσματα βιοδοκιμής deltamethrin με τις ουσίες γ-terpinene, S-limonene, R-limonene για την ανίχνευση συνεργιστικής δράσης σε δείγματα της περιοχής Αγίου Στεφάνου Αττικής(αστικό περιβάλλον) που εμφάνισαν τη μεγαλύτερη ανθεκτικότητα σύμφωνα με τα μοριακά διαγνωστικά.

Από τα αποτελέσματα που πήραμε φάνηκε να μην υπάρχει κάποια αξιολογη συνεργιστική δράση μεταξύ των δυο ουσιών που δοκιμάστηκαν καθώς όπως παρατηρούμε το ποσοστό θνησιμότητας των προνυμφών από την καθαρή ουσία ήταν μεγαλύτερο από ότι το ποσοστό του συνδυασμού τους.

Είδος: <i>Culex pipiens</i>				
Στέλεχος: Αγ. Στέφανος- αστικό				
Εντομοκτόνο: Δελταμεθρίνη – υποψήφιος συνεργιστής				
Δόση (ppm)	Σύνολο ατόμων	Νεκρά άτομα	Ζωντανά άτομα	Ποσοστό % νεκρών ατόμων
Control (acetone)	10	0	10	0
Control (acetone)	10	0	10	0
Deltamethrin 0,01	10	0	10	0
Deltamethrin 0,01 PBO 10	10	10	0	100
PBO 10	9	2	7	22,2
Deltamethrin 0,01 Thymol 10	10	3	7	30
Thymol 10	10	1	9	10
Deltamethrin 0,01 Linalool 10	10	1	9	10
Linalool 10	10	0	10	0
Deltamethrin 0,01 Citricidal 0,016%	8	0	8	0
Citricidal 0,016%	9	0	9	0

Πίνακας 4: αποτελέσματα βιοδοκιμής deltamethrin με τις ουσίες Thymol, Linalool, citricidal και με το PBO για την ανίχνευση συνεργιστικής δράσης σε δείγματα της περιοχής Αγίου Στεφάνου Αττικής(αστικό περιβάλλον) που εμφάνισαν τη μεγαλύτερη ανθεκτικότητα σύμφωνα με τα μοριακά διαγνωστικά.

Από τα αποτελέσματα διαπιστώνεται συνεργιστική δράση μεταξύ **PBO** και **deltamethrin**. Ακόμα ικανοποιητικά αποτελέσματα όσο αναφορά το συνεργισμό έδωσε η **Θυμόλη (Thymol)** και η **Linaool** αφού όταν συνδυάστηκαν με το εκλεκτικό εντομοκτόνο το ποσοστό θνησιμότητας των προνυμφών αυξήθηκε κατά 20% και 10 % αντίστοιχα.

3.3 αποτελέσματα βιοδοκιμών σε προνύμφες από το Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο

Είδος: <i>Culex pipiens</i>				
Στέλεχος: Μπενάκειο				
Εντομοκτόνο: Δελταμεθρίνη				
Δόση (ppm)	Σύνολο ατόμων	Νεκρά άτομα	Ζωντανά άτομα	Ποσοστό % νεκρών ατόμων
Control (acetone)	10	0	10	0
0,00001	10	0	10	0
0,00003	10	1	9	20
0,0001	10	7	3	70
0,0003	10	10	0	100
0,001	10	10	0	100

Πίνακας 5: αποτελέσματα βιοδοκιμής με το εντομοκτόνο- υποψήφιος συνεργιστής deltamethrin για την εύρεση του LC 50 της ουσίας σε δείγματα από το Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο.

Από τα αποτελέσματα που πάρθηκαν παρατηρήθηκε ότι το LC 50 της ουσίας deltamethrin σε δείγματα από εργαστηριακό χώρο του Μπενάκειου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου ήταν 0,00003 ppm.

Είδος: Culex pipiens				
Στέλεχος: Μπενάκειο				
Εντομοκτόνο: deltamethrin – quercetin				
Δόση (ppm)	Σύνολο ατόμων	Νεκρά άτομα	Ζωντανά άτομα	Ποσοστό % νεκρών ατόμων
Control (acetone + methanol)	10	0	10	0
Deltamethrin 0,00003 quercetin 10	10	0	10	0
Deltamethrin 0,00003 quercetin 100	10	1	9	10
Quercetin 100	10	1	9	10

Πίνακας 6: αποτελέσματα βιοδοκιμής deltamethrin με quercetin για την ανίχνευση συνεργιστικής δράσης σε δείγματα από το Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο για την ανίχνευση συνεργιστικής δράσης.

