



# Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

## Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

Χαριτοπούλου Κωνσταντία του Κωνσταντίνου

*«Μελέτη μεταγραφομικών δεικτών για τον ποιοτικό έλεγχο στελεχών  
γενετικού φυλετικού διαχωρισμού που αξιοποιούνται στην  
πληθυσμιακή διαχείριση της μύγας της Μεσογείου (Ceratitis  
capitata)»*

*«Study of transcriptomics markers for the quality control of genetic  
sexing strains that are used for population management of the  
Mediterranean fruit fly (Ceratitis capitata)»*

Λάρισα, 2025

Η παρούσα διπλωματική εργασία διεξήχθη στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής, του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας με επιβλέποντα τον καθηγητή Ματθιόπουλο Κωνσταντίνο, στη Λάρισα από τον Μάρτιο του 2025 έως τον Σεπτέμβριο του 2025.

#### Τριμελής επιτροπή

- *Ματθιόπουλος Κωνσταντίνος*, Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας
- *Μούτου Αικατερίνη*, Καθηγήτρια Αναπτυξιακής Βιολογίας
- *Παπαδόπουλος Νικόλαος*, Καθηγητής Εφαρμοσμένης Εντομολογίας

## Περιεχόμενα

|                                                                                                                                  |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Ευχαριστίες.....                                                                                                                 | 4  |
| Περίληψη.....                                                                                                                    | 5  |
| Abstract.....                                                                                                                    | 6  |
| 1. Εισαγωγή .....                                                                                                                | 8  |
| 1.1. <i>Ceratitis capitata</i> .....                                                                                             | 8  |
| 1.1.1. Κύκλος ζωής της Μεσογειακής Μύγας.....                                                                                    | 9  |
| 1.1.2. Καταπολέμηση της <i>Ceratitis capitata</i> .....                                                                          | 10 |
| 1.2. Τεχνική στείρων εντόμων (SIT).....                                                                                          | 11 |
| 1.2.1. Μέθοδος στείρωσης των αρσενικών εντόμων .....                                                                             | 11 |
| 1.2.2. Εφαρμογές της τεχνικής SIT .....                                                                                          | 12 |
| 1.2.3. Ανάπτυξη στελεχών γενετικού φυλετικού διαχωρισμού (GSS) .....                                                             | 13 |
| 1.2.4. Ταυτοποίηση των γονιδίων <i>wp</i> και <i>tsl</i> .....                                                                   | 14 |
| 1.2.5. Αναστροφή D53 .....                                                                                                       | 17 |
| 1.2.6. Μεταγραφομικοί δείκτες για τον έλεγχο της ποιότητας των GSS.....                                                          | 17 |
| 1.2.7. Προηγμένες εναλλακτικές προσεγγίσεις .....                                                                                | 19 |
| 1.3. Διατροφή της Μεσογειακής Μύγας .....                                                                                        | 20 |
| 1.3.1. Συνέπειες ειδικών διατροφικών συνθηκών στην αρμοστικότητα και ικανότητα ζευγαρώματος των στελεχών VIENNA 8 και EGII ..... | 21 |
| 1.4. Μηχανισμός RNAi.....                                                                                                        | 22 |
| 1.4.1. Εξωγενής ενεργοποίηση του μηχανισμού RNAi μέσω siRNA.....                                                                 | 24 |
| 2. Σκοπός.....                                                                                                                   | 25 |
| 3. Υλικά και Μέθοδοι .....                                                                                                       | 26 |
| 3.1. Μεταγραφομική μελέτη για την επιλογή γονιδίων-στόχων .....                                                                  | 26 |
| 3.2. Εργαστηριακές συνθήκες πειράματος .....                                                                                     | 26 |
| 3.3. Συλλογή δειγμάτων .....                                                                                                     | 27 |
| 3.4. Απομόνωση RNA (RNA extraction) .....                                                                                        | 27 |
| 3.5. Ποσοτικοποίηση νουκλεϊκών οξέων (DNA, RNA) .....                                                                            | 28 |
| 3.6. Επεξεργασία με DNase .....                                                                                                  | 28 |
| 3.7. Σύνθεση cDNA με αντίστροφη μεταγραφή .....                                                                                  | 29 |
| 3.8. Ποσοτική Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (RT-qPCR) .....                                                | 29 |
| 3.9. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR).....                                                                                  | 30 |
| 3.10. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης.....                                                                                     | 32 |
| 3.11. Ανάκτηση μορίων DNA/RNA από πήκτωμα αгарόζης (Gel extraction).....                                                         | 32 |
| 3.12. In vitro μεταγραφή για την δημιουργία του dsRNA.....                                                                       | 32 |

|        |                                                                           |    |
|--------|---------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.     | Αποτελέσματα.....                                                         | 34 |
| 4.1.   | Αποτελέσματα RNA-seq .....                                                | 34 |
| 4.2.   | Επιλογή γονιδίων- στόχων .....                                            | 35 |
| 4.3.   | Προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης επιλεγμένων γονιδίων.....             | 36 |
| 4.3.1. | Γονίδιο <i>Protein- late bloomer</i> .....                                | 36 |
| 4.3.2. | Γονίδιο <i>diego</i> .....                                                | 37 |
| 4.3.3. | Γονίδιο <i>farnesol dehydrogenase</i> .....                               | 37 |
| 4.3.4. | Γονίδιο <i>no mechanoreceptor potential C</i> .....                       | 38 |
| 4.3.5. | Γονίδιο <i>putative gamma-glutamylcyclotransferase CG2811</i> .....       | 39 |
| 4.4.   | Σίγηση της έκφρασης του γονιδίου <i>CG2811</i> μέσω χορήγησης dsRNA ..... | 40 |
| 3      | Συζήτηση .....                                                            | 42 |
| 4      | Παράρτημα.....                                                            | 46 |
| 4.1    | Αλληλουχίες εκκινητών.....                                                | 46 |
| 4.2    | Αποτελέσματα σύγκρισης της έκφρασης των 5 επιλεγμένων γονιδίων .....      | 46 |
| 5      | Βιβλιογραφία.....                                                         | 48 |

## Ευχαριστίες

Για την επιτυχή διεξαγωγή της παρούσας διπλωματικής εργασίας, θα ήθελα αρχικά να ευχαριστήσω τον επιβλέποντά μου, καθηγητή κ. Κωνσταντίνο Ματθιόπουλο για τη συνεχή στήριξη και την ευκαιρία που έδωσε να έρθω σε επαφή με ένα από τα εργαστήρια του τμήματος, έτσι ώστε να καλλιεργήσω την επιστημονική μου σκέψη και την επιμονή μου στην επίλυση προβλημάτων. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω και τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς επιτροπής μου, την καθηγήτρια κ. Μούτου Αικατερίνη και τον καθηγητή κ. Παπαδόπουλο Νικόλαο που ήταν παρόντες, όταν τους χρειάστηκα. Οφείλω ένα τεράστιο ευχαριστώ στους υποψήφιους Διδάκτορες Ράλλη Δημήτριο, Κατσιαμάνη Λευκή, Ξάνθου Μαρία, Σπανομήτρου Αντωνία που με συμπεριέλαβαν στην καθημερινότητα του εργαστηρίου και με βοήθησαν καθ' όλη τη διάρκεια της διπλωματικής μου, λύνοντας οποιαδήποτε απορία μου. Η ολοκλήρωση της παρούσας διπλωματικής αλλά και οι σπουδές μου στο τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας δεν θα είχαν επιτευχθεί χωρίς φυσικά την αμέριστη στήριξη της οικογένειάς μου, της γιαγιάς μου Ελένης, των θείων μου και των ξαδελφών μου. Τίποτα δεν θα ήταν το ίδιο χωρίς την συμπαράσταση των φίλων, ανάμεσά τους και μερικοί συνάδελφοι πλέον, που ήταν εκεί για να γιορτάσουμε κάθε επιτυχία και να ξεπεράσουμε κάθε δυσκολία. Χαράλαμπε, Μαρία, Λάουρα, Σουζάνα, Ορθοδοξία, Παναγιώτη, Τριαντάφυλλε, Μαργαρίτα, Ελισάβετ σας ευχαριστώ θερμά.

## Περίληψη

Η μύγα της Μεσογείου είναι ένα έντομο που προκαλεί μεγάλες απώλειες στις αγροδιατροφικές δραστηριότητες και είναι επιτακτική η ανάγκη μείωσης του πληθυσμού της. Μεταξύ των μεθόδων που χρησιμοποιούνται γι' αυτό, είναι και η Τεχνική Στείρων Εντόμων (SIT), η οποία βασίζεται στην μαζική εκτροφή των εντόμων, στην επιλογή και στείρωση των αρσενικών μέσω ακτινοβολίας και στην απελευθέρωσή τους στον αγρό. Για τη βελτιστοποίηση της μεθόδου, έχουν αναπτυχθεί στελέχη γενετικού φυλετικού διαχωρισμού (Genetic Sexing Strains, GSS), με πιο επιτυχημένο το VIENNA 8. Το VIENNA 8 προέκυψε με τη χρήση κλασικών τεχνικών μεταλλαξιγένεσης, οι οποίες είχαν ως αποτέλεσμα την υποβάθμιση του γενετικού υποβάθρου του στελέχους μέσω δημιουργίας ανεπιθύμητων μεταλλάξεων. Αυτό, σε συνδυασμό με τις συνθήκες εκτροφής (π.χ. διατροφή, μικροβίωμα) επηρεάζουν άμεσα την ποιότητα των παραγόμενων αρσενικών και, κατ' επέκταση, την αποτελεσματικότητα της SIT. Για τον σκοπό αυτό, έχει πραγματοποιηθεί μεταγραφωμική μελέτη των διαφορικά εκφραζόμενων γονιδίων μεταξύ του εργαστηριακού στελέχους EGII και του GSS στελέχους VIENNA 8 που χρησιμοποιείται σε εφαρμογές SIT, προκειμένου να εντοπιστούν γονίδια με διαφορετική έκφραση που ενδεχομένως να σχετίζονται με την αρμοστικότητα των εκτρεφόμενων αρσενικών εντόμων. Στην παρούσα εργασία, μελετήθηκε μέσω ποσοτικής PCR η διαφορετική έκφραση σε 5 υποψήφια γονίδια-δείκτες απ' όπου επιβεβαιώθηκαν οι διαφορές στην έκφραση για 2 από τα γονίδια. Από αυτά επιλέχθηκε το γονίδιο *CG2811 (putative γ-glutamyl cyclotransferase)* για μελέτη της σίγησης της έκφρασής του στους ιστούς που εκφράζεται μέσω RNAi. Τα αποτελέσματα έδειξαν αποτελεσματική σίγηση της έκφρασης του γονιδίου σε 24, 72, 96 και 120 ώρες μετά την ένεση. Εφόσον εξακριβωθεί ότι η σίγηση της έκφρασης του συγκεκριμένου γονιδίου επηρεάζει την αρμοστικότητα του εντόμου μετά από μελέτη του φαινοτύπου του, αυτό θα μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον ποιοτικό έλεγχο των νέων GSS που δημιουργούνται, ενισχύοντας την ακρίβεια και την οικονομική αποτελεσματικότητα της μεθόδου SIT.

