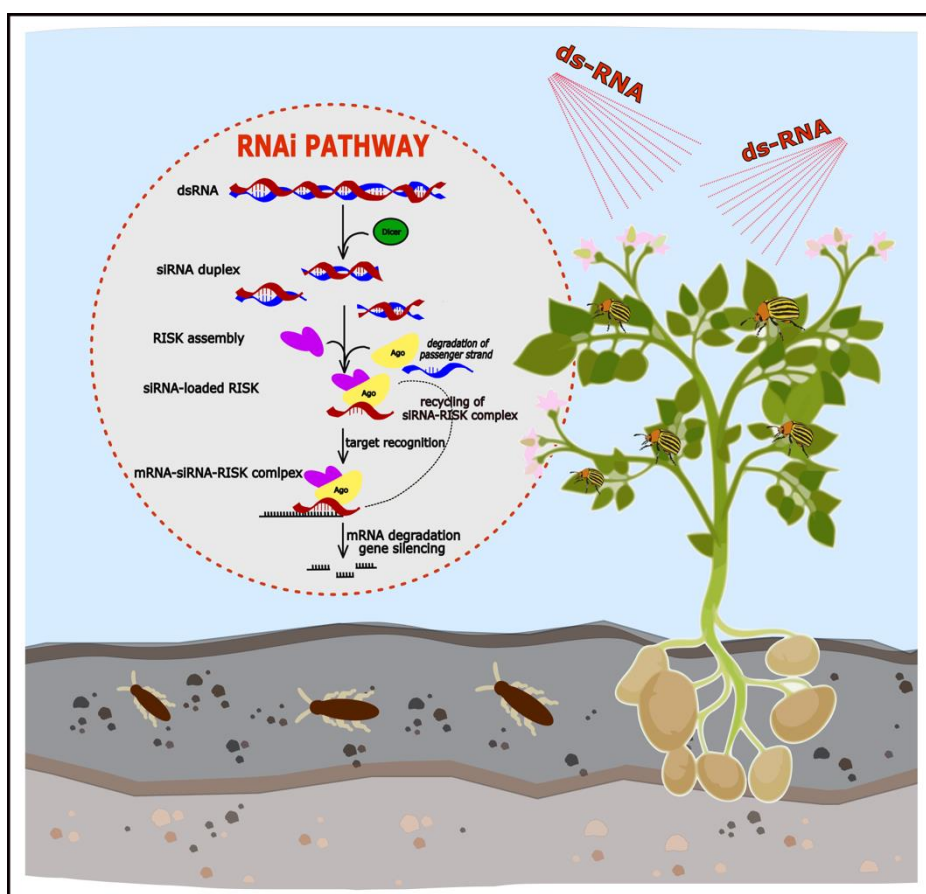


Διπλωματική Εργασία

**Μελέτη του μοτίβου αποδόμησης
των double-stranded RNA (dsRNA) νέας γενιάς
δυσνητικά χαμηλού ρίσκου εντομοκτόνων
σε περιβαλλοντικά δείγματα.**

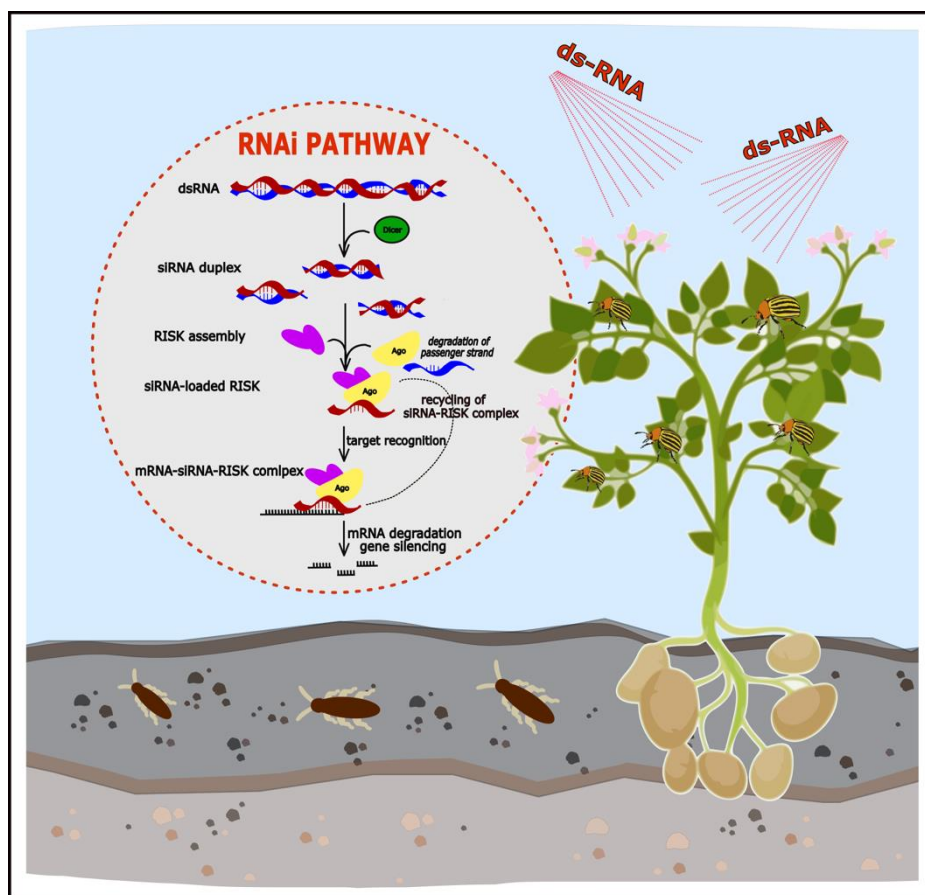


Ταμβακολόγου Ευαγγελία

Λάρισα, 2025

BSc. Thesis

Study of degradation pattern of new generation potentially low-risk double-stranded RNA (dsRNA) pesticides in environmental samples.



Tamvakologou Evangelia

Larissa, 2025

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

Παπαδοπούλου Καλλιόπη: Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα (επιβλέπουσα).

Καρπούζας Δημήτριος: Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Περιβάλλοντος, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα.

Δαλακούρας Αθανάσιος: Εντεταλμένος Ερευνητής Μοριακής Γενετικής και Αναπαραγωγής Φυτών, ΕΛΓΟ-Δήμητρα, Ινστιτούτο Βιομηχανικών και Κτηνοτροφικών Φυτών, Τμήμα Φυτικής Παραγωγής, Λάρισα.

Ευχαριστίες

Η εκπόνηση της παρούσας πτυχιακής εργασίας πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος και αποτέλεσε ένα όμορφο ταξίδι γεμάτο εκπλήξεις και δυσκολίες. Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα της διπλωματικής μου εργασίας, την κ. Καλλιόπη Παπαδοπούλου, που με δέχτηκε στο εργαστήριο και μου έδωσε την ευκαιρία να μάθω καινούργια πράγματα, αλλά και για την υποστήριξη και την καθοδήγηση που μου παρείχε καθ' όλη την διάρκεια της συνεργασίας μας.

Επιπλέον, ευχαριστώ τον εντεταλμένο ερευνητή Αθανάσιο Δαλακούρα, για τις συμβουλές, τις επισημάνσεις και την πολύτιμη βοήθεια του, και την εξαίρετη συνεργασία που είχαμε.

Ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα ήταν η συμβολή του καθηγητή Δημήτριο Καρπούζα, τον οποίο και ευχαριστώ για την εποικοδομητική συζήτηση και τις συμβουλές του .

Επίσης, ένα τεράστιο ευχαριστώ στη μεταδιδακτορική ερευνήτρια Βενετία Κοϊδου, που μέσα από τα μάτια της έμαθα πόσο απαιτητικός και ταυτόχρονα όμορφος είναι ο τομέας της επιστήμης. Πίστεψε σε εμένα από την πρώτη στιγμή της συνεργασίας μας και με βοήθησε ουσιαστικά στην ολοκλήρωση της πειραματικής διαδικασίας. Η επιστημονική της κατάρτιση αλλά και ο ενθαρρυντικός της λόγος αποτέλεσαν για εμένα πηγή έμπνευσης και ουσιαστικό οδηγό σε όλα τα στάδια της μελέτης.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου για το ευχάριστο κλίμα και τη βοήθεια που μου παρείχαν όποτε τη χρειαζόμουν.

Φυσικά, τίποτα δεν θα ήταν το ίδιο, χωρίς την αδιάκοπη συναισθηματική στήριξη και την ενθάρρυνση της οικογένειας και των φίλων μου. Η κατανόηση και η αδιάκοπη στήριξη που μου παρείχαν όλο αυτό το χρονικό διάστημα ήταν συγκινητική .Τους ευχαριστώ από καρδιάς.

Περιεχόμενα

Περίληψη	7
Abstract.....	9
1. Εισαγωγή	11
1.1. Ο δορυφόρος της πατάτας (Colorado potato beetle, CPB) και το φυτό-ξενιστής του, η πατάτα (<i>Solanum tuberosum</i> L.)	11
1.1.1. Η πατάτα (<i>Solanum tuberosum</i> L.)	11
1.1.2. Ο δορυφόρος της πατάτας (Colorado potato beetle, CPB)	12
1.2. Τρόποι καταπολέμησης του Colorado potato beetle.....	14
1.2.1. Συμβατικά χημικά εντομοκτόνα και ανάπτυξη ανθεκτικότητας	14
1.2.2. Εναλλακτικοί τρόποι καταπολέμησης του δορυφόρου της πατάτας	16
1.3. Σημαντικότητα εύρεσης αποτελεσματικού τρόπου καταπολέμησης του Colorado potato beetle- Νέας γενιάς εντομοκτόνα	17
1.3.1. Δυνητικά χαμηλού ρίσκου φυτοπροστατευτικές ουσίες βασισμένες στο RNAi.....	17
1.3.2. RNA interference	19
1.3.2.1. siRNAs.....	19
1.3.2.2. miRNAs.....	20
1.3.2.3. piRNAs.....	20
1.4. Αξιολόγηση της εφαρμογής dsRNA σε αγροοικοσυστήματα.....	21
1.4.1.Εκτίμηση του περιβαλλοντικού κινδύνου εφαρμογής dsRNA στο έδαφος	22
1.5. Η συνεστιακή μικροσκοπία ως μέσο παρακολούθησης των δίκλωνων μορίων RNA	25
1.6. Το φυτό Κουμκουάτ (<i>Citrus japonica</i>) και μετατόπιση του dsRNA στο εσωτερικό του φυτού	26
Σκοπός της παρούσας εργασίας.....	27
2.Υλικά και Μέθοδοι	28
2.1. Κεφάλαιο 1 ^ο	28
2.1.1. Συλλογή του εδάφους.....	28
2.1.2. Κατασκευή πρότυπης καμπύλης ποσοτικοποίησης dsRNA σε έδαφος	28
2.1.2.1. Πειραματικός σχεδιασμός	28
2.1.2.2. Προετοιμασία των διαλυμάτων εφαρμογής	29

2.1.2.3. Δημιουργία νανοσωματιδίων dsRNA-χιτοζάνης	29
2.1.2.4. Εφαρμογή των δόσεων.....	29
2.1.3. Διερεύνηση της υπολειμματικότητας του dsRNA σε εδαφικά δείγματα	30
2.1.3.1. Πειραματικός σχεδιασμός	30
2.1.3.2. Προετοιμασία του εδάφους	30
2.1.3.3. Προετοιμασία των διαλυμάτων εφαρμογής	31
2.1.3.4. Εφαρμογή των διαλυμάτων.....	32
2.1.3.5. Ρύθμιση της υγρασίας.....	32
2.1.3.6. Δειγματοληψία.....	32
2.1.4. Απομόνωση RNA από τα δείγματα εδάφους	33
2.1.5. Καθαρισμός του dsRNA με το RNeasy PowerClean Pro Cleanup Kit	34
2.1.6. Μοριακή μέθοδος για την ανάλυση του dRNA με Luna RT-qPCR	35
2.2. Κεφάλαιο 2 ^ο	36
2.2.1. Λήψη δειγμάτων	36
2.2.2. Προετοιμασία δειγμάτων.....	36
2.2.3. Παρατήρηση των δειγμάτων στο συνεστιακό μικροσκόπιο και διερεύνηση αυτοφθορισμού σε μήκη κύματος 488 και 560 nm,.....	37
3. Αποτελέσματα	38
3.1. Κεφάλαιο 1 ^ο	38
3.1.1. Μέρος 1ο: Κατασκευή πρότυπης καμπύλης ποσοτικοποίησης dsRNA σε εδαφικά δείγματα	38
3.1.2. Μέρος 2ο: Διερεύνηση της υπολειμματικότητας του dsRNA σε εδαφικά δείγματα μετά από επαναλαμβανόμενες εφαρμογές	40
3.2. Κεφάλαιο 2 ^ο	44
4. Συζήτηση	46
5. Βιβλιογραφία.....	50

Περίληψη

Ο παγκόσμιος πληθυσμός και η κλιματική κρίση αυξάνουν την πίεση στα γεωργικά συστήματα, με κύριο περιοριστικό παράγοντα την απώλεια καλλιεργειών από έντομα-παράσιτα. Η ανάγκη για στοχευμένα νέας γενιάς δυνητικά χαμηλού ρίσκου φυτοπροστατευτικά προϊόντα (potential low-risk pesticides, LRP), με αυξημένη αποτελεσματικότητα και περιβαλλοντική ασφάλεια είναι πλέον επιτακτική. Στις κύριες κατηγορίες LRP περιλαμβάνονται φυτικά εκχυλίσματα, φερομόνες, δίκλωνα μόρια RNA (dsRNA) και μικροβιακά σκευάσματα. Ωστόσο, η αξιολόγηση του κινδύνου τους είναι απαραίτητη πριν από ευρεία εφαρμογή. Η ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των dsRNA πραγματοποιείται μέχρι σήμερα κυρίως με τη μέθοδο QuantiGene™, η οποία βασίζεται στην ενίσχυση σήματος και όχι του ίδιου του στόχου. Αν και είναι ειδική και ευαίσθητη, απαιτεί ειδικά σχεδιασμένες ανιχνευτικές αλληλουχίες (probes) ανά μόριο, ακριβό εξοπλισμό, και φαίνεται ακατάλληλη για την ανάλυση προσροφημένων μορφών του dsRNA στο έδαφος (Zhang 2020).

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η ανάπτυξη, εφαρμογή και αξιολόγηση μιας νέας μοριακής μεθόδου ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης του dsRNA στο έδαφος και χωρίζεται σε δύο επιμέρους κεφάλαια: στο πρώτο κεφάλαιο διερευνάται η υπολειμματικότητα των dsRNA σε περιβαλλοντικά δείγματα εδάφους μετά από επαναλαμβανόμενες εφαρμογές, και στο δεύτερο πραγματοποιείται μελέτη του αυτοφθορισμού του φυτού κουμκουατ (*Citrus japonica*), με σκοπό την επιλογή του κατάλληλου πρωτοκόλλου για παρακολούθηση των dsRNA, μετά από εφαρμογή τους σε αυτό το φυτό.

Κατά το πρώτο κεφάλαιο, εφαρμόστηκε με επαναλαμβανόμενο τρόπο μία φορά ανά επτά μέρες dsRNA το οποίο στοχεύει το γονίδιο της ακτίνης του δορυφόρου της πατάτας (*Leptinotarsa decemlineata*, Ld-dsACTIN), σε εδαφικά δείγματα, και ακολούθησαν δειγματοληψίες σε έξι χρονικές στιγμές και ανάλυση με RT-qPCR. Το dsRNA εφαρμόστηκε σε απλή μορφή ή σε διαμορφωμένη με την προσθήκη χιτοζάνης. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η εφαρμοσμένη συνιστώμενη δόση των 15ng dsRNA/g εδάφους αποικοδομείται σε μεγάλο βαθμό σε 7 μέρες. Επίσης, μετά από επαναλαμβανόμενες εφαρμογές φαίνεται το dsRNA να συσσωρεύεται στο έδαφος και να μην αποικοδομείται πλήρως μετά την 4η και τελευταία εφαρμογή. Τέλος, η χιτοζάνη φαίνεται να επηρεάζει το ρυθμό αποικοδόμησης του dsRNA.

Κατά το δεύτερο και τελευταίο κεφάλαιο της παρούσας διπλωματικής εργασίας, μελετήθηκε ο αυτοφθορισμός του φυτού *kumquat* με χρήση συνεστιακής μικροσκοπίας, και τα αποτελέσματα έδειξαν πως το φυτό κουμκουάτ εκπέμπει ενδογενές σήμα μήκους κύματος 560 nm στο βλαστό, στους μίσχους του καρπού και του φύλλου, και σήμα μήκους κύματος 488 nm στον καρπό. Κατά συνέπεια, επεμβάσεις στους συγκεκριμένους ιστούς ενδείκνυται να γίνονται με φθορίζον-488 dsRNA και φθορίζον-CY3 dsRNA αντίστοιχα.

Συνολικά, η παρούσα εργασία συμβάλλει στην ανάπτυξη και εφαρμογή νέων μεθόδων παρακολούθησης των dsRNA σε περιβαλλοντικά υποστρώματα εδάφους και φυτών, και θέτει τα θεμέλια για την αξιολόγηση της περιβαλλοντικής τους σταθερότητας και τύχης.

Abstract

The rapid growth of the global population, along with the ongoing climate crisis, is placing increasing pressure on agricultural production systems, making food security a critical priority. Among the major limiting factors of crop productivity is the loss caused by insect pests. Consequently, the development and implementation of new generation potentially low-risk pesticides (LRP), with high specificity, effectiveness, and lower environmental persistence, is urgently needed. Main categories of pesticides classified as LRP include plant extracts, pheromones, double-stranded RNA molecules (dsRNA), and microbial biopesticides. However, to ensure the safety of non-target organisms and the broader environment, thorough risk assessment is essential prior to their widespread agricultural use. Regarding dsRNA pesticides, detection and quantification of dsRNA in soil, water, and plant tissues is currently achieved using the QuantiGene™ method. This technique allows direct measurement of dsRNA through signal amplification rather than target amplification. Despite its specificity and sensitivity, it lacks flexibility, as it requires the synthesis of custom-designed oligonucleotide probes for each dsRNA molecule, involves costly equipment, and is limited in detecting dsRNA adsorbed onto soil particles (Zhang, 2020).

The aim of this thesis is the development, implementation, and evaluation of a novel molecular method for the detection and quantification of double-stranded RNA (dsRNA) in soil. The study is divided into two chapters: the first investigates the persistence of dsRNA in environmental soil samples after repeated applications, while the second focuses on the autofluorescence of the kumquat plant (*Citrus japonica*) to select an appropriate protocol for monitoring dsRNA following application to the plant.

In the first chapter, dsRNA targeting the actin gene of the Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata*, Ld-dsACTIN) was applied (naked or formulated with chitosan) weekly to soil samples, followed by sampling at six time points and analysis via RT-qPCR. Results showed that dsRNA is being recovered in the second fraction of a specialized isolation protocol. Additionally, the recommended commercial dose of 15 ng dsRNA/g soil showed a significant degradation within seven days. However, repeated applications led to accumulation of dsRNA in the soil, where it was not fully degraded after the fourth and final application. Additionally, chitosan appeared to affect the degradation rate of dsRNA.

In the second chapter, kumquat autofluorescence was studied using confocal microscopy. Results showed emission at 560 nm in stems, fruit and leaf

petioles, and at 488 nm in the kumquat fruit. These results suggest the use of fluorescent-488 dsRNA and CY3-dsRNA accordingly in such tissues.

Overall, this thesis contributes to the development and evaluation of new methods for monitoring dsRNA in environmental soil and plant substrates and lays the groundwork for assessing their environmental stability and fate.

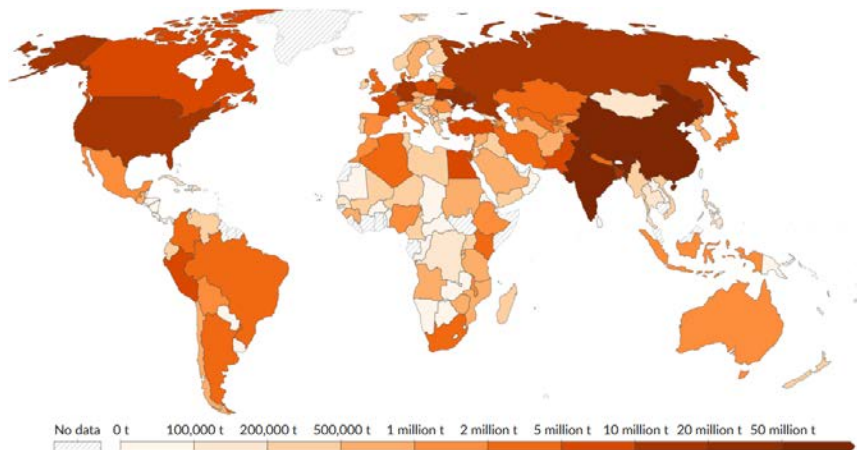
1.Εισαγωγή

Στη σύγχρονη πραγματικότητα, όπου η αύξηση της φυτικής παραγωγής αποτελεί επιτακτική ανάγκη για την κάλυψη των διατροφικών απαιτήσεων ενός συνεχώς αυξανόμενου παγκόσμιου πληθυσμού, και παράλληλα εντείνονται οι ανησυχίες για τις περιβαλλοντικές συνέπειες της ανθρώπινης δραστηριότητας, καθίσταται αναγκαία η ανάπτυξη καινοτόμων στρατηγικών καλλιεργειών και προστασίας αυτών (Ortolá & Daròs, 2024). Σε παγκόσμιο επίπεδο, τα έντομα συνιστούν σημαντική απειλή, καθώς ευθύνονται για την απώλεια περίπου 20% της παγκόσμιας ετήσιας γεωργικής παραγωγής. Επιπρόσθετα, ένα μεγάλο ποσοστό φυτικών ιών διαδίδεται μέσω εντόμων, τα οποία λειτουργούν ως φορείς και ευνοούν τη διασπορά των ιών, διευρύνοντας τόσο το φάσμα των ξενιστών όσο και τη γεωγραφική τους εξάπλωση. Τα δεδομένα αυτά, σε συνδυασμό με την ανθεκτικότητα που αναπτύσσουν τα έντομα στα συμβατικά μικρομοριακά χημικά εντομοκτόνα (small-molecule chemical pesticides), ενισχύουν την αναγκαιότητα για την ανάπτυξη νέων στρατηγικών για τον έλεγχο των εντομολογικών εχθρών των καλλιεργειών (Douglas, 2018).

1.1. Ο δορυφόρος της πατάτας (Colorado potato beetle, CPB) και το φυτό-ξενιστής του, η πατάτα (*Solanum tuberosum* L.)

1.1.1. Η πατάτα (*Solanum tuberosum* L.)

Η πατάτα (*Solanum tuberosum* L.) είναι μια από τις πιο σημαντικές καλλιέργειες σε όλο τον κόσμο. Περισσότερο από ένα δισεκατομμύριο άτομα καταναλώνουν την πατάτα ως βασικό διατροφικό αγαθό, ενώ η καλλιέργειά της αποκτά διαρκώς αυξανόμενη σημασία για τη διασφάλιση της παγκόσμιας διατροφικής επάρκειας στο μέλλον (Balaško et al., 2020a). Η συνολική παραγωγή της πατάτας για το 2023 υπολογίζεται σε 383 εκατομμύρια τόνους (Statistics | FAO | Food and Agriculture Organization of the United Nations, n.d.)(Εικόνα 1). Χωρίς προστασία των καλλιεργειών, περίπου το 75% της εφικτής παραγωγής πατάτας θα χανόταν από παράσιτα, ενώ το 34% της απώλειας αυτής θα οφειλόταν σε έντομα (Balaško et al., 2020a).