Από τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης βιοδοκιμής δεν προκύπτει κανένα αποτέλεσμα συνεργιστικής δράσης μεταξύ των δυο ουσιών αφού όπως παρατηρούμε στον πίνακα τα ποσοστά θνησιμότητας ήταν πάρα πολύ χαμηλά.

Είδος: Culex ripiens				
Στέλεχος: Μπενάκειο				
Εντομοκτόνο: Δελταμεθρίνη – υποψήφιος συνεργιστής				
Δόση (ppm)	Σύνολο ατόμων	Νεκρά άτομα	Ζωντανά άτομα	Ποσοστό % νεκρών ατόμων
Deltamethrin 0,00003	10	1	9	10
Deltamethrin 0,00003	10	1	9	10
Deltamethrin 0,00003 Thymol 10	11	1	10	9
Deltamethrin 0,00003 Thymol 100	10	10	0	100
Thymol 100	10	10	0	100
Deltamethrin 0,00003 S limonene 10	10	2	8	20
Deltamethrin 0,00003 S limonene 100	10	10	0	100
S limonene 100	10	10	0	100
Deltamethrin 0,00003 R limonene 10	10	3	7	30
Deltamethrin 0,00003 R limonene 100	10	10	0	100
R limonene 100	10	10	0	100
Deltamethrin 0,00003 Linalool 10	10	0	10	0
Deltamethrin 0,00003 Linalool 100	9	4	5	44,4
Linalool 100	10	3	7	30
Deltamethrin 0,00003 γ- terpinene 10	10	5	5	50
Deltamethrin 0,00003 γ- terpinene 100	10	10	0	100
γ- terpinene 100	10	10	0	100

Πίνακας 7: αποτελέσματα βιοδοκιμής deltamethrin με όλες τις ουσίες για την ανίχνευση συνεργιστικής δράσης σε δείγματα από Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο.

Από τα αποτελέσματα που πάρθηκαν αξιόπιστα δεδομένα συνεργιστικής δράσης δεν φάνηκε να δίνει καμία από τις ουσίες που επιλέχθηκε για τον εργαστηριακό πληθυσμό του Μπενάκειου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου.

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα αποτελέσματα *in vivo* των βιοδοκιμών που έγιναν στα κουνούπια έδειξαν ότι από τις ουσίες που είχαμε επιλέξει η **θυμόλη και η λιναλοόλη** μπορεί να δράσει συνεργιστικά με εκλεκτικό εντομοκτόνο (*Deltamethrin*) σε πληθυσμούς όπου εμφάνισαν υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας σύμφωνα με τα μοριακά διαγνωστικά, αφού όταν συνδυάστηκε με το εκλεκτικό εντομοκτόνο το ποσοστό θνησιμότητας των προνυμφών αυξήθηκε κατά 20% και 10 % αντίστοιχα..

Αυτό μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι διάφορες ουσίες φυσικής προέλευσης μπορούν να παίξουν ρόλο για την αναστολή της ανθεκτικότητας.

Επίσης σύμφωνα με τα *in vitro* αποτελέσματα όπου έγιναν βιοδοκιμές για τον μεταβολισμό των P450s η *Quercetin* ήταν εκείνη που ανάμεσα από τις υπόλοιπες ουσίες φάνηκε να μεταβολίζει τα ένζυμα ανθεκτικότητας. Το αποτέλεσμα αυτό έρχεται σε αντίθεση με το αποτέλεσμα που πήραμε στις *in vivo* βιοδοκιμές για την συγκεκριμένη ουσία, αφού σύμφωνα με τα αποτελέσματα δεν εμφάνισε κάποια συνεργιστική δράση. Το γεγονός αυτό μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η *Quercetin* δεν καθίστατο ικανή να εισέλθει στο κουνούπι και να δράσει με αποτέλεσμα να είναι αναγκαίο να παρασκευαστεί κάποιο άλλο καταλληλότερο σκεύασμα για την συγκεκριμένη ουσία.

