



## Καινοτόμες λύσεις για τη βιώσιμη και περιβαλλοντικά φιλική φυτοπροστασία των οπωροκηπευτικών της Ελλάδας, στην Ευρώπη του μέλλοντος

### Παραδοτέο Π.1.7.1: Μοριακή και λειτουργική ανάλυση νέων μηχανισμών ανθεκτικότητας – μοριακοί δείκτες

#### Πληροφορίες για το έγγραφο

Αριθμός παραδοτέου: **Π.1.7.1**

Ενότητα εργασίας: **ΕΕ1**

Επικεφαλής δικαιούχος: **ΙΤΕ**

Συγγραφείς: **Ιωάννης Τ. Μαργαριτόπουλος**

Έκδοση: **1**

Είδος Παραδοτέου: **Έκθεση**

Ημερομηνία παράδοσης: **[31/12/2025]**

#### Στοιχεία Πράξης

Τίτλος: Καινοτόμες λύσεις για τη βιώσιμη και περιβαλλοντικά φιλική φυτοπροστασία των οπωροκηπευτικών της Ελλάδας, στην Ευρώπη του μέλλοντος

Τίτλος (EN): InnoPP-Innovations in Plant Protection for sustainable and environmentally friendly pest control

Κωδικός πράξης: ΤΑΕDR-0535675

Ακρωνύμιο έργου: InnoPP

Ημερομηνία έναρξης: 15 Μαΐου 2023

Διάρκεια: 30,5 Μήνες

Συντονιστής Φορέας: Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Συντονιστής/Επιστημονικός Υπεύθυνος: Ιωάννης Βόντας

## Πίνακας Περιεχομένων

<b>1</b>	<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΣΤΟΧΟΙ</b> .....	<b>4</b>
<b>2</b>	<b>ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΩΝ ΕΡΓΑΣΙΩΝ</b> .....	<b>4</b>
2.1	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ .....	4
2.2	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	5
<b>3</b>	<b>ΣΥΝΟΨΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</b> .....	<b>6</b>
<b>4</b>	<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι- Βιβλιογραφικές Αναφορές</b> .....	<b>7</b>

## Περίληψη του Έργου

Το έργο «Καινοτόμες λύσεις για τη βιώσιμη και περιβαλλοντικά φιλική φυτοπροστασία των οπωροκηπευτικών της Ελλάδας, στην Ευρώπη του μέλλοντος» στοχεύει στην ανάπτυξη σύγχρονων και καινοτόμων μεθόδων για την προστασία των καλλιεργειών όπως τα κηπευτικά, τα εσπεριδοειδή και το επιτραπέζιο σταφύλι. Περιλαμβάνει τη δημιουργία προηγμένων διαγνωστικών εργαλείων για την ανίχνευση εχθρών και παθογόνων με τεχνολογίες αιχμής, όπως ηλεκτρονικές παγίδες και βιοαισθητήρες, καθώς και πλατφόρμες αλληλούχισης για τον πλήρη προσδιορισμό των ιωμάτων. Επιπλέον, θα αναπτυχθούν μοντέλα πρόβλεψης επιδημιών και καινοτόμα βιοφυτοπροστατευτικά προϊόντα, τα οποία θα αξιολογηθούν για την ασφάλειά τους σε μη στόχους οργανισμούς. Τέλος, οι νέες τεχνολογίες θα ενσωματωθούν σε συστήματα ολοκληρωμένης διαχείρισης φυτοπροστασίας και θα δοκιμαστούν σε πραγματικές συνθήκες, ενώ θα αξιολογηθούν οι κοινωνικοοικονομικές και περιβαλλοντικές επιπτώσεις τους.