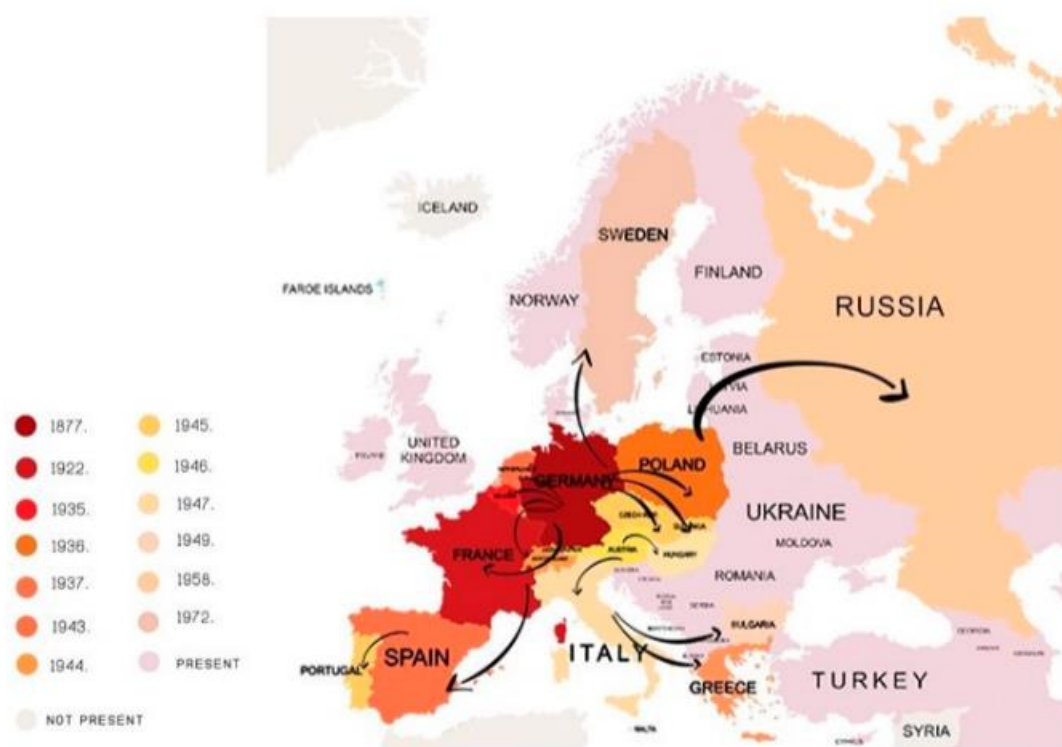
Εικόνα 1: Παραγωγή της πατάτας το 2023 υπολογισμένη σε τόνους (Statistics | FAO | Food and Agriculture Organization of the United Nations, *n.d.*).

1.1.2. Ο δορυφόρος της πατάτας (Colorado potato beetle, CPB)

Το CPB (*Leptinotarsa decemlineata* Say, Coleoptera: Chrysomelidae) είναι ένα φυλλοφάγο σκαθάρι και το κύριο έντομο παράσιτο του φυτού της πατάτας (Wen et al., 2019a). Επιπλέον, αποτελεί βασικό εχθρό της ντομάτας, της πιπεριάς και της μελιτζάνας. Το CPB είναι ένα κολεόπτερο που έκανε για πρώτη φορά την εμφάνισή του στο Μεξικό το 1811, στη συνέχεια εξαπλώθηκε σε όλη τη Βόρεια Αμερική και τελικά τον 20^ο αιώνα μετακινήθηκε σε όλη την Ευρώπη, την Ασία και τη δυτική Κίνα (Balaško et al., 2020a)(Εικόνα 2).

Το ενήλικο άτομο έχει χρώμα κιτρινωπό, με σκληρό εξωσκελετό και με χαρακτηριστικό μοτίβο δέκα μαύρων γραμμών στη ράχη του. Η προνύμφη είναι χρώματος πορτοκαλί και στα πλάγια της κοιλιακής χώρας φέρει μαύρες βούλες σε παράλληλη διάταξη και το σώμα της έχει σχήμα κυρτό (*“Leptinotarsa Decemlineata (Colorado Potato Beetle),”* 2021) (Εικόνα 3).

Ως προς τη βιολογία του, ένα θηλυκό το οποίο έχει ζευγαρώσει μπορεί να αποθέσει μέχρι και 800 αυγά κατά τη διάρκεια της ζωής του, σε ομάδες των 10-20 αυγών, στην κάτω επιφάνεια των φύλλων, ενώ ανάλογα με τις κλιματικές συνθήκες μπορεί να προκύψουν από μία έως και τρεις γεννήσεις ετησίως (Sablon et al., 2012). Κατά τη διάρκεια του προνυμφικού σταδίου, που διαρκεί 3 έως 4 εβδομάδες, οι προνύμφες καταναλώνουν περίπου 40 cm² φύλλων πατάτας, ενώ τα ενήλικα μπορούν να τρέφονται με έως και 10 cm² φύλλωμα την ημέρα. Όταν το φυτό, πλέον, έχει χάσει τα φύλλα του, τα ενήλικα CPB τρέφονται με μίσχους και εκτεθειμένους κονδύλους (Wen et al., 2019b).



Εικόνα 2: Εξάπλωση του σκαθαριού της πατάτας του Κολοράντο στην Ευρώπη κατά τον 20ό αιώνα (Balaško et al., 2020a).



Εικόνα 3: Α. Λάρβα CPB, Β. Ενήλικο άτομο CPB (Colorado Potato Beetle Larva #1 by Science Photo Library, n.d.; What to Do If You See the Colorado Potato Beetle (a UK Notifiable Quarantine Pest) | AHDB, n.d.)

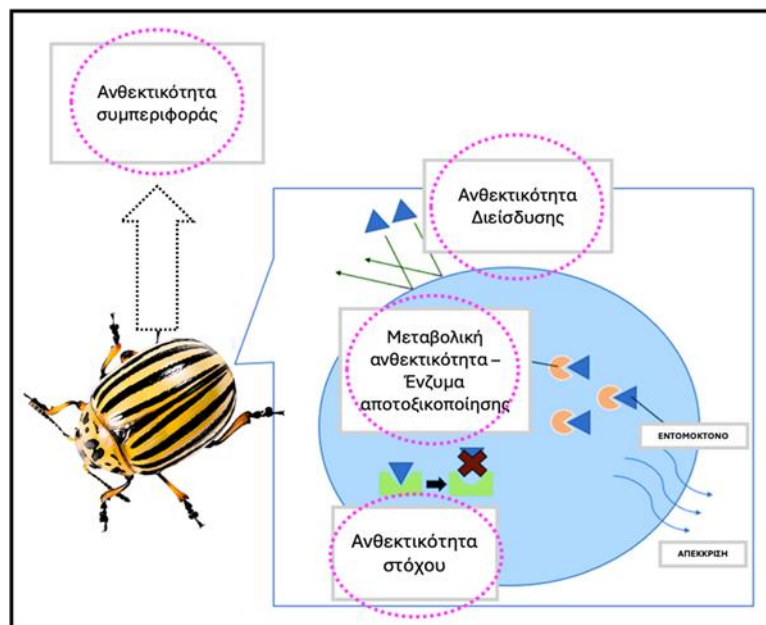
1.2. Τρόποι καταπολέμησης του Colorado potato beetle

1.2.1. Συμβατικά χημικά εντομοκτόνα και ανάπτυξη ανθεκτικότητας

Χωρίς σχέδιο καταπολέμησης, ο δορυφόρος της πατάτας κατά το προνυμφικό στάδιο μπορεί να προκαλέσει ολοκληρωτική αποφύλλωση των καλλιεργειών και συνολικές απώλειες της παραγωγής οι οποίες φτάνουν το 60% (Hare, 1980). Η βασικότερη στρατηγική ελέγχου των CPB βασίζεται στην εφαρμογή συμβατικών χημικών μικρομοριακών εντομοκτόνων (conventional small-molecule insecticides) (Kromann et al., 2014). Αν και η εφαρμογή εντομοκτόνων έχει περιορίσει σημαντικά τους πληθυσμούς του CPB, έχει οδηγήσει ωστόσο στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας των εντόμων, σε ένα πλήθος δραστικών ουσιών (Balaško et al., 2020a). Η εκτεταμένη και αλόγιστη χρήση εντομοκτόνων έχει οδηγήσει σε ανάπτυξη ανθεκτικότητας σε γεωργικούς εχθρούς και φορείς ασθενειών, η οποία αποτελεί περιοριστικό παράγοντα για τον αποτελεσματικό έλεγχο των πληθυσμών τους. Η ανθεκτικότητα των εντόμων στα εντομοκτόνα ορίζεται, με βάση την Επιτροπή Δράσης για την Ανθεκτικότητα στα Εντομοκτόνα (Insecticide Resistance Action Committee, IRAC), ως η κληρονομούμενη αλλαγή στην ευαισθησία του πληθυσμού ενός εχθρού, η οποία αντικατοπτρίζεται στην επανειλημμένη αποτυχία ενός εντομοκτόνου σκευάσματος να πετύχει τα αναμενόμενα επίπεδα ελέγχου, όταν εφαρμόζεται με βάση τις οδηγίες της ετικέτας του (IRAC, 2021). Όταν ένας πληθυσμός εντόμων εκτεθεί σε ένα εντομοκτόνο, ένα μικρό ποσοστό ατόμων θα επιβιώσει, λόγω της γενετικής ποικιλομορφίας που υπάρχει στον πληθυσμό. Η εφαρμογή της πίεσης επιλογής από την παρουσία του εντομοκτόνου έχει ως αποτέλεσμα η συχνότητα των γονοτύπων που δεν επηρεάζονται από την έκθεση σε αυτό να αυξάνει από γενιά σε γενιά. Μετά από αρκετές γενεές με εφαρμογή της ίδιας πίεσης επιλογής (εντομοκτόνου) ο αριθμός των ανθεκτικών ατόμων αυξάνει στον πληθυσμό με αποτέλεσμα ο πληθυσμός να αναπτύσσει ανθεκτικότητα στο σκεύασμα αυτό (Hemingway et al., 2002).

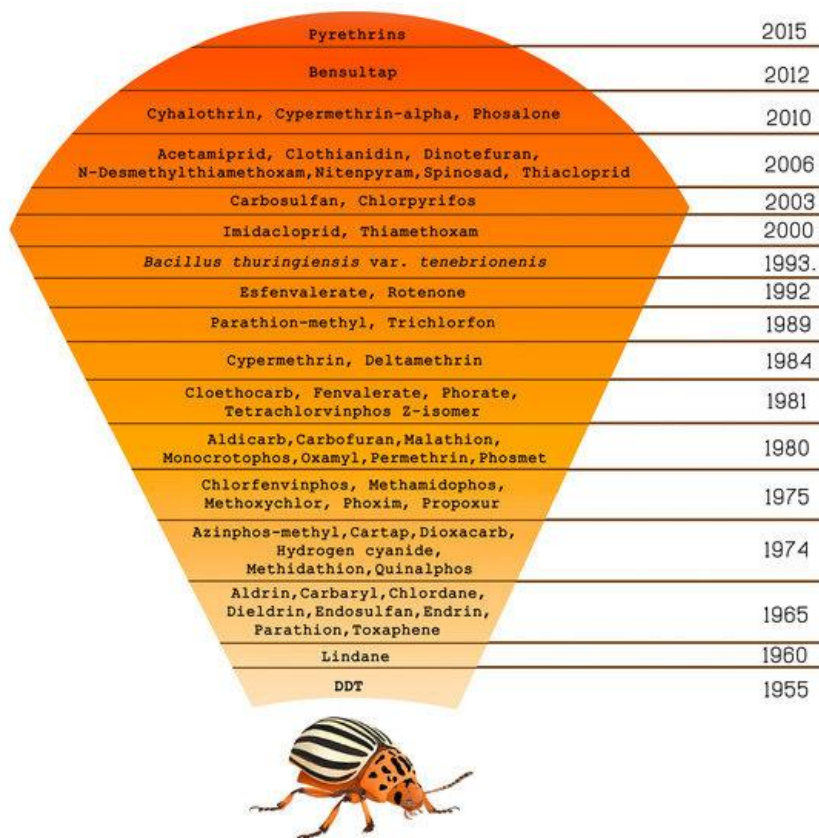
Οι κύριοι μηχανισμοί ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα που έχουν περιγραφεί έως σήμερα συνδέονται με φυσιολογικές και συμπεριφορικές αλλαγές στον οργανισμό των εντόμων και διαχωρίζονται ανάλογα με αυτές σε μεταβολική ανθεκτικότητα [όπου εμπλέκονται καρβοξυλεστεράσες (Carboxylesterases (CCEs) (Oakeshott et al., 2010), τρανσφεράσες της γλουταθειόνης (glutathione-S- transferases (GSTs)(Enayati et al., 2005), UDP-γλυκουρονοσυλτρανσφεράσες (UDP glycosyl-transferases (UGTs)(X. Li et al., 2020), μονοξυγενάσες του κυτοχρώματος P450 (cytochrome P450 monooxygenases (P450s) (Nauen et al., 2022) καθώς και ABC (Adenosine Triphosphate, ATP-Binding Cassette transporters) και άλλοι διαμεμβρανικοί μεταφορείς (Merzendorfer, 2014)] , ανθεκτικότητα στόχου (Homem et al., 2020),

ανθεκτικότητα δειόδουσης (Balabanidou et al., 2018), καθώς και ανθεκτικότητα συμπεριφοράς (Siddiqui et al., 2023; Zalucki & Furlong, 2017) (Εικόνα 4).



Εικόνα 4: Μηχανισμοί ανθεκτικότητας εντόμων σε εντομοκτόνα (τροποποιημένο από (Gan et al., 2021))

Μετά από εκτεταμένες μελέτες, το CPB καταγράφεται να έχει αναπτύξει ανθεκτικότητα στα περισσότερα εγκεκριμένα χημικά εντομοκτόνα (μεταβολική ανθεκτικότητα στην κυαλοθρίνη (cyhalothrin) (Lü et al., 2015) και στην κλοθειανιδίνη (clothianidin) (Bouafoura et al., 2022), και ανάπτυξη ανθεκτικότητας στόχου στη φωσφανόλη (phosanole) (Malekmohammadi & Galehdari, 2016), και πιο συγκεκριμένα σε 58 χημικές ενώσεις, οι οποίες ανήκουν σε διαφορετικές χημικές ομάδες (Ménard et al., 2025)(Εικόνα 5). Συνοπτικά, τα οργανοφωσφορικά (organophosphates)(Stanković et al., 2004), τα καρβαμιδικά (carbamates) (Stanković et al., 2004), τα νεονικοτινοειδή (neonicotinoid)(Stanković et al., 2012) και τα πυρεθροειδή (pyrethroids)(Stanković et al., 2012) είναι μερικές από τις βασικές κατηγορίες συμβατικών χημικών εντομοκτόνων, στις οποίες το CPB έχει αναπτύξει ανθεκτικότητα (Balaško et al., 2020).



Εικόνα 5: Χρονική πρόοδος της ανάπτυξης ανθεκτικότητας του CPB (Balaško et al., 2020a).

1.2.2. Εναλλακτικοί τρόποι καταπολέμησης του δορυφόρου της πατάτας

Δεδομένου ότι το CPB έχει αναπτύξει ανθεκτικότητα σχεδόν σε όλες τις κύριες κατηγορίες χημικών εντομοκτόνων, η ανάπτυξη και η εφαρμογή εναλλακτικών προσεγγίσεων κρίνεται απαραίτητη. Στο παρελθόν έχουν εφαρμοστεί στελέχη *Bacillus thuringiensis* (Bt), τα οποία έχουν εφαρμοστεί με ψεκασμό στα φύλλα του φυτού της πατάτας, με σκοπό την καταπολέμηση διαφόρων παρασίτων. Τα στελέχη Bt παράγουν πρωτεΐνες που παρουσιάζουν εντομοκτόνες ιδιότητες έναντι του CPB (Naimon et al., 2001). Παρόλο που τα εντομοκτόνα Bt καταγράφονται ως μη επιβλαβή για τον άνθρωπο και τα ωφέλιμα αρθρόποδα, ο ψεκασμός τους φαίνεται να προσφέρει περιορισμένη φυτοπροστασία λόγω της φωτοευαισθησίας και της ταχείας αποικοδόμησης των τοξινών, συγκριτικά με τα υπόλοιπα χημικά εντομοκτόνα (Balaško et al., 2020a). Επιπλέον έχουν καταγραφεί περιπτώσεις ανάπτυξης ανθεκτικότητας του δορυφόρου σε Bt τοξίνες, επηρεάζοντας τη αποτελεσματικότητά τους (Loseva et al., 2002). Ένας άλλος τρόπος καταπολέμησης του δορυφόρου της πατάτας που έχει δοκιμαστεί είναι οι γενετικά τροποποιημένες (GM) καλλιέργειες (Křížková et al., 2022). Τα γονίδια *Cry* που προέρχονται από στελέχη Bt έχουν χρησιμοποιηθεί για τη

δημιουργία διαγονιδιακών φυτών, ανθεκτικών στα έντομα, ωστόσο οι επιπλοκές που σχετίζονται με τη φύτευση γενετικά τροποποιημένων πατατών ως προς τη νομοθεσία, αλλά και η γενικότερη μη αποδοχή τους από το ευρύ κοινό, έχουν περιορίσει την εδραίωση αυτού του τρόπου καταπολέμησης (Balaško et al., 2020b; Křížkovská et al., 2022; Nickson, 2008).

1.3. Σημαντικότητα εύρεσης αποτελεσματικού τρόπου καταπολέμησης του Colorado potato beetle- Νέας γενιάς εντομοκτόνα

Παρά τις εκτεταμένες προσπάθειες για την αντιμετώπιση της ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα και την ανάπτυξη εναλλακτικών στρατηγικών ελέγχου, δεν έχει βρεθεί ακόμη μια βιώσιμη και ολοκληρωμένη λύση (Chen et al., 2023). Η καλλιέργεια της πατάτας παραμένει ιδιαίτερα ευάλωτη, καθώς η αποφύλλωση από το CPB μπορεί να οδηγήσει είτε σε πλήρη καταστροφή των φυτών είτε σε σοβαρή μείωση της απόδοσης των κονδύλων (Balaško et al., 2020a). Ο αποτελεσματικός έλεγχος του εντόμου είναι δύσκολος, κυρίως λόγω των ευέλικτων διατροφικών του συνηθειών και της ικανότητάς του να προσαρμόζεται σε περιβαλλοντικές πιέσεις. Συνολικά οι παράγοντες αυτοί καθιστούν αναγκαία την ανάπτυξη νέων τεχνολογιών, ικανών να παρεμποδίσουν την ανάπτυξη ή να προκαλέσουν τον θάνατο του εντόμου (Lv et al., 2023).

1.3.1. Δυνητικά χαμηλού ρίσκου φυτοπροστατευτικές ουσίες βασισμένες στο RNAi

Η ανάγκη για στοχευμένα νέας γενιάς δυνητικά χαμηλού ρίσκου φυτοπροστατευτικά προϊόντα (potential low-risk pesticides, LRP), με αυξημένη αποτελεσματικότητα και περιβαλλοντική ασφάλεια είναι πλέον επιτακτική. Στις κύριες κατηγορίες LRP περιλαμβάνονται φυτικά εκχυλίσματα, φερομόνες, δίκλωνα μόρια RNA (dsRNA) και μικροβιακά σκευάσματα. Η τεχνολογία σίγησης γονιδίων μέσω RNA παρεμβολής (RNA interference, RNAi) αναδύεται ως μια πολλά υποσχόμενη εναλλακτική προσέγγιση για την αντιμετώπιση της αυξανόμενης ανθεκτικότητας των εντόμων στα συμβατικά εντομοκτόνα, καθώς βασίζεται στην ειδική στόχευση γονιδίων-κλειδιών, επάγοντας δυσλειτουργίες στα κρίσιμα στάδια της ανάπτυξης του εντόμου (Balaško et al., 2020b). Τα παρασιτοκτόνα με βάση το διπλής έλικας RNA (dsRNA) αξιοποιούν αυτή την τεχνολογία και χαρακτηρίζονται ως εντομοκτόνα δυνητικά χαμηλού οικοτοξικολογικού ρίσκου (low-risk pesticides, LRP), λόγω της υψηλής ειδικότητάς τους και της μειωμένης επίδρασης σε οργανισμούς μη-στόχους (Dalakouras et al., 2024).

Η τεχνολογία RNAi η οποία ενεργοποιεί τον ενδογενή αμυντικό μηχανισμό των φυτών ενάντια σε εξωγενή νουκλεϊκά οξέα και παθογόνους οργανισμούς, έχει την προοπτική να αναδειχθεί ως ένα καινοτόμο και εξειδικευμένο εργαλείο για την προστασία των καλλιεργειών (Dalakouras et al., 2018). Βασιζόμενη στην επιλεκτική σίγηση γονιδίων, επιτρέπει την παρέμβαση σε κρίσιμες μεταβολικές ή αναπτυξιακές διεργασίες των εντόμων, οδηγώντας σε αναστολή ανάπτυξης ή και σε θάνατο (Balaško et al., 2020b). Τα παρασιτοκτόνα που βασίζονται στην τεχνολογία RNAi έχουν εφαρμοστεί πειραματικά, είτε μέσω μικροέγχυσης είτε διατροφικά, μέσω τροφής (Yu et al., 2013).

Η αποτελεσματικότητα του RNAi-τρόπου καταπολέμησης εξαρτάται από το είδος του εντόμου, με τα κολεόπτερα να παρουσιάζουν ιδιαίτερα υψηλή ευαισθησία, τόσο όταν η δραστική ουσία λαμβάνεται διά στόματος όσο και όταν εφαρμόζεται τοπικά (Pampolini et al., 2020a). Επιπλέον, η τεχνολογία αυτή μπορεί να προσφέρει σημαντικά πλεονεκτήματα σε σύγκριση με τα συμβατικά χημικά εντομοκτόνα: υψηλή εξειδίκευση ως προς το είδος-στόχο, περιορισμένο κίνδυνο για οργανισμούς μη-στόχους και χαμηλή περιβαλλοντική επιβάρυνση. Αξίζει επίσης να σημειωθεί πως η στρατηγική εναλλαγής των γονιδίων-στόχων περιορίζει σημαντικά την πιθανότητα ανάπτυξης ανθεκτικότητας από τους πληθυσμούς των εντόμων (Fletcher et al., 2020a).

Σύμφωνα την υπάρχουσα βιβλιογραφία, η εφαρμογή RNAi-εντομοκτόνων παραμένει περιορισμένη σε εμπορική κλίμακα, με το Ledprona (GreenLight Biosciences) να αποτελεί την πρώτη εγκεκριμένη και εμπορευματοποιημένη εφαρμογή, αποκλειστικά στις Η.Π.Α. (Dietz-Pfeilstetter et al., 2021). Το Ledprona είναι ένα εντομοκτόνο με βάση το dsRNA, το οποίο στοχεύει το γονίδιο της β-υπομονάδας τύπου 5 του πρωτεασώματος (*Proteasome Subunit Beta Type-5, PSMB5*) του δορυφόρου της πατάτας, επάγοντας βλάβες στο μονοπάτι αποικοδόμησης των πρωτεϊνών, των οποίων η συσσώρευση γίνεται τοξική και θανατηφόρα για τα κύτταρα. Πιο αναλυτικά, η μελέτη η οποία συνοδεύει το εν λόγω προϊόν, αναφέρει πως στις προνύμφες που τράφηκαν με το προϊόν για 6 ώρες, καταγράφηκε 90% θνησιμότητα μετά από 9 ημέρες (Rodrigues et al., 2021). Σύμφωνα με τα έως τώρα επιστημονικά δεδομένα, το Ledprona έχει λάβει έγκριση από την Υπηρεσία Προστασίας του Περιβάλλοντος των Ηνωμένων Πολιτειών και κυκλοφορεί στην αγορά των Η.Π.Α (United States Environmental Protection Agency-EPA) (2024 - *Week 1 • EPA's Approval of Ledprona for Crop Protection and More*, n.d.). Ωστόσο, σύμφωνα με την νομοθεσία της Ε.Ε., ως dsRNA προϊόν θεωρείται χημικό φυτοφάρμακο και απαιτούνται περαιτέρω έρευνες και αξιολογήσεις πριν από την έγκριση κυκλοφορίας του (Dalakouras et al., 2024; Dietz-Pfeilstetter et al., 2021).