## Abstract

The Mediterranean fruit fly is an insect that causes significant losses in agri-food activities, and there is an urgent need to reduce its population. Among the methods used for this purpose is the Sterile Insect Technique (SIT), which relies on the mass rearing of insects, the selection and sterilization of males through irradiation, and their release into the field. To optimize the method, Genetic Sexing Strains (GSS) have been developed, with the most successful being VIENNA 8. VIENNA 8 was created using classical mutagenesis techniques, which resulted in the degradation of the genetic background of the strain due to the introduction of undesirable mutations. This, in combination with rearing conditions (e.g., diet, microbiome), directly affects the quality of the produced males and, consequently, the effectiveness of SIT. For this reason, a transcriptomic study was conducted to identify differentially expressed genes between the laboratory strain EGII and the GSS strain VIENNA 8, which is used in SIT applications, in order to detect genes with differential expression that may be related to the fitness of reared male insects. In the present study, the differential expression of 5 candidate marker genes was examined using quantitative PCR, confirming expression differences in 2 of the genes. Of these, the gene CG2811 (putative  $\gamma$ -glutamyl cyclotransferase) was selected for gene silencing studies in the tissues where it is expressed, using RNAi. The results showed effective gene silencing at 24, 72, 96, and 120 hours after injection. If it is confirmed that the silencing of this gene affects insect fitness through phenotypic analysis, it could be used as a quality control marker for newly developed GSS strains, enhancing the precision and economic efficiency of the SIT method.

# 1. Εισαγωγή

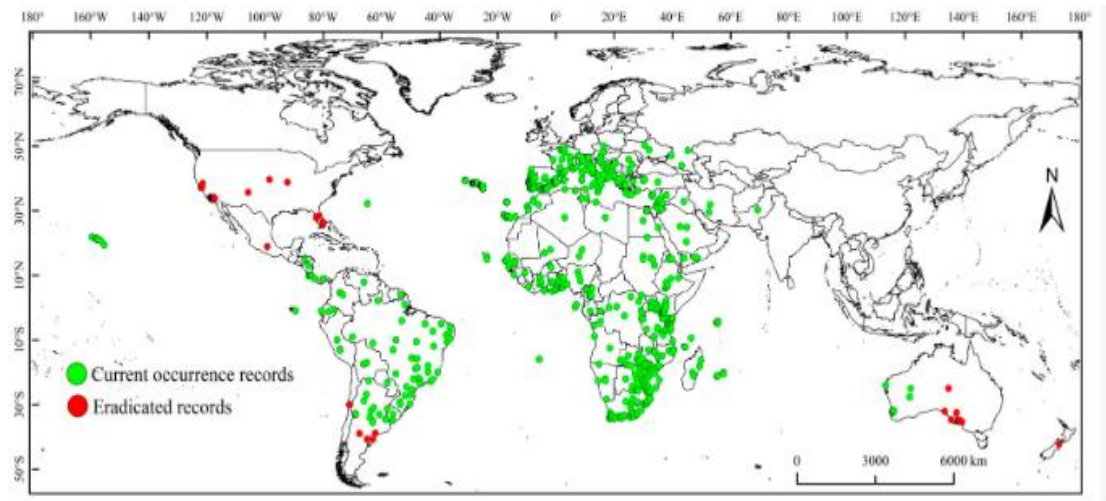
## 1.1. *Ceratitis capitata*

Η μύγα της Μεσογείου (Mediterranean fruit fly), *Ceratitis capitata* (Wiedemann, 1824) ανήκει στην τάξη των Δίπτερων (Diptera) και στην οικογένεια των Tephritidae (Εικόνα 1). Είναι ένα από τα πιο καταστροφικά παράσιτα φρούτων στον κόσμο, λόγω ορισμένων χαρακτηριστικών του όπως η ευρεία κατανομή του σε όλο τον κόσμο, η ικανότητά του να αντέχει



Εικόνα 1: Ενήλικη αρσενική Μεσογειακή μύγα, *Ceratits capitata* (Wiedemann) (Thomas et al., 1969)

σε χαμηλότερες θερμοκρασίες από άλλα είδη φρουτόμυγων και η μεγάλη ποικιλία ξενιστών (Rodonitis et al., 2024). Το έντομο προέρχεται από την υποσαχάρια Αφρική, αλλά έχει ανιχνευτεί και εγκατασταθεί πλέον σε πολλές χώρες τις Μεσογείου, στην Αυστραλία και στην κεντρική και νότια Αφρική, όπως φαίνεται στην εικόνα 2, παρά τις εντατικές και μαζικές προσπάθειες εξάλειψης του εντόμου (Rao et al., 2024).



Εικόνα 2: Παγκόσμια κατανομή της Μεσογειακής μύγας. Με κόκκινο χρώμα είναι υπογραμμισμένες οι περιοχές που είχε εντοπιστεί και πλέον έχει εξαλειφθεί και με πράσινο χρώμα οι περιοχές που εντοπίζεται σήμερα (Rao et al., 2024)

Η μύγα της Μεσογείου αναφέρεται και ως φρουτόμυγα (fruit fly), διότι οι κύριοι ξενιστές του εντόμου είναι τα εσπεριδοειδή και τα πυρηνόκαρπα, ενώ προσβάλλει και πολλά φυλλοβόλα και τροπικά φρούτα και μερικά λαχανικά. Η Μεσογειακή μύγα επιτίθεται σε περισσότερα από 300 διαφορετικά φρούτα, λουλούδια, λαχανικά και ξηρούς καρπούς (Sciarretta et al., 2018). Οι προτιμήσεις των ξενιστών

ποικίλλουν ανάλογα την γεωγραφική περιοχή, καθώς ο προτιμότερος ξενιστής σε μία χώρα μπορεί να είναι κακός ξενιστής σε μία άλλη. Οι προνύμφες του τρέφονται από το σαρκώδες τμήμα του περικαρπίου των φρούτων, οδηγώντας τα στο να σαπίζουν, τόσο λόγω της ανάπτυξης των ξενιστών όσο και λόγω επικείμενων μολύνσεων που προκαλούνται από την ωοαπόθεση. Τέλος, υπάρχουν ορισμένα φρούτα και λαχανικά που έχει παρατηρηθεί ότι προσβάλλονται από το έντομο μόνο υπό εργαστηριακές συνθήκες κάτι που ίσως να μην παρατηρηθεί όταν το έντομο βρίσκεται στη φύση (Domińiak & Taylor-Hukins, 2022).

### 1.1.1. Κύκλος ζωής της Μεσογειακής Μύγας

Η Μεσογειακή Μύγα ανήκει στην κατηγορία των ολομετάβολων εντόμων και, επομένως, ο κύκλος ζωής της διακρίνεται από 4 στάδια, τα οποία είναι τα εξής:



Εικόνα 3: Βιολογικός κύκλος της Μύγας της Μεσογείου, *Ceratitidis capitata*, από αριστερά προς τα δεξιά: ενήλικο, νύμφη, προνύμφη και αυγά (Thomas et al., 1969)

αυγό, προνύμφη (1<sup>ου</sup>, 2<sup>ου</sup>, 3<sup>ου</sup> σταδίου), νύμφη και το ενήλικο έντομο. Οι 4 μορφές με τις οποίες το έντομο εμφανίζεται στην φύση φαίνονται στην εικόνα 3. Ο κύκλος ζωής του άγριου πληθυσμού στη φύση ξεκινάει με την ωοαπόθεση των αυγών από τη θηλυκή ενήλικη μύγα στον καρπό των φρούτων,

στο σαρκώδες τμήμα τους και συνεχίζει με την εκκόλαψη των αυγών και τον σχηματισμό των προνυμφών (larvae) στο εσωτερικό του φρούτου, καθώς τρέφονται από αυτό. Όταν το έντομο φτάσει στο τελικό στάδιο της προνύμφης (προνύμφη 3<sup>ου</sup> σταδίου), πέφτει στο έδαφος, όπου βομβυκιάζεται και μετατρέπεται σε νύμφη (pupa). Τελικά, μετά την εκκόλαψη των νυμφών προκύπτουν ενήλικα αρσενικά και θηλυκά έντομα, τα οποία ζευγαρώνουν μετά την σεξουαλική ωρίμανσή τους και ο κύκλος επαναλαμβάνεται (Thomas et al., 1969). Η σεξουαλική ωρίμανση των ενήλικων αρσενικών διαρκεί περίπου τέσσερις μέρες, με αποτέλεσμα το ζευγάρωμα να ξεκινάει πέντε μέρες μετά την εκκόλαψή τους, ενώ η ωρίμανση των θηλυκών μυγών διαρκεί περίπου έξι μέρες (Abd-Elgawad, 2021). Το πόσο γρήγορα θα γίνει η ωοαπόθεση εξαρτάται από τη θερμοκρασία του περιβάλλοντος, καθώς σε υψηλότερες θερμοκρασίες συμβαίνει νωρίτερα (περίπου πέντε μέρες μετά το ζευγάρωμα) (Rodriguez et al., 2024). Συνήθως, το 50% του ενήλικου πληθυσμού πεθαίνει κατά τους πρώτους 2 μήνες μετά την εκκόλαψη, ενώ τα υπόλοιπα ενήλικα επιβιώνουν έως και 6 μήνες αν οι συνθήκες είναι ευνοϊκές (Rodovitis et al., 2024).

### 1.1.2. Καταπολέμηση της *Ceratitis capitata*

Η μύγα της Μεσογείου έχει χαρακτηριστεί ως κύριο έντομο οικονομικής σημασίας, λόγω της απώλειας εκατομμυρίων δολαρίων στον τομέα της γεωργίας, τόσο λόγω της μείωσης της συγκομιδής αλλά και λόγω της δαπανηρής μελέτης που έχει γίνει για την δημιουργία και εφαρμογή των εντομοκτόνων για την εξάλειψή της (Szyniszewska & Tatem, 2014). Γι' αυτό το λόγο, έχουν γίνει προσπάθειες ανάπτυξης πολλών μεθόδων καταπολέμησης του εντόμου με την κυριότερη να αποτελούν τα χημικά εντομοκτόνα, όπως τα οργανοφωσφορικά τα οποία έχουν πλέον αποσυρθεί λόγω του τοξικού αντίκτυπου που έχουν στον άνθρωπο και στη φύση, αλλά και λόγω της ανάπτυξης ανθεκτικότητας (Rahman & Broughton, 2016), αλλά και άλλες μορφές εντομοκτόνων όπως είναι τα αιθέρια έλαια (essential oils/ phytochemical compounds) (Boutjagualt et al., 2022). Τα πυρεθροειδή αποτελούν επίσης χημικές ουσίες που χρησιμοποιούνται ακόμα ως εντομοκτόνα, παρ'όλο που η παρατεταμένη χρήση τους έχει οδηγήσει επίσης στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας του πληθυσμού του εντόμου. Πολλές μελέτες έχουν τεκμηριώσει την εμφάνιση ανθεκτικών στελεχών της *C. capitata* σε διάφορες δραστικές ουσίες που ανήκουν στα πυρεθροειδή και οργανοφωσφορικά, μέσα από βιοχημικές δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν σε διάφορες χώρες (Abdel-Razek & Abdelgawad, 2021; Couso-Ferrer et al., 2011; Voudouris et al., 2018). Μια άλλη διαφορετική μέθοδος αντιμετώπισης της Μεσογειακής μύγας αποτελούν τα ελκυστικά, δηλαδή παγίδες που είτε σκοτώνουν είτε παγιδεύουν τις μύγες, χωρίς όμως να είναι ειδικά στην παγίδευση μόνο της μύγας της Μεσογείου και αυτό έχει ως αποτέλεσμα να σκοτώνουν και άλλα έντομα που πιθανών να μην είναι επιβλαβή για τον αγρό (Kouloussis et al., 2022). Ακόμη μία μέθοδος περιορισμού αποτελεί η απελευθέρωση παρασίτων του εντόμου ή μικροοργανισμών που μπορούν να τα βλάψουν, όπως οι ενδοπαρασιτικές σφήκες της οικογένειας *Broconidae* (Suarez et al., 2014). Οι συγκεκριμένες μέθοδοι ωστόσο εμφανίζουν κάποια μειονεκτήματα ως προς την ειδο-ειδικότητα και την αποτελεσματικότητά τους, καθώς πρέπει να εφαρμοστούν συνδυαστικά για να είναι αποτελεσματικές, αυξάνοντας ωστόσο τα χρήματα που πρέπει να δαπανηθούν. Το κυριότερο μειονέκτημα, ωστόσο, αποτελεί η ανθεκτικότητα που μπορεί να αναπτύξουν τα έντομα στα χημικά εντομοκτόνα, με αποτέλεσμα την επικράτηση ανθεκτικών εντόμων που είναι ακόμη δυσκολότερο να περιοριστούν (Guillem-Amat et al., 2020). Προκειμένου να μειωθεί η χρήση τέτοιων αναποτελεσματικών μεθόδων, το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας στράφηκε σε ειδο-ειδικές μεθόδους, όπως η Τεχνική Στείρου Εντόμου, που βασίζονται στο γενετικό υπόβαθρο του εντόμου και σε τυχόν τροποποιήσεις του, για να πετύχουν τον περιορισμό του παρασιτικού είδους.