## Σύνοψη της ΕΕ1

Στην ΕΕ1 θα αναπτυχθούν διαγνωστικά εργαλεία και μέθοδοι για την ανίχνευση, ταυτοποίηση και παρακολούθηση των εχθρών και παθογόνων και των χαρακτηριστικών τους (έντομα, ακάρεα, νηματώδεις, φυτοπαθογόνοι οργανισμοί και ζιζάνια), με βάση σύγχρονες ηλεκτρονικές παγίδες, συστήματα επεξεργασίας εικόνων (δορυφορικών και drones) και μοριακές τεχνικές συνδυασμένες με φορητά συστήματα ανίχνευσης. Τα διαγνωστικά θα αφορούν υφιστάμενους και νέους μοριακούς δείκτες που θα προκύψουν από τις δραστηριότητες της ΕΕ1, ενώ θα συμπεριληφθούν και βιοαισθητήρες για ανίχνευση υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων και μυκοτοξινών. Οι μοριακές διαγνωστικές πλατφόρμες που θα χρησιμοποιηθούν θα επιλεγούν από αυτές που έχουν ήδη αναπτυχθεί διεθνώς, οι οποίες έχουν δυναμικό για πρακτικές εφαρμογές. Για τον προσδιορισμό των εχθρών και των φυτοπαθογόνων θα χρησιμοποιηθεί η ισοθερμική τεχνολογία LAMP, με διάφορες εναλλακτικές πλατφόρμες ανίχνευσης: "eye detection" – ποιοτική ανίχνευση, ή μέσω φορητών και εύχρηστων μικροσυσκευών για ημιποσοτικό προσδιορισμό στο πεδίο. Για ποσοτικούς και υπερευαίσθητους προσδιορισμούς (για παράδειγμα παρουσία μεταλλαγής ανθεκτικότητας σε πολύ μικρό ποσοστό) θα χρησιμοποιηθούν πρωτότυπα προϊόντα όπως τα "Ready to Go Lyorhlysed pellets", με ενσωματωμένα όλα τα "probes" και τα ένζυμα που απαιτούνται για την ανάλυση των βιοδεικτών σε "ετοιμόχρηστο" pellet, στο οποίο προστίθεται το βιολογικό υλικό (πχ crude insect homogenate). Για τις ιολογικές – φυτοπαθολογικές, επιδημιολογικές αναλύσεις θα χρησιμοποιηθούν πλατφόρμες Minion - HTD αλληλούχισης νέας γενιάς, για τον πλήρη προσδιορισμό των ιωμάτων.

## Συνοπτική παρουσίαση του παραδοτέου Π1.7.1

Δημοσιεύσεις και νέοι βιοδείκτες για ανθεκτικότητα με έμφαση σε νέας γενιάς εντομοκτόνα (όπως ανθεκτικότητα αφίδων στο flupiradifurone, λεπιδοπτέρων οπωροκηπευτικών και αμπέλου σε διαμίδια και μη νευροτοξικές ουσίες κ.α.). Περιλαμβάνεται μοριακός χαρακτηρισμός για τον προσδιορισμό των κατάλληλων μοριακών δεικτών για την ανάπτυξη διαγνωστικών.

## 1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΣΤΟΧΟΙ

Η αφίδα *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae) είναι από τους σημαντικότερους εχθρούς της ροδακινιάς (πρωτεύων ξενιστής) και διαφόρων ποωδών καλλιεργειών (δευτερεύοντες ξενιστές, π.χ. πατάτα, πιπεριά και καπνός) στην Ελλάδα. Εκτός από της άμεσες ζημιές λόγω διατροφής, προκαλεί και έμμεσες με τη μετάδοση φυτο-ιών. Θεωρείται το ικανότερο έντομο φορέας, μεταδίδοντας περισσότερους από 100 φυτο-ιούς (Blackman & Eastop, 2000) (Blackman & Eastop, 2017). Ο έλεγχος της αφίδας παγκοσμίως και στην Ελλάδα βασίζεται κυρίως στα συνθετικά εντομοκτόνα διαφόρων χημικών ομάδων. Ωστόσο, η συνεχή χρήση των εντομοκτόνων έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας. Έχουν περιγραφεί επτά ανεξάρτητοι μηχανισμοί ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα στην αφίδα, οι οποίοι σχετίζονται με, μεταβολική ανθεκτικότητα (metabolic resistance), μη ευαισθησία των πρωτεϊνών στόχων και μειωμένη διείσδυση των εντομοκτόνων μέσω του εξωσκελετού (Bass *et al.*, 2014) (Bass & Nauen, 2023). Συνολικά, 522 περιπτώσεις ανθεκτικότητας σε εντομοκτόνα έχουν αναφερθεί για την αφίδα στη Βάση Δεδομένων Arthropod Pesticide Resistance Database (APRD), συμπεριλαμβανομένων 87 δραστικών ουσιών ([www.pesticidresistance.org](http://www.pesticidresistance.org)). Στην Ελλάδα έχουν καταγραφεί σοβαρές περιπτώσεις ανθεκτικότητας σε διάφορες χημικές ομάδες εντομοκτόνων, όπως οργανοφωσωρικά, καρβαμιδικά, διμέθυλο καρβαμιδικά, πυρεθρινοειδή, νενονικοτινοειδή και βουτενολίδες (Voudouris *et al.*, 2016) (Voudouris *et al.*, 2017) (Margaritoropoulos *et al.*, 2021) (Papadimitriou *et al.*, 2022).