Ακόμα ανάλογο φαινόμενο παρατηρήθηκε και με άλλες ουσίες (**θυμόλη, Linaool**) οι οποίες ενώ δεν εμφάνισαν κάποιο αποτέλεσμα αποτοξικοποίησης των ενζύμων ανθεκτικότητας σε *in vitro* βιοδοκιμές, αντίθετα όταν συνδυάστηκαν με εκλεκτικό εντομοκτόνο έδωσαν αποτελέσματα συνεργιστικής δράσης. Το φαινόμενο αυτό ίσως υποδεικνύει κάποιον άλλο μηχανισμό συνέργειας που θα είχε σημαντικό ενδιαφέρον να μελετηθεί περαιτέρω.

Στη συνέχεια καλό θα ήταν να αναφερθεί και το γεγονός ότι υπάρχουν πάρα πολλές τέτοιες φυσικές ουσίες οι οποίες προέρχονται από διαφορα αρωματικά φυτά και βότανα που παρουσιάζουν σημαντικό ενδιαφέρον και αξίζει να αναλυθούν με την παραπάνω μεθοδολογία για την ανεύρεση σημαντικών στοιχείων όσο αναφορά την αποτοξικοποίηση των ενζύμων ανθεκτικότητας αλλά και για την ανίχνευση συνεργισμού για την αναστολή της ανθεκτικότητας.

Τέλος στην Ελλάδα φύτεται ένας μεγάλος αριθμός αρωματικών φυτών, τα οποία είτε φύονται σε όλη την χώρα, είτε σε ένα βιότοπο, είτε εξαπλώνονται σε μία μικρή περιοχή. Έχουν καταγραφεί περίπου 2.000 είδη φυτών που παράγουν αιθέρια

έλαια. Ενώ η Ελλάδα κλιματολογικά ευνοεί την καλλιέργεια αρωματικών φυτών και βοτάνων, η καλλιέργεια αρωματικών φυτών θεωρείται ως νέα μορφή καλλιέργειας και δεν έχει αναπτυχθεί επαρκώς. Ο μεγάλος αριθμός μικροκλιμάτων λόγω της ιδιάζουσας τοπογραφίας – τα νησιά του Αιγαίου, τα ψηλά βουνά όπως ο Όλυμπος, ο Παρνασσός και ο Ταΰγετος, ο ξηρός νότος – βοηθούν να αναπτυχθεί η τόσο πλούσια γλωρίδα, που αποτελείται σε μεγάλο μέρος από φυτά που έχουν προσαρμοστεί, για να καταφέρουν να αναπτυχθούν σε ένα τόσο μοναδικό περιβάλλον. Στην Ελλάδα καλλιεργούνται περίπου 20.000 – 30.000 στρέμματα αρωματικών – φαρμακευτικών φυτών. Η συγκεκριμένη μορφή καλλιέργειας δύναται να αξιοποιήσει πολλές κατηγορίες εδαφών, ακόμη και ορεινών αλλά και μειονεκτικών περιοχών. Τα αρωματικά φυτά και βότανα δίνουν την ευκαιρία αντικατάστασης των χημικών ουσιών που χρησιμοποιούνται με φυσικές ουσίες που γίνονται όλο και πιο δημοφιλής στο ευρύ καταναλωτικό κοινό της Ελλάδας. Παράλληλα οι απαιτήσεις τους σε εισροές (φάρμακα και λιπάσματα) είναι μειωμένες καθώς μπορούν να καλλιεργηθούν ή να βιοκαλλιεργηθούν χωρίς να προσβάλλονται εύκολα από εχθρούς και ασθένειες.

Για αυτό χρήσιμο έως αναγκαίο θα κρινόταν το γεγονός όλο και περισσότεροι αρμόδιοι φορείς να ασχοληθούν με το συγκεκριμένο θέμα γιατί φαίνεται πως η φύση κρύβει μυστικά τα οποία μέχρι τώρα είναι ανεκμετάλλευτα τόσο για τη μείωση των χημικών στις καλλιέργειες που ισοδυναμεί με ελάφρυνση του περιβάλλοντος, αλλά όσο και για την ολοκληρωμένη αντιμετώπιση και αναστολή ανθεκτικότητας σε διάφορους ζωικούς εχθρούς.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1