## 1.2. Τεχνική στείρων εντόμων (SIT)

Η τεχνική στείρων εντόμων (SIT) είναι μία μέθοδος ειδο-ειδική και φιλική προς το περιβάλλον και αποτελεί μέρος κάποιων στρατηγικών διαχείρισης παρασιτικών εντόμων (Area-Wide Integrated Pest Management, AW-IPM) που τείνουν να έχουν παγκόσμια εφαρμογή (Vreysen et al., n.d.). Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην μαζική εκτροφή των εντόμων, στην στείρωσή τους με την χρήση ιονίζουσας ακτινοβολίας και τελικά στην απελευθέρωσή τους στη φύση. Η ιδέα για την ανάπτυξη της συγκεκριμένης μεθόδου προήλθε από τον Edward F. Knipling (1955). Συγκεκριμένα, ανέφερε ότι η στοχευμένη απελευθέρωση μεγάλου αριθμού στείρων αρσενικών θα μπορούσε να διαταράξει τον αναπαραγωγικό κύκλο του εντόμου-παράσιτου, μειώνοντας σταδιακά τον πληθυσμό του (Knipling, 1955). Έτσι, αναφέρεται ότι όλη η διαδικασία περιλαμβάνει τέσσερα στάδια που είναι κατά σειρά η μαζική εκτροφή του στοχευόμενου είδους σε ειδικές εγκαταστάσεις, η στείρωση των αρσενικών ατόμων του είδους με την χρήση ιονίζουσας ακτινοβολίας, η συσκευασία και μεταφορά τους σε περιοχές που κινδυνεύουν από την ραγδαία εξάπλωση του εντόμου και τελικά η απελευθέρωση των στείρων αρσενικών στις περιοχές αυτές, όπου συναγωνίζονται τα αρσενικά που βρίσκονται στον αγρό για την σύζευξή τους με τα θηλυκά αγρίου-τύπου. Η σύζευξη αυτή έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή μη βιώσιμων απογόνων και άρα την μείωση της αναπαραγωγικής ικανότητας του πληθυσμού και την καταστολή ή εξάλειψη του εντόμου (Capinera, 2008).

Στόχος της μεθόδου είναι να ευνοήσει τη σύζευξη των απελευθερωμένων στείρων αρσενικών με τα αγρίου-τύπου θηλυκά, έτσι ώστε να καταστείλει, τοπικά εξαλείψει ή περιορίσει τον πληθυσμό των παρασιτικών εντόμων που στοχεύει. Έχει αποδειχθεί ότι, οι απελευθερώσεις μόνο των στείρων αρσενικών είναι οικονομικά αποδοτικότερες από τις κοινές απελευθερώσεις με τα θηλυκά. Επιπλέον, με αυτόν τον τρόπο μειώνεται η ζημιά στις καλλιέργειες λόγω της απουσίας ωτοκίας των θηλυκών, ενώ αυξάνεται η πιθανότητα ζευγαρώματος των στείρων αρσενικών με τα αγρίου-τύπου θηλυκά (Plá et al., 2021).

### 1.2.1. Μέθοδος στείρωσης των αρσενικών εντόμων

Η ακτινοβολήση πραγματοποιείται συνήθως με ακτίνες Χ ή γ σε αρσενικές νύμφες λίγο πριν την εκκόλαψη, αφού έχει προηγηθεί ο διαχωρισμός των αρσενικών ήδη από το στάδιο του αυγού. Η ακτινοβολία μπορεί να προκαλέσει δίκλωνες ρήξεις και χρωμοσωμικές ανακατατάξεις στο γονιδίωμα των γαμετικών κυττάρων. Έτσι, προκύπτουν σεξουαλικά ενεργά αρσενικά, τα οποία ζευγαρώνουν με τα αγρίου-τύπου θηλυκά αλλά οι απόγονοι που δημιουργούνται δεν εκκολάπτονται, αφού τα σπερματοζωάρια φέρουν βλάβες στο DNA τους. Η δόση και ο τύπος της ακτινοβολίας μελετήθηκαν από ερευνητές, οι οποίοι σύγκριναν τις ακτίνες Χ και γ ανάλογα με το ποσοστό στείρότητας και επιβίωσης, αλλά και την ικανότητα πτήσης

και αναπαραγωγής των στείρων αρσενικών. Επομένως, τα μεγαλύτερα ποσοστά στειρότητας (99%) παρατηρήθηκαν σε 91 Gy από ακτίνες Χ και 125 Gy από ακτίνες γ, στην οποία τα αρσενικά επιβιώνουν και διατηρούν την ικανότητα αναπαραγωγής τους (Mastrangelo et al., 2010).

### 1.2.2. Εφαρμογές της τεχνικής SIT

Η μέθοδος έχει εφαρμοστεί με επιτυχία σε περιοχές της Αμερικής (Χιλή, Αργεντινή κ.α.) (Gonzalez & Troncoso, n.d.; Guillén & Sánchez, n.d.), αλλά και στην Κροατία και Ισπανία (Juan-Blasco et al., 2014). Αρχικά, εφαρμόστηκε στο νησί Curacao για την καταπολέμηση του *Cochliomyia hominivorax* (New World Screwworm). Με βάση τα στάδια της μεθόδου που είχε περιγράψει ο Knipling και δεδομένου ότι τα θηλυκά άτομα ζευγαρώνουν μόνο μία φορά στη διάρκεια της ζωής τους, η επικράτηση των στείρων αρσενικών ήταν αναμενόμενη και οδήγησε στην δραστική μείωση της αναπαραγωγής και τελικά στην καταπολέμηση του εντόμου στο συγκεκριμένο νησί (Baumhover et al., 1955). Έγιναν προσπάθειες εξάλειψης του συγκεκριμένου εντόμου με παρόμοιο τρόπο στις ΗΠΑ (1960-70), αλλά και στο Μεξικό (1980). Η αποτελεσματική χρήση της μεθόδου προκάλεσε το έναυσμα για την συμβολή της στην καταπολέμηση άλλων εντόμων μεγάλης αγρονομικής σημασίας όπως η *Ceratitis capitata*. Έτσι, από τις αρχές του 1970 εφαρμόστηκαν ευρείας κλίμακας προγράμματα στην Λατινική Αμερική (Guatemala-Mexico-Mediterranean Fruit Fly Programme) με μεγάλη επιτυχία αλλά και στην Μεσόγειο, όπου παρατηρήθηκαν ορισμένες αποτυχίες λόγω δυσκολιών στην μαζική παραγωγή στείρων αρσενικών και απελευθέρωσής τους σε επαρκείς αριθμούς (Dyck et al., 2005; Hendrichs et al., 2002). Ακολούθησαν προσπάθειες εξάλειψης της μύγας τσε-τσε (*Glossina morsitans*) στην Ζανζιβάρη, οι οποίες επίσης είχαν μεγάλη επιτυχία και οδήγησαν στην πλήρη εξάλειψη του παρασίτου από το νησί. Η ανάγκη καταπολέμησης του συγκεκριμένου εντόμου ήταν επιτακτική καθώς είναι υπεύθυνο για την μετάδοση νοσημάτων στους ανθρώπους όπως η ασθένεια του ύπνου, ενώ εκτιμάται ότι οδηγεί στην απώλεια 1,2 δισεκατομμυρίων δολαρίων κάθε χρόνο (Vreysen et al., 2000).

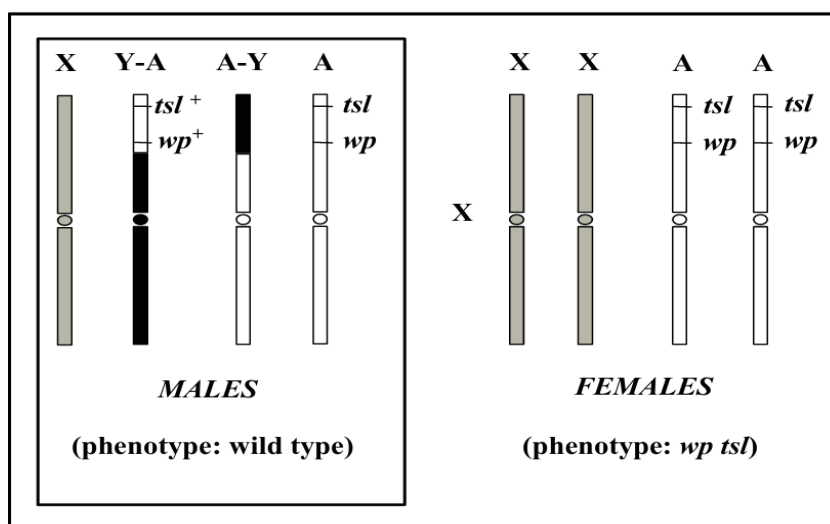
Ωστόσο, η μέθοδος δεν ήταν ιδιαίτερα αποτελεσματική όσον αφορά την αντιμετώπιση των κουνουπιών (*Aedes aegypti*) λόγω της μεγάλης κινητικότητας των εντόμων και της ταχείας αναπαραγωγικής τους τακτικής (Benedict, 2003). Δυσκολίες παρατηρήθηκαν και στον περιορισμό του πληθυσμού διαφόρων εντόμων που ανήκουν στην οικογένεια των Tephritidae, όπως η *Anastrepha ludens*, *Bactrocera dorsalis* και *Bactrocera oleae*. Πιο συγκεκριμένα, στις περιοχές που εφαρμόστηκε η SIT με σκοπό την εξάλειψη της *Anastrepha ludens* εμφανίστηκαν δυσκολίες λόγω της ανεπαρκούς ανταγωνιστικότητας των στείρων έναντι των αρσενικών αγρίου- τύπου (Sánchez-Rosario et al., 2017). Για τους ίδιους λόγους (μειωμένη διάρκεια ζωής, ικανότητα πτήσης, ανταγωνιστικότητα των στείρων αρσενικών, διαταραχή μικροβιώματος λόγω τεχνητής διατροφής)

δεν ήταν αποτελεσματική η εφαρμογή της SIT στην διαχείριση του πληθυσμού της *Bactrocera dorsalis* (Cai et al., 2018; Pérez-Staples et al., 2013). Εξίσου αναποτελεσματική ήταν η προσπάθεια απελευθέρωσης των στείρων αρσενικών του *Bactrocera oleae* (δάκος της ελιάς) που ξεκίνησε στην Κρήτη, Πελοπόννησο και Ιταλία το 1970 και δεν μπόρεσε να συνεχιστεί σε μεγάλη κλίμακα (Tsitsipis, 1977). Οι μικτές απελευθερώσεις στείρων αρσενικών και θηλυκών, καθώς και η απουσία του υποχρεωτικού συμβιώτη *Erwinia Dacicola* από το εντερικό μικροβίωμα των εκτρεφόμενων εντόμων, που είχε ως αποτέλεσμα μειωμένη ανταγωνιστικότητα και χαμηλότερη επιτυχία σύζευξής τους, είναι μερικά από τα προβλήματα που εμπόδισαν τον έλεγχο του πληθυσμού του δάκου της ελιάς (Caruzzo et al., 2005; Sagri et al., 2014). Γι' αυτό, κρίνεται επιτακτική η ανάγκη ανάπτυξης στελεχών γενετικού φυλετικού διαχωρισμού (GSSs), που θα συμβάλλουν στον περιορισμό τόσο της *C. capitata*, όσο και των υπόλοιπων εντόμων που ανήκουν στην οικογένεια των Tephritidae και αποτελούν μία συνεχώς αυξανόμενη απειλή για την γεωργική παραγωγή (Davydova, Yu, et al., 2025).