Ο χαρακτηρισμός των μηχανισμών ανθεκτικότητας σε μοριακό επίπεδο, προσδίδει τη δυνατότητα ανάπτυξης μοριακών διαγνωστικών για το μαζικό έλεγχο δειγμάτων και την υποβοήθηση της παρακολούθησης της ανθεκτικότητας στους πληθυσμούς του εχθρού. Στο πλαίσιο του έργου (Παραδοτέο Π2.2.2) ανακαλύφθηκαν με διαγνωστικές βιοδοκιμές κλώνοι της αφίδας ανθεκτικοί στα εντομοκτόνα flupyradifurone και flonicamid. Συνεπώς, στόχος του Παραδοτέου, είναι να διερευνηθεί ο μηχανισμός ανθεκτικότητας της αφίδας σε αυτά τα εντομοκτόνα.

## 2 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΩΝ ΕΡΓΑΣΙΩΝ

### 2.1 Υλικά και Μέθοδοι

Κλώνοι (παρθενογενετικές σειρές) της πράσινης αφίδας της ροδακινιάς, *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae) δημιουργήθηκαν από δείγματα της αφίδας που συλλέχθηκαν από οπορώνες ροδακινιάς (κλώνοι MP08, 09, 11, 13, 14 συλλογή το 2023 και κλώνος MP45 συλλογή το 2024).

Ένα σημείο προβληματισμού στις μελέτες πληθυσμών αφίδων είναι ότι ο ίδιος γενότυπος πολλαπλασιάζεται παρθενογενετικά στον αγρό κατά τη διάρκεια της καλλιεργητικής περιόδου. Αυτό μπορεί να οδηγήσει στην επανειλημμένη δειγματοληψία μερικών κυρίαρχων παρθενογενετικών γονοτύπων. Ο ανεπαρκής σχεδιασμός δειγματοληψίας ή η έλλειψη πληροφοριών σχετικά με τους διακριτούς γονότυπους αφίδων που λαμβάνονται ως δείγματα προκαλούν μεροληψία στα αποτελέσματα. Για αυτόν τον λόγο, εστιάσαμε σε δείγματα αφίδων από ροδακινιά, το πρωτεύοντα ξενιστή του είδους, όπου οι κλώνοι αφίδων από διαφορετικά δέντρα προέρχονται από διαφορετικά διαχειμάζοντα ώα που παράγονται σεξουαλικά, και ως εκ τούτου αντιπροσωπεύουν διαφορετικούς γονότυπους.

Για τη διερεύνηση μεταβολικών μηχανισμών ανθεκτικότητας κλώνοι της αφίδας *M. persicae*, που παρουσίασαν ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα flupyradifurone και flonicamid, εξετάστηκαν λεπτομερώς με βιοδοκιμές απόκρισης με εντομοκτόνο

(flupiradifurone ή flonicamid) και συνδυασμό εντομοκτόνου και συνεργιστή PBO (συγκέντρωση 1000 ppm), ο οποίος παρεμποδίζει την οικογένεια ενζύμων P450.

Οι κλώνοι εκτράφηκαν στο εργαστήριο σε ειδικά κυτία εκτροφής τύπου Blackman (Blackman, 1971), που μειώνουν την πιθανότητα μόλυνσης των κλώνων από άλλες αφίδες, σε φωτοπερίοδο μεγάλης ημέρας (L14:10) και 25°C. Οι βιοδοκιμές έγιναν στις ανωτέρω συνθήκες με τη μέθοδο της εμφύσησης φύλλου. Αναλυτική περιγραφή της μεθόδου παρατίθεται από τους (Voudouris *et al.*, 2017). Σε κάθε δόση (συγκέντρωση) εντομοκτόνου, συμπεριλαμβανομένου του μάρτυρα νερό, εξετάστηκαν τουλάχιστον 20 νεαρά ενήλικα θηλυκά από κάθε κλώνο. Η θνησιμότητα καταγράφηκε στις 3 ημέρες για το flupiradifurone και στις 7 ημέρες για το flonicamid. Στον μάρτυρα, σε όλες τις περιπτώσεις, η θνησιμότητα ήταν μηδενική. Η ίδια μέθοδος ακολουθήθηκε και με τον συνεργιστή PBO. Σε αυτή την περίπτωση υπήρχε έκθεση των αφίδων για 4 ώρες σε φύλλο εμβαπτισμένο σε διάλυμα με PBO και έπειτα έγινε η εφαρμογή των δόσεων του εντομοκτόνου συμπεριλαμβανομένου του μάρτυρα (νερό).