1. Απομόνωση γονιδιωματικού DNA με χρήση του DNAzol Reagent

1. Προετοιμασία δειγμάτων: Ομογενοποίηση κάθε ενός ακμαίου ατόμου ξεχωριστά, με ειδικό ομογενοποιητή που εφαρμόζει σε 1.5 ml eppendorf tube με την προσθήκη 200 µl DNAzol.
2. φυγοκέντρηση στα 10.000 rpm (στροφές ανά λεπτό) για 10 λεπτά στους 25⁰ C για απομάκρυνση των αδιάλυτων συστατικών.
3. Μεταφορά υπερκείμενου διαλύματος σε 1,5 ml eppendorf tube.
4. Προσθήκη 100 µl 100% αιθανόλης (ethanol) και καλή ανάμιξη με πολλή καλή ανακίνηση ταυτόχρονα.
5. Φυγοκέντηση στα 13.000 rpm για 20 λεπτά
6. Αφαίρεση υπερκείμενου διαλύματος.
7. Πλένεται το ίζημα (DNA) με 1 ml 75% αιθανόλη.
8. Φυγοκέντρηση στα 13.000 rpm για 5 λεπτά
9. Αφαίρεση υπερκείμενου διαλύματος.
10. Αφήνεται το ίζημα να στεγνώσει (ανοίγοντας το καπάκι από το eppendorf tube για 30 λεπτά.
11. Τέλος το ίζημα διαλύεται σε 50 µl TE buffer ή νερό.

2. Ηλεκτοφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.

Η ηλεκτροφόρηση είναι μια εργαστηριακή τεχνική για τον διαχωρισμό τμημάτων DNA βάσει μεγέθους φορτίου και διαμόρφωσης.

Για την Παρασκευή του gel:

- 1,8 gr (agaroze)
- 60 µl βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr)
- 120 ml 1 × T.A.E ρυθμιστικό διάλυμα

Εντός κωνικής φιάλης διαλύθηκε 1,8 gr αγαρόζης σε 120 ml dd H₂O.

Ακολούθησε θέρμανση του διαλύματος έως ότου διαλυθεί τελείως η αγαρόζη. Ακολούθησε προσθήκη 60 μl (EtBr) και μεταφορά του στην ειδική πλάκα ηλεκτροφόρησης που έφερε προσαρμοσμένα χτένια έως ότου αυτό να πήξει. Μετά το gel μεταφέρθηκε στη συσκευή ηλεκτροφόρησης γεμάτη που ήταν γεμάτη με ρυθμιστικό διάλυμα 1 × T.A.E. . Έπειτα έγινε προσθήκη στα προϊόντα της PCR ειδική χρωστική και ακολούθησε φόρτωμα των δειγμάτων στις εσοχές που είχαν σχηματιστεί από τα ειδικά χτένια. Τέλος η ηλεκτοφόρηση παραγματοποιήθηκε στα 120-130 V.

Τα τμήματα του DNA που προέκυψαν από την PCR έγιναν ορατά μετά την έκθεση του gel σε συσκευή εκπομπής υπέρυθρης ακτινοβολίας και στη συνέχεια φωτογραφήθηκαν.

Βιβλιογραφία

Different amino-acid substitutions confer insecticide resistance through acetylcholinesterase 1 insensitivity in *Culex vishnui* and *Culex tritaeniorhynchus* (Diptera: Culicidae) from China. *J. Med. Entomol.* 44, 463e469.

Alout H, Berthomieu A, Hadjivassilis A, Weill M 2007b. **A new amino-acid substitution in acetylcholinesterase 1 confers insecticide resistance to *Culex pipiens* mosquitoes from Cyprus.** *Insect Biochem. Mol. Biol.* 37, 41e47.

Bahnck CM, Fonseca DM. **Rapid assay to identify the two genetic forms of *Culex* (*Culex*) *pipiens* L. (Diptera: Culicidae) and hybrid populations.** *Am J Trop Med Hyg* 2006 Aug; 75(2):251-5.

Becker, N., D. Petric, M. Zgomba, C. Boase, M. Madon, C.Dahl and A. Kaiser. 2010. **Mosquitos and their control.** Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. 577 pp.

Beehler JW, Mulla MS, 1996. **Larvicidal oils modify the oviposition behaviour of *Culex* mosquitoes.** *J Vector Ecol* 21(1):60–65.