1.3.2. RNA interference

Η παρεμβολή RNA (RNA interference-RNAi) είναι ένας κυτταρικός μηχανισμός, ο οποίος μέσω της σίγησης γονιδίων ρυθμίζει την έκφραση αυτών των γονιδίων-στόχων (Pampolini et al., 2020a). Στα έντομα και σε άλλα ζώα, τρεις διαφορετικές κατηγορίες μικρών RNA (sRNA) ενεργοποιούν τρεις αντίστοιχες οδούς RNAi, οι οποίες ακολουθούν διαφορετικά μονοπάτια επεξεργασίας και στρατηγικές σίγησης (Zhu & Palli, 2020). Στην παρεμβολή RNA συμμετέχουν τρία είδη μικρών RNAs, τα μικρά παρεμβαλλόμενα RNA (siRNAs, short interfering RNAs), τα μικρά RNA (miRNAs, microRNAs) και τα PIWI-αλληλεπιδρώντα RNA (piRNAs, PIWI-interacting RNAs). Για τα δύο πρώτα η παρεμβολή RNA διακρίνεται σε δύο φάσεις, την εναρκτήρια (initiator) και την τελεστική (effector). Η εναρκτήρια φάση περιλαμβάνει τον τεμαχισμό του dsRNA σε μικρά RNAs 21-23 νουκλεοτιδίων και η τελεστική τον τεμαχισμό του mRNA από το RISC, επάγοντας αποσιώπηση στο επίπεδο μετά τη μεταγραφή (post-transcriptional gene silencing). Όσον αφορά τα siRNAs (ενδογενή siRNAs) και τα piRNAs, υπάρχουν επιπλέον μηχανισμοί μέσω των οποίων επιτυγχάνεται σίγηση στο επίπεδο της μεταγραφής (transcriptional gene silencing). Τα piRNAs σχηματίζουν σύμπλοκα RNA-πρωτεΐνης μέσω αλληλεπιδράσεων με τις πρωτεΐνες piwi, τα οποία έχουν συνδεθεί τόσο με επιγενετική όσο και με μετα-μεταγραφική σίγηση γονιδίων ρετροτρανσποζονίων και άλλων γενετικών στοιχείων σε κύτταρα της βλαστικής σειράς. Τέλος, τα piRNAs παράγονται με διαφορετικούς μηχανισμούς συγκριτικά με τα άλλα δύο είδη και επάγουν αποσιώπηση σε συγκεκριμένα κύτταρα του οργανισμού (Ortolá & Daròs, 2024)(Εικόνα 6).

1.3.2.1. siRNAs

Η οδός αυτή ενεργοποιείται από την παρουσία συμπληρωματικών dsRNAs ή φουρκετών RNA στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων. Τα dsRNAs αναγνωρίζονται και επεξεργάζονται από ένζυμα της οικογένειας πρωτεϊνών Dicer και Dicer-like (DCL), οι οποίες είναι ενδοριβονουκλεάσες ειδικές για το dsRNA, και κόβουν το dsRNA σε μικρότερα τμήματα 20-22 νουκλεοτιδίων, τα siRNAs.

Στη συνέχεια, το δίκλωνο μόριο RNA φορτώνεται σε μια πρωτεΐνη της οικογένειας Argonaute (AGO), η οποία μαζί με άλλες βοηθητικές πρωτεΐνες (RP) και το RNA συναρμολογούν το πρόδρομο σύμπλοκο RISC (RNA-induced silencing complex, RNA-σύμπλοκο που επάγει τη γονιδιακή σίγηση). Στο ώριμο RISC η αλυσίδα επιβάτης (sense, passenger strand) του siRNA αποικοδομείται, επιτρέποντας με αυτόν τον τρόπο στην αλυσίδα οδηγό (antisense) να υβριδιστεί και να καθοδηγήσει τη διάσπαση του συμπληρωματικού RNA-στόχου (π.χ. mRNA). Το ώριμο RISC διαθέτει μια ενεργότητα που ονομάζεται slicer και η οποία κόβει το RNA-στόχο. Η διάσπαση αφήνει 5'-φωσφορικά και 3'-υδροξυλικά άκρα, με αποτέλεσμα να παράγεται ένα θραύσμα RNA χωρίς

πολυ(A) ουρά και ένα άλλο χωρίς 5'καλύπτρα, τα οποία στη συνέχεια αποικοδομούνται από εξωνουκλεάσες (Ortolá & Daròs, 2024).

1.3.2.2. miRNAs

Τα miRNAs εκφράζονται είτε ως πολυκιστρονικά RNAs από διαγονιδιακές περιοχές του γονιδιώματος και φέρουν τους δικούς τους υποκινητές ή από ενδογονιδιακές περιοχές που συνεκφράζονται με το γονίδιο που ρυθμίζουν. Γενικά τα miRNAs μεταγράφονται από την RNA πολυμεράση II ως πρωτογενή αντίγραφα (pri-miRNA) που υφίστανται τροποποιήσεις όπως το mRNA (5' κάλυμμα και 3' πολυ(A) ουρά) και έχουν χαρακτηριστική δομή φουρκέτας, η οποία χαρακτηρίζεται από μια μακριά συμπληρωματική δίκλωνη περιοχή που πλαισιώνεται από έναν τελικό βρόχο και δύο μη δομημένα μονόκλωνα τμήματα (ssRNA).

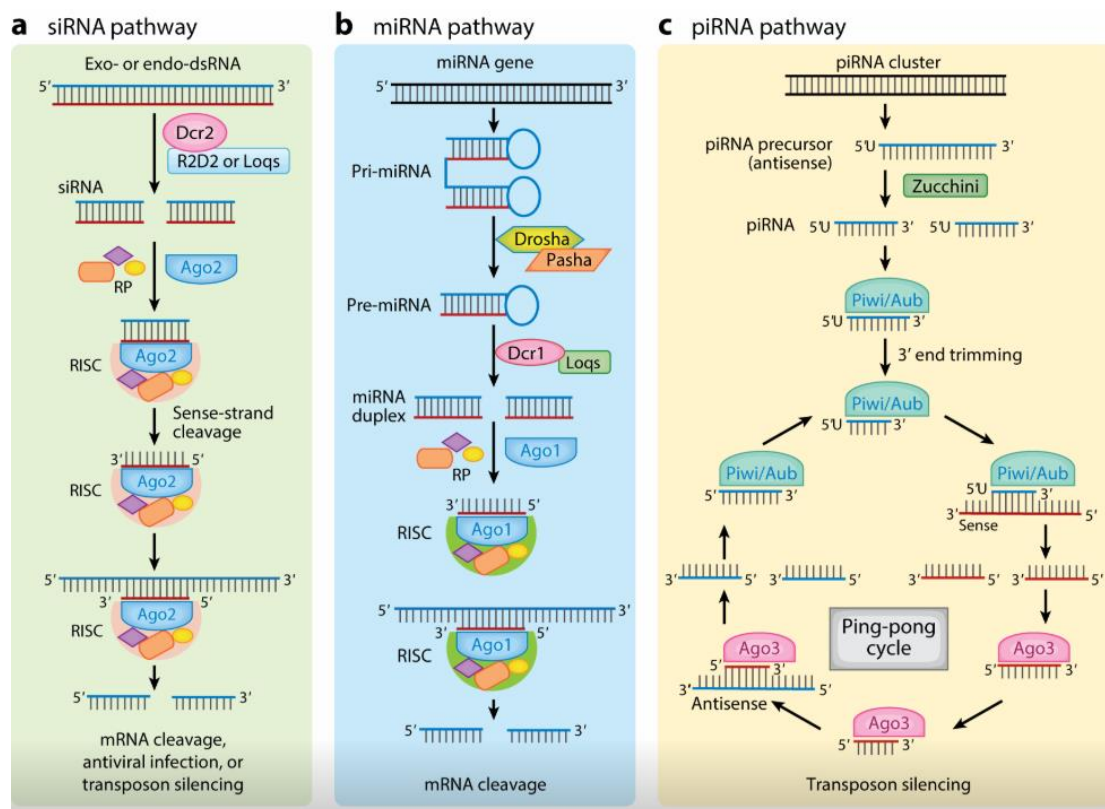
Τα pri-miRNAs επεξεργάζονται στον πυρήνα από το ενζυμικό σύμπλοκο του μικροεπεξεργαστή, το οποίο αποτελείται από ένα μόριο ριβονουκλεάσης τύπου III Drosha, και δύο μόρια DGCR8. Οι δύο περιοχές RNase III της Drosha εξαλείφουν τα βασικά μονόκλωνα τμήματα και μέρος του dsRNA (~11 nt), δημιουργώντας πρόδρομα miRNA (pre-miRNAs), δηλαδή φουρκέτες περίπου 70 nt με προεξέχοντα 3' άκρα 2 νουκλεοτιδίων. Στη συνέχεια, τα pre-miRNAs εξέρχονται στο κυτταρόπλασμα με τη βοήθεια της Exportin-5, όπου και επεξεργάζονται από την Dicer-1. Κατά την επεξεργασία από την Dicer, η θηλιά αφαιρείται και δημιουργούνται δίκλωνα miRNAs με μήκος περίπου 22nt.

Στη συνέχεια, το miRNA φορτώνεται στην AGO1 σχηματίζεται το σύμπλοκο RISC, ενώ ακολουθεί η επιλογή της αλυσίδας οδηγού και η υπόλοιπη διαδικασία, όπως ακριβώς και για τα siRNAs, με τη μόνη διαφορά ότι σε αυτό το μονοπάτι το R2D2 δεν παίζει κάποιο ρόλο (Ortolá & Daròs, 2024).

1.3.2.3. piRNAs

Το μονοπάτι βιογένεσης και επεξεργασίας των piRNA εντοπίζεται κυρίως σε βλαστικές σειρές, με κύριο ρόλο τη διατήρηση της ακεραιότητας του γονιδιώματος. Σε αντίθεση με τα siRNA και τα miRNA, τα piRNA, στις σωματικές σειρές, προέρχονται από μονόκλωνα πρόδρομα μόρια που μεταγράφονται από την RNA pol II από συγκεκριμένες γονιδιωματικές θέσεις (συστάδες piRNA) που περιέχουν μεταθετά στοιχεία. Στη συνέχεια το πρόδρομο piRNA κόβεται σε πρωτογενές piRNA από την ενδονουκλεάση Zucchini (Zuc) και το anti-sense piRNA που προκύπτει φορτώνεται στις πρωτεΐνες Piwi και Aub. Το σύμπλεγμα Piwi/Aub διασπά ένα sense τρασποζόνιο μεταγραφεί, ενώ παράλληλα δημιουργεί και ένα νέο sense piRNA. Στη συνέχεια, η AGO3 χρησιμοποιεί το νέο piRNA για να καθοδηγήσει τη διάσπαση του συμπληρωματικού anti-sense τρασποζονίου και να δημιουργήσει επιπλέον anti-sense piRNA, το οποίο με τη

σειρά του μπορεί να φορτωθεί στο σύμπλεγμα Piwi/Aub για να διασπάσει κι άλλα συμπληρωματικά τρανσποζόνια που έχουν μεταγραφεί. Αυτό το μονοπάτι σίγησης ονομάζεται «μηχανισμός του κύκλου πινγκ-πονγκ» (Zhu & Palli, 2020).



Εικόνα 6: Μηχανισμοί διαφορετικών μονοπατιών παρεμβολής RNA (RNAi) στα έντομα (Zhu & Palli, 2020).

1.4. Αξιολόγηση της εφαρμογής dsRNA σε αγροοικοσυστήματα

Ως φυτοπροστατευτικά προϊόντα, τα σκευάσματα ψεκασμού τα οποία βασίζονται στην τεχνολογία παρεμβολής RNAi, απαιτούν εκτενείς διαδικασίες αξιολόγησης του περιβαλλοντικού κινδύνου, πριν από τη χορήγηση έγκρισης για ευρεία εμπορική χρήση στην Ευρωπαϊκή Ένωση (Dietz-Pfeilstetter et al., 2021). Η διαδικασία αυτή είναι απαραίτητη για τη διασφάλιση μη δυσμενών επιπτώσεων στο περιβάλλον και σε όλους τους οργανισμούς μη-στόχους που διαβιούν σε αυτό (Romeis & Widmer, 2020).

Η υψηλή ειδικότητα του μηχανισμού δράσης της RNAi τεχνολογίας, η οποία βασίζεται στη συμπληρωματικότητα αλληλουχιών γονιδίων, καθιστά τα προϊόντα αυτά εξαιρετικά στοχευμένα από το σχεδιασμό τους, περιορίζοντας τις επιδράσεις τους σε οργανισμούς μη-στόχους (Dietz-Pfeilstetter et al., 2021).

Παρ' όλα αυτά, η πολυπλοκότητα των οικοσυστημάτων και η περιορισμένη κατανόηση της αλληλεπίδρασης ανάμεσα στο dsRNA και σε είδη μη-στόχους, καθιστούν αδύνατη την πλήρη πρόβλεψη ή την εξαίρεση πιθανών ανεπιθύμητων επιπτώσεων (Luo et al., 2024). Συνεπώς, η ανάπτυξη κατάλληλων πειραματικών πρωτοκόλλων ανίχνευσης με ρεαλιστικά σενάρια εφαρμογής, είναι απαραίτητη για την παρακολούθηση της υπολειμματικότητας και την αξιόπιστη εκτίμηση της ασφάλειας αυτών των καινοτόμων βιοτεχνολογικών προϊόντων (Zarrabian & Sherif, 2024). Η αξιολόγηση της περιβαλλοντικής τύχης (environmental fate) του dsRNA προερχόμενο από γεωργικά προϊόντα βασισμένα στην τεχνολογία RNAi, προϋποθέτει την ανάπτυξη αναλυτικών μεθόδων που να μπορούν να ανιχνεύουν και να ποσοτικοποιούν το dsRNA με ακρίβεια, εξειδίκευση και ευαισθησία, σε ένα ευρύ φάσμα περιβαλλοντικών δειγμάτων (Fischer et al., 2016). Μέχρι στιγμής, η ανίχνευση και η ποσοτικοποίηση των dsRNA επιτυγχάνεται μέσω της μεθόδου QuantiGene, η οποία βασίζεται σε ειδικά σχεδιασμένους ανιχνευτές που υβριδίζουν στο dsRNA. Η τεχνική αυτή επιτρέπει την άμεση μέτρηση των μορίων dsRNA μέσω ενίσχυσης του σήματος και όχι του ίδιου του γενετικού στόχου και έχει ήδη εφαρμοστεί για την ανίχνευση και την ποσοτική ανάλυση dsRNA σε εδαφικά, φυτικά και σε υδατικά δείγματα (Albright et al., 2017; Armstrong et al., 2013; Bachman et al., 2020a; Dubelman et al., 2014; Fischer et al., 2016).

1.4.1. Εκτίμηση του περιβαλλοντικού κινδύνου εφαρμογής dsRNA στο έδαφος

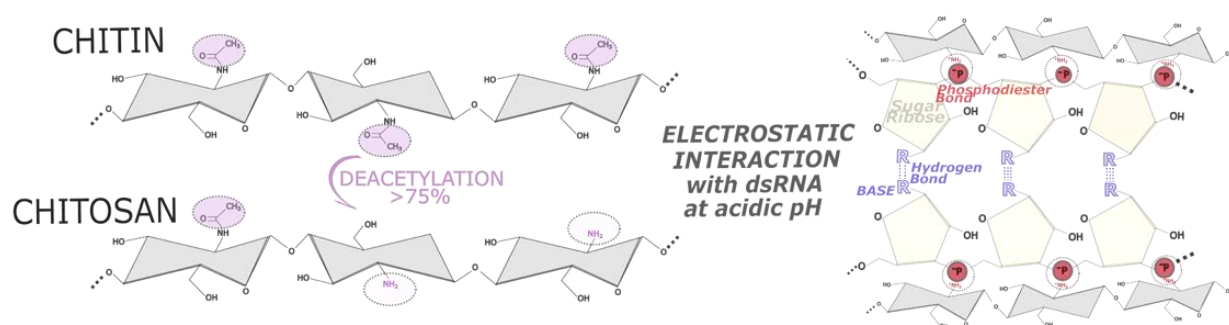
Το έδαφος θεωρείται ένας βασικός τελικός αποδέκτης τόσο ενδογενών μακρομορίων, όπως πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων που προέρχονται από φυτά, ζώα και μικροοργανισμούς, όσο και εξωγενώς εφαρμοζόμενων βιομορίων, όπως π.χ. το dsRNA. Η μελέτη της συμπεριφοράς και της σταθερότητας του εφαρμοζόμενου dsRNA στο έδαφος είναι κρίσιμη, καθώς προσφέρει βασικά δεδομένα για την εκτίμηση της δυνητικής έκθεσης και επίδρασης σε οργανισμούς μη-στόχους και συνεπώς για την ορθή αξιολόγηση της ασφάλειας της τεχνολογίας αυτής, σε περιβαλλοντικό επίπεδο (Fischer et al., 2016).

Τα ελεύθερα (γυμνά) dsRNAs είναι ιδιαίτερα ευάλωτα σε ταχεία αποικοδόμηση όταν εκτίθενται σε σύνθετα γεωργικά περιβάλλοντα, κυρίως λόγω της παρουσίας εξωκυτταρικών νουκλεασών (Arjunan et al., 2024). Η περιορισμένη περιβαλλοντική σταθερότητα, τόσο των dsRNAs όσο και των siRNAs, αποτελεί κρίσιμο περιοριστικό παράγοντα για την αποτελεσματική εφαρμογή βιοφυτοπροστατευτικών προϊόντων βασισμένων στο RNAi στο πεδίο (Bachman et al., 2020b). Ως εκ τούτου, η ερευνητική δραστηριότητα πλέον επικεντρώνεται στην ανάπτυξη τεχνολογιών που στοχεύουν στην ενίσχυση της

μοριακής τους σταθερότητας. Μία από τις πιο πολλά υποσχόμενες στρατηγικές περιλαμβάνει την αξιοποίηση νανοτεχνολογικών φορέων για την προστασία και ελεγχόμενη απελευθέρωση των dsRNA μορίων, βελτιώνοντας επιπλέον κατά αυτόν τον τρόπο την απορρόφησή τους από το έντομο-στόχο (Luo et al., 2024).

Γενικά, η εφαρμογή της νανοτεχνολογίας στον αγροτικό τομέα έχει αναδειχθεί σε πεδίο έντονου επιστημονικού ενδιαφέροντος τα τελευταία χρόνια, χάρη στην ικανότητά της να προσφέρει μοριακή διαχείριση τόσο βιοτικών όσο και αβιοτικών καταπονήσεων, ταχεία και αποτελεσματική ανίχνευση φυτοπαθολογικών ασθενειών, καθώς και προηγμένα συστήματα χορήγησης λιπασμάτων και φυτοπροστατευτικών ουσιών (Li et al., 2023). Μεταξύ των διαφόρων φορέων μεταφοράς που διερευνώνται, τα βιοαποδομήσιμα πολυμερή, όπως η χιτοζάνη, έχουν προσελκύσει σημαντικό ενδιαφέρον, κυρίως λόγω της δυνατότητάς τους να χρησιμοποιούνται ως συστήματα ελεγχόμενης αποδέσμευσης δραστικών ουσιών και σταθεροποίησης ευαίσθητων βιομορίων, όπως πρωτεΐνες, πεπτίδια ή γενετικό υλικό (Kashyap et al., 2015).

Συγκεκριμένα η περίπτωση της χιτοζάνης (β-1,4-D-γλυκοζαμίνη) αποτελεί έναν πολυσακχαρίτη που προέρχεται από τη χιτίνη (N -ακετυλο-D-γλυκοζαμίνη), μετά από απακετυλίωση (Εικόνα 7). Η χιτίνη είναι το δεύτερο πιο άφθονο βιοπολυμερές στη φύση και εντοπίζεται στον εξωσκελετό των καρκινοειδών και των εντόμων, σε άλγη, καθώς και στο κυτταρικό τοίχωμα των μυκήτων (Κου et al., 2021). Η χιτοζάνη αποτελεί το μοναδικό φυσικό πολυκατιονικό πολυμερές και η πυκνότητα του ηλεκτρικού της φορτίου εξαρτάται από τον βαθμό απακετυλίωσης και το pH του περιβάλλοντος μέσου. Η διαλυτότητα του πολυμερούς συσχετίζεται άμεσα τόσο με τον βαθμό απακετυλίωσης, όσο και με το μοριακό του βάρος. Τα олиγομερή της χιτοζάνης εμφανίζουν υψηλή διαλυτότητα σε ένα ευρύ φάσμα τιμών pH, συμπεριλαμβανομένων τόσο όξινων όσο και βασικών τιμών, ακόμη και σε ουδέτερο pH (7.4) (Aranaz et al., 2021). Αντιθέτως, τα πολυμερή χιτοζάνης με υψηλό μοριακό βάρος είναι εύκολα διαλυτά σε υδατικά διαλύματα πολλών ανόργανων και οργανικών οξέων, και όχι σε βασικά περιβάλλοντα, ακόμα και όταν έχουν υποστεί εκτεταμένη απακετυλίωση (Ogawa et al., 2004).



Εικόνα 7: Δομή της χιτίνης και της χιτοζάνης (απο Koidou et al. 2025 under review)

Το θετικό φορτίο της χιτοζάνης επιτρέπει την ισχυρή ηλεκτροστατική αλληλεπίδρασή της με αρνητικά φορτισμένα μόρια, όπως τα νουκλεϊκά οξέα, χωρίς να επηρεάζεται η βιοδραστικότητά τους (Divya & Jisha, 2017). Η σύζευξη αυτή οδηγεί στο σχηματισμό νανοσωματιδίων χιτοζάνης–νουκλεϊκών οξέων, τα οποία προσφέρουν πολλαπλά πλεονεκτήματα: προστασία του dsRNA από ενζυμική αποικοδόμηση, επαγωγή σταδιακής απελευθέρωσής του και ενίσχυση της σταθερότητάς του σε περιβαλλοντικές συνθήκες (M. Li et al., 2023b). Επιπλέον, τα νανοσωματίδια αυτά, όπως και άλλα βιοπολυμερικά συστήματα, παρουσιάζουν σημαντικά χαρακτηριστικά όπως ο ρυθμός βιοδιάσπασης, η βιοσυμβατότητα, καθώς και τα χαμηλά επίπεδα τοξικότητας. Ένα ακόμη καθοριστικό πλεονέκτημα της χιτοζάνης είναι η ικανότητά της να προσκολλάται αποτελεσματικά στις επιφάνειες των φυτών, αυξάνοντας τον χρόνο παραμονής του δραστικού υλικού και ενισχύοντας την πρόσληψη του dsRNA από το έντομο-στόχο (Kolge et al., 2021). Η ικανότητά της να ενθυλακώνει το dsRNA λειτουργεί ως προστατευτική ασπίδα κατά τη μεταφορά του, διασφαλίζοντας ότι μεγαλύτερη ποσότητα του δραστικού μορίου φτάνει άθικτη στον επιθυμητό βιολογικό στόχο (Arjunan et al., 2024). Μελέτες έχουν δείξει πως η εφαρμογή χιτοζάνης ως νανοσωματιδιακός φορέας του dsRNA αύξησε την αποτελεσματικότητα του RNAi σε κουνούπια (X. Zhang et al., 2010).

Το γυμνό dsRNA (naked, non-formulated dsRNA) έχει χαρακτηριστεί από περιορισμένη περιβαλλοντική σταθερότητα, ενώ πειραματικά δεδομένα έχουν αποδείξει πως αποικοδομείται ταχέως, εντός 72 ωρών, τόσο σε εδαφικά όσο και σε υδάτινα περιβάλλοντα (K. Zhang et al., 2020). Παράλληλα, έχει διαπιστωθεί ότι η μερική προσρόφησή του dsRNA σε σωματίδια του εδάφους, αλλά και η επίδραση μικροβιακών νουκλεασών, μπορούν να επηρεάσουν το ρυθμό αποικοδόμησής του (Parker et al., 2019a). Η αποικοδόμησή του, από την άλλη, φαίνεται να είναι ανεξάρτητη από τη χορηγούμενη δόση, το μήκος ή τη δομή του μορίου dsRNA (Romeis & Widmer, 2020).