### 1.2.3. Ανάπτυξη στελεχών γενετικού φυλετικού διαχωρισμού (GSS)

Προκειμένου η εφαρμογή της SIT να είναι αποδοτική πρέπει να υπάρχουν στελέχη που να επιτρέπουν τον διαχωρισμό αρσενικών με θηλυκά στα αρχικά στάδια ανάπτυξης του εντόμου. Έτσι, αναπτύχθηκαν τα δύο πιο επιτυχημένα στελέχη γενετικού φυλετικού διαχωρισμού (Genetic Sexing Strain, GSS) στην εφαρμογή της SIT ενάντια στην Μεσογειακή μύγα: τα VIENNA 7 και VIENNA 8 (Augustinos et al., 2017), τα οποία βασίζονται σε δύο επιλέξιμους δείκτες: τη θερμοευαισθησία και το χρώμα της νύμφης (Vreysen et al., 2021). Για τους συγκεκριμένους φαινοτύπους είναι υπεύθυνα 2 γονίδια, τα *white-pupae* (*wp*) και *temperature-sensitive lethal* (*tsl*), τα οποία βρίσκονται στο πέμπτο χρωμόσωμα. Το γονίδιο *wp* είναι υπεύθυνο για το χρώμα της νύμφης και κληρονομείται με αυτοσωμικό υπολειπόμενο τρόπο. Επομένως, τα ομόζυγα (*wp+/wp+*) καθώς και τα ετερόζυγα (*wp+/wp-*) άτομα για το αλληλόμορφο *wp+* θα έχουν καφέ χρώμα νύμφης, ενώ τα ομόζυγα άτομα (*wp-/wp-*) για το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο *wp-* θα εμφανίσουν λευκό χρώμα νύμφης. Αντίστοιχα, το γονίδιο *tsl* είναι υπεύθυνο για την θερμοευαισθησία και κληρονομείται επίσης με αυτοσωμικό υπολειπόμενο τρόπο. Άρα, τα άτομα που είναι ομόζυγα (*tsl+/tsl+*) και ετερόζυγα (*tsl+/tsl-*) για το αλληλόμορφο *tsl+* θα είναι ανθεκτικά στις υψηλές θερμοκρασίες (34-35° C) ακόμη από το στάδιο του αυγού και θα επιβιώσουν, ενώ τα άτομα που είναι ομόζυγα για το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο *tsl-* (*tsl-/tsl-*) θα πεθαίνουν μετά από το θερμικό σοκ. Με αυτόν τον τρόπο, τα μεταλλαγμένα αλληλόμορφα κληρονομούνται με αυτοσωμικό υπολειπόμενο τρόπο και δεν θα μπορούσαν να συμβάλλουν στον διαχωρισμό του φύλου (Robinson, 2002).

Ωστόσο, μέσω της ακτινοβόλησης σχηματίστηκε εκ προθέσεως μία αμοιβαία μετατόπιση ανάμεσα στο τμήμα του χρωμοσώματος 5 που περιέχει τους γενετικούς τόπους των 2 γονιδίων-δεικτών και ένα τμήμα του αρρενοειδικού χρωμοσώματος Y (Εικόνα 4). Είναι γνωστό ότι στην Μεσογειακή μύγα, το φύλο των εντόμων καθορίζεται από ένα ζεύγος φυλετικών χρωμοσωμάτων, και συγκεκριμένα ισχύει το σύστημα XX/XY, όπου τα αρσενικά είναι XY και φέρουν το φυλο-καθοριστικό χρωμόσωμα Y. Επομένως, τα αρσενικά άτομα που φέρουν επιπλέον στο Y το φυσιολογικό αλληλόμορφο (*wp*<sup>+</sup> και *tsl*<sup>+</sup>) που διασώζει τον φαινότυπο (rescue allele), προέρχονται από καφέ νύμφες και είναι ανθεκτικά στις υψηλές θερμοκρασίες, ενώ τα θηλυκά άτομα προέρχονται από λευκές νύμφες και πεθαίνουν όταν υπόκεινται σε θερμικό σοκ (Sollazzo et al., 2024).

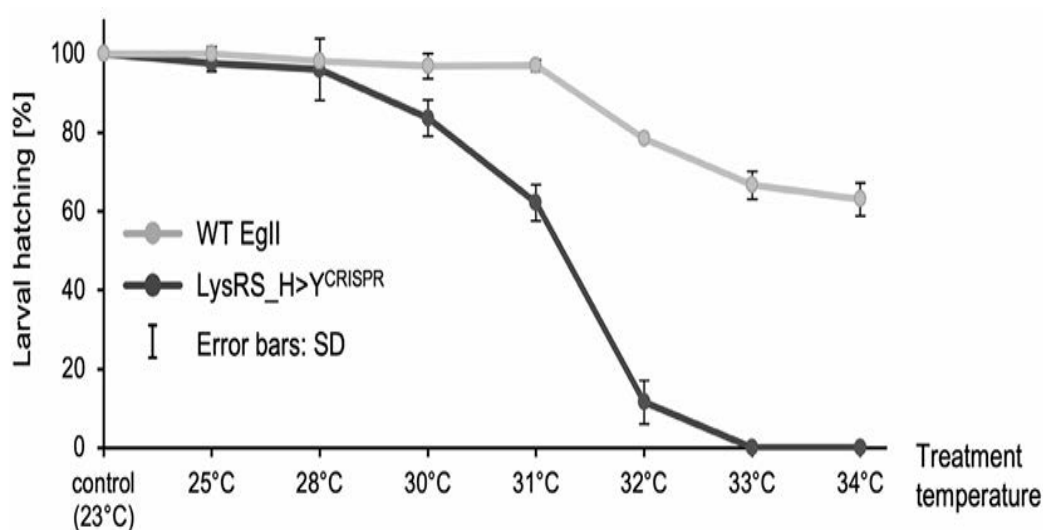


Εικόνα 4: Η βασική δομή του GSS που απεικονίζει την μετάθεση ανάμεσα στο χρωμόσωμα 5 και στο χρωμόσωμα Y που συνδέει την έκφραση των αλληλομόρφων *wp*<sup>+</sup> και *tsl*<sup>+</sup> με το αρσενικό φύλο (Franz, 2005)

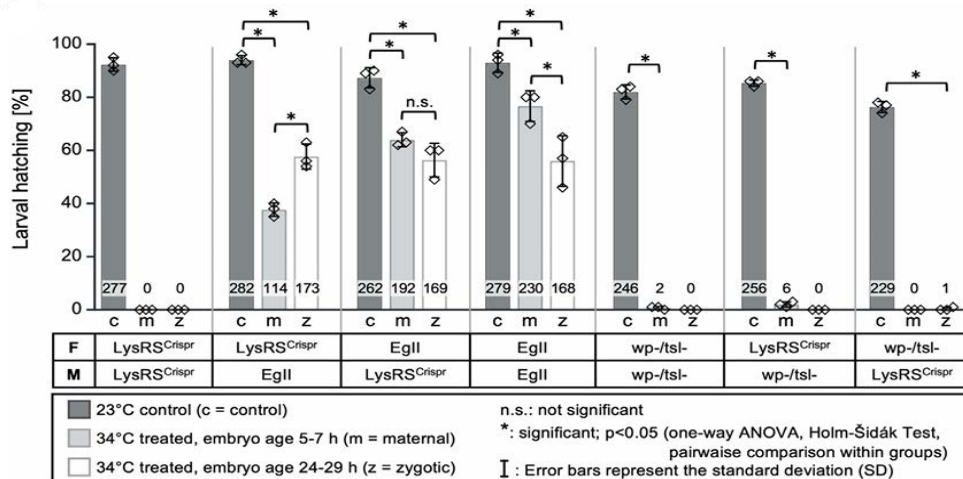
#### 1.2.4. Ταυτοποίηση των γονιδίων *wp* και *tsl*

Το γονίδιο του οποίου η τροποποίηση οδηγεί σε λευκό χρώμα νύμφης (*white pupae*, *wp*) έχει ταυτοποιηθεί και είναι το ίδιο γονίδιο που κωδικοποιεί για έναν μεταφορέα MFS (Ward et al., 2021). Το γονίδιο αυτό είναι εξαιρετικά συντηρημένο και υπεύθυνο για την μεταφορά κατεχολαμινών (ντοπαμίνη και νορεπινεφρίνη) από την αιμολέμφο στο κουκούλι συμβάλλοντας στην σωστή μελανοποίηση και σκλήρυνσή του. Όταν η πρωτεΐνη είναι λειτουργική, οι κατεχολαμίνες μεταφέρονται και δίνουν το καφέ χρώμα της πούπας, ενώ όταν το γονίδιο είναι μεταλλαγμένο και δεν γίνεται σωστή παραγωγή του μεταφορέα, οι κατεχολαμίνες δεν φτάνουν στο κουκούλι έτσι ώστε να παραμένει λευκό (Davydova, Yu, et al., 2025). Αντίθετα, η ταυτοποίηση του γονιδίου *tsl* ήταν περισσότερο πολύπλοκη, αποτέλεσε αντικείμενο εκτενούς έρευνας, όμως φαίνεται ότι έχει επιτευχθεί. Μέσω μεθόδων χαρτογράφησης εντοπίστηκε μία περιοχή στον δεξιό βραχίονα του χρωμοσώματος 5, μεταξύ των γενετικών τόπων *wp* και *Zw*, η οποία