Blackman RL, Spence JM, Field LM, Devonshire AL, 1999. **Variation in the chromosomal distribution of amplified esterase (FE4) genes in Greek field populations of *Myzus persicae* (Sulzer).** *Heredity* 82 (2) , pp. 180-186

Black WC 4th, Vontas JG, 2007. **Affordable assays for genotyping single nucleotide polymorphisms in insects.** *Insect Molecular Biology* 16 (4) , pp. 377-387

Brogdon WG, McAllister JC, 1998. **Insecticide Resistance and Vector Control.** *Emerg Infect Dis* 4:605-613. Center for Disease Control and Prevention. 2002.

Campbell GL, Marfin AA, Lanciotti RS, Gubler DJ, 2002. **West Nile virus.** *Lancet Infectious Diseases* 2 (9), 519–529.

Chen L, Zhong D, Zhang D, Shi L, Zhou G, et al, 2010. **Molecular Ecology of Pyrethroid Knockdown Resistance in *Culex pipiens pallens* Mosquitoes.** *PLoS ONE*. 2010;5:1–9.

Chris Bass a, , Alin M. Puinean a, Christoph T. Zimmer a, Ian Denholm a, Linda M. Field a, Stephen P. Foster a, Oliver Gutbrod b, Ralf Nauen c, Russell Slater d, Martin S. Williamson. 2014. **The evolution of insecticide resistance in the peach potato aphid, *Myzus persicae*.**

Coleman M, Hemingway J, 2007. **Insecticide resistance monitoring and evaluation in disease transmitting mosquitoes.** *Journal of Pesticide Science*. 32 (2), 69 – 76.

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

D. Fournier, A. Cuany, M. Pralavorio, J.M. Bride, J.B. Berge. 1987. **Analysis of methidathion resistance mechanisms in *Phytoseiulus persimilis* A.H.** *Pest. Biochem. Physiol.* 28: 271-278.

David Martinez-Torres¹, C Chevillon, A Brun-Barale, J B Bergé, N Pasteur and David Pauron. **Voltage-dependent Na⁺ channels in pyrethroid-resistant *Culex pipiens L* mosquitoes.** *Pesticide Science* Volume 55, Issue 10, pages 1012–1020, October 1999

FAN TONG AND JEFFREY R. BLOOMQUIST,² 2013. **Plant Essential Oils Affect the Toxicities of Carbaryl and Permethrin Against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae).**

Feyereisen R, 1999. **Insect P450 enzymes.** *Ann. Rev. Entomol.* 44, 507–533.

Fonseca DM, Keyghobadi N, Malcolm CA, Mehmet C, Schaffner F, Mogi M, Fleischer RC. **Emerging Vectors in the Culex pipiens Complex**. Science 2004, 5 March: 303 (5663):1535-8

Giatropoulos A, Emmanouel N, Koliopoulos G, Michaelakis A, 2012. **A Study on distribution and seasonal abundance of Aedes albopictus (Diptera: Culicidae) population in Athens, Greece**. *Journal of Medical Entomology* 49 (2) , pp. 262-266.

Gomes B1, Kioulos E, Papa A, Almeida AP, Vontas J, Pinto J. 2013. **Distribution and hybridization of Culex pipiens forms in Greece during the West Nile virus outbreak of 2010**. *Infect. Genet. Evol.* 16: 218-225

Halliday WR, Georghiou GP, 1985. **Inheritance of resistance to permethrin and DDT in the southern house mosquito (Diptera: Culicidae)**. *Journal of Economic Entomology*, 78, 726-727.

Hamer, G.L., Kitron, U.D., Brawn, J.D., Loss, S.R., Ruiz, M.O., Goldberg, T.L., Walker, E.D. **Culex pipiens (Diptera: Culicidae): a bridge vector of West Nile virus to humans**. *J. Med. Entomol.* 2008.45, 125–128.

Hemingway J, 2000. **The molecular basis of two contrasting metabolic mechanisms of insecticide resistance**. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 30, 1009–1015.

Hemingway J, Hawkes NJ, McCarroll L, Ranson H, 2004. **The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes**. *Insect Biochem Mol Biol.* 34:653–665.

Kioulos I, Kampouraki A, Morou E, Skavdis G, Vontas J. **Insecticide resistance status in the major West Nile virus vector Culex pipiens from Greece**. *Pest Manag Sci.* 2014 Apr; 70(4):623-7.

K. Dong, Y. Du, F. Rinkevich, Y. Nomura, P. Xu, L. Wang, K. Silver, C. Zhorov, **Molecular biology of insect sodium channels and pyrethroid resistance**. *Insect Biochem Mol Biol.* 50 (2014) 1-17. **Hyperforin and deoxycohumulone as a larvicidal agent against Culex pipiens (Diptera: Culicidae)**.