Σύμφωνα με τους Fischer et al., 2016, μετά από εφαρμογή σχετικά υψηλών συγκεντρώσεων dsRNA (τάξη μεγέθους $\mu\text{g/mL}$ ή $\mu\text{g/g}$ εδάφους) δεν είναι επιτρεπτή η σαφής διάκριση μεταξύ της συμβολής της προσρόφησης του dsRNA στις επιφάνειες των σωματιδίων και της αποικοδόμησής τους στην συνολική μείωση της συγκέντρωσής του. Για το λόγο αυτό, κρίνεται απαραίτητο να αναπτυχθούν αναλυτικές προσεγγίσεις που θα μπορούν να ποσοτικοποιήσουν και να διακρίνουν τόσο τα διαλυμένα όσο και τα προσροφημένα μόρια dsRNA, καθώς και τα προϊόντα αποικοδόμησής τους ή την ενσωμάτωσή τους σε βιομόρια από μικροοργανισμούς του εδάφους (Parker et al., 2019b).

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, συγκεκριμένα στο πρώτο της κεφάλαιο, αναπτύσσουμε, εφαρμόζουμε και αξιολογούμε μια μέθοδο απομόνωσης και ποσοτικής ανίχνευσης των dsRNA μορίων σε περιβαλλοντικά δείγματα εδάφους. Σκοπός μας είναι να υπολογίσουμε την υπολειμματικότητα του dsRNA

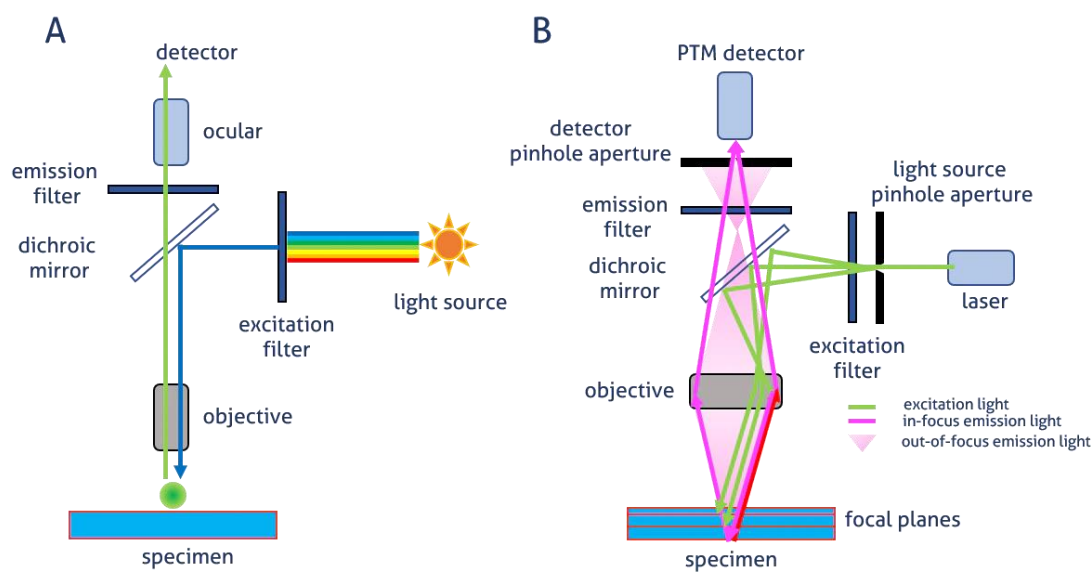
στο έδαφος, σε ένα ορισμένο χρονικό διάστημα και να διερευνήσουμε την επίδραση της χιτοζάνης ως διαμορφωτικό παράγοντα (formulation factor) σε αυτό.

Στο δεύτερο κεφάλαιο της παρούσας διπλωματικής εργασίας αναπτύσσουμε και εφαρμόζουμε ένα πρωτόκολλο μονιμοποίησης και κατάτμησης φυτικών ιστών, με σκοπό την παρακολούθηση της μετατόπισης των dsRNA στο εσωτερικό αυτών, με χρήση συνεστιακού μικροσκοπίου (confocal microscopy, CLSM), στο πλαίσιο πειραμάτων μελέτης της περιβαλλοντικής τύχης των μορίων dsRNA.

1.5. Η συνεστιακή μικροσκοπία ως μέσο παρακολούθησης των δίκλωνων μορίων RNA

Η συνεστιακή μικροσκοπία (Confocal Laser Scanning Microscopy, CLSM), είναι μια τεχνική οπτικής απεικόνισης, κατά την οποία το φως παρέχεται από μια φωτεινή πηγή λέιζερ, διεγείρει ένα σημείο στο δείγμα (focal plane), και το φθορίζον φως που εκπέμπεται, συγκεντρώνεται μέσω μιας χωρικής οπής (pinhole) στον ανιχνευτή (detector), αποκλείοντας κάθε σήμα το οποίο προκύπτει εκτός αυτής της διόδου, αποσκοπώντας με αυτή τη διάταξη, στον περιορισμό του θορύβου λόγω περίθλασης του φωτός (Εικόνα 8). Για να δημιουργηθεί μια πλήρης εικόνα από το δείγμα, το σημείο διέγερσης και εκπομπής πρέπει να μετακινηθεί πάνω στο δείγμα και τα δεδομένα να συλλεχθούν σημείο προς σημείο (Elliott, 2020). Επιπλέον, το φως διέγερσης προέρχεται από μια πηγή λέιζερ, έτσι ώστε να επιτυγχάνονται υψηλές εντάσεις φθορισμού ή ανάκλασης στο εστιασμένο σημείο. Στην Εικόνα 8 παρουσιάζονται τα μέρη ενός συνεστιακού και ενός μικροσκοπίου φθορισμού.

Η συνεστιακή μικροσκοπία προσφέρει σημαντικά πλεονεκτήματα σε σχέση με τη συμβατική ευρυεπίπεδη (wide-field) μικροσκοπία φθορισμού, όπως βελτιωμένη οπτική ανάλυση και αντίθεση της εικόνας, δυνατότητα τρισδιάστατης ανακατασκευής των μεμονωμένων λήψεων, λήψη διαδοχικών οπτικών τομών σε παχιά δείγματα, καθώς και απεικόνιση κυττάρων ή ιστών *in vivo* (Nwaneshiudu et al., 2012).



Εικόνα 8: Δημιουργία εικόνας σε wide-field και συνεστιακή μικροσκοπία φθορισμού. (IF Imaging: Widefield versus Confocal Microscopy | Proteintech Group, n.d.)

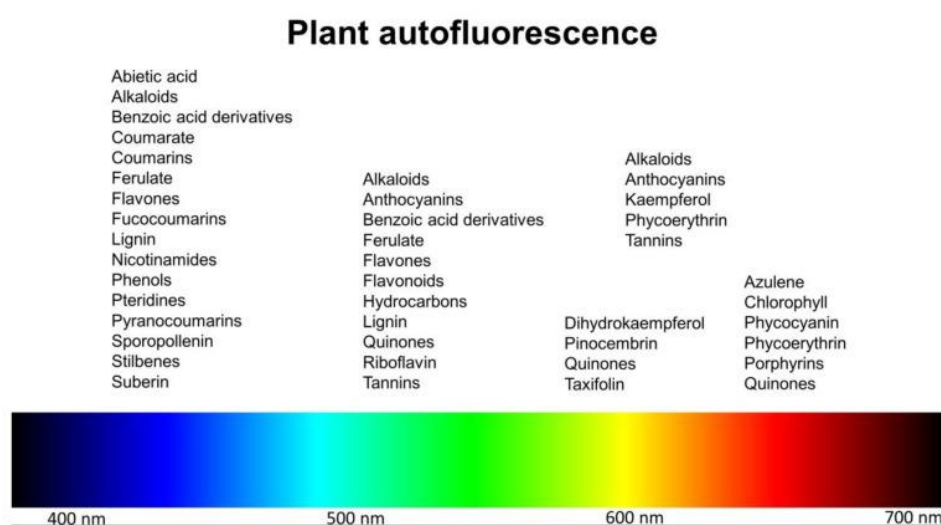
1.6. Το φυτό Κουμκουάτ (*Citrus japonica*) και μετατόπιση του dsRNA στο εσωτερικό του φυτού

Το φυτό κουμκουάτ ευδοκίμει στις περισσότερες χώρες της υποτροπικής ζώνης και παράγει καρπούς οι οποίοι χαρακτηρίζονται ως οι μικρότεροι βρώσιμοι εσπεριδοειδείς καρποί και οι μόνοι που μπορούν να καταναλωθούν ολόκληροι με τη φλούδα. Οι καρποί αυτοί, μεταξύ άλλων, είναι πλούσιοι σε καροτενοειδή, πολυφαινόλες, φλαβονοειδή και τερπενοειδή (Pawelczyk et al., 2023). Κύριοι εντομολογικοί εχθροί του κουμκουάτ αποτελούν οι αλευρώδεις, οι ψευδόκοκκοι, τα κοκκοειδή, κάποιες προνύμφες λεπιτόπτερων, κάποια ακάρεα και το η μύγα της Μεσογείου (*Ceratitis capitata*, δίπτερο) (Kawpet & Ganeshaborirak, 2024).

Στο πλαίσιο μιας άλλης σειράς πειραμάτων (δεν συμπεριλαμβάνονται στην παρούσα διπλωματική εργασία), σκοπός είναι να μελετηθεί η μετατόπιση ενός dsRNA το οποίο στοχεύει απαραίτητο γονίδιο της *Ceratitis capitata*, στο κουμκουάτ, με χρήση συνεστιακής μικροσκοπίας. Το κουμκουάτ, όπως και όλα τα φυτά, περιέχει αυτοφθορίζοντα μόρια, τα οποία μπορούν να αξιοποιηθούν σε διάφορες βιοχημικές ή απεικονιστικές μελέτες (Donaldson, 2020), αλλά συχνά αποτελούν περιοριστικό παράγοντα σε άλλου τύπου μεθοδολογίες, όπως για παράδειγμα σε τεχνικές μικροσκοπίας (García-Plazaola et al., 2015). Ο όρος «αυτοφθορισμός» χρησιμοποιείται για τη διάκριση του ενδογενούς φθορισμού των κυττάρων και των ιστών, από τον φθορισμό που ανιχνεύεται μετά από επεξεργασία των δειγμάτων με εξωγενείς φθορίζοντες δείκτες, οι οποίοι συνδέονται με κυτταρικές και ιστικές δομές (Monici, 2005).

Ο αυτοφθορισμός άλλοτε μπορεί να εμποδίσει μια πειραματική διαδικασία, ενώ σε άλλες περιπτώσεις να τη διευκολύνει (Donaldson, 2020). Τα δύο βασικά μόρια που αυτοφθορίζουν στα φυτά είναι η χλωροφύλλη και η λιγνίνη

(Donaldson & Williams, 2018). Η χλωροφύλλη, η κύρια φωτοσυνθετική χρωστική των φυτών, διεγείρεται με υπεριώδη ακτινοβολία (με μήκη κύματος από 340 έως 360 nm) και εκπέμπει φθορισμό στο φάσμα του κόκκινου-έντονου κόκκινου χρώματος (Talamond et al., 2015). Η λιγνίνη, χαρακτηριστικό συστατικό του ξηλώματος, διεγείρεται, επίσης, από υπεριώδες φως, ωστόσο χαρακτηρίζεται από ένα ευρύ φάσμα εκπομπής από το μπλε έως το πράσινο χρώμα, εξαιτίας της παρουσίας πολλαπλών τύπων φθοροφόρων εντός του μορίου της (Donaldson & Williams, 2018). Πολλά επιπλέον μόρια εκπέμπουν αυτοφθορισμό όταν διεγείρονται με ορατό ή υπεριώδες φως, μεταξύ των οποίων περιλαμβάνονται στοιχεία τόσο του κυτταροπλάσματος όσο και των κυτταρικών τοιχωμάτων (Εικόνα 9) (Donaldson, 2020).



Εικόνα 9: Εκπομπή φθορισμού κοινών αυτοφθορίζουσών ενώσεων που βρίσκονται στα φυτά (Donaldson, 2020).

Σκοπός της παρούσας εργασίας

1) Η ανάπτυξη, εφαρμογή και αξιολόγηση ενός αξιόπιστου μοριακού εργαλείου για την ανίχνευση των dsRNA στο έδαφος και η μελέτη του μοτίβου αποδόμησης των dsRNA σε περιβαλλοντικά δείγματα εδάφους, διαμορφωμένων και μη με χιτοζάνη.

2) Η μελέτη του αυτοφθορισμού διάφορων ιστών του φυτού *kuquat*, με σκοπό την επιλογής του κατάλληλου πρωτοκόλλου για τη σήμανση και την παρακολούθηση της πορείας ενός dsRNA μορίου στο φυτό, μετά από εφαρμογή του στο κουκουάτ, σε επόμενη σειρά πειραμάτων.

2.Υλικά και Μέθοδοι

2.1. Κεφάλαιο 1^ο

Το πρώτο πειραματικό μέρος χωρίζεται σε δύο σκέλη: την κατασκευή μιας πρότυπης καμπύλης ποσοτικοποίησης του dsRNA σε έδαφος και τη διερεύνηση της υπολειμματικότητας του dsRNA σε εδαφικά δείγματα, με βάση την καμπύλη ποσοτικοποίησης.

2.1.1. Συλλογή του εδάφους

Το έδαφος που χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη συλλέχθηκε από επιφάνεια γεωργικής έκτασης στην περιοχή της Καλλιπεύκης στη Λάρισα (N 39.962335, E 22.461202), ομογενοποιήθηκε με κοσκίνισμα και αποθηκεύτηκε στο σκοτάδι στους 4°C, μέχρι να χρησιμοποιηθεί. Το συγκεκριμένο έδαφος πρόκειται για έδαφος τύπου αμμώδους αργίλου, με σύσταση 14% άργιλο, 32% ιλύς και 54% άμμο. Το pH του συγκεκριμένου εδάφους είναι 6.67, ενώ η περιεκτικότητά του σε οργανικό άνθρακα (OC) προσδιορίστηκε στο 2,9%.

2.1.2. Κατασκευή πρότυπης καμπύλης ποσοτικοποίησης dsRNA σε έδαφος

2.1.2.1. Πειραματικός σχεδιασμός

Για την κατασκευή της καμπύλης ποσοτικοποίησης εφαρμόστηκε dsRNA (dsACTIN) σε εδαφικά δείγματα, με ή χωρίς παρουσία χιτοζάνης και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε απομόνωση, καθαρισμός και ποσοτική ανίχνευση του dsRNA στα δείγματα αυτά. Το dsACTIN που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη είναι μήκους 297 bp και στοχεύει το γονίδιο *actin-3* του δορυφόρου της πατάτας (*Leptinotarsa decemlineata*) και παρήχθη μετά από T7 *in vitro* μεταγραφή.

Οι δόσεις του dsRNA παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.

ng dsRNA/ g εδάφους
10 ⁻³
10 ⁻²
10 ⁻¹
1

10
5*10
10 ²
5*10 ²
10 ³

Πίνακας 1: Δόσεις dsRNA για κατασκευή πρότυπης καμπύλης ποσοτικοποίησης.

2.1.2.2. Προετοιμασία των διαλυμάτων εφαρμογής

Το πρωτόκολλο το οποίο ακολουθήθηκε παρακάτω προέρχεται από προηγούμενη δημοσίευση (Zhang et al., 2020), με μικρές τροποποιήσεις.

- Αρχικά, υπολογίστηκε η αναλογία της ποσότητας του dsRNA ως προς τα 0.3g εδάφους ανά βιολογική επανάληψη, και υπολογίστηκε ο όγκος του dsRNA πρέπει να εφαρμοστεί σύμφωνα με τη συγκέντρωση του. Στη συνέχεια, το dsRNA διαλύθηκε σε ίσο όγκο διαλύματος θειικού νατρίου 0.1M (Na₂SO₄, 0.05M). Στις συνθήκες με χιτοζάνη, η χιτοζάνη προστέθηκε σε αναλογία μάζας 5:1 χιτοζάνη: dsRNA (Ramesh Kumar et al., 2016).
- Για την προετοιμασία της χιτοζάνης, 0,002g χιτοζάνης (Sigma-Aldrich, C3646, ≥75% deacetylated) διαλυτοποιήθηκαν σε 10 mL διαλύματος οξικού νατρίου 0.1M (CH₃COONa), έτσι ώστε να προκύψει διάλυμα χιτοζάνης 0.02% w/v, το οποίο διατηρήθηκε σε θερμοκρασία δωματίου και σε ανακίνηση πριν τη χρήση του. Ακολούθησε έντονη ανάδευση σε vortex έως την πλήρη διαλυτοποίηση της χιτοζάνης (Ramesh Kumar et al., 2016).

2.1.2.3. Δημιουργία νανοσωματιδίων dsRNA-χιτοζάνης

Για την δημιουργία των νανοσωματιδίων, τα διαλύματα όλων των δόσεων μαζί με τη χιτοζάνη θερμάνθηκαν στους 55°C και στη συνέχεια αναδεύθηκαν έντονα για 1 λεπτό σε vortex σε υψηλή ταχύτητα (Ramesh Kumar et al., 2016).

2.1.2.4. Εφαρμογή των δόσεων

Η κάθε δόση dsRNA διαλύθηκε σε Buffer1 (MOPS 3mM, NaCl 10mM, pH 6.67), μέχρι τον τελικό όγκο των 600 μL και πραγματοποιήθηκε η εφαρμογή της σε tube χωρητικότητας 2 mL, στο οποίο περιέχονταν ήδη 0.3g εδάφους ανά βιολογική επανάληψη.

2.1.3. Διερεύνηση της υπολειμματικότητας του dsRNA σε εδαφικά δείγματα

2.1.3.1. Πειραματικός σχεδιασμός

Στο πείραμα που πραγματοποιήθηκε εφαρμόστηκε ποσότητα dsRNA σε εδάφη. Χρησιμοποιήθηκε ένας τύπος εδάφους και ένας τύπος dsRNA, το Ld_dsACTIN. Πιο συγκεκριμένα εφαρμόστηκε δόση 15ng dsRNA/g εδάφους και το αντίστοιχο control, δηλαδή 0ng dsRNA/g εδάφους, ενώ ταυτόχρονα εξετάστηκε και η επίδραση της παρουσίας ή όχι της χιτοζάνης. Συνεπώς οι συνθήκες ήταν οι εξής:

- 0ng dsRNA/g εδάφους χωρίς χιτοζάνη
- 0ng dsRNA/g εδάφους με **χιτοζάνη**
- 15ng dsRNA/g εδάφους χωρίς χιτοζάνη
- 15ng dsRNA/g εδάφους με **χιτοζάνη**

Οι εφαρμογές που πραγματοποιήθηκαν συνολικά ήταν 4, μία ανά επτά μέρες, ενώ για κάθε συνθήκη πραγματοποιήθηκαν 3 βιολογικές επαναλήψεις. Συνολικά το πείραμα πραγματοποιήθηκε σε 12 δείγματα (4 συνθήκες * 3 βιολογικές επαναλήψεις =12).

Για τη κάθε βιολογική επανάληψη χρησιμοποιήθηκαν 40 g εδάφους, άρα συνολικά χρειάστηκαν $40g * 12 = 480 g$ εδάφους.

Τέλος, πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες τις εξής χρονικές στιγμές: 0 (αμέσως μετά την πρώτη εφαρμογή dsRNA), και τις ημέρες: 7,14,21,28 και 40.

2.1.3.2. Προετοιμασία του εδάφους

Μία ημέρα πριν την έναρξη του πειράματος, υπολογίστηκε το ποσοστό υγρασίας του εδάφους. Για τον προσδιορισμό της περιεχόμενης υγρασίας, τρία δείγματα 10g εδάφους μεταφέρθηκαν σε προ-ζυγισμένο δοχείο. Αμέσως μετά, τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε προθερμασμένο φούρνο (LabLine) στους 105°C, στον οποίο παρέμειναν για 16 ώρες. Στη συνέχεια τα δείγματα επαναζυγίστηκαν. Η απώλεια βάρους οφείλεται στην ποσότητα νερού που διατηρούσε το έδαφος και εξατμίστηκε κατά τη διάρκεια της ξήρανσης (Πίνακας 2). Η περιεχόμενη υγρασία του εδάφους υπολογίστηκε σύμφωνα με τον τύπο:

$$MC = [(W1 - W2) * 100\%]$$

(MC: η περιεχόμενη υγρασία του εδάφους, W1: το βάρος του εδάφους πριν την ξήρανση, W2: το βάρος του εδάφους μετά την ξήρανση).

Δείγμα εδάφους	W1 (g)	W2 (g)	% Περιεχόμενη υγρασία	M.O.
A	10	9,7	3,00	3,20
B	10	9,7	3,00	
Γ	10	9,64	3,60	

Πίνακας 2: Η μάζα του εδάφους πριν και μετά την ξήρανση και το ποσοστό υγρασίας του.

Στη συνέχεια, υπολογίστηκε η ποσότητα νερού που χρειάζεται να προστεθεί, έτσι ώστε να ρυθμιστεί η υγρασία του εδάφους στο επίπεδο 30% της συνολικής υδατοχωρικότητάς του, συνυπολογίζοντας την ποσότητα του dsRNA που θα προστεθεί κατά την κάθε εφαρμογή, καθώς είναι διαλυμένο σε υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα. Η υδατοχωρικότητα του εδάφους είναι η μέγιστη ποσότητα νερού που μπορεί να συγκρατήσει το έδαφος μετά από την πλήρη διαβροχή του και την αποστράγγιση της περίσσειας νερού υπό την επίδραση της βαρύτητας (de Jong van Lier, 2017). Γενικά, υγρασία 30-40% της συνολικής υδατοχωρικότητας, συνίσταται ως βέλτιστη συνθήκη για την επιβίωση και την ομαλή ανάπτυξη των μικροοργανισμών τους εδάφους (Shawver et al., 2024).

Για τα 480 g εδάφους χρειάστηκαν 65,58 mL H₂O, τα οποία προστέθηκαν σταδιακά, με συνεχή αναμόχλευση του εδάφους με σκοπό την αποφυγή συσσωματωμάτων, και την ομαλή κατανομή της υγρασίας. Αφού, η υγρασία έφτασε στο επιθυμητό επίπεδο, το έδαφος διαμοιράστηκε σε 12 γυάλινα δοχεία με μεταλλικά καπάκια, όπου παρέμεινε έως την ολοκλήρωση του πειράματος, σε επωαστήρα με σταθερή θερμοκρασία 25°C.

2.1.3.3. Προετοιμασία των διαλυμάτων εφαρμογής

- Η δόση που επρόκειτο να εφαρμοστεί ήταν 15ng/g εδάφους, οπότε υπολογίστηκε ο απαιτούμενος όγκος dsRNA που αντιστοιχεί στην ποσότητα που πρέπει να εφαρμοστεί σε κάθε βιολογική επανάληψη εδάφους των 40 g. Αντίστοιχα, για τη δόση 0 ng προστέθηκε ο ίδιος όγκος ddH₂O αντί για dsRNA. Ίσος όγκος θειικού νατρίου προστέθηκε στο dsRNA (Na₂SO₄ C_{final} 0.05M) (βλ. Ενότητα 2.1.2.2). Τέλος, για τις συνθήκες που περιείχαν χιτοζάνη, αυτή προστέθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο στην ενότητα 2.1.2.2.

Ακολούθησε προετοιμασία των συμπλόκων dsRNA-χιτοζάνης, όπως αναφέρεται στην ενότητα 2.1.2.3. Τέλος, στα διαλύματα όλων των συνθηκών προστέθηκε Buffer 1 με τελικό όγκο 1mL.

2.1.3.4. Εφαρμογή των διαλυμάτων

Τα διαλύματα εφαρμόστηκαν στα περιβαλλοντικά δείγματα εδάφους (40g/βιολογική επανάληψη) με την μέθοδο τους ψεκασμού (Εικόνα 9). Αυτός ο τρόπος εφαρμογής επιλέχθηκε, ώστε να προσομοιάζονται οι πραγματικές συνθήκες εφαρμογής εντομοκτόνου στις καλλιέργειες. Σε κάθε βιολογική επανάληψη ψεκάστηκε 1mL διαλύματος εφαρμογής. Πραγματοποιήθηκαν 4 συνολικά εφαρμογές τις εξής ημέρες: d0, d7, d14, d21.

Οι διαδικασίες 2.1.3.3. και 2.1.3.4 επαναλήφθηκαν πριν από κάθε εφαρμογή.



Εικόνα 9: Εφαρμογή dsRNA με ψεκασμό.

