

Slutrapport SLF (Diarienum:125; projnr: 010133020)

Molekylära studier av rapsbaggar och deras insekticidresistens

Problemställning:

Rapsbaggar har lokalt i Sverige utvecklat resistens mot pyretroider. Fenomenet observerades initialt i Östergötland vid millennieskiftet. Vi har utnyttjat denna observation för att studera hur pass utbredd resistensen är, hur fort den sprids i Sverige och dess molekylära bakgrund för att bidra med information hur skyddet av oljeväxter kan förbättras på sikt.

Bakgrund

Insekticidresistens är en förändring i en insektspopulation som ökar möjligheterna för vissa individer att överleva insekticidbehandling (Roush & Tabashnik 1990). Det är en (sub) population som blir resistent och inte alla individer av en art vilket innebär att en population i ett område kan uppvisa resistens medan en population i ett annat område eller en subpopulation i samma område fortfarande kan vara mottaglig för bekämpning. Graden och frekvensen av resistens beror på selektionstryck, graden av naturlig variation och genflöde (mobilitet av insekter)(Lenormand 2002). Alla insekter dör i regel inte av en kemisk bekämpning och de som överlever och fortplantar sig bär på anlag för att överleva insekticider. Resistens brukar indelas i metabolisk resistens (insekten oskadliggör insekticiden) eller målmolekylresistens (insekten är okänslig för insekticiden). Insekter har enzymer som bryter ner och oskadliggör kemikalier som förekommer i deras mat tex växtsubstanser som skall förhindra insektsangrepp. Avgiftningsenzymer har ofta låg specificitet och steget till detoxifiering av insekticider är inte långt speciellt om de liknar en naturlig kemisk förening. I många fall beror resistensen på en enda gen (Scott 1999). Vanliga enzymer som är inblandade i metabolisk resistens är cytokrom P-450, glutation transferaser och esteraser (French-Constant et al. 2004). Målmolekylen för pyretroider är ett natriumkanal-protein i cellmembran som slås ut och stör nervsystemet i insekten (Raymond-Delpech et al. 2005). Mutationer i denna jonkanal förhindrar inbindning av pyretroid utan att ha någon större effekt på Na⁺ transport. Man har dokumenterat resistens i alla insektsgrupper och i mer än 500 arter varav de flesta är växtskadegörare som regelbundet bekämpas med kemiska medel t.ex. rapsbagge.

Man kan kanske tro att om man sprutar i medeltal bara en gång per säsong och vårt nordiska klimat kan fördröja resistensutveckling. Men rapsbaggar har bekämpats med pyretroider i över 15 år så det är inte konstigt att resistens uppträder. Samma fenomen har observerats i Frankrike sedan 1997. En välkänd insekticidresistent insekt är Coloradoskalbaggen (Follett et al. 1995) som huvudsakligen finns i Nordamerika och Europa. Den bekämpas varje säsong och det tog bara sju år innan resistens till pyretroider förelåg i USA. Tyvärr ökar risken för resistens till andra insekticider om en insekt har blivit resistent mot en insekticid. Eftersom pyretroider är kemiskt lika så betyder resistens mot en ofta resistens mot alla formuleringar.

Resistens hos rapsbaggar upptäcktes i Östergötland under 2000 när upprepad bekämpning inte fick avsedd effekt. I vissa fält hade upp till sex bekämpningar inte godtagbar effekt.

Rapsbaggar samlades in från olika områden och flera preparat testades men efter 24 timmar var bekämpningseffekten inte mer än cirka 50%. Burförsök med rapsbaggar från Östergötland och Uppsala visade också på högre överlevnad. Fältförsök i Linköping med Gusathion, en icke-pyretroid, användes som kontroll och gav över 90% effekt. Fältförsök upprepade på tre platser vid två tidpunkter visade skillnader mellan platser vad gäller effektivitetsnivå, men den inbördes rangordning av preparat var ungefär samma vid alla platser.

För att säkra oljeväxtproduktionen krävs forskning på flera plan och vi vill bidra med att undersöka skadeinsekter för att förstå dess biologi, genetiska variation och identifiera den molekylära bakgrunden till resistens samt studera hur växtens försvar kan förbättras. Genom studier av olika insektspopulationer kan vi också få ett mått på om resistensen har ett ursprung och sedan sprids eller om den uppkommit på flera platser oberoende av varandra. Detta är en viktig kunskap för hur framtida växtskyddsåtgärder kan utformas. Med stöd från SLF fick vi möjlighet att anställa en forskarstuderande, Nadiya Kazachkova, och bearbeta tre delprojekt:

1. Biologiska tester i laboratoriet (bioassay) mot olika generationer av rapsbaggar insamlade 2002-2004 från geografiskt spridda lokaler utfördes med pyretroid för att studera resistensens utbredningsmönster.
2. Etablera AFLP för att studera den grundläggande genetiska variationen (genotypning) hos olika populationer av rapsbaggar och finna ev. molekylära markörer för resistens.
3. Använda biokemisk och molekylärbiologisk teknik för att försöka fastställa resistensens bakgrund hos rapsbaggar.