Kornilia P. Mitsopoulou a,b, Veroniki P. Vidali a, George Koliopoulos c, Elias A. Couladouros a,b, Antonios Michaelakis d,

Lynd A, Weetman D, Barbosa S, Egyir-Yawson A, Mitchell S, Pinto J, Hastings I, Donnelly MJ, 2010. **Field, genetic and modeling approaches show strong positive selection acting upon an insecticide resistance mutation in *Anopheles gambiae* s.s.** *Mol Biol Evol*, 27:1117-1125.

Martinez-Torres D, Chandre F, Williamson MS, Darriet F, Berge JB, Devonshire AL, et al., 1998. **Molecular characterization of pyrethroid knock-down resistance (kdr) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s.s.** *Insect Mol. Biol.* 7, 179–184.

Mostafa A. Abbassy¹, Samir A. M. Abdelgaleil^{2*} & Rasha Y. A. Rabi¹
Alout H, Berthomieu A, Cui F, Tan Y, Berticat C, Qiao CL, Weill M, 2007a. **Insecticidal and synergistic effects of *Majorana hortensis* essential oil and some of its major constituents.** DOI:1570-7458.

Nicolescu, G. 1998. **A general characterisation of the mosquitos fauna (Diptera: Culicidae) in the endemic area for West Nile virus in the south of Romania.** *Europ. Mosq. Bull.* 2: 13-19

Nicoletta Faraone, N. Kirk Hillier, G. Christopher Cutler. 2015. **Plant Essential Oils Synergize and Antagonize Toxicity of Different Conventional Insecticides against *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae).** DOI: 10.1371/journal.pone.0127774

RANIL WALIWITIYA,¹ RUSSELL A. NICHOLSON, CHRISTOPHER J. KENNEDY, AND CARL A. LOWENBERGER. 2012. **The Synergistic Effects of Insecticidal Essential Oils and Piperonyl Butoxide on Biotransformational Enzyme Activities in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae).**

Scott, J. G. 1999. Cytochromes **P450** and insecticide resistance. *Ins. Biochem. Mol. Biol.* 29: 757-777

Smith JL, Fonseca DM. **Rapid assays for identification of members of the *Culex (Culex) pipiens* complex, their hybrids, and other sibling species (Diptera: Culicidae).** *Am J Trop Med Hyg* 2004; 70: 339–45.

Vontas J, Kioulos E, Pavlidi N, Morou E, della Torre A, Ranson H, 2012. **Insecticide resistance in the major dengue vectors *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*.** *Pesticide Biochemistry and Physiology. Article in Press.*

Yanina Estefania Rossi, Sara Maria Palacios. 2013. **Fumigant toxicity of Citrus sinensis essential oil on *Musca domestica* L. adults in the absence and presence of a P450 inhibitor.**

Ελληνική βιογραφία

Βογιατζόγλου Σαμανίδου, Α. 2011. τα κουνούπια της Ελλάδας: Μορφολογία, Βιολογία, Δημόσια υγεία, Κλείδες προσδιορισμού, Αντιμετώπιση. Αθήνα, Εκδόσεις Αγρότυπος. 112 σελ.

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

Εμμανουήλ, Ν.Γ. 1999. Δίπτερα υγειονομικής σημασίας. Αναγνώριση, βιολογία, οικονομική σημασία, αντιμετώπιση. Εκδόσεις Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. 91 σελ.

Ζιώγας Βασίλειος Ν., Μαρκόγλου Αναστάσιος Ν. , ΓΕΩΡΓΙΚΗ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑ. Βιοχημεία, Φυσιολογία, Μηχανισμοί Δράσης και Χρήσεις των Φυτοπροστατευτικών Προϊόντων. Πρώτη Έκδοση. Αθήνα 2007.

Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Ασθενειών (www.keelpno.gr).

Κιούλος, Η., Γ. Κολιόπουλος, Χ Τράκα, Π. Περγαντάς, Γ Σκαβίδης και Ι. Βόντας.
2007. Μελέτη της ανθεκτικότητας κουνουπιών της Ελλάδας σε σκευάσματα πθ
χρησιμοποιούνται για την καταπολέμηση τους. 12^ο Πανελλήνιο Εντομολογικό
Συνέδριο, Κύπρος. Πρακτικά: 248-250.