Τα αποτελέσματα επεξεργάστηκαν με ανάλυση probit χρησιμοποιώντας τη γλώσσα R (version 4.3.3) και το πακέτο ecotox (Hlina *et al.*, 2021) (R Core Team, 2024). Υπολογίστηκαν οι τιμές LC<sub>50</sub> (σε ppm), οι συντελεστές ανθεκτικότητας (ΣΑ, LC<sub>50</sub> κλώνου αγρού / LC<sub>50</sub> ευαίσθητου εργαστηριακού κλώνου) και οι συντελεστές συνεργισμού (SR, LC<sub>50</sub> κλώνου από βιοδοκιμή με εντομοκτόνο / LC<sub>50</sub> κλώνου από βιοδοκιμή με συνδυασμό εντομοκτόνου και συνεργιστή PBO). Οι τιμές LC<sub>50</sub> του ευαίσθητου εργαστηριακού κλώνου προέρχονται από προηγούμενα δημοσιευμένα πειράματα (Margaritoroulos *et al.*, 2021) (Paradimitriou *et al.*, 2022). Σε όλες τις βιοδοκιμές τα δεδομένα ήταν σύμφωνα με το μοντέλο probit ( $P > 0,05$ ).

Επίσης, 2 από τους ανθεκτικούς κλώνους στο flonicamid και ένας κλώνος που δεν παρουσίασε ανθεκτικότητα αναλύθηκαν με RNAseq.

## 2.2 Αποτελέσματα και Συζήτηση

Τα αποτελέσματα παρατίθενται στον **Πίνακα 1.7.7-1**. Πολύ υψηλές τιμές ΣΑ (809–1913) παρατηρήθηκαν στους 5 κλώνους που εξετάστηκαν με flupyradifurone. Οι κλώνοι που εξετάστηκαν με flonicamid έδειξαν επίσης, υψηλές τιμές ΣΑ (270–278).

Οι βιοδοκιμές με τον συνεργιστή PBO έδειξαν σημαντικές τιμές SR τόσο στο flonicamid (9,4–10,4) όσο και στο flupyradifurone (3,4–15,5), υποδηλώνοντας την εμπλοκή των P450 στην ανθεκτικότητα.

**Πίνακας 1.7.7-1.** Αποτελέσματα βιοδοκιμών με τα εντομοκτόνα flupiradifurone και flonicamid και σε συνδυασμό με συνεργιστή με κλώνους της αφίδας *Myzus persicae*.

Κλώνος	Τοποθεσία	N	n	LD <sub>50</sub>	95% FL	ΣΑ	SR	Slope	SE
<b>flupyradifurone</b>									
MP11	Γαλατάδες	160	8	435.5	320.5	598.5	1522.6	1.9	0.3
MP11_PBO		180	9	127.6	100.9	165.6	3.4	2.1	0.2
MP14	Σκύδρα	160	8	431.8	314.0	596.1	1509.9	1.9	0.3
MP14_PBO		160	8	125.0	92.5	168.6	3.5	2.1	0.3
<b>flonicamid</b>									
MP11	Γαλατάδες	180	9	294.3	215.1	407.5	269.8	1.9	0.2
MP11_PBO		200	10	31.4	23.7	41.8	9.4	1.7	0.2
MP8	Γαλατάδες	180	9	291.6	212.5	405.1	267.3	1.8	0.2
MP8_PBO		180	9	30.3	21.8	41.5	9.6	1.9	0.2

MP9	Γαλατάδες	180	9	303.3	223.7	415.7	278.0		2.0	0.3
MP9_PBO		180	9	30.3	21.8	41.5		10.0	1.9	0.2
MP13	Σκύδρα	180	9	294.3	215.1	407.5	269.8		1.9	0.2
MP13_PBO		180	9	28.3	20.7	38.2		10.4	2.0	0.3

N = αριθμός εξετασθέντων αφίδων, n = αριθμός δόσεων συμπεριλαμβανομένου του μάρτυρα (νερό).

LC<sub>50</sub> = μέση θανατηφόρος συγκέντρωση σε ppm, FL = όρια εμπιστοσύνης 95%.