Material och Metoder

Insektsinsamling och biotester

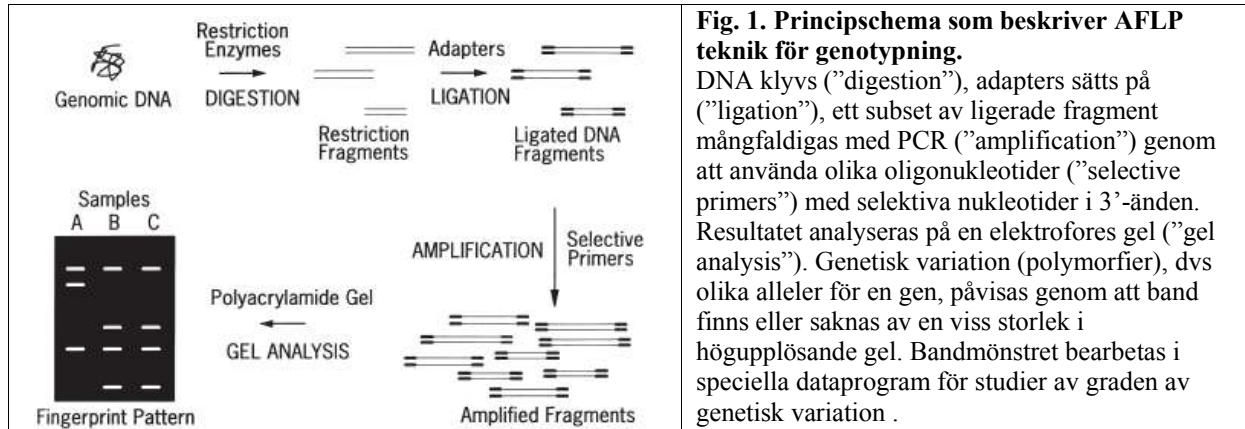
För att få grepp om omfånget av resistensen har rapsbaggepopulationer insamlats från Uppland, Östergötland, Västergötland, Småland och Skåne varje säsong mellan 2000-2004 för att konstatera graden av resistens på en geografisk skala. Materialet har hävats på raps- och ryps-fält på flera definierade platser och sedan transporterats till Uppsala för vidare försök. Minst 200 insekter samlades från varje ställe som rekommenderats av lokal expertis, framförallt växtskyddscentraler. Rapsbaggar identifierades map flera morfologiska kriterier.

Bearbetning av proverna (biologiska tester) gjordes med hjälp av en metod som rekommenderas av FAO (FAO 1979) och används för Coloradoskalbaggen i Kanada (www.gov.on.ca/OMAFRA/english/crops/facts/92-028.htm). Metoden kallas för "Dip Test". Man exponerar insekterna för olika bekämpningsmedel och doser genom att doppa dem i medlet 8-10 sekunder. Sedan torkas insekterna och placeras i en burk med lufthål i locket. Avläsning av döda (orörliga) och levande insekter sker efter 24 timmar. Kontrollen består av insekter som doppas i vatten, samt ett alternativt preparat (t.ex. Gusathion) för att registrera minimal och maximal dödlighet. 80 insekter doppades i lambda-cyhalothrin vid en rekommenderad fältdos (1,5 g/liter). Tidigare (hösten 2001) hade doser mellan 0,75-4,5 g/liter testats. De insekter som överlevde klassificerades som resistent (R) och de som dog som känsliga (S). Insekterna frystes vid -80°C för vidare analys.

Genotypning av rapsbaggar

DNA isolerades från rapsbaggar mha en metod som bygger på användning av cetylammoniumbromid (Kazachkova et al. 2004). Kvaliteten av preparationen testades på agaroselektrofores. För att studera genetisk variation av rapsbaggar valdes AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) analys (Vos et al. 1995). Isolerat totalt DNA från insekten klyvs med olika restriktionsenzymer. Komplementära dubbelsträngade syntetiska adapters (oligonukleotider) ligeras till ändarna på DNA fragmenten (Figur 1). Ett subset av restriktionsfragmenten PCR amplifieras med två primers som är komplementära till adapters och har ytterligare 1-3 baser i 3'-änden som är komplementära mot vissa restriktionsfragment. Selektionen görs för att det annars blir för många band vid amplifieringen så det går inte att säkert urskilja olika alleler (bara homozygoter analyseras normalt med AFLP). Genom att analysera flera primerkombinationer kan dock antalet gener/alleler ökas så att ett mycket stort antal alleler kan analyseras från samma prov. Den ena primern är fluorescens-inmärkt och fragmenten analyseras sedan på en denaturerande polyakrylamidgel och mönstren jämförs i en