2.1.3.5. Ρύθμιση της υγρασίας

Κάθε επτά μέρες και πριν από κάθε δειγματοληψία, τα βάζα ζυγίζονταν, το μεικτό βάρος καταγραφόταν και η απώλεια βάρους συμπληρωνόταν με dH₂O, ώστε η υγρασία να επαναφέρεται στο αρχικό επιθυμητό επίπεδο (30% της υδατοχωριτικότητας του συγκεκριμένου εδάφους).

2.1.3.6. Δειγματοληψία

Πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία σε 6 χρονικές στιγμές:

t0	Αμέσως μετά την 1 ^η εφαρμογή-έναρξη του πειράματος
t7	7 μέρες μετά την 1 ^η εφαρμογή
t14	7 μέρες μετά την 2 ^η εφαρμογή (14 ημέρες μετά την έναρξη του πειράματος)
t21	7 μέρες μετά την 3 ^η εφαρμογή (21 ημέρες μετά την έναρξη του πειράματος)
t28	7 μέρες μετά την 3 ^η εφαρμογή (21 ημέρες μετά την έναρξη του πειράματος)
t40	19 μέρες μετά την 4 ^η εφαρμογή (40 ημέρες μετά την έναρξη του πειράματος)

Σε κάθε δειγματοληψία, από κάθε βιολογική επανάληψη του πειράματος λαμβάνονταν 0.3g εδάφους σε 2mL tube και αποθηκεύονταν στους -80°C για ανάλυση RNA και ίδια ποσότητα εδάφους η οποία αποθηκεύονταν στους -20°C για ανάλυση DNA (τα δείγματα αυτά δεν αναλύθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία).

2.1.4. Απομόνωση RNA από τα δείγματα εδάφους

Στα δείγματα εδάφους (που βρίσκονται σε 2mL tubes) προστέθηκαν 0.6mL Buffer1, ενώ οι παρακάτω διαδικασίες πραγματοποιήθηκαν για όλα τα εδαφικά δείγματα (καμπύλης ποσοτικοποίησης και διερεύνησης υπολειματικότητας).

Σε όλα τα δείγματα, αρχικά, πραγματοποιήθηκε ανάδευση σε vortex για 1 λεπτό και επώαση για 2 ώρες σε περιστρεφόμενο τροχό (rotating wheel) σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στα 21,100xg για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και λήφθηκε το υπερκείμενο υδατικό διάλυμα A (ονομάστηκε εδαφικό διάλυμα-soil solution). Ακολούθησε αραιώση 1:100 των soil solutions σε Buffer3 (3 mM borate, 10 mM NaCl, 12 mM phosphate, pH 7.0) και αποθηκεύτηκαν στους -20°C.

Σε κάθε ίζημα, αφού αφαιρέθηκε το soil solution, προστέθηκαν 0.875 mL Buffer2 (pH 11.0) και ακολούθησε επώαση για 4 ώρες στον περιστρεφόμενο τροχό στους 4°C. Στη συνέχεια, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στα 21,100xg για 5 λεπτά στους 4°C και λήφθηκε το υπερκείμενο υδατικό διάλυμα B (ονομάστηκε εδαφικό εκχύλισμα-soil extract). Στα soil extracts προστέθηκε HCL 0.1M υπό ανάδευση μέχρι την εξισορρόπηση του pH στην τιμή 7.0.

Στη συνέχεια, στα soil extracts προστέθηκε ίση ποσότητα φαινόλης: χλωροφόρμιου: ισαμυλικής αλκοόλης (PCI, 25:24:1, v/v, AppliChem, A2279) σε 2 mL tube. Ακολούθησε έντονη ανάδευση σε vortex για 20 δευτερόλεπτα και φυγοκέντρηση στα 21,100xg για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα, μεταφέρθηκε η υδατική φάση σε νέο 2 mL tube, προστέθηκαν 0.45 mL κρύας ισοπροπανόλης και τα tubes αποθηκεύτηκαν στους -20°C overnight. Την επόμενη ημέρα, τα soil extracts φυγοκεντρήθηκαν στα 21,100xg για 5 λεπτά στους 4°C και ακολούθησε πλύση με αιθανόλη δύο φορές. Πιο συγκεκριμένα, στα δείγματα προστέθηκαν 0.5 mL 70% αιθανόλης, φυγοκεντρήθηκαν στα 21,100xg για 5 λεπτά στους 4°C και απορρίφθηκε το υπερκείμενο. Μετά και από την 2^η πλύση, οι πελλέτες διαλυτοποιήθηκαν σε 100μL Buffer 3.

2.1.5. Καθαρισμός του dsRNA με το RNeasy PowerClean Pro Cleanup Kit

Το QIAGEN RNeasy PowerClean Pro Cleanup Kit (QIAGEN) χρησιμοποιήθηκε για τον περαιτέρω καθαρισμό του απομονωμένου RNA. Το συγκεκριμένο kit καθαρισμού αφαιρεί το καφέ χρώμα των δειγμάτων, καθώς και οποιεσδήποτε άλλες ουσίες που μπορεί να αναστέλλουν την PCR, όπως πολυσακχαρίτες, πολυφαινόλες, φουλβικά οξέα και χρωστικές (Πίνακας 2). Το RNA προσδένεται σε μεμβράνη πυριτίου και στη συνέχεια εκπλένεται και εκλούεται από τη μεμβράνη.

Τα extracts καθαρίστηκαν με χρήση του συγκεκριμένου kit, ακολουθώντας τις οδηγίες και τα βήματα του κατασκευαστή. Στο τελικό στάδιο, τα δείγματα soil extracts αποθηκεύτηκαν στους -80°C και για χρήση σε επόμενες πειραματικές διαδικασίες, πραγματοποιήθηκε αραιώση 1:10 σε Buffer 3.

RNeasy PowerClean Pro Cleanup Kit	
Συστατικά	Τρόπος δράσης
MB RNA Spin Columns	Ειδική σύνδεση του RNA με τη μεμβράνη πυριτίου της στήλης.
Solution CU	Αποσύνδεση RNA από ουσίες-αναστολείς PCR.
Solution IR	Καθίζηση οργανικών και ανόργανων υλικών του εδάφους εκτός του RNA (όπως πρωτεΐνες και χουμικές ουσίες).
Solution SB	Περιέχει υψηλές συγκεντρώσεις αλάτος, που παρουσία 100% αιθανόλης επιτρέπουν τη σύνδεση του RNA με το πυρίτιο της στήλης.
Solution RW	Διάλυμα με βάση την αιθανόλη που απομακρύνει υπολείμματα αλάτων, χουμικών ουσιών και άλλων ρύπων του εδάφους.
RNaseFree Water	Με τον διερχομό του από τη μεμβράνη το RNA απελευθερώνεται, καθώς παραμένει συνδεδεμένο στη στήλη μόνο παρουσία υψηλής συγκέντρωσης αλάτων.

Πίνακας 2: Τα αντιδραστήρια του QIAGEN RNeasy PowerClean Pro Cleanup Kit.

2.1.6. Μοριακή μέθοδος για την ανάλυση του dsRNA με Luna RT-qPCR

Η Αντίστροφη Μεταγραφή - Ποσοτική PCR (Reverse Transcription - quantitative PCR, RT-qPCR) είναι μια τεχνική που χρησιμοποιείται για την ποσοτικοποίηση του RNA μέσω της μετατροπής του σε συμπληρωματικό DNA (cDNA) και στη συνέχεια της ενίσχυσής του μέσω qPCR (León-Sosa et al., 2022).

Για την ποσοτικοποίηση του dsRNA σε αυτό το πείραμα χρησιμοποιήθηκε το **Luna Universal One-Step RT-qPCR Kit** (New England Biolabs, NEB #E3005S). Το kit αυτό επιτρέπει την πραγματοποίηση των αντιδράσεων της αντίστροφης μεταγραφής (RT) και της qPCR σε ένα βήμα (one-step). Σε μία μόνο αντίδραση, το RNA μετατρέπεται πρώτα σε cDNA από το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση και στη συνέχεια μια DNA-εξαρτώμενη DNA πολυμεράση ενισχύει το cDNA, επιτρέποντας την ποσοτικοποίηση μέσω qPCR ανάλυσης.

Το Luna Universal One-Step RT-qPCR Kit περιλαμβάνει:

- Luna Universal One-Step Reaction Mix, το οποίο περιέχει: Hot-Start *Taq* DNA πολυμεράση, dNTPs, TaqMan probes και όλα τα απαραίτητα συστατικά ρυθμιστικού διαλύματος. Τα TaqMan probes είναι εξειδικευμένες φθορίζουσες ανιχνευτικές αλληλουχίες DNA (probes) που χρησιμοποιούνται σε τεχνικές qPCR για την ειδική ανίχνευση και ποσοτικοποίηση ενός στόχου DNA ή cDNA. Το Reaction Mix διαθέτει επίσης μια μη φθορίζουσα ορατή χρωστική για την παρακολούθηση της ρύθμισης της αντίδρασης. Αυτή η ορατή χρωστική έχει χρώμα μπλε και δεν επικαλύπτεται φασματικά με την παρεχόμενη χρωστική δέσμευσης dsDNA και δεν παρεμβαίνει στην ανίχνευση σε πραγματικό χρόνο.
- Το Luna WarmStart RT Enzyme Mix περιέχει Luna WarmStart Reverse Transcriptase καθώς και Murine RNase Inhibitor για να βοηθήσει στην πρόληψη της υποβάθμισης του RNA. Η αντίστροφη μεταγραφάση είναι σχεδιασμένη να ενεργοποιείται σε υψηλότερες θερμοκρασίες (μεγαλύτερες από 50°C), επιτρέποντας την αποφυγή μη ειδικών αντιδράσεων κατά την προετοιμασία των αντιδράσεων σε θερμοκρασία δωματίου.

Για την Luna RT-qPCR αντίδραση, από κάθε δείγμα (soil solution 1:100 ή soil extract 1:10) μεταφέρθηκαν 38μL σε νέο tube και προστέθηκαν 5μL forward primer (5'- GAT-GTA-GCG-GCT-CTT-GTC-GT-3', 10μM) και 5μL reverse primer (5'-TGA CTC CTT GAT GCC TTG GG-3', 10μM) στο καθένα. Τα primer-

sample μείγματα επωάστηκαν στους 95°C για 5 λεπτά και έπειτα στους -20°C για 15 λεπτά. Στη συνέχεια, για κάθε αντίδραση προετοιμάστηκαν οι ποσότητες των αντιδραστηρίων από το kit και προστέθηκαν τα δείγματα με τις ποσότητες που αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3).

Luna reaction mix (2X)	5 μ L
Enzyme mix (20X)	0.5 μ L
Primers-sample mix	4.5 μ L

Πίνακας 3: Συστατικά της αντίδρασης Luna RT-qPCR

Η αντίδραση Luna RT-qPCR περιλαμβάνει την ενεργοποίηση της αντίστροφης μεταγραφάσης (95°C για 10 λεπτά), την αποδιάταξη των κλώνων (95°C για 1 λεπτό), τον υβριδισμό των εκκινητών (primers) στους αποδιαταγμένους κλώνους (95°C για 10 δευτερόλεπτα) και τη σύνθεση νέων μορίων DNA (62°C για 30 δευτερόλεπτα). Η παραπάνω διαδικασία (εκτός του πρώτου βήματος) επαναλήφθηκε για 40 κύκλους. Στο τέλος των αντιδράσεων πραγματοποιήθηκε ανάλυση της καμπύλης τήξης των προϊόντων (melting curve analysis) (55-95°C με βήμα 0.05-0.5°C), με στόχο την επιβεβαίωση της ειδικότητας των προϊόντων ενίσχυσης. Για κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκαν τρεις τεχνικές επαναλήψεις κατά την ενίσχυση με RT-qPCR. Σε πίνακες και διαγράμματα στην ενότητα των Αποτελεσμάτων.

2.2. Κεφάλαιο 2°

2.2.1. Λήψη δειγμάτων

Από ένα φυτό κουρκουάτ παρελήφθησαν οι εξής ιστοί: βλαστός (διαμέτρου 4 χιλ), μίσχος φύλλου (διαμέτρου 2 χιλ), μίσχος καρπού (διαμέτρου 2 χιλ), και εξωκάρπιο/επιδερμίδα καρπού. Συνολικά, πάρθηκαν 2 δείγματα από κάθε ιστό.

2.2.2. Προετοιμασία δειγμάτων

Το πρωτόκολλο περιλαμβάνει τη βύθιση των δειγμάτων σε 4% παραφορμαλδεΰδη (PFA σε PBS 1X, pH 7.4) στους 4°C για 2h για τα δείγματα από βλαστό και μίσχους φύλλου και καρπού και για 1h για αυτά της επιδερμίδας. Η αναλογία ιστού:διαλύτη είναι τουλάχιστον 1:50 (Howat & Wilson, 2014). Τα δείγματα στη συνέχεια εκπλύθηκαν με 1X PBS (4°C) δύο φορές, με σκοπό την αποφυγή της υπερβολικής μονιμοποίησης του ιστού και άρα της αποδόμησής του.

Στη συνέχεια ακολούθησε μια σειρά βημάτων τα οποία πραγματοποιήθηκαν σε μια αυτοματοποιημένη ιστοκινέτα (MTP, Slee Medical) (Εργαστήριο Γενετικής,

Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας (BIOZ) του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας). Αρχικά, τα δείγματα αφυδατώθηκαν σε μια σειρά διαλυμάτων, αυξανόμενης συγκέντρωσης αιθανόλης (70% για 30min, 95% για 1h, 100% για 2h). Ακολούθησε η αντικατάσταση της αιθανόλης με διαδοχικές πλύσεις με ξυλόλη (ethanol:xylene 1:1 για 1h, xylene για 2.5h). Αυτό το βήμα αφαιρεί επιπλέον μια ποσότητα λίπους από τον ιστό, που διαφορετικά θα λειτουργούσε ως εμπόδιο στον εμποτισμό του ιστού με παραφίνη. Στο τελικό βήμα του εμποτισμού με παραφίνη, το ξυλένιο αντικαθίσταται πλήρως από υγρή παραφίνη (xylene:paraffin 1:1 για 2h, paraffin για 2h).

Ο εγκλεισμός του ιστού πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας ειδικά καλούπια από ανοξείδωτο χάλυβα, τα οποία πληρώθηκαν με υγρή παραφίνη (58°C) σε μηχανήμα ιστοκινέτας. Ο ιστός προσανατολίστηκε με τον επιθυμητό τρόπο, τοποθετήθηκε στο καλούπι και αποθηκεύτηκε στους -20°C ολονύχτια, έτσι ώστε να στερεοποιηθεί η παραφίνη. Τέλος, ο κύβος παραφίνης με τον εγκλεισμένο ιστό τοποθετήθηκε στην υποδοχή της μικροτόμου, με τον κατάλληλο προσανατολισμό, και παράχθηκαν εγκάρσιες τομές (8μm) για κάθε δείγμα. Οι τομές εκπτύχθηκαν σε υδατόλουτρο (στους 47°C για 10 λεπτά), στη συνέχεια επικολλήθηκαν σε αντικειμενοφόρο πλάκα, αφυδατώθηκαν σε ξηραντήρα στους 62°C (15 λεπτά) για να λιώσουν τα υπολείμματα παραφίνης και στη συνέχεια εμβαπτίστηκαν σε ξυλόλη (15 λεπτά) (Georgiou et al., 2016). Στη συνέχεια, τα δείγματα αφέθηκαν να στεγνώσουν για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (RT), πάνω τους τοποθετήθηκαν καλυπτρίδες, με ενδιάμεσο μέσο σταθεροποίησης και μονιμοποίησης (DPX, 255254, AppliChem), και τέλος αφέθηκαν να στεγνώσουν και να πήξουν Ο/Ν στο σκοτάδι, έτσι ώστε να γίνει εφικτή η παρατήρησή τους στο μικροσκόπιο την επόμενη μέρα.

2.2.3. Παρατήρηση των δειγμάτων στο συνεστιακό μικροσκόπιο και διερεύνηση αυτοφθορισμού σε μήκη κύματος 488 και 560 nm,

Οι ιστοί απεικονίστηκαν με χρήση συνεστιακού μικροσκοπίου σάρωσης τύπου LSCM (Zeiss LSM 800). Με σκοπό την επιλογή του κατάλληλου πρωτοκόλλου για την ανίχνευση σημασμένου dsRNA (επόμενη σειρά πειραμάτων όχι στα πλαίσια της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας) διερευνήθηκε ο αυτοφθορισμός του κουκουάτ στα μήκη κύματος 488 και 560 nm,

Το CY3 διεγείρεται βέλτιστα στα ~550 nm και εκπέμπει στα ~570 nm, χρησιμοποιώντας το λέιζερ 561 (560–620 nm φασματικό παράθυρο). Το ChromaTide™ Alexa Fluor™ 488-5-UTP απαιτεί πηγή διέγερσης στο κυανό τμήμα του φάσματος, καθώς έχει μέγιστο διέγερσης γύρω στα 495 nm. Το λέιζερ 488 είναι ιδανικό για την ανίχνευσή του, καθώς ευθυγραμμίζεται σχεδόν

απόλυτα με το μέγιστο διέγερσης, εξασφαλίζοντας αποτελεσματική διέγερση και ισχυρό φθορισμό. Η εκπομπή φθορισμού (~519 nm) καταγράφεται ως έντονο πράσινο σήμα. Έτσι, το λέιζερ 488 αποτελεί την καταλληλότερη επιλογή για την ανίχνευση του σε επόμενες εφαρμογές απεικόνισης του dsRNA που έχεισημανθεί με αυτή τη χρωστική.

Για την ανάλυση των εικόνων χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό ImageJ.

3. Αποτελέσματα

3.1. Κεφάλαιο 1^ο

3.1.1. Μέρος 1ο: Κατασκευή πρότυπης καμπύλης ποσοτικοποίησης dsRNA σε εδαφικά δείγματα

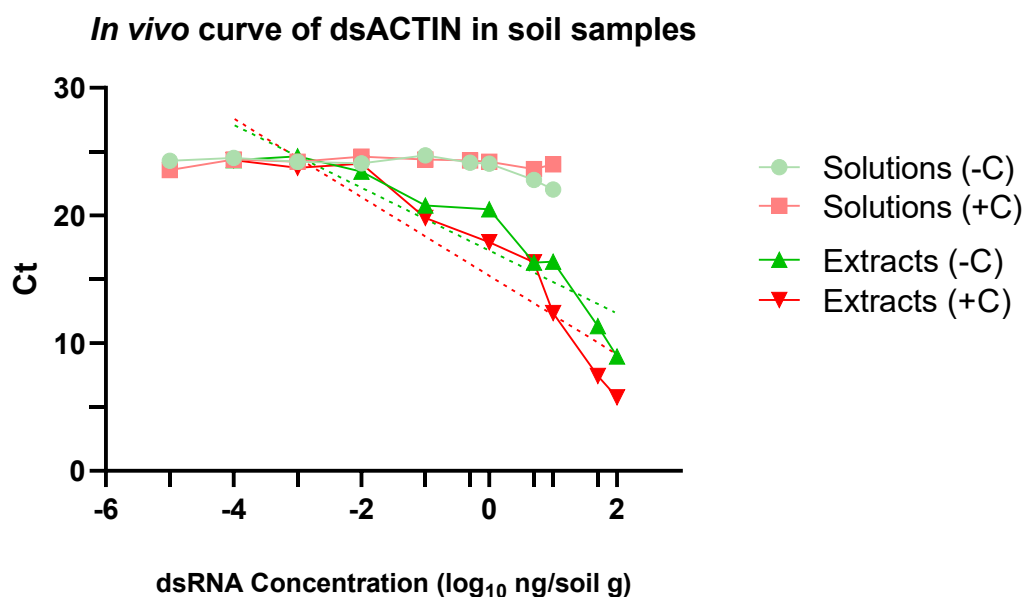
Τα εδαφικά δείγματα με διαφορετικές συγκεντρώσεις dsRNA αναλύθηκαν με LUNA RT-qPCR, με σκοπό τον εντοπισμό του κατώτατου ορίου ανίχνευσης της συγκεκριμένης μεθόδου, καθώς και την αντιστοιχία των κύκλων ανίχνευσης (Ct) σε συγκέντρωση dsRNA (ng per g of soil). Αυτό βασίζεται στην παραδοχή ότι το στο dsRNA, κατά τη χρονική στιγμή της εφαρμογής δεν πραγματοποιείται αποδόμηση, αφού η απομόνωσή του από το έδαφος ξεκινά αμέσως μετά την εφαρμογή του σε αυτό, στον ίδιο χρόνο 0. Οι αραιώσεις στα πρώτα (Soil solutions, 1:100) και στα δεύτερα κλάσματα (Soil extracts, 1:10) πραγματοποιήθηκαν με σκοπό την αραιώση ανασταλτικών ουσιών που πιθανότατα εντοπίζονται στα διαλύματα αυτά, σύμφωνα με τους (Zhang et al., 2020). Στον πίνακα 1 παρουσιάζονται οι αρχικές δόσεις του dsRNA (Στήλη 1), ενώ έχει υπολογιστεί και η πραγματική συγκέντρωση του dsRNA ύστερα από τις αραιώσεις που προαναφέρθηκαν (Στήλες 2 και 5), και η οποία χρησιμοποιήθηκε στις παρακάτω δοκιμασίες. Αναγράφονται, επίσης, οι κύκλοι ανίχνευσης της RT-qPCR των κλασμάτων solutions και extracts, χωρίς και με παρουσία χιτοζάνης. Το κατώτατο όριο ανίχνευσης με αυτήν την μέθοδο φαίνεται να είναι η συγκέντρωση 10^{-1} ng dsACTIN/g εδάφους με τιμή κύκλου 24,72 για τα solutions χωρίς χιτοζάνη και 10^{-2} ng dsACTIN/g εδάφους με τιμή κύκλου 24,62 για τα solutions με χιτοζάνη. Για τα extracts χωρίς χιτοζάνη, το κατώτατο όριο ανίχνευσης είναι 10^{-3} ng dsACTIN/g εδάφους με τιμή κύκλου 24,63 ενώ για τα extracts με χιτοζάνη είναι 10^{-2} ng dsACTIN/g εδάφους με τιμή κύκλου 24,06. Για τη συγκέντρωση 10^3 ng dsACTIN/g εδάφους με χιτοζάνη στα solutions παρατηρείται αυξημένος κύκλος συγκριτικά με την αμέσως χαμηλότερη συγκέντρωση, γεγονός που μπορεί να οφείλεται στην επαγωγή της προσρόφησης του dsRNA στα εδαφικά σωματίδια, με αποτέλεσμα την παραμονή του στο έδαφος μετά την πρώτη επώαση. Η θεωρία αυτή επιβεβαιώνεται με τα αποτελέσματα των extracts, όπου η ίδια συγκέντρωση dsRNA παρουσιάζει διαφορά κύκλου μεταξύ των δειγμάτων χωρίς και με

χιτοζάνη, με τη παρουσία χιτοζάνης να έχει χαμηλότερο κύκλο ανίχνευσης, άρα μεγαλύτερη ποσότητα dsRNA.

Αρχική Δόση ng dsACTIN/soil g	Κύκλος ανίχνευσης στην RT-qPCR (Ct)					
	Soil solutions 1:100			Soil extracts 1:10		
	Συγκέντρωση dsRNA	- C	+C	Συγκέντρωση dsRNA	- C	+C
[1]	[2]	[3]	[4]	[5]	[6]	[7]
(0,001) 10 ⁻³	10 ⁻⁵	24,29	23,56	10 ⁻⁴	24,33	24,34
(0,01) 10 ⁻²	10 ⁻⁴	24,51	24,38	10 ⁻³	24,63	23,73
(0,1) 10 ⁻¹	10 ⁻³	24,21	24,22	10 ⁻²	23,43	24,06
(1) 10 ⁰	10 ⁻²	24,08	24,62	10 ⁻¹	20,79	19,80
10 ¹	10 ⁻¹	24,72	24,38	10 ⁰ =1	20,48	17,92
(50) 5*10 ¹	5*10 ⁻¹	24,14	24,30	5,00	16,30	16,34
(100) 10 ²	10 ⁰ =1	24,06	24,22	10,00	16,39	12,37
(500) 5*10 ²	5*10 ⁰ =5	22,78	23,65	50,00	11,35	7,43
(1000) 10 ³	10	22,03	24,00	100,00	8,96	5,75

Πίνακας 1: Κύκλοι ανίχνευσης της RT-qPCR των δειγμάτων της καμπύλης ποσοτικοποίησης

Στο Διάγραμμα 1 παρουσιάζεται η *in vivo* καμπύλη ανίχνευσης του dsACTIN σε δείγματα εδάφους, μέσω RT-qPCR σε σχέση με την συγκέντρωση του dsACTIN (σε λογαριθμική κλίμακα log□□ ng/g εδάφους). Στον κάθετο άξονα απεικονίζονται οι τιμές των κύκλων ανίχνευσης (Ct), ενώ στον οριζόντιο η συγκέντρωση του dsRNA. Αναλυτικότερα, στο διάγραμμα απεικονίζονται τέσσερις καμπύλες (μία για κάθε κατηγορία κλάσματος που παραλήφθηκε): solutions χωρίς χιτοζάνη (ανοιχτό πράσινο), solutions με χιτοζάνη (ροζ), extracts χωρίς χιτοζάνη (πράσινο), extracts χωρίς χιτοζάνη (κόκκινο). Στον πίνακα 2 απεικονίζονται οι εξισώσεις των ευθειών των 4 καμπύλων, καθώς και οι τιμές R².