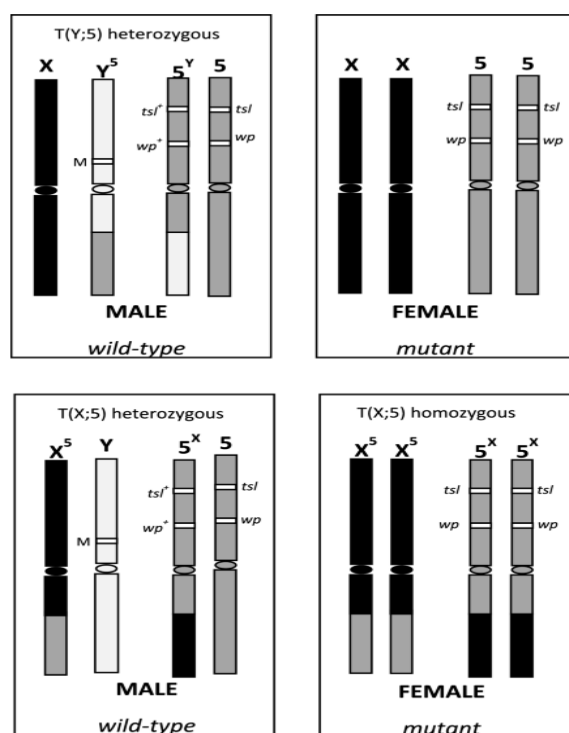
περιλαμβάνει συνολικά 561 γονίδια, από τα οποία τα 33 εμφανίζουν ορθόλογα στην *D. Melanogaster* που εμφανίζουν φαινότυπο παρόμοιο με το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο *tsl* (Sollazzo et al., 2023). Πρόσφατα, χρησιμοποιήθηκε και το γονίδιο *deep orange* (*Ccdor*) ως υποψήφιο γονίδιο που προκαλεί τον φαινότυπο *tsl*. Οι ερευνητές δημιούργησαν στοχευμένες μεταλλάξεις στο τέταρτο και έκτο εξόνιο του γονιδίου, με την βοήθεια του εργαλείου CRISPR/Cas9, έχοντας ως αποτέλεσμα την υψηλή θνησιμότητα σε θηλυκά αυγά και νύμφες όταν εκτίθενται σε θερμοκρασία 36° C (Sollazzo et al., 2024). Ωστόσο, σε πρόσφατη μελέτη, ο φαινότυπος που προκαλείται μετά από εισαγωγή μίας σημειακής μετάλλαξης στο γονίδιο *LysRS* (*Lysyl-tRNA synthetase*) φαίνεται να ταυτίζεται με αυτόν που προκαλεί το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο *tsl* όταν βρίσκεται σε ομοζυγωτία. Η φυσιολογική δράση του γονιδίου αυτού είναι η σύνδεση του αμινοξέος λυσίνη με το αντίστοιχο tRNA που θα μεταφέρει ειδικά το συγκεκριμένο αμινοξύ στην σωστή θέση στο ριβόσωμα κατά την διάρκεια της πρωτεϊνοσύνθεσης. Έτσι, το αμινοξύ λυσίνη δεν μπορεί να συμπεριληφθεί στις πολυπεπτιδικές αλυσίδες, ως συνέπεια τον σχηματισμό μη λειτουργικών πρωτεϊνών. Οι ερευνητές παρατήρησαν ότι τα αυγά που έφεραν την μετάλλαξη εκκόλαπτονταν κανονικά σε θερμοκρασία 25° C, ενώ πέθαιναν πριν την εκκόλαψη ή δεν αναπτύσσονταν σωστά όταν εκτέθηκαν συγκεκριμένα σε θερμοκρασία 34° C (Εικόνα 5, Εικόνα 6) (Aumann et al., 2025).



Εικόνα 5: Ρυθμός εκκόλαψης των προνυμφών που έχουν την σημειακή μετάλλαξη (*LysRS\_H>YCRISPR[E]*) σε σύγκριση με τα WT EglI μετά από 24 ώρες έκθεσης σε αυξανόμενες θερμοκρασίες, σε σύγκριση με την συνθήκη-control στους 23° C (Aumann et al., 2025)



Εικόνα 6: Ρυθμός εκκόλαψης των νυμφών που έχουν προκύψει από διασταυρώσεις των μεταλλαγμένων μυγών *LysRS<sub>H>Y</sub> CRISPR[E]* με *WT EgII* ή/και μεταλλαγμένων *wp-/tsl-* μετά από έκθεση σε θερμοκρασία 34° C (Aumann et al., 2025)



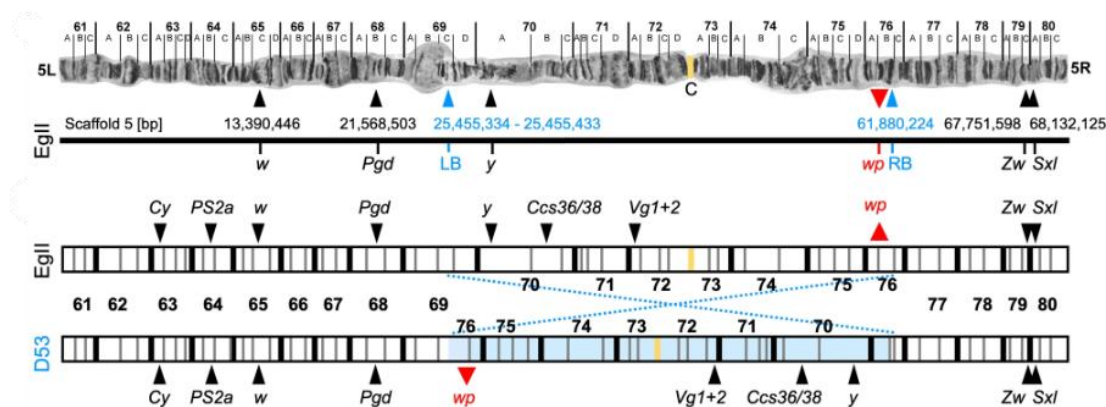
Εικόνα 7: Η δομή των στελεχών γενετικού φυλετικού διαχωρισμού (GSS) της *C. capitata* T(Y;A) και T(XX;AA) (Cáceres et al., 2023)

Εκτός από τα στελέχη VIENNA 7 και 8, έχει αναπτυχθεί και ένα νέο στέλεχος GSS στο οποίο σχηματίστηκε μετάθεση ανάμεσα σε 2 X χρωμοσώματα (XX) και ένα αυτοσωμικό (AA) αντί της τυπικής μετάθεσης ανάμεσα στο χρωμόσωμα Y και ένα αυτοσωμικό. Με την μέθοδο αυτή τα θηλυκά άτομα παραμένουν 100% γόνιμα και μέσω διασταυρώσεων με αγρίου-τύπου αρσενικά άτομα παράγουν περισσότερους απογόνους με μεγαλύτερα επίπεδα εκκολαψιμότητας (82%) από τα θηλυκά του στελέχους

VIENNA 8 (69%), κάτι που καθιστά το συγκεκριμένο στέλεχος πιο αποδοτικό στην εφαρμογή του για την SIT (Εικόνα 7) (Cáceres et al., 2023).

### 1.2.5. Αναστροφή D53

Προκειμένου να μειωθεί η πιθανότητα ανασυνδυασμού μεταξύ των 2 δεικτών (*w<sup>r</sup>* και *tsl*) έτσι ώστε να εξασφαλίζεται γενετική σταθερότητα στο στέλεχος VIENNA 8 και να αποτρέπεται η επαναφορά του φυσιολογικού φαινοτύπου οι ερευνητές



Εικόνα 8:Απεικόνιση των breakpoint της αναστροφής D53 στο χρωμόσωμα 5 της *C.capitata* (LB= left breakpoint, RB= right breakpoint)(Ward et al., 2021)

δημιούργησαν με την χρήση ακτινοβολίας την χρωμοσωμική αναστροφή D53 (Dyck et al., 2005). Η χρωμοσωμική αναστροφή περιλαμβάνει την περιοχή 69C-76C του χρωμοσώματος 5, στην οποία περικλείεται και το γονίδιο *w<sup>r</sup>* αλλά όχι το γονίδιο *tsl* και έχει ως αποτέλεσμα την σύνδεση της έκφρασης των 2 γονιδίων, αφού το *w<sup>r</sup>* μεταφέρεται πιο κοντά στο *tsl*, έτσι ώστε οι 2 δείκτες να χρησιμοποιούνται συνδυαστικά στον φυλετικό διαχωρισμό (Εικόνα 8) (Zacharopoulou et al., 2017). Τα αρσενικά άτομα που φέρουν 3 αντίγραφα των γονιδίων του χρωμοσώματος 5 λόγω της αναστροφής D53 εμφανίζουν μειωμένη βιωσιμότητα, και σε περίπτωση επιβίωσης στειρότητα και αναπτυξιακές ανωμαλίες. Αυτό συμβαίνει πιθανών, διότι τα έντομα λόγω της αναστροφής έχουν δεχθεί επιπλέον ακτινοβολία άρα και μεταλλάξεις που ενδεχομένως να επηρεάζουν την ανάπτυξη και αναπαραγωγή τους. Γι' αυτό το λόγο, επιβιώνουν τα ετερόζυγα αρσενικά (D53/+) στην ανάπτυξη του στελέχους VIENNA 8 (Sim et al., 2017).

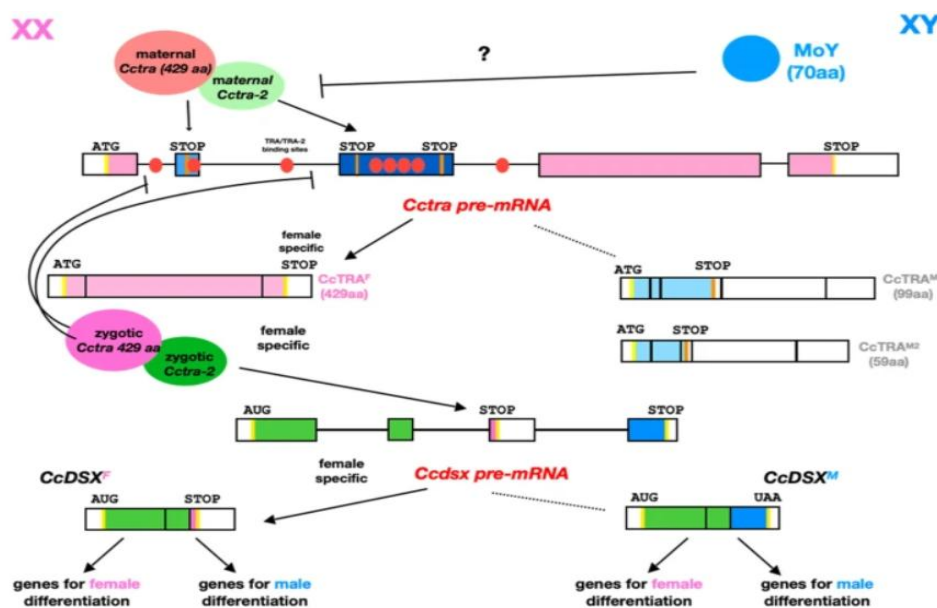
### 1.2.6. Μεταγραφικοί δείκτες για τον έλεγχο της ποιότητας των GSS

Καθώς η SIT επιτυγχάνει τον πληθυσμιακό έλεγχο μέσω της αναπαραγωγής των στείρων αρσενικών, η αποτελεσματικότητα της μεθόδου εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την ποιότητα και ανταγωνιστικότητα των αρσενικών αυτών. Τα στείρα αρσενικά θα πρέπει να επιβιώσουν και να ανταγωνιστούν τα αγρίου-τύπου αρσενικά στο ζευγάρωμα με τα αγρίου-τύπου θηλυκά. Η μαζική εκτροφή των εντόμων σε μεγάλες εγκαταστάσεις και η διαδικασία δημιουργίας των GSS μπορεί να επηρεάσει το γονιδίωμα του εντόμου και κατ' επέκταση την συμπεριφορά του μετά την απελευθέρωση. Η στειρώση των αρσενικών γίνεται με την χρήση ακτινοβολίας, η οποία εισάγει απρόβλεπτες μεταλλάξεις που ενδέχεται να