dator efter editering. För rapsbagge användes *PstI* och *EcoRI* som restriktionsenzymer och motsvarande adapters designades med 1-3 basers 3'-överhäng. DynaZymeII (Finnzymes) användes som Taq polymeras vilket är ett bättre enzym som minskar risken för att mutationer uppstår under PCR ampliifierng. Fragmenten analyserades med en ABI Prism 377XL sekvenator och profilerna lästes in med GeneScan och importerades i GenoTyper. Endast toppar med intensitet större än 100 analyserades för att minska bakgrundsbrus.



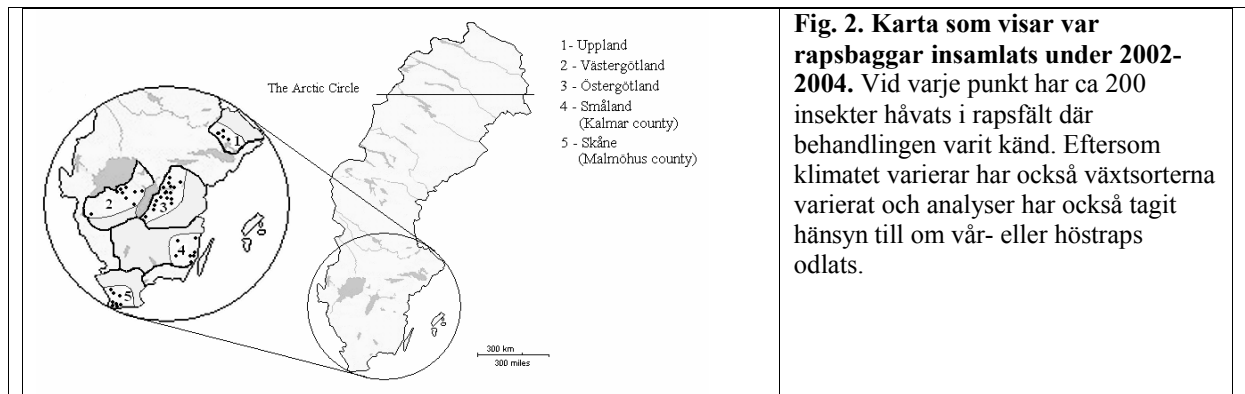
Molekylär bakgrund till insekticidresistens hos rapsbaggar

Mutationer i Natriumkanalproteinet analyserades mha kloning och DNA sekvensning. En trolig DNA sekvens kompilerades genom att alla kända natriumkanalreceptorgener för insekter analyserades från NCBI's databas. Sekvensalignments (sekvenserna överlagras) identifierade konsensussekvenser dvs konserverade sekvenser som i princip är lika mellan olika insekter. Dessa användes för att klona fragment (domäner) av rapsbaggegenen. RNA isolerades från rapsbaggar mha Triazol (Invitrogen) och användes för cDNA (RT-PCR) syntes mha syntetiska oligonukleotider designade mot konserverade sekvenser. PCR fragment subklonas i TOPO vektor (Invitrogen), transformerar i *E. coli* och enstaka kolonier upparbetas för DNA sekvensanalys via "BigDyeTerminator" kemi enligt "cycled sequencing technique". Sekvenser translateras och ev. aminosyrautbyten studeras. Minst tre oberoende kolonier analyseras från varje prov för att minimera problem med ev PCR artefakter. På liknande sätt har även en cytokrom P450 (CYP) gen börjat analyseras.

Resultat

Insektsinsamling och biotester

Rapsbaggar insamlades 2002-2004 vilket gjorde att vi hade möjlighet att studera tre generationer av rapsbaggar (Figur 2). Rapsbaggen har bara en generation per år. Rapsbaggar fortplantar sig på sommaren och efter proviantering så övervintrar de i jorden. Hibernering bryts när temperaturen stiger och vid ca 11°C blir de aktiva och börjar äta pollen från olika växter och senare på säsongen blir de mer specialiserade på pollen från raps och ryps och lägger ägg i dessa växters blomknoppar. Samlas prov på våren så är det samma generation som övervintrat och motsvarar prov som samlats föregående höst. Genom att samla material från samma plats flera år i rad både höst och vår hade vi möjlighet att kontrollera graden av resistens hos de rapsbaggar som har klarat övervintringen. Det finns teorier om att det finns en kostnad förknippat med resistens hos insekter och det är möjligt att resistenta rapsbaggar är