Διάγραμμα 1: Πρότυπες καμπύλες ποσοτικοποίησης dsACTIN σε έδαφος

	Εξίσωση συγκέντρωσης dsRNA	R ²
Solution -C	$Y = -0,2678 \cdot X + 23,46$	0,4201
Solution +C	$Y = 0,002075 \cdot X + 24,15$	0,0001584
Extract -C	$Y = -2,461 \cdot X + 17,26$	0,8508
Extract +C	$Y = -3,080 \cdot X + 15,29$	0,8598

Πίνακας 2: Εξισώσεις και R² των πρότυπων καμπύλων

3.1.2. Μέρος 2ο: Διερεύνηση της υπολειμματικότητας του dsRNA σε εδαφικά δείγματα μετά από επαναλαμβανόμενες εφαρμογές

Για την αξιολόγηση της παρουσίας dsACTIN στα εδαφικά δείγματα, πραγματοποιήθηκε εφαρμογή του dsACTIN και ανάλυση με RT-qPCR. Κατά το πείραμα πραγματοποιήθηκε εφαρμογή επαναλαμβανόμενης δόσης 15 ng dsACTIN/g εδάφους τέσσερις φορές (μία ανά επτά μέρες). Οι χρονικές στιγμές της δειγματοληψίας ήταν οι εξής: 0 (αμέσως μετά την 1^η εφαρμογή), 7 (επτά μέρες μετά την 1^η εφαρμογή), 14 (7 μέρες μετά την 2^η εφαρμογή), 21 (7 μέρες μετά την 3^η εφαρμογή), 28 (7 μέρες μετά την 4^η εφαρμογή) και 40 (19 μέρες μετά την 4^η εφαρμογή).

Ο πειραματικός σχεδιασμός στο πρώτο κεφάλαιο της παρούσας εργασίας περιλάμβανε τέσσερις επαναλαμβανόμενες εφαρμογές με dsRNA, σε διάστημα ενός μήνα, μία ανά επτά μέρες. Το μοτίβο των εφαρμογών αλλά και η δόση που εφαρμόστηκε επιλέχθηκαν, με βάση τη συνιστώμενη δοσολογία του Ledprona. Η εν λόγω εταιρεία προτείνει την εφαρμογή 10 g dsRNA/hectar (ισούται με 10 g ανά 10 στρέμματα = 1 g ανά 1000 m²). Στοχεύοντας στο βάθος των 5 cm του

εδάφους, $1000 \text{ m}^2 \cdot 0.05 \text{ m} = 50 \text{ m}^3$. Λαμβάνοντας ως παραδοχή την πυκνότητα του εδάφους (bulk density) ως $1.5 \text{ tn/m}^2 \cdot 50 \text{ m}^3 = 75 \text{ tn}$, η δοσολογία είναι $1 \text{ g dsRNA}/75 \text{ tn} = 1 \text{ g dsRNA}/75,000 \text{ kg} = 0.014 \text{ mg/kg} = 14 \text{ µg/kg} = 14 \text{ ng/g soil}$. Η εταιρεία προτείνει την εφαρμογή $14 \text{ ng dsRNA /g εδάφους}$, μία φορά ανά επτά μέρες, με μέγιστη ποσότητα τις τέσσερις εφαρμογές.

Στον πίνακα 3 παρουσιάζονται οι τιμές των κύκλων ανίχνευσης των solutions για κάθε δόση ng dsACTIN/g εδάφους (0 χωρίς χιτοζάνη, 0 με χιτοζάνη, 15 χωρίς χιτοζάνη, 15 με χιτοζάνη) στην εκάστοτε ημέρα δειγματοληψίας, ενώ στον Πίνακα 4, οι κύκλοι ανίχνευσης των extracts.

Οι τιμές των κύκλων ανίχνευσης (Ct) εφαρμόστηκαν στις εξισώσεις των πρότυπων καμπυλών ανίχνευσης dsRNA (Ενότητα 3.1, Πίνακας 2), με σκοπό τη διερεύνηση της περιβαλλοντικής τύχης του dsRNA, κατά την πάροδο του χρόνου. Τα δείγματα του χρόνου δειγματοληψίας των 21 ημερών δεν αναλύθηκαν σε αυτή τη φάση των πειραμάτων.

Δόση Ημέρα	0	0+	15	15+
0	28,17	28,31	21,09	27,46
7	28,10	27,92	25,77	20,69
14	18,72	27,24	22,80	20,10
28	28,49	27,75	20,34	26,99
40	27,68	26,00	21,06	26,58

Πίνακας 3:

Κύκλος ανίχνευσης του dsRNA των Soil Solutions με Luna RT-qPCR

Δόση Ημέρα	0	0+	15	15+
0	21,99	23,06	14,19	13,95
7	26,20	26,35	16,10	13,87
14	24,72	26,65	15,32	13,54
28	25,84	27,06	14,62	12,42
40	23,59	22,64	15,41	12,53

Πίνακας 4: Κύκλος ανίχνευσης του dsRNA των Soil Extracts με Luna RT-qPCR

Στον πίνακα 5 και 6 παρουσιάζονται οι δόσεις dsRNA που εφαρμόστηκαν, οι ημέρες δειγματοληψίας των δειγμάτων που αναλύθηκαν (Στήλη 1), οι τιμές των κύκλων ανίχνευσης (Στήλες 2, 5, 8 και 11) και η αντικατάστασή τους στις εξισώσεις των πρότυπων καμπυλών (Στήλες 3, 6, 9 και 12), και τέλος η συγκέντρωση dsRNA που ανιχνεύεται τελικά στο κάθε δείγμα (Στήλες 4, 7, 10 και 13).

Τα αποτελέσματα (Πίνακας 5) δείχνουν πως οι κύκλοι ανίχνευσης της RT-qPCR των solutions βρίσκονται εκτός του εύρους της καμπύλης. Πιθανώς να αντιστοιχούν σε συγκέντρωση dsRNA χαμηλότερη από το όριο ανίχνευσης της συγκεκριμένης μεθόδου αλλά από τις χαμηλότερες τιμές Ct που καταγράφηκαν στις εφαρμογές των 15ng/ g εδάφους, συμπεραίνουμε ότι η πρότυπη καμπύλη των δειγμάτων solution θα πρέπει να επαναληφθεί με μικρότερη αραίωση των αρχικών δειγμάτων RNA.

Αναφορικά με τα extracts (Πίνακας 6), παρατηρούμε πως οι δόσεις 0 ng dsACTIN/g εδάφους (χωρίς ή με χιτοζάνη) είναι πάρα πολύ κοντά στην τιμή μηδέν (Στήλες 4 και 7). Επομένως, επιβεβαιώνεται η ευαισθησία και η ακρίβεια της μεθόδου. Συνεχίζοντας με τη δόση 15 ng dsACTIN/g εδάφους χωρίς χιτοζάνη, κατά τη χρονική στιγμή 0 ανιχνεύονται 17,78 ng/g dsRNA τα οποία αποικοδομούνται σχεδόν εξ ολοκλήρου (t7: 2,95 ng/g) σε επτά μέρες. Αντίστοιχα, με την εφαρμογή της επόμενης δόσης και το πέρας των επτά ημερών, το dsRNA αποικοδομείται, αλλά όχι πλήρως (t14: 6,14 ng/g). Μέχρι και την τέταρτη (τελευταία) εφαρμογή παρατηρείται σταθερός ρυθμός αποικοδόμησης του dsRNA (~ 15 ng/7 days), ενώ από την ημέρα 28 έως την ημέρα 40 που δεν έχει εφαρμοστεί επιπλέον ποσότητα dsRNA, το dsRNA αποικοδομείται πολύ πιο αργά, αφήνοντας υπολείμματα στο έδαφος (t40: 5,65 ng/g). Στην παρουσία χιτοζάνης, η ανάκτηση σε t0 δεν αντιστοιχεί στην αναμενόμενη συγκέντρωση dsRNA. Αυτό πιθανώς να οφείλεται σε κάποια τεχνική αστοχία κατά τον πειραματισμό ή σε κάποια συνθήκη που επικράτησε κατά την εφαρμογή (π.χ. δέσμευση σε κολλοειδή, ταχύτατη αποικοδόμηση), η οποία δεν έχει παρατηρηθεί σε άλλα αντίστοιχα δείγματα στο πλαίσιο αυτής πτυχιακής εργασίας. Είναι, όμως αξιοπρόσεκτο, ότι αντιστοίχως τα υπολείμματα dsRNA που απομένουν στο έδαφος είναι σε χαμηλότερα επίπεδα, συγκριτικά με τα δείγματα των αντίστοιχων ημερών χωρίς χιτοζάνη (t7: (-C)2,95 ng/g, (+C) 2,89 ng/g, t14: (-C) 6,14 ng/g (+C) 3,7 ng/g, t28: (-C) 11,83 ng/g, (+C) 8,55 ng/g).

SOLUTIONS						
	ΔΟΣΗ: 0-			ΔΟΣΗ: 0+		
[1]	[2]	[3]	[4]	[5]	[6]	[7]
Χρόνος Δειγματοληψίας	Ct	x με βάση την εξίσωση solutions - c $x = -(Y - 23,46)/0,2678$	ng/g (10 ^x)	Ct	x με βάση την εξίσωση solutions +c $x = (Y - 24,15)/0,002075$	ng/g (10 ^x)
t0 (1δόση +0μέρες)	28,17	-	-	28,31	-	-
t7 (1δόση +7μέρες)	28,10	-	-	27,92	-	-
t14 (2δόσεις +14μέρες)	18,72	-	-	27,24	-	-
t21(3δόσεις +21μέρες)						

t28 (4δόσεις +28μέρες)	28,49	-	-	27,75	-	-
t40 (4δόσεις +40μέρες)	27,68	-	-	26,00	-	-
ΔΟΣΗ: 15-				ΔΟΣΗ: 15+		
	[8]	[9]	[10]	[11]	[12]	[13]
	Ct	x με βάση την εξίσωση solutions - c $X=-(Y-23,46)/0,2678$	ng/g (10 ^x)	Ct	x με βάση την εξίσωση solutions +c $x=(Y-24,15)/0,002075$	ng/g (10 ^x)
t0 (1δόση +0μέρες)	21,09	-	-	27,46	-	-
t7 (1δόση +7μέρες)	25,77	-	-	20,69	-	-
t14 (2δόσεις +14μέρες)	22,80	-	-	20,10	-	-
t21(3δόσεις +21μέρες)						
t28 (4δόσεις +28μέρες)	20,34	-	-	26,99	-	-
t40 (4δόσεις +40μέρες)	21,06	-	-	26,58	-	-

Πίνακας 5: Συγκέντρωση dsRNA στα soil solutions σύμφωνα με τις εξισώσεις των πρότυπων καμπύλων.

EXTRACTS						
	ΔΟΣΗ: 0-			ΔΟΣΗ: 0+		
[1]	[2]	[3]	[4]	[5]	[6]	[7]
Χρόνος Δειγματοληψίας	Ct	x με βάση την εξίσωση extracts - c $x=-(Y-17,26)/2,461$	ng/g (10 ^x)	Ct	x με βάση την εξίσωση extracts +c $x=-(Y-15,29)/3,080$	ng/g (10 ^x)
t0 (1δόση +0μέρες)	21,99	-1,921982934	0,0119	23,06	-2,522727273	0,0030
t7 (1δόση +7μέρες)	26,20	-3,632669646	0,0002	26,35	-3,590909091	0,0003
t14 (2δόσεις +14μέρες)	24,72	-3,031288094	0,0009	26,65	-3,688311688	0,0002
t21(3δόσεις +21μέρες)						
t28 (4δόσεις +28μέρες)	25,84	-3,486387647	0,0003	27,06	-3,821428571	0,0002
t40 (4δόσεις +40μέρες)	23,59	-2,572125152	0,0026	22,64	-2,386363636	0,0041
ΔΟΣΗ: 15-				ΔΟΣΗ: 15+		
	[8]	[9]	[10]	[11]	[12]	[13]
	Ct	x με βάση την εξίσωση extracts - c $x=-(Y-17,26)/2,461$	ng/g (10 ^x)	Ct	x με βάση την εξίσωση extracts +c $x=-(Y-15,29)/3,080$	ng/g (10 ^x)
t0 (1δόση +0μέρες)	14,19	1,247460382	17,78	13,95	0,435064935	2,72
t7 (1δόση +7μέρες)	16,10	0,471353108	2,95	13,87	0,461038961	2,89
t14 (2δόσεις +14μέρες)	15,32	0,78829744	6,14	13,54	0,568181818	3,7
t21(3δόσεις +21μέρες)			no data			no data
t28 (4δόσεις +28μέρες)	14,62	1,072734661	11,83	12,42	0,931818182	8,55
t40 (4δόσεις +40μέρες)	15,41	0,75172694	5,65	12,53	0,896103896	7,87

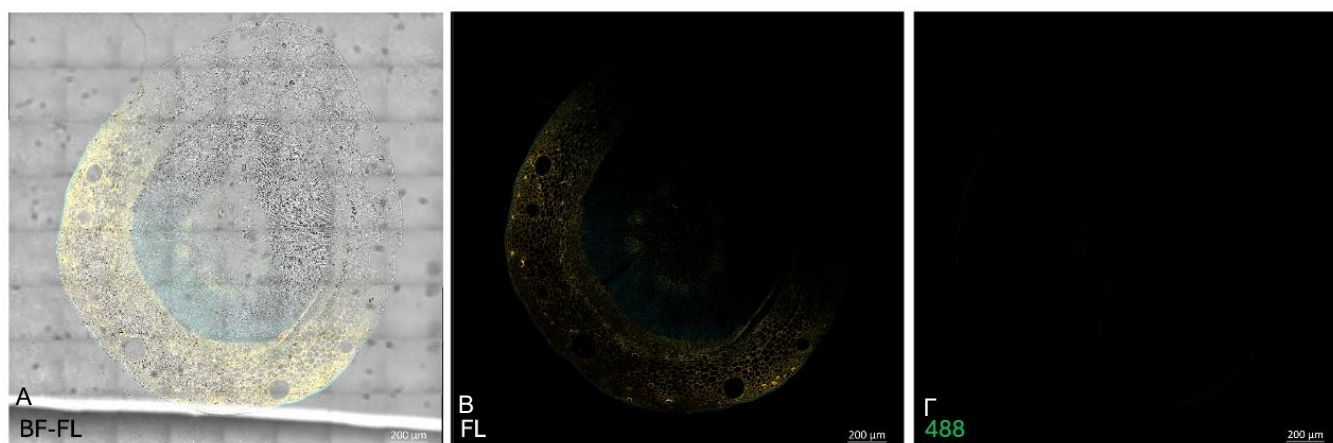
Πίνακας 6: Συγκέντρωση dsRNA στα soil extracts σύμφωνα με τις εξισώσεις των πρότυπων καμπύλων.

3.2. Κεφάλαιο 2^ο

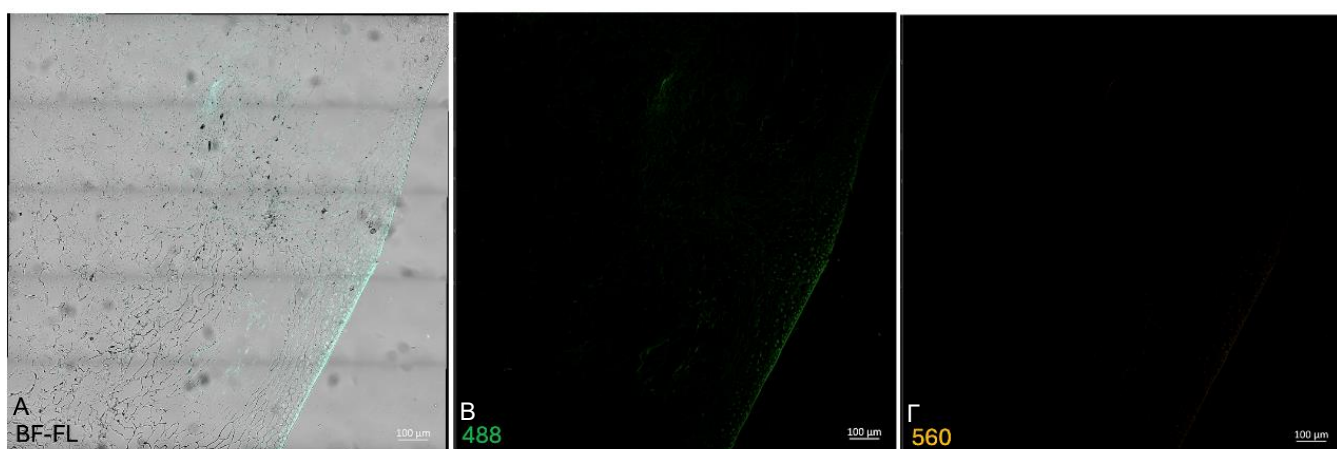
Η διερεύνηση του αυτοφθορισμού του φυτού κουμκουάτ (*Citrus japonica*), πραγματοποιήθηκε για τέσσερις διαφορετικούς ιστούς του φυτού: τον καρπό, τους μίσχους των καρπών και των φύλλων, καθώς και το βλαστό. Η παρατήρηση πραγματοποιήθηκε με χρήση συνεστιακής μικροσκοπίας (με χρήση φακού 20X) και τα αποτελέσματα έδειξαν τα παρακάτω.

Το φυτό παρουσιάζει ενδογενές φθορίζον σήμα μήκους στα 560 nm (κίτρινο) στους μίσχους των καρπών (Εικόνα 1B) και των φύλλων (Εικόνα 3B) και στο βλαστό (Εικόνα 4B). Αντίστοιχα, στα 488 nm (πράσινο), δεν ανιχνεύεται ενδογενές σήμα σε κανέναν από τους τρεις προαναφερθέντες ιστούς αντίστοιχα (Εικόνα 1Γ, 3Γ, 4Γ)

Αντιστρόφως, στον καρπό του κουμκουάτ παρατηρήθηκε ενδογενές σήμα αποκλειστικά στα 488 nm (πράσινο), ενώ στα 560 nm (κίτρινο) δεν υπήρχε ίχνος αυτοφθορισμού στον ιστό αυτό.

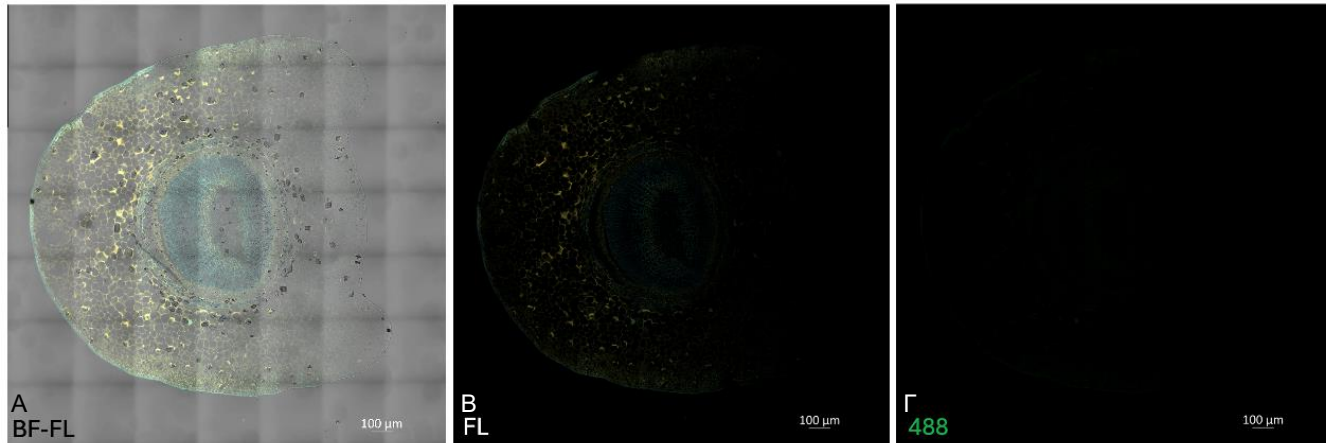


Εικόνα 3: Αυτοφθορισμός στον μίσχο καρπού στο φυτό κουμκουάτ. Α. Εικόνα αλληλοεπικάλυψης ορατού φωτός και φθορίζοντος σήματος μετά από διέγερση με λέιζερ στα 488 και 560 nm. Β. Εικόνα φθορισμού μετά από διέγερση στα 488 και 560 nm. Γ. Εικόνα φθορισμού μετά από διέγερση στα 488 nm. Παρατήρηση και λήψη στιγμιότυπου τύπου κολάζ με 20X φακό.

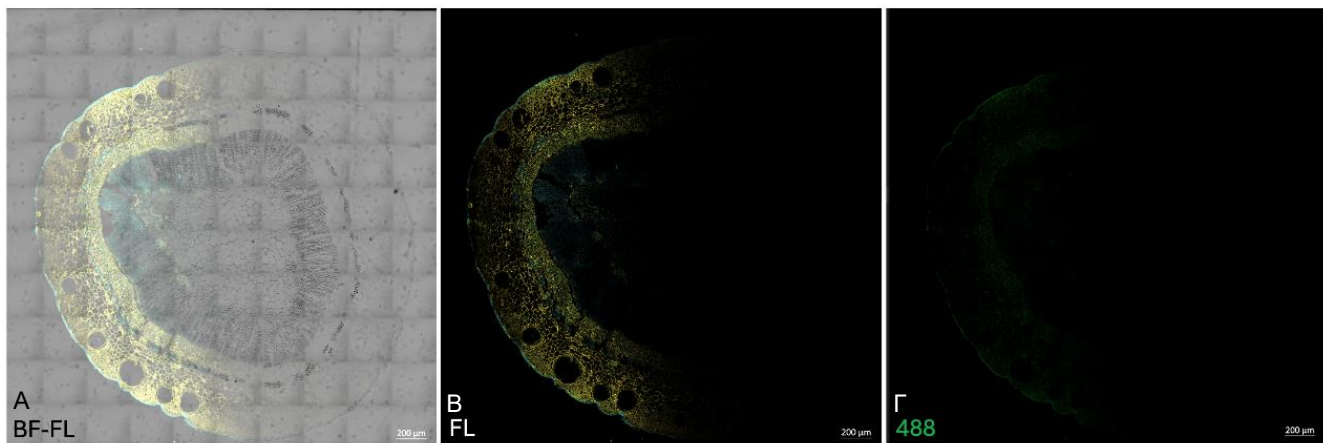


Εικόνα 4: Αυτοφθορισμός στον καρπό του φυτού κουμκουάτ. Α. Εικόνα αλληλοεπικάλυψης ορατού φωτός και φθορίζοντος σήματος μετά από διέγερση με λέιζερ στα 488 και 560 nm. Β. Εικόνα φθορισμού

μετά από διέγερση στα 488 nm. Γ. Εικόνα φθορισμού μετά από διέγερση στα 560 nm. Παρατήρηση και λήψη στιγμιότυπου τύπου κολάζ με 20X φακό.



Εικόνα 5: Αυτοφθορισμός στον μίσχο φύλλου του φυτού κουμκουάτ. Α. Εικόνα αλληλοεπικάλυψης ορατού φωτός και φθορίζοντος σήματος μετά από διέγερση με λέιζερ στα 488 και 560 nm. Β. Εικόνα φθορισμού μετά από διέγερση στα 488 και 560 nm. Γ. Εικόνα φθορισμού μετά από διέγερση στα 488 nm. Παρατήρηση και λήψη στιγμιότυπου τύπου κολάζ με 20X φακό.