επηρεάζουν την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων και έχουν ως αποτέλεσμα μειωμένη διάρκεια ζωής, ικανότητα πτήσης, αρμοστικότητα και ανταγωνιστικότητα των στεριών αρσενικών. Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι επηρεάζει την μικροβιακή ποικιλότητα του εντέρου των αρσενικών λόγω τεχνητής διατροφής, κάτι που επίσης έχει συνέπειες στην πέψη, την αντοχή, την πτήση αλλά και στις αναπαραγωγικές επιδόσεις των στεριών αρσενικών (Guerfali et al., 2011). Αποτελέσματα από RNA-seq στο στελέχος VIENNA 7 έδειξε σημαντικές διαφορές στην έκφραση γονιδίων, οι οποίες ενδέχεται να επηρεάζουν τη φυσιολογία και την απόδοση του στελέχους στο πλαίσιο της SIT. Συνολικά, εντοπίστηκαν 968 γονίδια με στατιστικά σημαντική διαφορά στην έκφραση μεταξύ του στελέχους VIENNA 7 και του αγρίου-τύπου στελέχους (hawaiian wild-type population), με την πλειονότητα αυτών να εμπλέκονται σε διαδικασίες όπως η αναπνοή, η κινητικότητα, η λειτουργικότητα των αισθήσεων αλλά και η απόκριση στο στρες (Calla et al., 2014). Ειδικότερα, παρατηρήθηκε μείωση της έκφρασης γονιδίων που με την κινητικότητα, την όραση και την ακοή στο Vienna 7, γεγονός που ενδέχεται να επηρεάζει την ικανότητά του να ανταγωνίζεται τον πληθυσμό αγρίου-τύπου. Αντίθετα, η έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την οξειδωτική αναπνοή ήταν αυξημένη, υποδεικνύοντας πιθανή προσαρμογή του στελέχους σε συνθήκες θερμικού στρες. Εκτός αυτού, η ακτινοβολία επηρεάζει το εντερικό μικροβίωμα των εντόμων, αφού στα ακτινοβολημένα έντομα *Bactrocera dorsalis* και *Bactrocera tryoni* επικρατούν τα ανθεκτικά και μειώνονται τα ωφέλιμα βακτήρια (Cai et al., 2018; Woruba et al., 2019), ενώ στην *C. capitata* και *Anastrepha ludens* η ακτινοβολία επηρεάζει την δομή των βακτηρίων και συγκεκριμένα το σχήμα της πλασματικής μεμβράνης (Deutscher et al., 2019). Η μείωση της ποικιλότητας του εντερικού μικροβιώματος είναι συνδεδεμένη με μειωμένο ρυθμό ανάπτυξης και μικρότερα ποσοστά επιβίωσης, με μειωμένη την παραγωγή φερομονών, την σεξουαλική συμπεριφορά και άρα την πιθανότητα επιτυχούς ζευγαρώματος με αγρίου-τύπου θηλυκά. Επιπλέον, τα ωφέλιμα βακτήρια προστατεύουν από παθογόνα και ρυθμίζουν την ανοσολογική απόκριση, με αποτέλεσμα η μείωση του πληθυσμού τους να οδηγεί σε αυξημένη ευαισθησία σε στρες και λοιμώξεις.

### 1.2.7. Προηγμένες εναλλακτικές προσεγγίσεις

Εκτός από τις μετατοπίσεις που δημιουργήθηκαν μέσω ακτινοβολίας (Υ;5, D53) και είχαν ως σκοπό τον διαχωρισμό των δύο φύλων στο στέλεχος VIENNA 8, αναπτύχθηκαν και άλλα τέτοια στελέχη των οποίων ο φυλετικός διαχωρισμός βασίζεται σε εναλλακτικές προσεγγίσεις. Έτσι, αναπτύχθηκε η στρατηγική φυλετικού διαχωρισμού SEPARATOR, η οποία βασίζεται στο εναλλακτικό μάτισμα που υφίσταται το γονίδιο *tra* προκαλώντας διαχωρισμό του φύλου. Ο φυλοκαθορισμός στα Δίπτερα βασίζεται σε μεταγραφικούς παράγοντες Tra/Tra2, που παράγονται από τα γονίδια *CcTRA/CcTRA2* αντίστοιχα. Τα γονίδια αυτά, αν και ορθόλογα με τα γονίδια *DmTRA/DmTRA2* της *D.melanogaster*, φαίνεται να λειτουργούν με διαφορετικό τρόπο, καθώς έχουν αναπτύξει ένα ειδικό αυτορυθμιστικό για τα θηλυκά μάτισμα. Η μητέρα μεταφέρει στα ωάρια την θηλυκή πρωτεΐνη Tra/Tra2 (maternal contribution) με αποτέλεσμα στα ΧΧ έμβρυα να ενεργοποιείται ένας θετικός αυτορρυθμιστικός βρόχος με τον οποίο απομακρύνονται τα εξόνια M1/M2 (male-specific exons) που περιλαμβάνουν πρόωρα κωδικόνια λήξης. Με αυτόν τον τρόπο, παράγεται η ειδική για τα θηλυκά πρωτεΐνη Tra, η οποία συνεργάζεται με την πρωτεΐνη Tra-2, έτσι ώστε να παράγεται ο θηλυκός φαινότυπος μέσω της συρραφής του pre-mRNA του *doublesex* με ειδικό για θηλυκά τρόπο (Εικόνα 9) (Pane et al., 2002; Perrotta et al., 2023).



Εικόνα 9: Μονοπάτι προσδιορισμού του φύλου στην *C. capitata* με απεικόνιση της δράσης των ρυθμιστικών στοιχείων *Cctra/Cctra2* (Primo et al., 2020)

Οι ερευνητές εισήγαγαν γονίδια που όταν εκφράζονται εκπέμπουν φθορισμό, τα γονίδια *DsRed* (που εκπέμπει κόκκινο χρώμα) και *eGFP* (που εκπέμπει πράσινο χρώμα) υπό τον έλεγχο του ιντρονίου 5 του γονιδίου *tra* που υφίσταται το εναλλακτικό μάτισμα, με αποτέλεσμα το γονίδιο *DsRed* να εκφράζεται μόνο στα αρσενικά και το γονίδιο *eGFP* στα θηλυκά. Οι ομόζυγες σειρές που

δημιουργήθηκαν είχαν την ικανότητα διαχωρισμού του φύλου σε όλα τα στάδια ανάπτυξης του εντόμου, ακόμα και στα πρώιμα, γεγονός που καθιστά δυνατή την έγκαιρη απομάκρυνση των θηλυκών πριν την ενηλικίωση (Davydova et al., 2023).

Επιπλέον, κάποιοι ερευνητές δημιούργησαν ένα στέλεχος (T228) στο οποίο τα θηλυκά άτομα εκκολάπτονται πιο αργά από τα αρσενικά, επιτρέποντας τον έγκαιρο φυλετικό διαχωρισμό τους ακόμη από το στάδιο του αυγού (Calcagno & Vilardi, n.d.). Μελέτησαν επίσης την ικανότητα των αρσενικών ατόμων του συγκεκριμένου στελέχους να ανταγωνίζονται τα αγρίου-τύπου αρσενικά στην αναζήτηση των θηλυκών, την ικανότητα αναπαραγωγής και τον αριθμό των απογόνων και κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η ανταγωνιστικότητά τους είναι επαρκής και μπορεί να έχει επιτυχία σε μελλοντική εφαρμογή της μεθόδου SIT.

Στις προηγμένες εναλλακτικές τεχνικές δημιουργίας των GSS ανήκει και η τεχνική CRISPR/Cas9. Οι ερευνητές δημιούργησαν μεταλλάξεις μέσω CRISPR/Cas9 σε γονίδια που σχετίζονται με τον καθορισμό του φύλου (όπως το *transformer*) ώστε να προκαλέσουν μετατροπή των θηλυκών σε αρσενικά ή την δημιουργία στείρων διαγονιδιακών γραμμών (intersex) (Aumann et al., 2020). Σε πιο προσφατη μελέτη, οι ερευνητές ανέπτυξαν ένα αυτοπεριοριζόμενο σύστημα του πληθυσμού της *C. capitata*, με την χρήση CRISPR/Cas9 στο οποίο συμβαίνει διασταύρωση δύο γενετικά τροποποιημένων στελεχών, ώστε να παραχθούν μόνο στείρα αρσενικά, αποφεύγοντας την ακτινοβολία (Davydova, Liu, et al., 2025). Τέτοιες προηγμένες προσεγγίσεις, επιτρέπουν την στοχευμένη τροποποίηση προκαθορισμένων σημείων του γονιδιώματος (συγκεκριμένων γονιδίων ή ρυθμιστικών περιοχών) με ακρίβεια, σε αντίθεση με τις κλασικές μεθόδους μεταλλαξιγένεσης που προκαλούν μεγάλες χρωμοσωμικές ανακατατάξεις και τυχαίες μετατοπίσεις των γονιδίων-δεικτών. Αυτό ενδεχομένως να έχει αρνητικές επιπτώσεις στην γονιδιακή έκφραση των συγκεκριμένων γονιδίων και άρα στην βιωσιμότητα και συμπεριφορά των εντόμων (YAN et al., 2023).

### 1.3. Διατροφή της Μεσογειακής Μύγας

Η μύγα της Μεσογείου είναι ένα έντομο που περιλαμβάνει στην φυσική διατροφή του κυρίως σακχαρούχες και αζωτούχες ενώσεις. Συγκεκριμένα, οι προνύμφες τρέφονται με τον πολτό ώριμων φρούτων, αφού τα θηλυκά έντομα εναποθέτουν τα αυγά τους ακριβώς σε αυτό το τμήμα του φρούτου και έτσι επιτυγχάνεται η γρήγορη ανάπτυξη των προνυμφών. Αντίθετα, τα ενήλικα άτομα αντλούν την ενέργειά τους από υδατάνθρακες που περιέχουν το νέκταρ και από πρωτεΐνες που προέρχονται από βακτήρια για να ωριμάσουν σεξουαλικά και να αναπτύξουν τις αναπαραγωγικές τους ικανότητες (Demirel, 2007).

Για την προσαρμογή της *C. capitata* σε συνθήκες μαζικής εκτροφής και συνεπώς την ανάπτυξη και συντήρηση εργαστηριακών στελεχών έχουν αναπτυχθεί διάφορες τεχνητές δίαιτες (artificial diets). Αυτές αντικαθιστούν τον φυσικό καρπό

με απλά θρεπτικά συστατικά (π.χ. πρωτεΐνες, υδατάνθρακες, φυτικές ίνες, άλατα) που παρέχονται στο έντομο σε συγκεκριμένη αναλογία. Ωστόσο, αυτό το πέρασμα από την φυσιολογική στην τεχνητή διατροφή απαιτεί εξοικείωση του εντερικού μικροβιώματος, καθώς πολλά στελέχη αναπτύσσουν συμβιωτικές κοινότητες που συμβάλλουν στην πέψη και τον μεταβολισμό, κάτι που μπορεί να προκαλέσει αλλαγές στην φυσική κατάσταση και συμπεριφορά του εντόμου (Morrow et al., 2015). Φυσιολογικά, τα βακτήρια είναι αυτά που συμβάλλουν στην διάσπαση φυτικών πολυσακχαριτών και στην αποτοξίνωση φυτικών δευτερογενών μεταβολιτών. Παρ' όλα αυτά η τεχνητή διατροφή, τα επηρεάζει τόσο, ώστε ο ρόλος τους να μετατοπίζεται στην απορρόφηση θρεπτικών και στη σύνθεση βιταμινών και αμινοξέων, επειδή η τροφή είναι πιο φτωχή σε αυτά τα συστατικά. Επομένως, η σύσταση του εντερικού μικροβιώματος αλλάζει, καθώς ορισμένα γένη (*Enterobacter*, *Klebsiella*) πολλαπλασιάζονται και επικρατούν έναντι άλλων συμβιωτικών βακτηρίων που χάνονται. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τα εργαστηριακά στελέχη που εκτρέφονται για την χρήση τους στην SIT να προσαρμόζονται περιορίζοντας τον αριθμό των βακτηρίων που στελεχώνουν το εντερικό μικροβίωμα, κάτι που φαίνεται να επηρεάζει την ανταγωνιστικότητά τους σε σχέση με τα αγρίου-τύπου αρσενικά (Augustinos et al., 2021).