mindre tåliga och därmed klarar övervintring sämre. Om andelen resistenta rapsbaggar minskar från år till år så finns det stöd för ”kostnads” tanken. Om det blir tvärtom (större andel resistenta) kan man möjligen tolka det som att resistensen kan medför andra fördelar (t. ex. bättre skydd mot kyla). Bioassays visade att resistensfrekvensen totalt varierade hos avkomman mellan olika generationer (Kazachkova et al. 2006) vilket kan tolkas som att det inte verkar finnas någon avgörande fördel med resistens utan att den har en kostnad alternativt att insekter faktiskt dör och invandring sker av mottagliga individer som då späder ut resistensen. När det gäller effekt av övervintring så finns inte heller någon statistiskt signifikant skillnad mellan höst och vår och inte heller totalt någon tydlig trend. Vi har populationer där frekvensen av resistens både minskar och ökar i samma region. Resistens har alltså ingen tydlig fördel att insekterna blir mer köldtåliga och tål övervintring bättre. Resultaten redovisas i Tabell 1 i publikation nr 2. I Småland påvisades ingen resistens, Skåne visade låg eller ingen resistens som ökat kraftigt under 2004 i vissa lokaler, medan ett prov i Uppland hade hög frekvens resistens liksom flera prov från Västergötland och Östergötland. Regionalt finns det skillnader där förmodligen en kombination av övervintring, växtskyddsåtgärder och utsäde påverkar effekten. Tex om både vår och höst gröda finns så kan besprutningstrycket vara högre och det kan bidra till att Östergötland har högre frekvens resistenta insekter än Skåne med hög andel höstutsäde. Småland har låg andel oljeväxter och mest höstsorter.

Genetisk variation hos rapsbagge

Vi fick till att börja med utveckla utveckla metodiken för analys av rapsbaggar. Först testades metoder för att få DNA i högt utbyte, hög renhet och intakt form. Bäst resultat erhöles när insekterna krossas med en stålkula efter nedkyllning i flytande kväve under högfrekvent skakning (Mixer Mill type MM200, Retsch) (Kazachkova et al. 2004). Fem olika metoder för att isolera DNA från rapsbaggar utvärderades och CTAB metoden visade sig bäst (Kazachkova et al. 2004) tillsammans med några andra steg. AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) metodiken testades med olika restriktionsenzymer för att få fram en storleksdistribution på fragmenten som ger resultat som är lätta att tolka och diskriminerar mellan olika prover. Eftersom genomet är fullständigt okänt hos rapsbagge testades flera olika enzymkombinationer. Två enzymer med 6 bp specificitet (kombinationen *EcoRI* (G|AATTC) och *PstI* (CTGCA|G)) gav bäst resultat. Vi testade sedan olika primerkombinationer för att få ett stort antal band som ändå kan särskiljas för att få så många gener/alleler som möjligt i analyserna. Vi kom fram till fyra kombinationer som gav upphov till ca 2000 fragment totalt (Kazachkova et al. 2006). Genom att optimera AFLP metodiken och få högt informationsvärde blir det enklare att påvisa skillnader (polymorfier) mellan rapsbaggar. Flera olika kontrollförsök gjordes där DNA isolerades från samma biologiska material, identiska klyvningar och amplifieringar gjordes i replikat från samma DNA mm. Detta visade att AFLP protokollet är en mycket robust, reproducerbar och känslig genotypningsteknik.

Genotypning gjordes sedan på ett stort antal prov som insamlats under flera år. Den genetiska variationer var överraskande stor mellan olika individer och populationer och även mellan individer från samma population (Figur 3). Variation inom regioner svarade för 97 % av all variation men bara 3 % mellan landskapen. Ingen tydlig gruppering efter resistens (R) eller