ΣΑ = Συντελεστής Ανθεκτικότητας, LC<sub>50</sub> κλώνου αγρού / LC<sub>50</sub> ευαίσθητου εργαστηριακού κλώνου). Οι τιμές LC<sub>50</sub> του ευαίσθητου εργαστηριακού κλώνου προέρχονται από προηγούμενα δημοσιευμένα πειράματα (Margaritoroulos et al., 2021, Papadimitriou et al., 2022).

SA = Συντελεστής Συνεργισμού, LC<sub>50</sub> κλώνου από βιοδοκιμή με εντομοκτόνο / LC<sub>50</sub> κλώνου από βιοδοκιμή με συνδυασμό εντομοκτόνου και συνεργιστή PBO.

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης των RNAseq έδειξαν τα παρακάτω γονίδια υπερεκφρασμένα στους δύο ανθεκτικούς κλώνους στο flonicamid σε σχέση με αυτόν που δεν παρουσίασε ανθεκτικότητα, 4 P450s: *CYP6CY8*, *CYP6CY9*, *CYP302A1* και *CYP306A1*

### 3 ΣΥΝΟΨΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα αποτελέσματα των βιοδοκιμών με παρεμποδιστή έδειξαν την εμπλοκή των P450 στην ανθεκτικότητα του flurygradifurone και flonicamid. Μηχανισμός ανθεκτικότητας στο flonicamid **αναφέρεται για πρώτη φορά**.

Η ανάλυση των **RNAseq** ανέδειξε υποψήφια γονίδια που εμπλέκονται στην ανθεκτικότητα στο flonicamid, **4 γονίδια P450s** (*CYP6CY8*, *CYP6CY9*, *CYP302A1* και *CYP306A1*) και **UDP-glucosyltransferase**.

Να επισημανθεί ότι από όσο γνωρίζουμε, υψηλές τιμές ΣΑ για το flonicamid αναφέρονται **πρώτη φορά παγκοσμίως**. Αντιθέτως, υψηλοί ΣΑ για το flurygradifurone έχουν αναφερθεί σε προγενέστερη μελέτη σε ελληνικούς πληθυσμούς (Papadimitriou et al., 2022).

## 4 ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

### Βιβλιογραφικές Αναφορές

- Bass, C. & Nauen, R. (2023) The molecular mechanisms of insecticide resistance in aphid crop pests. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **156**, 103937.
- Bass, C., Puinean, A.M., Zimmer, C.T., Denholm, I., Field, L.M., Foster, S.P., *et al.* (2014) The evolution of insecticide resistance in the peach potato aphid, *Myzus persicae*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **51**, 41–51.
- Blackman, R.L. (1971) Variation in the photoperiodic response within natural populations of *Myzus persicae* (Sulz.). *Bulletin of Entomological Research*, **60**, 533–546.
- Blackman, R.L. & Eastop, V.F. (2000) *Aphids on the World's Crops: An Identification and Information Guide*. 2nd edn. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, UK.
- Blackman, R.L. & Eastop, V.F. (2017) Taxonomic Issues. In *Aphids as Crop Pests* (ed. by Emden, H.F. van & Harrington, R.). CAB International, Wallingford, Oxfordshire, UK, pp. 1–36.
- Margaritopoulos, J.T., Kati, A.N., Voudouris, C.C., Skouras, P.J. & Tsitsipis, J.A. (2021) Long-term studies on the evolution of resistance of *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) to insecticides in Greece. *Bulletin of Entomological Research*, **111**, 1–16.
- Papadimitriou, F., Folia, M., Ilias, A., Papapetrou, P., Roiditakis, E., Bass, C., *et al.* (2022) Flupyradifurone resistance in *Myzus persicae* populations from peach and tobacco in Greece. *Pest Management Science*, **78**, 304–312.
- R Core Team. (2024) *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Voudouris, C.C., Kati, A.N., Sadikoglou, E., Williamson, M., Skouras, P.J., Dimotsiou, O., *et al.* (2016) Insecticide resistance status of *Myzus persicae* in Greece: long-term surveys and new diagnostics for resistance mechanisms. *Pest Management Science*, **72**, 671–683.
- Voudouris, C.C., Williamson, M.S., Skouras, P.J., Kati, A.N., Sahinoglou, A.J. & Margaritopoulos, J.T. (2017) Evolution of imidacloprid resistance in *Myzus persicae* in Greece and susceptibility data for spirotetramat. *Pest Management Science*, **73**, 1804–1812.