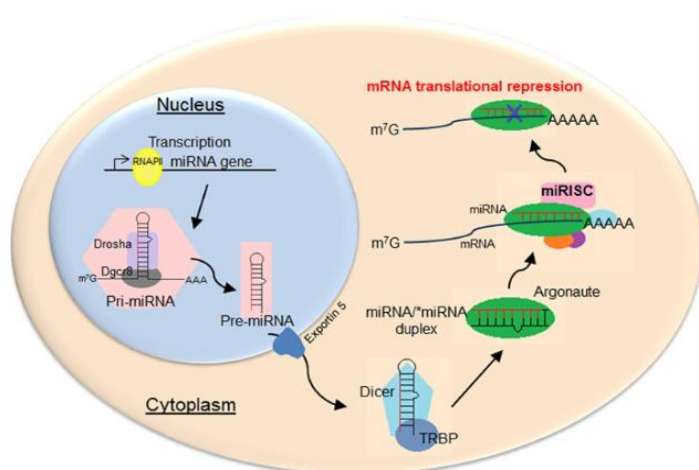
Η ίδια επίδραση της τεχνητής αυτής διατροφής παρατηρήθηκε και στην μύγα τσε-τσε (*Glossina morsitans*), η οποία περιλαμβάνει στο μικροβίωμά της υποχρεωτικούς συμβιώτες (*Wigglesworthia*, *Sodalis*, *Wolbachia*), οι οποίοι συμβάλλουν στην σωστή λειτουργία του ανοσοποιητικού και της αναπαραγωγικής ικανότητας του εντόμου. Πιο συγκεκριμένα, η απουσία κάποιων συμβιωτών (*Wigglesworthia*) μειώνει την αντίσταση του εντόμου σε λοιμώξεις, προκαλώντας μεγάλη οικονομική ζημιά που δυσχεραίνει την αποδοτική εφαρμογή της μεθόδου SIT (Abd-Alla et al., 2013).

### 1.3.1. Συνέπειες ειδικών διατροφικών συνθηκών στην αρμοστικότητα και ικανότητα ζευγαρώματος των στελεχών VIENNA 8 και EGII

Η τεχνητή διατροφή που χρησιμοποιείται στη μαζική εκτροφή των εντόμων υπό εργαστηριακές συνθήκες τείνει να απλοποιεί και να αλλάζει την σύνθεση του μικροβιώματος του εντέρου, ως συνέπεια την διαφοροποίηση της φυσιολογίας και συμπεριφοράς του εντόμου. Μία πρωτοποριακή μελέτη αποτέλεσε το έναυσμα για την δημιουργία μίας διαφοροποιημένης, από την τυπική εργαστηριακή, διατροφής εμπλουτισμένης με προβιοτικά βακτήρια που έχουν πολλά οφέλη για το έντομο, όπως θα αναλυθεί στη συνέχεια. Οι ερευνητές μελέτησαν την σύνθεση του εντερικού μικροβιώματος στα εργαστηριακά στελέχη σε σχέση με τα στελέχη της Μεσογειακής μύγας που βρίσκονται στο φυσικό τους περιβάλλον και κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι τα πρώτα εμφανίζουν χαμηλότερη μικροβιακή ποικιλότητα, η οποία περιλαμβάνει κυρίως συγκεκριμένα στελέχη της

οικογένειας Enterobacteriaceae. Τα εργαστηριακά στελέχη ανέπτυξαν αυτό το αποτέλεσμα ως απόκριση στην τυπική εργαστηριακή διατροφή. Επιπλέον, διαπίστωσαν ότι η ποικιλιότητα του εντερικού μικροβιώματος εξαρτάται και από την εξειδίκευση ως προς τα φυτά-ξενιστές του εντόμου καταλήγοντας στο συμπέρασμα ότι γενικά οι διατροφικές και περιβαλλοντικές συνήθειες μπορούν να διαφοροποιήσουν σε μεγάλο βαθμό την εντερική μικροβιακή κοινότητα (Morrow et al., 2015). Έτσι, η προσθήκη των βακτηρίων *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter hormaechei* στην διατροφή των προνυμφών επιτάχυνε την ανάπτυξη κυρίως των αρσενικών ατόμων του στελέχους VIENNA 8 χωρίς να επηρεάζονται αρνητικά συγκεκριμένα χαρακτηριστικά του εντόμου όπως βάρος, ανταγωνιστικότητα στο ζευγάρωμα και η πτητική τους ικανότητα (Augustinos et al., 2015). Η συγκεκριμένη διατροφή έχει την ικανότητα επίσης να αποκαθιστά ή απλώς να βελτιώνει την αναπαραγωγική ικανότητα των στείρων αρσενικών εντόμων και αύξησε την ανταγωνιστικότητά τους σε σχέση με τα αγρίου-τύπου. Αυτό είναι αδιαμφησβήτητο ένα αποτέλεσμα που μπορεί να βελτιώσει τις μαζικές απελευθερώσεις που περιλαμβάνει η μέθοδος SIT (Gavriel et al., 2011).

#### 1.4. Μηχανισμός RNAi

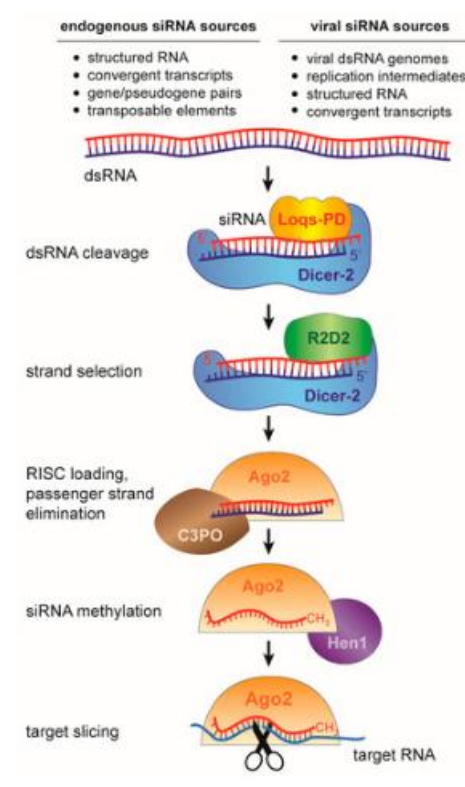


Εικόνα 10: Σχηματική απεικόνιση της βιοσύνθεσης και της λειτουργίας των mRNA στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς (Hajarnis et al., 2015)

Ο μηχανισμός της παρεμβολής RNA ή αλλιώς RNA interference (RNAi) αποτελεί έναν μηχανισμό ρύθμισης, συγκεκριμένα αποσιώπησης, της γονιδιακής έκφρασης γονιδίων- στόχων με βάση τη συμπληρωματικότητα μικρών μορίων RNA με τα μετάγραφα αυτών των γονιδίων. Στα έντομα υπάρχουν 3 κατηγορίες τέτοιων μικρών μορίων RNA και είναι τα microRNA (miRNAs), τα small interfering RNA (siRNAs) και τα P-element induced wimpy testis (Piwi)-interacting RNA (piRNAs). Τα πρώτα δύο εμφανίζουν παρόμοιο μηχανισμό δράσης, ενώ ο μηχανισμός δράσης των piRNA δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως ακόμη (Cooper et al., 2019). Τα miRNAs μεταγράφονται από το γονιδίωμα από την RNAPol II με αποτέλεσμα να παράγονται μόρια RNA που έχουν συμπληρωματικότητα στα άκρα τους, δημιουργώντας έτσι δομές φουρκέτας (pri-miRNAs), αφού τα γονίδια που κωδικοποιούν για miRNA περιέχουν αναστροφές επαναλήψεις. Τα αρχικά αυτά μόρια επεξεργάζεται η Drosha, η οποία δρα ως ριβονουκλεάση και αφαιρεί τα μονόκλωνα άκρα που προεξέχουν με αποτέλεσμα

Ο μηχανισμός της παρεμβολής RNA ή αλλιώς RNA interference (RNAi) αποτελεί έναν μηχανισμό ρύθμισης, συγκεκριμένα αποσιώπησης, της γονιδιακής έκφρασης γονιδίων- στόχων με βάση τη συμπληρωματικότητα μικρών μορίων RNA με τα μετάγραφα αυτών των γονιδίων. Στα έντομα υπάρχουν 3 κατηγορίες τέτοιων μικρών μορίων RNA και είναι τα microRNA

τη δημιουργία των pre-miRNA (Εικόνα 10) (Wilson & Doudna, 2013). Τα miRNA μπορεί να προέρχονται από τα ιντρόνια των γονιδίων που κωδικοποιούν, από μεγάλα ncRNA αλλά και από ψευδογονίδια- θεωρητικά ανενεργές περιοχές που προσομοιάζουν σε γονίδια και θεωρούνται απολύτως μη λειτουργικές (Leitão & Enguita, 2022). Αντίθετα, τα πρόδρομα siRNA δεν σχηματίζουν δομές φουρκέτας, αλλά προκύπτουν από την μεταγραφή και των δύο αντιπαράλληλων κλώνων ενός γονιδίου (NATs: natural antisense transcripts) με την δράση της RNAPol II. Τα siRNA παράγονται συνήθως κατά την διάρκεια μόλυνσης από ιό. Τα μικρά δίκλινα μόρια που σχηματίζονται είναι συμπληρωματικά σε όλο το μήκος τους και άρα τελικά εμφανίζουν πλήρη συμπληρωματικότητα με την αλληλουχία-στόχο σε αντίθεση με τα miRNA. Έχει βρεθεί ότι, στην *Drosophila melanogaster* τα περισσότερα μόρια siRNA προκύπτουν από την μεταγραφή μεταθετών στοιχείων (Schuster et al., 2019).

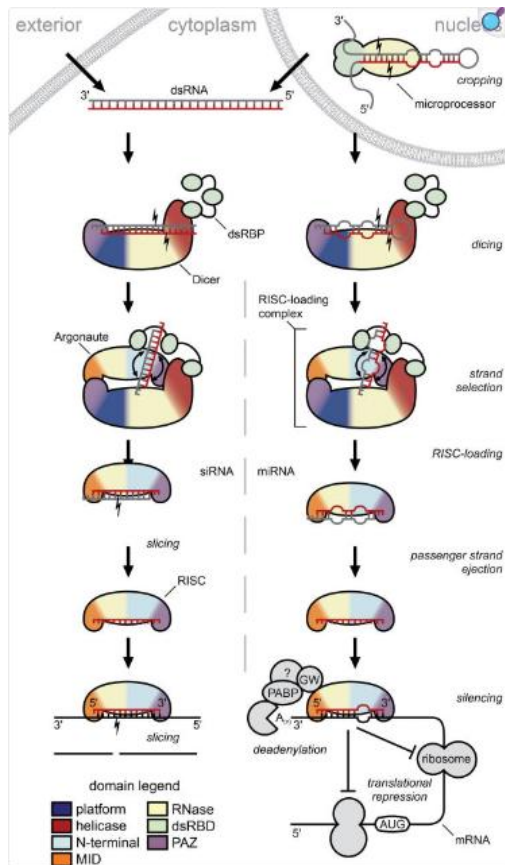


Εικόνα 11: Το μονοπάτι παρεμβολής RNA μέσω siRNA στην *Drosophila melanogaster* (Schuster et al., 2019)

Εν συνεχεία, τα pre-miRNA αλλά και τα siRNA επεξεργάζονται από την Dicer (Dcr1 και Dcr2 αντίστοιχα) και τελικά προκύπτουν μικρά δίκλινα μόρια RNA μήκους 19-24 νουκλεοτιδίων. Η αλυσίδα οδηγός είναι αυτή που θα συνδεθεί λόγω συμπληρωματικότητάς με την αλληλουχία του mRNA που στοχεύεται για σίγηση και άρα αυτή η αλυσίδα προσδένεται στην πρωτεΐνη αργοναύτη (Ago), η οποία είναι μέρος ενός πολύ-πρωτεϊνικού συμπλόκου σίγησης επαγόμενο από RNA (RISC, RNAi induced silencing complex). Το σύμπλοκο αυτό εναποθέτει συνήθως τα siRNA και miRNA στην 3' αμετάφραστη περιοχή του mRNA- στόχου (Εικόνα 11) (Wilson & Doudna, 2013). Τα miRNA φορτώνονται συνήθως στην πρωτεΐνη Ago1 και οδηγούν σε διακοπή της μετάφρασης με πολλούς τρόπους. Πιο συγκεκριμένα, μπορεί να παρεμβάλλονται στην μετάφραση που βρίσκεται ήδη σε εξέλιξη από ένα ριβόσωμα, εμποδίζοντας την επιμήκυνση της μετάφρασης ή προκαλώντας πρωτεόλυση του πολυπεπτιδίου που παράγεται.