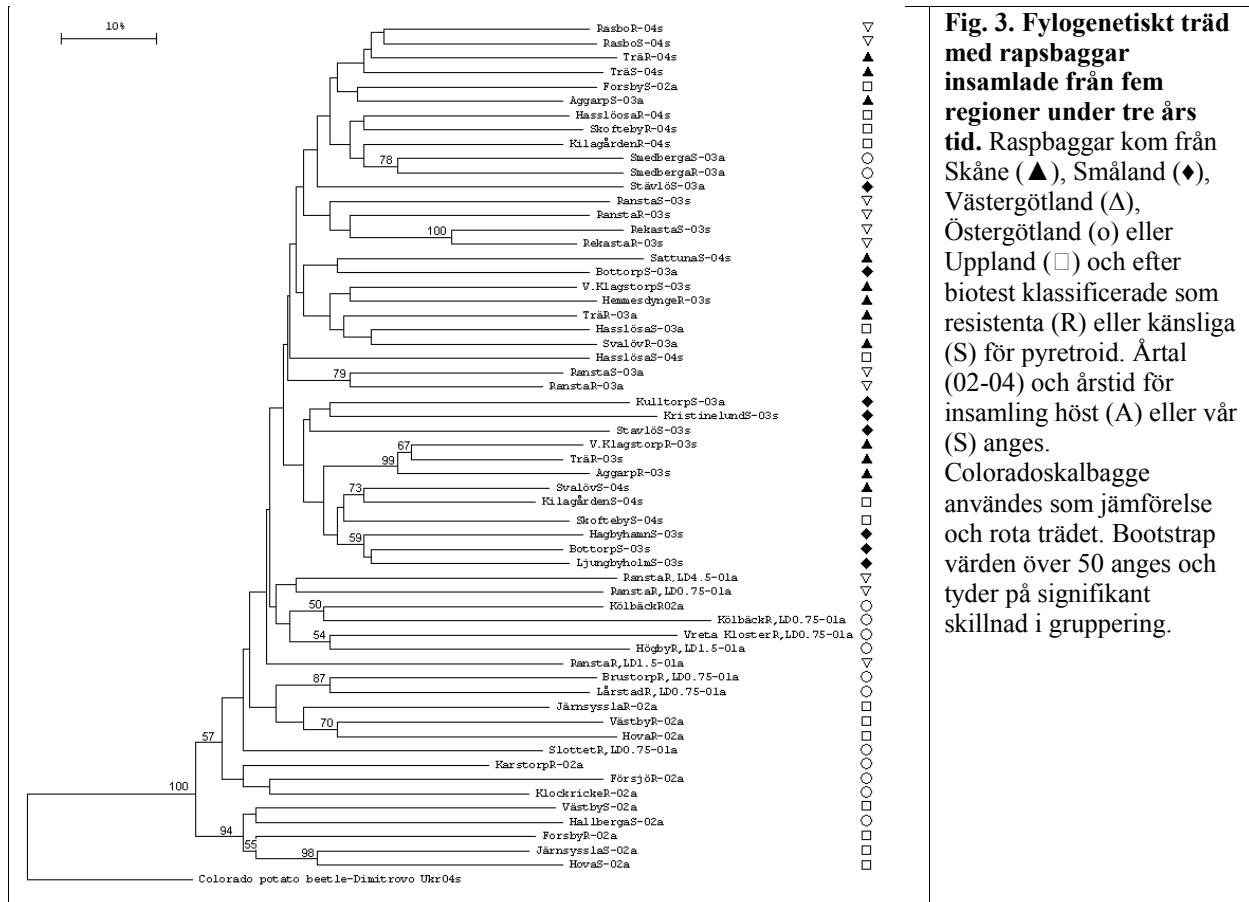
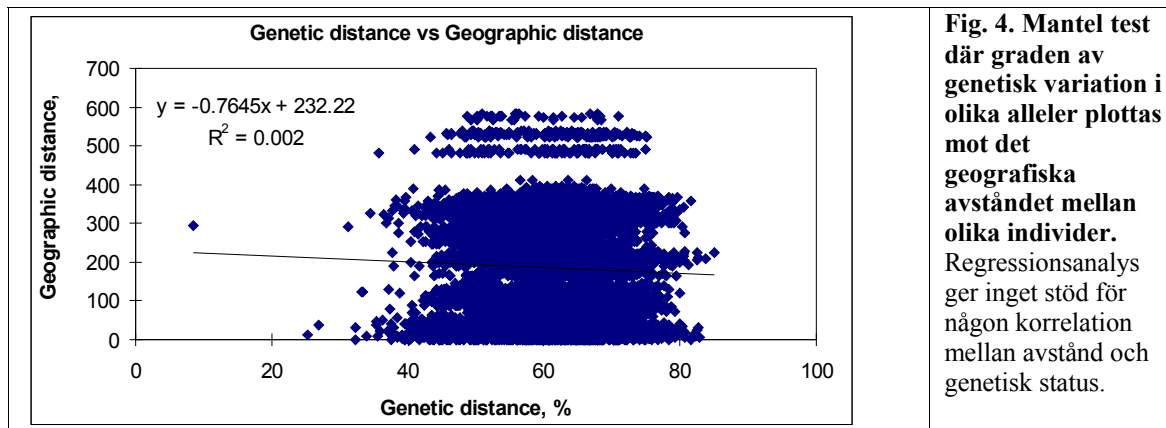


