

Κακάνη Ευδοξία

Μοριακή ανάλυση γονιδιακών τόπων που εμπλέκονται στο μηχανισμό ανάπτυξης της ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα του σημαντικότερου παρασίτου της ελιάς, του εντόμου *Bactrocera oleae*

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Μαθιόπουλος Κωνσταντίνος (Επιβλέπων Καθηγητής)

Επίκουρος Καθηγητής

Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Κουρέτας Δημήτριος

Καθηγητής

Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Μαμούρης Ζήσης

Καθηγητής

Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το έντομο *Bactrocera oleae*, ο κοινός δάκος της ελιάς, αποτελεί το πιο επιβλαβές έντομο της ελαιοκαλλιέργειας, δεδομένου ότι προκαλεί τεράστιες καταστροφές στην ελαιοπαραγωγή. Ο έλεγχος της προσβολής του δάκου περιλαμβάνει την εφαρμογή χημικών εντομοκτόνων και κυρίως οργανοφωσφορικών (ΟΡ). Η αλόγιστη, όμως, χρήση των εντομοκτόνων, πέρα από τις καταστροφικές επιπτώσεις στο περιβάλλον, έχει οδηγήσει στη δημιουργία και εξάπλωση της ανθεκτικότητας του δάκου σε αυτά. Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν αφενός η κατανόηση του μεγέθους της εξάπλωσης της ανθεκτικότητας στους φυσικούς πληθυσμούς του εντόμου και αφετέρου η κατανόηση της γενετικής της βάσης.

Βασικός γενετικός τόπος που εμπλέκεται στην ανθεκτικότητα των εντόμων στα ΟΡ εντομοκτόνα είναι το γονίδιο της ακετυλοχολινεστεράσης. Στο πρώτο σκέλος της διατριβής, μελετήθηκε η μοριακή οργάνωση του γονιδιακού της τόπου στο δάκο. Μέσω αλληπάλληλων διαλογών γονιδιωματικής βιβλιοθήκης του δάκου και αντιδράσεων PCR προσδιορίστηκε η οργάνωση των εξονίων και ιντρονίων της AChE, η οποία παρουσίασε παρόμοια δομή με το αντίστοιχο γονίδιο της *Drosophila melanogaster*. Το γονίδιο εκτείνεται σε περιοχή τουλάχιστον 75 kb και οργανώνεται σε δέκα εξόνια. Επιπλέον, η *in silico* ανάλυση του ενζύμου αποκάλυψε ότι διατηρεί όλα τα κύρια χαρακτηριστικά της AChE των εντόμων, καταδεικνύοντας την υψηλή συντήρησή του.

Η ανθεκτικότητα του δάκου στα ΟΡ είχε ήδη συσχετιστεί με την ύπαρξη δύο σημειακών μεταλλάξεων που εντοπίζονται στο ενεργό κέντρο της AChE και προκαλούν 16 φορές μεγαλύτερη ανθεκτικότητα από εκείνη του εργαστηριακού πληθυσμού. Η κατανόηση του μεγέθους της εξάπλωσης της ανθεκτικότητας βασίστηκε στην ανάλυση φυσικών πληθυσμών δάκου ως προς την ύπαρξη των δύο αυτών μεταλλάξεων. Οι δύο μεταλλάξεις βρέθηκαν (σχεδόν σε ομοζυγωτία) στο συντριπτικό ποσοστό των ατόμων που εξετάστηκαν, αλλά όχι ως συνάρτηση του επιπέδου της ανθεκτικότητάς τους. Σε μια προσπάθεια να εντοπιστούν νέες μεταλλάξεις που πιθανώς να συνεισέφεραν στα υψηλότερα επίπεδα ανθεκτικότητας,

πραγματοποιήθηκε PCR ενίσχυση των εξονίων της AChE και καθορίστηκε η DNA αλληλουχία τους σε άτομα υψηλής ανθεκτικότητας. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσίασε μια μικρή έλλειψη τριών γλουταμινών στο εξόνιο X του ενζύμου (BoaceΔ642-644 ή Δ3Q). Δημιουργήθηκαν τρία διαφορετικά μοριακά διαγνωστικά τεστ για την ανίχνευση της μετάλλαξης αυτής και η ανάλυση φυσικών πληθυσμών του δάκου από την Ελλάδα και την Κύπρο κατέδειξε τη συσχέτισή με υψηλές δόσεις OP εντομοκτόνων. Μάλιστα, η εξάπλωσή της στο Μεσογειακό χώρο σχετίζεται με τη χρήση OP εντομοκτόνων. Επιπλέον, βιοχημικές αναλύσεις σε ξεχωριστά άτομα έδειξαν ότι η αναστολή του Δ3Q ενζύμου από εντομοκτόνο είναι πολύ μικρότερη από ότι στο ένζυμο αγρίου τύπου.

Είναι η πρώτη περιγραφή μετάλλαξης εκτός ενεργού κέντρου της ακετυλοχολινεστεράσης που σχετίζεται με ανθεκτικότητα σε οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα. (με πιθανή συμμετοχή στην ανθεκτικότητα στα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα). Η πιθανότητα να εμπλέκεται η μετάλλαξη αυτή στο αγκυροβόλημα της πρωτεΐνης στη μεμβράνη του νευρικού κυττάρου μέσω GPI άγκυρας ελέγχθηκε με έκφραση της πρωτεΐνης αγρίου τύπου (wt), της μεταλλαγμένης (Δ3Q) και μίας υποθετικής πρωτεΐνης που περιέχει έλλειψη πέντε διαδοχικών γλουταμινών (Δ5Q) σε ευκαρυωτικό σύστημα κυττάρων. Ο προσδιορισμός των βιοχημικών παραμέτρων των αγρίου τύπου, Δ3Q και Δ5Q κατασκευών καθώς και η ανάλυσή τους ως προς την ικανότητα προσθήκης GPI άγκυρας κατέδειξε ότι η μετάλλαξη Δ3Q επηρεάζει τις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις του ενζύμου (GPI αγκυροβόληση, σταθερότητα /αποικοδόμηση πρωτεΐνης). Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν έναν εντελώς νέο μηχανισμό ανθεκτικότητας ως προς τα OP εντομοκτόνα, κατά τον οποίο η βελτιωμένη προσθήκη GPI άγκυρας στο μεταλλαγμένο ένζυμο έχει ως αποτέλεσμα τη συγκέντρωση περισσότερων ενεργών μορίων ενζύμου στη συναπτική σχισμή και ως εκ τούτου τη μειωμένη ευαισθησία στο εντομοκτόνο. Τέλος, αλληπάλληλες αποτυχημένες προσπάθειες δημιουργίας ομοζυγωτικών ως προς τη μετάλλαξη εργαστηριακών στελεχών, καθώς και η μειωμένη ικανότητα ολοκλήρωσης των αναπτυξιακών σταδίων απογόνων διασταυρώσεων ετεροζυγωτικών ατόμων συνάδει με την ιδέα μιας μετάλλαξης με υψηλό γενετικό κόστος (fitness cost).