Εικόνα 6: Αυτοφθορισμός στον βλαστό του φυτού κουμκουάτ. Α. Εικόνα αλληλοεπικάλυψης ορατού φωτός και φθορίζοντος σήματος μετά από διέγερση με λέιζερ στα 488 και 560 nm. Β. Εικόνα φθορισμού μετά από διέγερση στα 488 και 560 nm. Γ. Εικόνα φθορισμού μετά από διέγερση στα 488 nm. Παρατήρηση και λήψη στιγμιότυπου τύπου κολάζ με 20X φακό.

4. Συζήτηση

Η παγκόσμια γεωργία αναμένεται να αντιμετωπίσει περαιτέρω προκλήσεις εξαιτίας διαφόρων παραγόντων, όπως η αυξημένη ζήτηση για θρεπτικότερα τρόφιμα σε αναπτυσσόμενες οικονομίες, η μείωση της καλλιεργήσιμης γης εξαιτίας της αστικοποίησης και της εκτεταμένης χημικής πίεσης και υποβάθμισης των εδαφών, καθώς και οι έντονες επιπτώσεις της κλιματικής κρίσης (Hashiro & Yasueda, 2022)(Fletcher et al., 2020b). Τα έντομα ευθύνονται για σημαντικές απώλειες στην παγκόσμια γεωργική παραγωγή, φτάνοντας έως και το 40% ετησίως, θέτοντας σε κίνδυνο την επισιτιστική ασφάλεια. Η εκτεταμένη χρήση χημικών εντομοκτόνων έχει συμβάλει στον έλεγχο των παρασίτων, ωστόσο η συστηματική εφαρμογή τους έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας αλλά και στη χημική επιβάρυνση του περιβάλλοντος (L. He et al., 2022). Οι σύγχρονες γεωργικές πρακτικές απαιτούν ολοένα και περισσότερο καινοτόμες λύσεις για τη διαχείριση των παρασίτων, ενώ ταυτόχρονα είναι απαραίτητο να πληρούν τα κανονιστικά πρότυπα και τις προσδοκίες των καταναλωτών για βιώσιμη παραγωγή τροφίμων (Fusar Poli & Fontefrancesco, 2024). Με δεδομένο αυτό, κρίνεται απαραίτητη η ανάπτυξη και η εφαρμογή εναλλακτικών τροπών καταπολέμησης του εντομολογικού αυτού εχθρού (San Miguel & Scott, 2016).

Τα νέας γενιάς δυνητικά χαμηλού ρίσκου φυτοπροστατευτικά προϊόντα (LPRs), ως εναλλακτική των συνθετικών χημικών μικρομοριακών προϊόντων, κερδίζουν συνεχώς έδαφος παγκοσμίως. Σε αυτά περιλαμβάνονται φυτικά εκχυλίσματα, φερομόνες, dsRNA μόρια και μικροβιακά παρασκευάσματα. Μέχρι σήμερα, 33 δραστικές ουσίες έχουν εγκριθεί ως LRP στην Ε.Ε., ενώ προϊόντα βασισμένα σε dsRNA, φάγους πρότιστα και μικροβιώματα, αναμένονται να εγκριθούν τα επόμενα χρόνια. Ωστόσο, η Ε.Ε. καθυστερεί στην έγκριση LRP σε σύγκριση με τις ΗΠΑ, την Ινδία και την Κίνα, κυρίως λόγω του ίδιου, αυστηρού συστήματος καταχώρησης που εφαρμόζεται και στα συνθετικά φυτοφάρμακα.

Τα dsRNA φυτοπροστατευτικά προϊόντα τα οποία βασίζονται στη σίγηση γονιδίων μέσω παρεμβολής RNA (RNAi), προσφέρουν μια απόλυτα στοχευμένη προσέγγιση στον έλεγχο των παρασίτων, και μπορούν να προσφέρουν καινοτόμες στρατηγικές διαχείρισής, με την προοπτική της μειωμένης περιβαλλοντικής επίπτωσης, σε σύγκριση με τα συμβατικά χημικά μικρομοριακά φυτοφάρμακα (Ortolá & Daròs, 2024). Το RNAi είναι ένας ενδογενής, μετα-μεταγραφικός μηχανισμός ρύθμισης γονιδίων. Σύμφωνα με τον μηχανισμό αυτό, δίκλωνο RNA (dsRNA) διασπάται από μια ενδονουκλεάση σε μικρότερα τμήματα συγκεκριμένου μήκους, τα οποία στη συνέχεια φορτώνονται σε πρωτεΐνες αργοναύτες και κατευθύνονται προς το mRNA-στόχο. Η σίγηση των γονιδίων επάγεται μέσω διαφορετικών στρατηγικών ανάλογα με το μήκος των επεξεργασμένων dsRNAs (Menezes et al., 2022).

Η αγορά φυτοπροστατευτικών προϊόντων βασισμένων σε RNAi αναμένεται να παρουσιάσει ταχεία ανάπτυξη, καθώς η γεωργική βιομηχανία στρέφεται όλο και περισσότερο προς καινοτόμες και εξειδικευμένες τεχνολογίες, με στόχο την ενίσχυση της βιωσιμότητας και της αποτελεσματικότητας στον έλεγχο επιβλαβών οργανισμών. Το πρώτο εμπορευματοποιημένο, αποκλειστικά στις Η.Π.Α., παρασιτοκτόνο προϊόν βασισμένο στο RNAi, είναι το Ledprona (GreenLight Biosciences), το οποίο στοχεύει την β-υπομονάδα του προτεασώματος του δορυφόρου της πατάτας και προκαλεί την θνησιμότητα του (Narva et al., 2025; Rodrigues et al., 2021). Ωστόσο, πριν από την έγκριση των φυτοπροστατευτικών προϊόντων και στην Ε.Ε. είναι απαραίτητη η ορθή διεξαγωγή μελετών εκτίμησης του περιβαλλοντικού κινδύνου, κατά τις οποίες θα διερευνηθεί η υπολειμματικότητα νέων προϊόντων βασισμένων στο RNAi, σε διαφορετικά περιβαλλοντικά δείγματα, όπως σε φυτικούς ιστούς, και σε εδαφικά και υδατικά δείγματα (Bachman et al., 2020b; Dietz-Pfeilstetter et al., 2021).

Αναφορικά με την ανίχνευση των συγκεντρώσεων dsRNA στο έδαφος, μέχρι στιγμής, η ανίχνευση και η ποσοτικοποίησή τους διενεργείται με χρήση της τεχνολογίας QuantiGene™, η οποία βασίζεται στην υβριδοποίηση και την ενίσχυση του σήματος και όχι του ίδιου του στόχου. Αν και είναι ειδική και ευαίσθητη, απαιτεί υψηλού κόστους ειδικά σχεδιασμένες ανιχνευτικές αλληλουχίες (probes) ανά μόριο και ακριβό εξοπλισμό, και φαίνεται να έχει περιορισμούς όσον αφορά την ανάλυση προσροφημένων μορφών του dsRNA στα σωματίδια του εδάφους (Zhang 2020) (Bachman et al., 2020c).

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, αναπτύχθηκε και εφαρμόστηκε μια μέθοδος ποσοτικοποίησης του dsRNA σε εδαφικά υποστρώματα. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην RT-qPCR και χαρακτηρίζεται από υψηλή ακρίβεια και ευαισθησία, και μπορεί να αποτελέσει ένα σημαντικό εργαλείο για τον προσδιορισμό της περιβαλλοντικής τύχης dsRNA φυτοφαρμάκων, κατά την εκτέλεση αξιολογήσεων οικοτοξικολογικού κινδύνου. Το dsRNA που εφαρμόστηκε στην παρούσα μελέτη έχει ως στόχο το γονίδιο της ακτίνης του δορυφόρου της πατάτας (*Ld_actin*). Η ακτίνη, μία από τις πιο άφθονες και εξελικτικά διατηρημένες πρωτεΐνες στα ευκαρυωτικά κύτταρα, έχει καθοριστικό ρόλο στη δομή και τη δυναμική του κυτταροσκελετού των οργανισμών (Perrin & Ervasti, 2010). Το γονίδιο της ακτίνης είναι ένα πολύ συντηρημένο γονίδιο μεταξύ των οργανισμών, και το συγκεκριμένο dsRNA το οποίο στοχεύει το γονίδιο της ακτίνης του δορυφόρου της πατάτας, είναι πολύ πιθανό ότι θα επηρεάσει και οργανισμούς μη-στόχους. Έχει ήδη καταγραφεί πως η εφαρμογή dsACTIN σε προνύμφες CPB, μειώνει σημαντικά την έκφραση του γονιδίου β-ακτίνης, το οποίο έχει ως αποτέλεσμα σημαντική μείωση στην ωτοκία αλλά και την επιβίωση των προνυμφών (Basnet & Kamble, 2018; W. He et al., 2022).

Όσον αφορά την υπολειμματικότητα του εφαρμοσμένου dsRNA στο έδαφος, τα αποτελέσματα του πειράματός μας έδειξαν ότι το dsRNA παρουσιάζει έναν

σταθερό ρυθμό αποικοδόμησης σε διάστημα επτά ημερών, μετά από μια σειρά τεσσάρων επαναλαμβανόμενων εφαρμογών (15 ng dsRNA/g εδάφους), ανά μία εβδομάδα, σε συνολικό διάστημα έξι εβδομάδων. Ωστόσο, παρατηρούμε πως μια ποσότητα dsRNA παραμένει διαρκώς στο έδαφος και αργεί να αποικοδομηθεί περαιτέρω, τρεις εβδομάδες μετά από την τελευταία εφαρμογή. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με προηγούμενες μελέτες που έχουν δείξει ότι το dsRNA στο έδαφος υφίσταται αποικοδόμηση, με χρόνο ημιζωής μικρότερο των δύο ημερών, ωστόσο η ποσότητα που παραμένει διαθέσιμη (επίπεδα ng/g εδάφους) μπορεί να συνεχίζει να είναι βιολογικά δραστική για αρκετές ημέρες μετά (Bachman et al., 2020).

Παρ' όλο που τα εντομοκτόνα που βασίζονται σε τεχνολογία RNAi, μελετώνται εκτενώς τα τελευταία χρόνια, υπάρχουν επιπλέον περιοριστικοί παράγοντες ως προς την πρόσληψή τους από τους οργανισμούς στόχους. Καθώς τα γυμνά dsRNAs είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα σε αποικοδόμηση σε γεωργικά περιβάλλοντα, η σταθερότητά τους στο περιβάλλον είναι ένας σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει την αποτελεσματικότητα εφαρμογής φυτοπροστατευτικών προϊόντων, βασισμένων σε dsRNA, στο πεδίο (Mat Jalaluddin et al., 2023). Ως εκ τούτου, η ερευνητική δραστηριότητα εστιάζει στη βελτίωση της σταθερότητας των dsRNA κατά την εφαρμογή και μετά, προτείνοντας τη χρήση σταθεροποιητικών παραγόντων, όπως για παράδειγμα νανοσυστημάτων χορήγησης, ως μέσο για τον περιορισμό της περιβαλλοντικής αστάθειας του dsRNA (Luo et al., 2024). Η εφαρμογή νανοσωματιδίων συμπλόκων χιτοζάνης – dsRNA αποτελεί ένα πολλά υποσχόμενο υποπεδίο εφαρμογών, των οποίο χρήζει περαιτέρω διερεύνησης. Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετάται η επίδραση συγκεκριμένα του παράγοντα της χιτοζάνης στην ανίχνευση του dsRNA με RT-qPCR, μετά από εφαρμογή σε δείγματα εδάφους. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι ο ρυθμός αποικοδόμησης του dsRNA είναι πιο χαμηλός παρουσία χιτοζάνης.

Για τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας σε οργανισμούς-στόχους αλλά και για την αξιολόγηση του κινδύνου σε οργανισμούς μη-στόχους, χρειάζεται να ληφθούν υπόψη τόσο η διαδρομή την οποία θα ακολουθήσει το dsRNA για να εισέλθει στον οργανισμό (στόχο και μη-στόχο), όσο και ο χρόνος τον οποίο θα παραμείνει διαθέσιμο σε αυτόν. Παράγοντες όπως ο ρυθμός εφαρμογής του δραστικού συστατικού, ο χρόνος και η μέθοδος εφαρμογής, ο αριθμός των εφαρμογών και η σταθερότητα του εξωγενώς εφαρμοζόμενου dsRNA κατά την εφαρμογή, παίζουν καθοριστικό ρόλο σε τέτοιου είδους μελέτες (Romeis & Widmer, 2020). Το πείραμά μας έδειξε πως με τέσσερις επαναλαμβανόμενες εφαρμογές dsRNA στο έδαφος, ανά διαστήματα επτά ημερών, το dsRNA δεν αποικοδομείται πλήρως, ενώ παραμένουν υπολείμματα στο έδαφος δεκαεννέα ημέρες μετά την τελευταία εφαρμογή. Το γεγονός αυτό, ενδέχεται να επηρεάσει το μικροβίωμα των οργανισμών και των μικροοργανισμών του εδάφους, αφού η έκθεση σε περιβάλλον που περιέχει μικρές ποσότητες dsRNA για εκτεταμένο

χρονικό διάστημα, μπορεί να επηρεάσει τη βιοποικιλότητα, τη σχετική αφθονία ειδών (εκτοπισμός ευαίσθητων ειδών και εμπλουτισμός ανθεκτικών πληθυσμών, με αποτέλεσμα τη διαταραχή της φυσικής ισορροπίας) αλλά και διάφορες λειτουργίες των μικροοργανισμών του εδάφους (ενζυμική δραστηριότητα, αποικοδομητικές και συμβιωτικές λειτουργίες) (Un Jan Contreras & Gardner, 2022). Γι' αυτούς τους λόγους, επιπλέον αναλύσεις των μικροβιωμάτων του εδάφους που έχει δεχθεί dsRNA, αξίζει να πραγματοποιηθούν, και έχουν σχεδιαστεί για να λάβουν χώρα στο πλαίσιο επόμενης σειράς πειραμάτων. Ένας ακόμα παράγοντας που αξίζει να διερευνηθεί είναι η επίδραση του pH του εδάφους, στο ρυθμό διάσπασης του εφαρμοζόμενου dsRNA. Δεδομένου ότι τα νουκλεϊκά οξέα υδρολύονται σε αλκαλικό περιβάλλον, παρουσιάζεται ενδιαφέρον στην υπόθεση εάν σε ένα αλκαλικό έδαφος ο ρυθμός αποδόμησης του dsRNA θα επηρεαστεί. Μια νέα σειρά πειραμάτων που λαμβάνει χώρα στο Εργαστήριο διερευνάει ακριβώς αυτή την ερευνητική υπόθεση.

Όσον αφορά τη μελέτη της μετατόπισης του dsRNA στο εσωτερικό των οργανισμών στόχων ή και μη-στόχων, αυτή μπορεί να επιτευχθεί με απομόνωση του ολικού RNA και με ανάλυση RT-qPCR, ή με παρακολούθηση ενός φθορίζοντος μορίου dsRNA, με χρήση συνεστιακού μικροσκοπίου. Κατά τη δεύτερη τεχνική είναι απαραίτητη η αρχική διερεύνηση του ενδογενούς αυτοφθορισμού του εκάστοτε ιστού. Με αυτόν τον τρόπο, μπορεί στη συνέχεια να επιλεγεί το κατάλληλο πρωτόκολλο και η κατάλληλη χρωστική με την οποία θα σημειωθεί το dsRNA, με σκοπό την παρακολούθησή του στο εκάστοτε περιβαλλοντικό δείγμα. Προηγούμενες μελέτες μετατόπισης των dsRNA στο εσωτερικό φυτών έχουν δείξει τη συγκέντρωσή του εγχυόμενου dsRNA στο ξύλωμα και στον αποπλάστη του μίσχου του φύλλου, αλλά και του βλαστού, μετά από εφαρμογή στο φυτό *Nicotiana benthamiana* (Dalakouras et al., 2018). Επιπλέον, φυτά τέφρας (ash plants, φράξινο) στα οποία έχει πραγματοποιηθεί χορήγηση σημασμένου με CY3 dsRNA, παρουσιάζουν εντοπισμό του dsRNA στο ξύλωμα του βλαστού, τη ρίζα και τα φύλλα, 48 ώρες μετά την εφαρμογή (Pampolini et al., 2020b).

Στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας, διερευνήθηκε ο ενδογενής αυτοφθορισμός του φυτού κουμκουάτ, ως πρώτο βήμα και ως φυτό-ξενιστής ενός άλλου εντόμου γεωργικού ενδιαφέροντος, της μύγας Μεσογείου (*Ceratitis capitata*), στο οποίο έχουμε σκοπό να επεμβαίνουμε με εφαρμογή dsRNA που στοχεύει σημαντικό για την επιβίωση γονίδιο της μύγας, στα πλαίσια μιας άλλης παράλληλης μελέτης. Συγκεκριμένα, διερευνήσαμε τον αυτοφθορισμό του κουμκουάτ στον καρπό, σε μίσχους καρπών και φύλλων και στο βλαστό. Τα αποτελέσματα έδειξαν ενδογενή φθορισμό μήκους κύματος 560 nm (κίτρινο), στους μίσχους καρπών και φύλλων και στο βλαστό, και φθορισμό μήκους κύματος 488 nm (πράσινο) στον καρπό. Συνεπώς, για τη μελέτη της μετατόπισης ενός φθορίζοντος μορίου dsRNA στο συγκεκριμένο φυτό, το

dsRNA θα πρέπει να παρακολουθηθεί στους μίσχους καρπών και φύλλων και στο βλαστό στα 488 nm (πράσινο), και όσον αφορά τον καρπό, στα 560 nm (κίτρινο). Λαμβάνοντας υπόψιν αυτά τα αποτελέσματα, στο πλαίσιο παράλληλης μελέτης που διενεργείται, με σκοπό την παρακολούθηση ενός σημασμένου μορίου dsRNA στο εσωτερικό του κουμκουάτ, θα προχωρήσουμε με χρώση του dsRNA με ChromaTide™ Alexa Fluor™ 488-5-UTP και παρατήρηση των μίσχων των καρπών και των φύλλων και του βλαστού στα, και με ξεχωριστή χρώση του dsRNA με CY3 ξεχωριστά, και παρατήρηση των καρπών, στο συνεστιακό μικροσκόπιο.

Συνολικά, η παρούσα εργασία συμβάλλει στην ανάπτυξη και εφαρμογή νέων μεθόδων παρακολούθησης των dsRNA σε περιβαλλοντικά υποστρώματα εδάφους και φυτών, και θέτει τα θεμέλια για την αξιολόγηση της περιβαλλοντικής τους σταθερότητας και τύχης.

5. Βιβλιογραφία

2024 - Week 1 • EPA's Approval of Ledprona for Crop Protection and more.

(n.d.). Retrieved June 20, 2025, from

<https://www.useforesight.io/newsletter/epas-approval-of-ledprona-for-crop-protection-and-more>

Albright, V. C., Wong, C. R., Hellmich, R. L., & Coats, J. R. (2017). Dissipation of double-stranded RNA in aquatic microcosms. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 36(5), 1249–1253.

<https://doi.org/10.1002/ETC.3648>,

Aranaz, I., Alcántara, A. R., Civera, M. C., Arias, C., Elorza, B., Caballero, A. H., & Acosta, N. (2021). Chitosan: An Overview of Its Properties and Applications. *Polymers* 2021, Vol. 13, Page 3256, 13(19), 3256.

<https://doi.org/10.3390/POLYM13193256>

Arjunan, N., Thiruvengadam, V., & Sushil, S. N. (2024). Nanoparticle-mediated dsRNA delivery for precision insect pest control: a comprehensive review. *Molecular Biology Reports*, 51(1), 1–22.

<https://doi.org/10.1007/S11033-023-09187-6/FIGURES/2>

Armstrong, T. A., Chen, H., Ziegler, T. E., Iyadurai, K. R., Gao, A. G., Wang, Y., Song, Z., Tian, Q., Zhang, Q., Ward, J. M., Segers, G. C., Heck, G. R., & Staub, J. M. (2013). Quantification of transgene-derived double-stranded RNA in plants using the quantigene nucleic acid detection platform.

- Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(51), 12557–12564.
<https://doi.org/10.1021/JF4031458>,
- Bachman, P., Fischer, J., Song, Z., Urbanczyk-Wochniak, E., & Watson, G. (2020a). Environmental Fate and Dissipation of Applied dsRNA in Soil, Aquatic Systems, and Plants. *Frontiers in Plant Science*, 11, 508351.
<https://doi.org/10.3389/FPLS.2020.00021/BIBTEX>
- Bachman, P., Fischer, J., Song, Z., Urbanczyk-Wochniak, E., & Watson, G. (2020b). Environmental Fate and Dissipation of Applied dsRNA in Soil, Aquatic Systems, and Plants. *Frontiers in Plant Science*, 11, 508351.
<https://doi.org/10.3389/FPLS.2020.00021/BIBTEX>
- Bachman, P., Fischer, J., Song, Z., Urbanczyk-Wochniak, E., & Watson, G. (2020c). Environmental Fate and Dissipation of Applied dsRNA in Soil, Aquatic Systems, and Plants. *Frontiers in Plant Science*, 11, 21.
<https://doi.org/10.3389/FPLS.2020.00021>
- Balabanidou, V., Grigoraki, L., & Vontas, J. (2018). Insect cuticle: a critical determinant of insecticide resistance. *Current Opinion in Insect Science*, 27, 68–74. <https://doi.org/10.1016/J.COIS.2018.03.001>
- Balaško, M. K., Mikac, K. M., Bažok, R., & Lemic, D. (2020a). Modern Techniques in Colorado Potato Beetle (*Leptinotarsa decemlineata* Say) Control and Resistance Management: History Review and Future Perspectives. *Insects 2020*, Vol. 11, Page 581, 11(9), 581.
<https://doi.org/10.3390/INSECTS11090581>
- Balaško, M. K., Mikac, K. M., Bažok, R., & Lemic, D. (2020b). Modern Techniques in Colorado Potato Beetle (*Leptinotarsa decemlineata* Say) Control and Resistance Management: History Review and Future Perspectives. *Insects 2020*, Vol. 11, Page 581, 11(9), 581.
<https://doi.org/10.3390/INSECTS11090581>
- Basnet, S., & Kamble, S. T. (2018). RNA Interference of the Muscle Actin Gene in Bed Bugs: Exploring Injection Versus Topical Application for dsRNA Delivery. *Journal of Insect Science*, 18(3), 5.
<https://doi.org/10.1093/JISESA/IEY045>
- Bouafoura, R., Bastarache, P., Ouédraogo, B. C., Dumas, P., Moffat, C. E., Vickruck, J. L., & Morin, P. J. (2022). Characterization of Insecticide Response-Associated Transcripts in the Colorado Potato Beetle: Relevance of Selected Cytochrome P450s and Clothianidin. *Insects*, 13(6), 505. <https://doi.org/10.3390/INSECTS13060505/S1>
- Chen, Y. H., Cohen, Z. P., Bueno, E. M., Christensen, B. M., & Schoville, S. D. (2023). Rapid evolution of insecticide resistance in the Colorado potato

- beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. *Current Opinion in Insect Science*, 55, 101000. <https://doi.org/10.1016/J.COIS.2022.101000>
- Colorado Potato Beetle Larva #1* by Science Photo Library. (n.d.). Retrieved June 26, 2025, from <https://sciencephotogallery.com/featured/1-colorado-potato-beetle-larva-pascal-goetgheluckscience-photo-library.html>
- Dalakouras, A., Jarausch, W., Buchholz, G., Bassler, A., Braun, M., Manthey, T., Krczal, G., & Wassenegger, M. (2018). Delivery of hairpin rnas and small rnas into woody and herbaceous plants by trunk injection and petiole absorption. *Frontiers in Plant Science*, 9, 392749. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2018.01253/BIBTEX>
- Dalakouras, A., Koidou, V., & Papadopoulou, K. (2024). DsRNA-based pesticides: Considerations for efficiency and risk assessment. *Chemosphere*, 352, 141530. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2024.141530>
- de Jong van Lier, Q. (2017). Field capacity, a valid upper limit of crop available water? *Agricultural Water Management*, 193, 214–220. <https://doi.org/10.1016/J.AGWAT.2017.08.017>
- Dietz-Pfeilstetter, A., Mendelsohn, M., Gathmann, A., & Klinkenbuß, D. (2021). Considerations and Regulatory Approaches in the USA and in the EU for dsRNA-Based Externally Applied Pesticides for Plant Protection. *Frontiers in Plant Science*, 12, 682387. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2021.682387/BIBTEX>
- Divya, K., & Jisha, M. S. (2017). Chitosan nanoparticles preparation and applications. *Environmental Chemistry Letters* 2017 16:1, 16(1), 101–112. <https://doi.org/10.1007/S10311-017-0670-Y>
- Donaldson, L. (2020). Autofluorescence in Plants. *Molecules*, 25(10), 2393. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES25102393>
- Donaldson, L., & Williams, N. (2018). Imaging and Spectroscopy of Natural Fluorophores in Pine Needles. *Plants* 2018, Vol. 7, Page 10, 7(1), 10. <https://doi.org/10.3390/PLANTS7010010>
- Douglas, A. E. (2018). Strategies for Enhanced Crop Resistance to Insect Pests. *Annual Review of Plant Biology*, 69(Volume 69, 2018), 637–660. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-ARPLANT-042817-040248/CITE/REFWORKS>
- Dubelman, S., Fischer, J., Zapata, F., Huizinga, K., Jiang, C., Uffman, J., Levine, S., & Carson, D. (2014). Environmental Fate of Double-Stranded RNA in Agricultural Soils. *PLOS ONE*, 9(3), e93155. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0093155>

- Elliott, A. D. (2020). Confocal Microscopy: Principles and Modern Practices. *Current Protocols in Cytometry*, 92(1), e68.
<https://doi.org/10.1002/CPCY.68>
- Enayati, A. A., Ranson, H., & Hemingway, J. (2005). Insect glutathione transferases and insecticide resistance. *Insect Molecular Biology*, 14(1), 3–8. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2583.2004.00529.X>;
- Fischer, J. R., Zapata, F., Dubelman, S., Mueller, G. M., Jensen, P. D., & Levine, S. L. (2016). Characterizing a novel and sensitive method to measure dsRNA in soil. *Chemosphere*, 161, 319–324.
<https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2016.07.014>
- Fletcher, S. J., Reeves, P. T., Hoang, B. T., & Mitter, N. (2020a). A Perspective on RNAi-Based Biopesticides. *Frontiers in Plant Science*, 11, 508089.
www.frontiersin.org
- Fletcher, S. J., Reeves, P. T., Hoang, B. T., & Mitter, N. (2020b). A Perspective on RNAi-Based Biopesticides. *Frontiers in Plant Science*, 11, 508089.
<https://doi.org/10.3389/FPLS.2020.00051/BIBTEX>
- Fusar Poli, E., & Fontefrancesco, M. F. (2024). Trends in the implementation of biopesticides in the Euro-Mediterranean region: a narrative literary review. *Sustainable Earth Reviews* 2024 7:1, 7(1), 1–11.
<https://doi.org/10.1186/S42055-024-00085-8>
- Gan, S. J., Leong, Y. Q., Fakrul, M., Bin Barhanuddin, H., Wong, S. T., Wong, S. F., Mak, J. W., & Ahmad, R. B. (2021). Dengue fever and insecticide resistance in Aedes mosquitoes in Southeast Asia: a review. *Parasites Vectors*, 14, 315. <https://doi.org/10.1186/s13071-021-04785-4>
- Georgiou, S., Alami-Durante, H., Power, D. M., Sarropoulou, E., Mamuris, Z., & Moutou, K. A. (2016). Transient up- and down-regulation of expression of myosin light chain 2 and myostatin mRNA mark the changes from stratified hyperplasia to muscle fiber hypertrophy in larvae of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Cell and Tissue Research*, 363(2), 541–554.
<https://doi.org/10.1007/S00441-015-2254-0>,
- Hare, D. J. (1980). Impact of Defoliation by the Colorado Potato Beetle on Potato Yields. *Journal of Economic Entomology*, 73(3), 369–373.
<https://doi.org/10.1093/JEE/73.3.369>
- Hashiro, S., & Yasueda, H. (2022). RNA Interference-Based Pesticides and Antiviral Agents: Microbial Overproduction Systems for Double-Stranded RNA for Applications in Agriculture and Aquaculture. *Applied Sciences* 2022, Vol. 12, Page 2954, 12(6), 2954.
<https://doi.org/10.3390/APP12062954>

- He, L., Huang, Y., & Tang, X. (2022). RNAi-based pest control: Production, application and the fate of dsRNA. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10, 1080576.
<https://doi.org/10.3389/FBIOE.2022.1080576/XML/NLM>
- He, W., Xu, W., Fu, K., Guo, W., Kim, D. S., & Zhang, J. (2022). Positional effects of double-stranded RNAs targeting β -Actin gene affect RNA interference efficiency in Colorado potato beetle. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 184, 105121.
<https://doi.org/10.1016/J.PESTBP.2022.105121>
- Hemingway, J., Field, L., & Vontas, J. (2002). An overview of insecticide resistance. *Science*, 298(5591), 96–97.
<https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1078052/ASSET/1039B30E-83D9-4FEF-804E-967A0D6A510D/ASSETS/GRAPHIC/SE3820895001.JPEG>
- Homem, R. A., Buttery, B., Richardson, E., Tan, Y., Field, L. M., Williamson, M. S., & Emyr Davies, T. G. (2020). Evolutionary trade-offs of insecticide resistance — The fitness costs associated with target-site mutations in the nAChR of *Drosophila melanogaster*. *Molecular Ecology*, 29(14), 2661–2675. <https://doi.org/10.1111/MEC.15503>,
- Howat, W. J., & Wilson, B. A. (2014). Tissue fixation and the effect of molecular fixatives on downstream staining procedures. *Methods*, 70(1), 12–19. <https://doi.org/10.1016/J.YMETH.2014.01.022>
- IF imaging: Widefield versus confocal microscopy* | Proteintech Group. (n.d.). Retrieved June 21, 2025, from <https://www.ptglab.com/news/blog/if-imaging-widefield-versus-confocal-microscopy/>
- Kashyap, P. L., Xiang, X., & Heiden, P. (2015). Chitosan nanoparticle based delivery systems for sustainable agriculture. *International Journal of Biological Macromolecules*, 77, 36–51.
<https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2015.02.039>
- Kawpet, R., & Ganeshaborirak, R. (2024). Role of Insect Natural Enemies Integrated Pest Management of Citrus Insect Pests. *AGBIOFORUM*, 26(3), 1–10.
<https://agbioforum.org/menuscript/index.php/agb/article/view/387>
- Kolge, H., Kadam, K., Galande, S., Lanjekar, V., & Ghormade, V. (2021). New Frontiers in Pest Control: Chitosan Nanoparticles-Shielded dsRNA as an Effective Topical RNAi Spray for Gram Podborer Biocontrol. *ACS Applied Bio Materials*, 4(6), 5145–5157.
https://doi.org/10.1021/ACSABM.1C00349/ASSET/IMAGES/LARGE/MT1C00349_0006.JPEG

- Kou, S. (Gabriel), Peters, L. M., & Mucalo, M. R. (2021). Chitosan: A review of sources and preparation methods. *International Journal of Biological Macromolecules*, 169, 85–94.
<https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2020.12.005>
- Křížkovská, B., Viktorová, J., & Lipov, J. (2022). Approved Genetically Modified Potatoes (*Solanum tuberosum*) for Improved Stress Resistance and Food Safety. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 70(38), 11833–11843.
https://doi.org/10.1021/ACS.JAFC.2C03837/ASSET/IMAGES/LARGE/JF2C03837_0003.JPEG
- Kromann, P., Miethbauer, T., Ortiz, O., & Forbes, G. A. (2014). Review of potato biotic constraints and experiences with integrated pest management interventions. *Integrated Pest Management: Pesticide Problems*, Vol.3, 245–268. https://doi.org/10.1007/978-94-007-7796-5_10/TABLES/2
- León-Sosa, A., Castañeda, V., Espinosa-Vallejo, R., Gómez, X., Díaz, R. F., Cabrera, F., & Caicedo, A. (2022). Key points for translating wound regenerative agents from in vivo assays in mice to clinical validation. *Cytotherapy*, 24(11), 1074–1086.
<https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2022.07.004>
- Leptinotarsa decemlineata (Colorado potato beetle). (2021). *CABI Compendium*. <https://doi.org/10.1079/CABICOMPENDIUM.30380>
- Li, M., Sun, X., Yin, M., Shen, J., & Yan, S. (2023a). Recent Advances in Nanoparticle-Mediated Co-Delivery System: A Promising Strategy in Medical and Agricultural Field. *International Journal of Molecular Sciences* 2023, Vol. 24, Page 5121, 24(6), 5121.
<https://doi.org/10.3390/IJMS24065121>
- Li, M., Sun, X., Yin, M., Shen, J., & Yan, S. (2023b). Recent Advances in Nanoparticle-Mediated Co-Delivery System: A Promising Strategy in Medical and Agricultural Field. *International Journal of Molecular Sciences* 2023, Vol. 24, Page 5121, 24(6), 5121.
<https://doi.org/10.3390/IJMS24065121>
- Li, X., Jianhua, W., Yu, M., Dongzhi, L., Li, X., Jianhua, W., Yu, M., & Dongzhi, L. (2020). Research progress on the molecular mechanisms of insecticides resistance mediated by detoxification enzymes and transporters. *Chinese Journal of Pesticide Science*, 2020, Vol. 22, Issue 1, Pages: 1-10, 22(1), 1–10. <https://doi.org/10.16801/J.ISSN.1008-7303.2020.0016>

- Loseva, O., Ibrahim, M., Candas, M., Koller, C. N., Bauer, L. S., & Bulla, L. A. (2002). Changes in protease activity and Cry3Aa toxin binding in the Colorado potato beetle: implications for insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32(5), 567–577. [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(01\)00137-0](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(01)00137-0)
- Lü, F. G., Fu, K. Y., Li, Q., Guo, W. C., Ahmat, T., & Li, G. Q. (2015). Identification of carboxylesterase genes and their expression profiles in the Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata* treated with fipronil and cyhalothrin. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 122, 86–95. <https://doi.org/10.1016/J.PESTBP.2014.12.015>
- Luo, X., Nanda, S., Zhang, Y., Zhou, X., Yang, C., & Pan, H. (2024). Risk assessment of RNAi-based biopesticides. *New Crops*, 1, 100019. <https://doi.org/10.1016/J.NCROPS.2024.100019>
- Lv, H., Li, X., Li, J., Yu, C., Zeng, Q., Ning, G., Wan, H., Li, J., Ma, K., & He, S. (2023). Overcoming resistance in insect pest with a nanoparticle-mediated dsRNA and insecticide co-delivery system. *Chemical Engineering Journal*, 475, 146239. <https://doi.org/10.1016/J.CEJ.2023.146239>
- Malekmohammadi, M., & Galehdari, H. (2016). Target site insensitivity mutations in the AChE enzyme confer resistance to organophosphorous insecticides in *Leptinotarsa decemlineata* (Say). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 126, 85–91. <https://doi.org/10.1016/J.PESTBP.2015.08.002>
- Mat Jalaluddin, N. S., Asem, M., Harikrishna, J. A., & Ahmad Fuaad, A. A. H. (2023). Recent Progress on Nanocarriers for Topical-Mediated RNAi Strategies for Crop Protection—A Review. *Molecules* 2023, Vol. 28, Page 2700, 28(6), 2700. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES28062700>
- Ménard, É., Wu, G. M., & Bordier, C. (2025). Insecticide resistance of Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata*) in the province of Québec. *Canadian Journal of Plant Science*, 105. <https://doi.org/10.1139/CJPS-2025-0007>
- Menezes, P. S., Yan, Y., Yang, Y., Mitter, N., Mahony, T. J., & Mody, K. T. (2022). RNAi-Based Biocontrol of Pests to Improve the Productivity and Welfare of Livestock Production. *Applied Biosciences* 2022, Vol. 1, Pages 229-243, 1(3), 229–243. <https://doi.org/10.3390/APPLBIOSCI1030015>
- Merzendorfer, H. (2014). ABC Transporters and Their Role in Protecting Insects from Pesticides and Their Metabolites. *Advances in Insect Physiology*, 46, 1–72. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417010-0.00001-X>

- Monici, M. (2005). Cell and tissue autofluorescence research and diagnostic applications. *Biotechnology Annual Review*, 11(SUPPL.), 227–256. [https://doi.org/10.1016/S1387-2656\(05\)11007-2](https://doi.org/10.1016/S1387-2656(05)11007-2)
- Naimov, S., Weemen-Hendriks, M., Dukiandjiev, S., & De Maagd, R. A. (2001). *Bacillus thuringiensis* Delta-Endotoxin Cry1 Hybrid Proteins with Increased Activity against the Colorado Potato Beetle. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(11), 5328. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.11.5328-5330.2001>
- Narva, K., Toprak, U., Alyokhin, A., Groves, R., Jurat-Fuentes, J. L., Moar, W., Nauen, R., Whipple, S., & Head, G. (2025). Insecticide resistance management scenarios differ for RNA-based sprays and traits. *Insect Molecular Biology*. <https://doi.org/10.1111/IMB.12986>
- Nauen, R., Bass, C., Feyereisen, R., & Vontas, J. (2022). The Role of Cytochrome P450s in Insect Toxicology and Resistance. *Annual Review of Entomology*, 67, 105–124. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-ENTO-070621-061328>,
- Nickson, T. E. (2008). Planning environmental risk assessment for genetically modified crops: Problem formulation for stress-tolerant crops. *Plant Physiology*, 147(2), 494–502. <https://doi.org/10.1104/PP.108.118422>
- Nwaneshiudu, A., Kuschal, C., Sakamoto, F. H., Rox Anderson, R., Schwarzenberger, K., & Young, R. C. (2012). Introduction to confocal microscopy. *Journal of Investigative Dermatology*, 132(12), 1–5. <https://doi.org/10.1038/JID.2012.429>
- Oakeshott, J. G., Johnson, R. M., Berenbaum, M. R., Ranson, H., Cristino, A. S., & Claudianos, C. (2010). Metabolic enzymes associated with xenobiotic and chemosensory responses in *Nasonia vitripennis*. *Insect Molecular Biology*, 19(SUPPL. 1), 147–163. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2583.2009.00961.X;SUBPAGE:STRING:FULL>
- Ogawa, K., Yui, T., & Okuyama, K. (2004). Three D structures of chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*, 34(1–2), 1–8. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2003.11.002>
- Ortolá, B., & Daròs, J. A. (2024). RNA Interference in Insects: From a Natural Mechanism of Gene Expression Regulation to a Biotechnological Crop Protection Promise. *Biology 2024, Vol. 13, Page 137*, 13(3), 137. <https://doi.org/10.3390/BIOLOGY13030137>
- Pampolini, F., Rodrigues, T. B., Leelesh, R. S., Kawashima, T., & Rieske, L. K. (2020a). Confocal microscopy provides visual evidence and confirms the feasibility of dsRNA delivery to emerald ash borer through plant tissues.

- Journal of Pest Science*, 93(4), 1143–1153.
<https://doi.org/10.1007/S10340-020-01230-W/FIGURES/9>
- Pampolini, F., Rodrigues, T. B., Leelesh, R. S., Kawashima, T., & Rieske, L. K. (2020b). Confocal microscopy provides visual evidence and confirms the feasibility of dsRNA delivery to emerald ash borer through plant tissues. *Journal of Pest Science*, 93(4), 1143–1153.
<https://doi.org/10.1007/S10340-020-01230-W/FIGURES/9>
- Parker, K. M., Barragán Borrero, V., Van Leeuwen, D. M., Lever, M. A., Mateescu, B., & Sander, M. (2019a). Environmental Fate of RNA Interference Pesticides: Adsorption and Degradation of Double-Stranded RNA Molecules in Agricultural Soils. *Environmental Science and Technology*, 53(6), 3027–3036.
https://doi.org/10.1021/ACS.EST.8B05576/ASSET/IMAGES/LARGE/ES-2018-05576D_0004.JPEG
- Parker, K. M., Barragán Borrero, V., Van Leeuwen, D. M., Lever, M. A., Mateescu, B., & Sander, M. (2019b). Environmental Fate of RNA Interference Pesticides: Adsorption and Degradation of Double-Stranded RNA Molecules in Agricultural Soils. *Environmental Science and Technology*, 53(6), 3027–3036.
https://doi.org/10.1021/ACS.EST.8B05576/ASSET/IMAGES/LARGE/ES-2018-05576D_0004.JPEG
- Pawełczyk, A., Żwawiak, J., & Zaprutko, L. (2023). Kumquat Fruits as an Important Source of Food Ingredients and Utility Compounds. *Food Reviews International*, 39(2), 875–895.
<https://doi.org/10.1080/87559129.2021.1928179>
- Perrin, B. J., & Ervasti, J. M. (2010). The Actin Gene Family: Function Follows Isoform. *Cytoskeleton (Hoboken, N.j.)*, 67(10), 630.
<https://doi.org/10.1002/CM.20475>
- Ramesh Kumar, D., Saravana Kumar, P., Gandhi, M. R., Al-Dhabi, N. A., Paulraj, M. G., & Ignacimuthu, S. (2016). Delivery of chitosan/dsRNA nanoparticles for silencing of wing development vestigial (vg) gene in *Aedes aegypti* mosquitoes. *International Journal of Biological Macromolecules*, 86, 89–95.
<https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2016.01.030>
- Rodrigues, T. B., Mishra, S. K., Sridharan, K., Barnes, E. R., Alyokhin, A., Tuttle, R., Kokulapalan, W., Garby, D., Skizim, N. J., Tang, Y. W., Manley, B., Aulisa, L., Flannagan, R. D., Cobb, C., & Narva, K. E. (2021). First Sprayable Double-Stranded RNA-Based Biopesticide Product Targets Proteasome Subunit Beta Type-5 in Colorado Potato Beetle (*Leptinotarsa*

- decemlineata). *Frontiers in Plant Science*, 12, 728652.
<https://doi.org/10.3389/FPLS.2021.728652/BIBTEX>
- Romeis, J., & Widmer, F. (2020). Assessing the Risks of Topically Applied dsRNA-Based Products to Non-target Arthropods. *Frontiers in Plant Science*, 11, 503517.
<https://doi.org/10.3389/FPLS.2020.00679/XML/NLM>
- Sablon, L., Dickens, J. C., Haubruge, É., & Verheggen, F. J. (2012). Chemical Ecology of the Colorado Potato Beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Coleoptera: Chrysomelidae), and Potential for Alternative Control Methods. *Insects 2013*, Vol. 4, Pages 31-54, 4(1), 31–54.
<https://doi.org/10.3390/INSECTS4010031>
- San Miguel, K., & Scott, J. G. (2016). The next generation of insecticides: DsRNA is stable as a foliar-applied insecticide. *Pest Management Science*, 72(4), 801–809.
<https://doi.org/10.1002/PS.4056>;REQUESTEDJOURNAL:JOURNAL:15264998;WGROU:STRING:PUBLICATION
- Shawver, S., Ishii, S., Strickland, M. S., & Badgley, B. (2024). Soil type and moisture content alter soil microbial responses to manure from cattle administered antibiotics. *Environmental Science and Pollution Research International*, 31(18), 27259. <https://doi.org/10.1007/S11356-024-32903-Z>
- Siddiqui, J. A., Fan, R., Naz, H., Bamisile, B. S., Hafeez, M., Ghani, M. I., Wei, Y., Xu, Y., & Chen, X. (2023). Insights into insecticide-resistance mechanisms in invasive species: Challenges and control strategies. *Frontiers in Physiology*, 13, 1112278.
<https://doi.org/10.3389/FPHYS.2022.1112278/XML/NLM>
- Stanković, S., Kostić, M., Sivčev, I., Janković, S., Kljajić, P., Todorović, G., & Jevđović, R. (2012). Resistance of Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) to neonicotinoids, pyrethroids and nereistoxins in Serbia. *Romanian Biotechnological Letters*, 17(5), 7599–7609.
<https://plantarum.izbis.bg.ac.rs/handle/123456789/890>
- Stanković, S., Zabel, A., Kostic, M., Manojlovic, B., & Rajkovic, S. (2004). Colorado potato beetle [*Leptinotarsa decemlineata* (Say)] resistance to organophosphates and carbamates in Serbia. *Journal of Pest Science*, 77(1), 11–15. <https://doi.org/10.1007/S10340-003-0020-7/TABLES/4>
- Statistics | FAO | Food and Agriculture Organization of the United Nations. (n.d.). Retrieved May 14, 2025, from <https://www.fao.org/statistics/en>
- Talamond, P., Verdeil, J. L., & Conéjéro, G. (2015). Secondary Metabolite Localization by Autofluorescence in Living Plant Cells. *Molecules 2015*,

Vol. 20, Pages 5024-5037, 20(3), 5024–5037.

<https://doi.org/10.3390/MOLECULES20035024>

- Un Jan Contreras, S., & Gardner, C. M. (2022). Environmental fate and behaviour of antibiotic resistance genes and small interference RNAs released from genetically modified crops. *Journal of Applied Microbiology*, 133(5), 2877–2892. <https://doi.org/10.1111/JAM.15741>
- Wen, G., Khelifi, M., Cambouris, A. N., & Ziadi, N. (2019a). Responses of the Colorado Potato Beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) to the Chemical Composition of Potato Plant Foliage. *Potato Research*, 62(2), 157–173. <https://doi.org/10.1007/S11540-018-9405-0/FIGURES/1>
- Wen, G., Khelifi, M., Cambouris, A. N., & Ziadi, N. (2019b). Responses of the Colorado Potato Beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) to the Chemical Composition of Potato Plant Foliage. *Potato Research*, 62(2), 157–173. <https://doi.org/10.1007/S11540-018-9405-0/FIGURES/1>
- What to do if you see the Colorado potato beetle (a UK notifiable quarantine pest) | AHDB.* (n.d.). Retrieved June 26, 2025, from <https://ahdb.org.uk/knowledge-library/what-to-do-if-you-see-the-colorado-potato-beetle-a-uk-notifiable-quarantine-pest>
- Yu, N., Christiaens, O., Liu, J., Niu, J., Cappelle, K., Caccia, S., Huvenne, H., & Smagghe, G. (2013). Delivery of dsRNA for RNAi in insects: An overview and future directions. *Insect Science*, 20(1), 4–14. <https://doi.org/10.1111/J.1744-7917.2012.01534.X>;SUBPAGE:STRING:FULL
- Zalucki, M. P., & Furlong, M. J. (2017). Behavior as a mechanism of insecticide resistance: evaluation of the evidence. *Current Opinion in Insect Science*, 21, 19–25. <https://doi.org/10.1016/J.COIS.2017.05.006>
- Zarrabian, M., & Sherif, S. M. (2024). Silence is not always golden: A closer look at potential environmental and ecotoxicological impacts of large-scale dsRNA application. *Science of The Total Environment*, 950, 175311. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2024.175311>
- Zhang, K., Wei, J., Huff Hartz, K. E., Lydy, M. J., Moon, T. S., Sander, M., & Parker, K. M. (2020). Analysis of RNA Interference (RNAi) Biopesticides: Double-Stranded RNA (dsRNA) Extraction from Agricultural Soils and Quantification by RT-qPCR. *Environmental Science and Technology*, 54(8), 4893–4902. https://doi.org/10.1021/ACS.EST.9B07781/SUPPL_FILE/ES9B07781_SI_001.PDF
- Zhang, X., Zhang, J., & Zhu, K. Y. (2010). Chitosan/double-stranded RNA nanoparticle-mediated RNA interference to silence chitin synthase genes

through larval feeding in the African malaria mosquito (*Anopheles gambiae*). *Insect Molecular Biology*, 19(5), 683–693.
<https://doi.org/10.1111/J.1365-2583.2010.01029.X>

Zhu, K. Y., & Palli, S. R. (2020). Mechanisms, applications, and challenges of insect RNA interference. *Annual Review of Entomology*, 65(Volume 65, 2020), 293–311. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-ENTO-011019-025224/CITE/REFWORKS>