Fig. 3. Fylogenetiskt träd med rapsbaggar insamlade från fem regioner under tre års tid. Rapsbaggar kom från Skåne (▲), Småland (◆), Västergötland (Δ), Östergötland (o) eller Uppland (□) och efter biotest klassificerade som resistent (R) eller känsliga (S) för pyretroid. Årtal (02-04) och årstid för insamling höst (A) eller vår (S) anges. Coloradoskalbagge användes som jämförelse och rota träd. Bootstrap värden över 50 anges och tyder på signifikant skillnad i gruppering.

känslighet (S) kunde påvisas inom eller mellan regioner eller inom R eller S gruppen medan en signifikant skillnad fanns mellan generationer. Detta resultat stödjer att den huvudsakliga långväga flytten av rapsbaggar sker under sommaren och inte mellan höst och vår. Klimatfaktorer kan därför spela roll där tex en kylig och regnig sommar gynnar vissa individer som sedan missgynnas om påföljande sommar blir mer torr och varm. Graden av genflöde var mycket stor mellan populationer och regioner och högst utbyte fanns mellan Västergötland och Östergötland och lägst mellan Skåne och Östergötland med sju gångers skillnad. De olika beräkningarna baseras på enstaka individer men resultat från analyser baserade på att flera individer poolades (vilket ökar antalet gener/alleler och delvis späder ut extremvariation av slumpmässigt analyserade individer) visade också på en snarlik distribution vid fylogenetisk analys. Resultaten baserat på fylogenetisk analys och beräkningar av genflöde pekar alltså entydigt på en mycket hög genetisk variation av rapsbaggar och en hög grad av utbyte mellan olika populationer. Analys av honor och hanar visade bara på ett band som skilde dem åt med de primerkombinationer som testades men det påverkar inte analysen och det är därför inte viktigt att veta könet på insekten för genotypning vilket är synnerligen tidsbesparande. Ett Manteltest visade ingen signifikant korrelation mellan genetisk diversitet och geografisk åtskillnad (Figur 4). En utförlig beskrivning av dessa data finns i Kazachkova et al. 2006.



Vidare så har ett antal prover av rapsbaggar insamlade från Europa under 2004 analyserats. Prover från Danmark, England, Finland, Frankrike och Tyskland jämfördes med Svenska prover. Denna analys visar dock en viss geografisk struktur som kan hänga ihop med hur rapsbaggar ev. förflyttar sig längre sträckor. Detta material håller på att sammanställas i ett manuskript som beräknas vara färdigbearbetat i början av hösten.

Molekylär bakgrund till insekticidresistens hos rapsbaggar

AFLP analysen kunde inte peka ut något band som korrelerar till insekticidresistens. Byte av insekticid förhindrade också vidare planerade analyser (se nedan). Vi har lagt ned mycket tid på att försöka se understrukturer i materialet som korrelerar med resistens men inte lyckats påvisa något. Dessa analyser är mycket beräkningsintensiva och tidskrävande vilket medför vissa begränsningar när det gäller att gå igenom hela materialet. Parallellt har dock arbete med att klonera gener som kan vara inblandade i resistens påbörjats. Tre olika domäner i natriumkanaltransportören har klonats och sekvensats från känsliga och resistenta individer. Fem mutationer har påträffats men alla dessa är tysta dvs leder inte till någon aminosyraförändring och har därför ingen roll i resistens men det visar att det finns en variation i gensekvensen i alla fall. Ytterligare en domän skall analyseras men Nadiya har inte lyckats isolera detta cDNA fragment ännu, vilket tyder på att den avviker sekvensmässigt från tidigare kända gener i andra insekter. RACE-PCR teknik skall därför användas för att försöka isolera denna domän. Nyligen har också domäner av en cytokrom P450 (CYP) gen som ofta är inblandad i resistens blivit isolerad men hittills har inga mutationer påträffats men detta arbete kommer att fortsätta framgent.

Diskussion

Detta projekt har gett möjlighet att studera pyretroidresistens hos rapsbaggar med avseende på geografisk spridning och trend under flera års tid kompletterat med tidigare data. För en sådan här studie är det viktigt att följa utvecklingen för flera kompletta generationer i lokaler där baslinjedata finns och komplettera med insamling i nya lokaler. Genom bioassays kunde vi se att det fanns ingen entydig utveckling tex att resistens påverkar överlevnad avseende övervintring och på det sättet minskar eller ökar selektionen av resistenta insekter.

Vi utvecklade AFLP teknik för genotypning av rapsbaggar. AFLP anses överlägsen RAPD, RFLP och liknande tekniker för genotypning genom att ett mycket stort antal gener spridda över hela genomet kan studeras simultant och med hög reproducerbarhet och man behöver heller inte känna till någonting om genomet men nackdelen är metoden inte är avpassad för att mäta heterozygoter. Metoden är mycket känslig och vi vet att material från kroppsdelar av en rapsbagge räcker för analysen vilket möjliggör att prov tas från levande rapsbaggar som sedan kan leva vidare i försök. De grundläggande mönstren från AFLP analysen möjliggjorde

studier av hur genetiskt skilda olika populationer är från varandra, vilket lättast åskådliggörs i fylogenetiska träd medan avancerade statistiska och beräkningsverktyg kan beskriva graden av variation och förändring som sker mellan olika lokaler och generationer. Den genetiska variationen var mycket stor mellan rapsbaggar och ingen korrelation med geografiska lokaler eller resistens kunde urskiljas. Den enda covariationen som fanns mellan olika insekter var mellan generationer vilket antyder att det inte sker någon entydig selektion vid övervintring och resistens har ingen tydlig effekt vad avser övervintring. Bioassays av insekticidresistens visade på en liknande tendens. En annan viktig observation var den relativt höga graden av genflöde som verkar finnas mellan flera av de testade regionerna. Stor naturlig variation och hög migration innebär en stor risk för resistensutveckling av flera skäl. Resistens-gener/-alleler finns redan i omlopp (eller kan bildas lätt om mutationsfrekvensen är hög) och om rapsbaggar skulle sprutas bort i en lokal så kan nya individer snabbt migrera in i denna lokal och ge skördebeskador. Vi avsåg att utveckla markörer för några genotyper för att mer exakt kunna studera hur dessa sprids och korrelera detta till bekämpningstryck. Ett stort aber var dock att odlare nyligen bytt preparat till starkare insekticider och med annan verkningsmekanism (Sumithion - organofosforinsekticid som hämmar acetylkolinesteras) i områden med pyretroidresistens. Detta innebär att ett helt nytt selektionstryck lagts på rapsbaggar och därför gör en fortsatt analys av material som utsatts för pyretroidbekämpning mindre informativ. Av samma orsak har vi därför inte kunnat göra korsningar mellan insekter resistent och känsliga mot pyretroid som planerats för att studera hur resistensen nedärvs och möjliggöra identifiering av resistensgener och ej heller utveckla alleler som markörer för spridningsstudier. Den stora variationen i resistens mellan lokaler och generationer gör det svårt att generalisera om resistensen uppkommer oberoende av varandra i olika lokaler eller om det är en källa men fortsatt analyser avser att studera detta (se nedan).

Ett annat problem som uppstod under projektet var den starkt försämrade ekonomin vid institutionen som avsevärt försämrade basservicen och gjort att allt större tid ägnas åt triviala arbetsuppgifter vilket bromsar upp experimenten. Vi försökte etablera samarbete med kemister (bl.a. vid SLU) för att studera metabolism av insekticiden hos resistent rapsbaggar och se om metabolism sker för att få indirekt information om vilket enzym som är inblandat (Hemingway 2000). Men intresset har tyvärr inte funnits för detta. När det gäller tidsplanen så har vi dock samlat in insekter varje säsong under 2002-2004, AFLP metodiken etablerades, genotypning genomfördes och vi har påbörjat försök med att identifiera en trolig resistensgen. För att identifiera resistensgener hos rapsbaggar så är nu möjligheten framförallt att direkt studera några av de gener som är kända från andra insekter och se om de är muterade eller överaktiva. Mutationer är vanligast i vissa regioner och positioner av Na-kanalproteiner och avgiftningsenzymer som vi avser att studera.

Att variationen är mycket stor mellan rapsbaggar utan entydig regional struktur kan bero på att denna insekt är relativt ung. Oljeväxtodlingen är av relativt sent datum, speciellt raps är ju en sent utvecklad gröda, och pga istiden har ingen kolonisering varit möjlig tidigare även om någon Brassica släkting teoretiskt kunnat fungera som värdväxt. Den relativt snabba expansionen av oljeväxtodlingen och med en liten ursprungspopulation av rapsbaggar har förmodligen lett till en mycket snabb expansion av en liten ursprungspopulation som kan förklara en begränsad regional differentiering.

Eftersom Natriumkanalproteinet är den vanligaste målmolekylen för pyretroider kommer vi att fortsätta att analysera denna gen för mutationer tillsammans med analys av ett cytokrom P-450 som är den vanligaste enzymet inblandat i resistens. När vi hittat en resistensallel kan vi designa en PCR genotypningsmetod som snabbt och enkelt fastställer om man har resistent eller känsliga rapsbaggar eller en viss genotyp i en population. Vi kan då studera spridning i

vårt arkivmaterial för att studera hur resistens principiellt uppkommer och sprids. Detta projektet har lett till en ökad förståelse av rapsbaggar med en stor genetisk variation vilket innebär att det finns en stor potential för rapsbaggar att utveckla resistens i olika populationer och förmodligen oberoende av varandra. Dessutom är genflödet/migrationen hög mellan många lokaler vilket innebär att även om man skulle vara lyckosam att temporärt slå ut rapsbaggar i en geografisk lokal så kan nya individer snabbt flytta in och expandera där och öka genpoolen. Det är uppenbart att växtskydd hos oljeväxter mot rapsbaggar kräver flera olika strategier för att bli lyckosam. Det viktigaste åtgärden f.n. är att utveckla en strategi för att bromsa resistensutvecklingen. Den enda strategin som har gett resultat är att minimera selektionstrycket, dvs spruta mindre för att se till att mottagliga insekter finns kvar i populationen. Detta görs genom: att behandla enbart när bekämpningströskeln är överskriden, att behandla lokalt för att spara områden där de icke-resistenta baggarna kan överleva, samt att använda alternativa metoder så mycket som möjligt. Det kan nämnas att vi i ett annat projekt tittar på nya resistenskällor för raps och har en lektinvariant som ger ett bättre skydd. Men vi kommer även att studera om modifieringar av myrosinas-glukosinolatsystemet i raps kan göra växten mindre attraktiv för rapsbagge genom att inte stimulera äggläggning eller ätbeteende och ev. vara mer skadlig.

Resultatrapportering

Möten med abstract/poster

1. Jordbrukskonferensen 2002, SLU, 19-20 November, 2002.
2. BIFI 2004 – International Conference, "Biology after the genome", Zaragoza, Spanien, Februari, 2004.
3. 2nd European Whitefly Symposium, Dubrovnik, Croatien, Oktober 2004. (Fd "Advances in European Crop Protection", JIC, Norwich, Maj, 2003 flyttat till Dubrovnik!).
4. WennerGren Stiftelsens Symposium, "Phenotypic diversity and Evolution", Kristineberg Marine Research Station, Juni, 2005.

Publicering

1. N.Kazachkova, J.Fahleson, J.Meijer (2004) Establishment of the Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) technique for genotyping of pollen beetle (*Meligethes aeneus*) - a noxious insect pest on oilseed rape (*Brassica napus*). Molecular Biology Reports **31**: 37-42. (Impact factor 1,06)
2. N. Kazachkova, J. Meijer, B. Ekbom (2006) Genetic diversity in pollen beetles (*Meligethes aeneus*) in Sweden: population structure and insecticide resistance. Molecular Ecology, Submitted. (Impact factor 4,38)
3. N. Kazachkova, J. Meijer, B. Ekbom. Genetic diversity of European pollen beetle (*Meligethes aeneus*) populations. Manuskript avsett för Bull. Entom. Res. (Impact factor 1,30)
4. N. Kazachkova, B. Ekbom, J. Meijer. Analysis of potential resistance genes for mutations in pyrethroid resistant pollen beetles (*Meligethes aeneus*). Planerad.

Nadiya kommer att presentera undersökningarna i sin doktorsavhandling före årsskiftet och vi kommer då också att avrapportera till populärvetenskapliga fora.

Delar av informationen har visats på hemsidor och kontakter med växtskyddscentraler har gett fortlöpande information om fält och labtester.

Referenser

- FAO (1979) Recommended methods for the detection and measurement of resistance of agricultural pests to pesticides. Method for adult aphids. FAO method no. 17. FAO Plant Prot. Bull. 27:29-32.
- [Ffrench-Constant, R.H., Daborn, P.J., Le Goff, G.](#) (2004) The genetics and genomics of insecticide resistance. *Trends Genet.* 20:163-170.
- Follett, P.A., Gould, F. & Kennedy, G.G. (1995) High-realism model of Colorado Potato Beetle adaptation to permethrin. *Environ. Entom.* 24:167-178.
- Hemingway J. (2000) The molecular basis of two contrasting metabolic mechanisms of insecticide resistance. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 30: 1009-1015.
- Hoy, M.A. (1994) *Insect Molecular Genetics, An Introduction to Principles and Applications.* Academic Press, San Diego.
- Lenormand, T. (2002) Gene flow and the limits to natural selection. *Trends Ecol. Evol.* 17: 183-189.
- Raymond-Delpech, V., Matsuda, K., Sattelle, B.M., Rauh, J.J., Sattelle, D.B. (2005) Ion channels: molecular targets of neuroactive insecticides. *Invert Neurosci.* 5:119-133.
- Roush, R.T. & Tabashnik, B.E. (1990) *Pesticide Resistance in Arthropods.* Chapman and Hall, New York and London.
- Scott, J.G. (1999) Cytochromes P450 and insecticide resistance. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 29:757-777.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., vandeLee, T., Hornes, M., Fritjters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., Zabeau, M. (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucl. Acids Res.* 23:4407-4414.