Επίσης, τα miRNA συνήθως αναστέλλουν την έναρξη της μετάφρασης με διαφορετικούς μηχανισμούς (Leitão & Enguita, 2022). Αντίθετα, τα siRNA είναι υπεύθυνα για την αποικοδόμηση του mRNA-στόχου, διότι μεταφέρονται από την Ago2 και προσδένονται πλήρως συμπληρωματικά με αυτό. Ένας τρόπος αποικοδόμησης είναι η προαγωγή της απαδενυλίωσης και της επακόλουθης αφαίρεσης της καλύπτρας από το 5' άκρο του mRNA-στόχου (Schuster et al., 2019).

### 1.4.1. Εξωγενής ενεργοποίηση του μηχανισμού RNAi μέσω siRNA



Εικόνα 12: Τα siRNA (αριστερά) και miRNA (δεξιά) μονοπάτια που οδηγούν στην παρεμβολή RNA.

Η ενεργοποίηση της παρεμβολής RNA στα έντομα μπορεί να πραγματοποιηθεί και μέσω της χορήγησης εξωγενών μορίων RNA. Αυτά μπορεί είτε να προέρχονται από ιούς είτε να χορηγούνται πειραματικά, με μεθόδους όπως η ένεση ή η λήψη μέσω τροφής (Cooper et al., 2019). Για την χορήγηση σε πειραματικό επίπεδο χρησιμοποιούνται συνήθως δίκλινα μόρια RNA (dsRNA) πιο σπάνια δίκλινα μικρά αποσιωπητικά RNA (siRNA) με φουρκέτα ή χωρίς. Τα dsRNA, που έχουν μέγεθος 200-520 bp, μετά την είσοδό τους στο κύτταρο υδρολύονται από την ενδονουκλεάση Dicer και παράγουν μία πληθώρα μορίων siRNA διαφορετικού μήκους (Darrington et al., 2017). Με την είσοδο του dsRNA γίνεται αναγνώριση και αποικοδόμηση των ώριμων mRNA του γονιδίου-στόχου με αποτέλεσμα να μειώνονται και τα μόρια της παραγόμενης πρωτεΐνης (Εικόνα 12). Με αυτόν τον τρόπο παρατηρούνται οι φαινοτυπικές αλλαγές στα έντομα και

συνδέεται το γονίδιο με συγκεκριμένη λειτουργία (Scolari et al., 2014). Ωστόσο, μπορεί να χορηγηθούν εξ αρχής και siRNAs, το μήκος των οποίων σχεδιάζεται ανάλογα τον οργανισμό που θα γίνει η σίγηση. Σε πειράματα στην *D. melanogaster* έχει παρατηρηθεί ότι τα siRNAs μήκους 21 νουκλεοτιδίων μπορούν να λειτουργήσουν ικανοποιητικά, αλλά η αποτελεσματικότητα αυξάνεται αν χορηγηθούν siRNAs με 2 προεξέχοντα νουκλεοτίδια στο 3' άκρο τους (Elbashir, 2001).

## 2. Σκοπός

Σκοπός της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας είναι η χρήση των δύο στελεχών της Μεσογειακής μύγας, του αγρίου-τύπου εργαστηριακού στελέχους EGII και του στελέχους VIENNA 8 που έχει προκύψει με κλασσική μεταλλαξιγένεση, ώστε να εντοπιστούν διαφορές στην έκφραση γονιδίων που ενδεχομένως να μπορούν να αξιοποιηθούν ως μεταγραφομικοί δείκτες ελέγχου ποιότητας. Η αναγνώριση τέτοιων γονιδίων μπορεί να παρέχει ένα σύνολο μεταγραφομικών δεικτών για τον συνεχή ποιοτικό έλεγχο των αρσενικών που στερώνονται με ακτινοβολία και μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε τρέχουσες ή μελλοντικές εφαρμογές της SIT. Γι' αυτό επιλέχθηκαν από το σύνολο των διαφορεκώς εκφραζόμενων, γονίδια προκειμένου να επιβεβαιωθεί πειραματικά η διαφορεική έκφραση και στη συνέχεια έγιναν λειτουργικά πειράματα με RNAi έναντι του διαφορεκώς εκφραζόμενου γονιδίου *CG2811*.

## 3. Υλικά και Μέθοδοι

### 3.1. Μεταγραφομική μελέτη για την επιλογή γονιδίων-στόχων

Με βάση τα αποτελέσματα του RNA-seq (Εικόνα 14) και ορισμένες παραμέτρους που τέθηκαν ( $p\text{Value} < 0.01$  και  $\log\text{FC} > 2$ ) περιορίστηκε ο αριθμός των διαφορικά εκφραζόμενων γονιδίων, έτσι ώστε να έχουν μεγάλη διαφορά στην έκφραση και μεγάλη στατιστική σημαντικότητα. Τα γονίδια είναι καταγεγραμμένα με τον γονιδιακό τόπο στο γονιδίωμα της *C.capitata* (π.χ. CCAP1982\_LOCUS22924) και για να βρούμε πληροφορίες για την λειτουργία τους βρίσκουμε τα ορθόλογά τους στο γονιδίωμα της *D.melanogaster* (π.χ. *putative gamma-glutamylcyclotransferase CG2811*). Αναζητούμε το όνομα αυτό στην βάση δεδομένων FlyBase και βρίσκουμε πληροφορίες για την λειτουργία, το προφίλ έκφρασης καθώς και τους φαινοτύπους που προκαλούν τα διαφορετικά αλληλόμορφα του γονιδίου στον οργανισμό μοντέλο *D.melanogaster*, υποθέτοντας παρόμοια δράση του γονιδίου και στην *C.capitata*, αφού και οι δύο οργανισμοί ανήκουν στην οικογένεια των Διπτέρων. Επιλέγουμε κάποια γονίδια με βάση την δράση τους, λαμβάνοντας υπόψιν την χρήση τους ως δείκτες στον έλεγχο ποιότητας των νέων GSS, αλλά και στην εύκολη παρατήρηση του φαινοτύπου τους μετά από ενδεχόμενη σίγηση της έκφρασής τους. Με άλλα λόγια, επιλέχθηκαν γονίδια που εμπλέκονται στην ικανότητα πτήσης ή στην αναπαραγωγική ικανότητα των εντόμων.

### 3.2. Εργαστηριακές συνθήκες πειράματος

Το στέλεχος της Μεσογειακής μύγας *Ceratitis capitata* που χρησιμοποιήθηκε για την διεξαγωγή των πειραμάτων είναι το εργαστηριακό Egypt II. Στο εντομοτροφείο τα έντομα διαβίωναν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος  $23 \pm 2^\circ \text{C}$  και υγρασία  $65 \pm 5\%$  με φωτοπερίοδο 14:10 (φως: σκοτάδι). Για την ανάπτυξη του πληθυσμού που χρησιμοποίησα στην παρούσα διπλωματική συλλέγονται αυγά, κατά την περίοδο ενηλικίωσης και ωρίμανσης των ενήλικων εντόμων του κύριου πληθυσμού. Τα αυγά τοποθετούνται σε τροφή προνυμφών και αρχίζουν να εκκολάπτονται 2 μέρες μετά την συλλογή τους. Το στάδιο της προνύμφης διαρκεί περίπου μία εβδομάδα, στο τέλος της οποίας έχουμε προνύμφες 3<sup>ου</sup> σταδίου, οι οποίες μεταφέρονται σε άμμο, όπου θα μετατραπούν σε νύμφες. Τις επόμενες πραγματοποιείται η μεταφορά των νυμφών σε κλουβί που περιέχει τροφή για ενήλικα έντομα, αφού θα γίνει το τελικό στάδιο της μεταμόρφωσης των νυμφών σε ενήλικα έντομα.

Η τυπική δίαιτα που ακολουθείται σε εργαστηριακά στελέχη EGII και Vienna 8 επιτρέπει την μαζική εκτροφή τους σε εργαστηριακές συνθήκες. Συγκεκριμένα, η τροφή των προνυμφών αποτελείται από προϊόντα δημητριακών (π.χ. σιτάλευρο), μαγιά ως βασική πηγή πρωτεΐνης και βιταμινών, ζάχαρη για ενέργεια και διάφορα

διαλύματα που συγκρατούν την υγρασία, ενώ εξίσου σημαντική είναι η προσθήκη συντηρητικών που αναστέλλουν την ανάπτυξη βακτηρίων και μυκήτων (Πίνακας 1).

*Πίνακας 1: Συστατικά τροφής προνυμφών του εργαστηρίου*

| Συστατικά                 | Ποσότητα |
|---------------------------|----------|
| Νερό βρύσης               | 450ml    |
| Μαγιά                     | 30gr     |
| Ζάχαρη                    | 30gr     |
| Χαρτοβάμβακας             | 30gr     |
| Διάλυμα χοληστερόλης      | 10ml     |
| Διάλυμα HCl               | 10ml     |
| Διάλυμα βενζοϊκού νατρίου | 10ml     |

Το διάλυμα χοληστερόλης περιέχει 25gr χοληστερόλη, 350ml dH<sub>2</sub>O, 125ml 95% EtOH και το διάλυμα βενζοϊκού νατρίου περιέχει 25gr βενζοϊκό νάτριο, 75ml dH<sub>2</sub>O και 150ml 95% EtOH.

Η τροφή των ενηλίκων είναι απλούστερη, καθώς χρησιμοποιείται η υδρολυμένη μαγιά ως πηγή αμινοξέων και η ζάχαρη ως πηγή υδατανθράκων σε αναλογία 3:1.

### 3.3. Συλλογή δειγμάτων

Προκειμένου να δημιουργηθεί το προφίλ έκφρασης του γονιδίου CG2811 συλλέχθηκαν δείγματα (κοιλίες των ενήλικων θηλυκών και αρσενικών εντόμων) με 4 βιολογικές επαναλήψεις για τα αρσενικά και αντίστοιχα 4 βιολογικές επαναλήψεις για τα θηλυκά. Το κάθε δείγμα περιλαμβάνει 3 κοιλίες διαφορετικών εντόμων, άρα είναι pool των 3. Τα δείγματα συλλέχθηκαν 4 ημέρες μετά την μεταμόρφωση των νυμφών σε ενήλικα έτσι ώστε τα έντομα να είναι σεξουαλικά ώριμα (το γονίδιο εκφράζεται ιστοειδικά μόνο σε testes και gut σύμφωνα με τα δεδομένα RNA-seq που διαθέτουμε). Συλλέχθηκαν, σύμφωνα με το παραπάνω πρότυπο, δείγματα EGII και Vienna 8 στα οποία ακολουθήθηκε η τυπική διαίτα (Standard Diet), καθώς και δείγματα EGII και Vienna 8, στα οποία ακολουθήθηκε η διαίτα εμπλουτισμένη με προβιοτικά (Bacterial Diet).

### 3.4. Απομόνωση RNA (RNA extraction)

Για την απομόνωση του ολικού RNA από τα παραπάνω δείγματα χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο Extrazol (GRISP) και ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο που προτείνεται από τον κατασκευαστή του, με αποτέλεσμα τον διαχωρισμό του RNA από τα υπόλοιπα συστατικά των ιστών του εντόμου (πρωτεΐνες, λιπίδια κ.α.).

Κατά την συλλογή των δειγμάτων ετοιμάστηκαν tubes με 100μl Extrazol, διότι εξασφαλίζει την ακεραιότητα του RNA ακριβώς από τη στιγμή που η κοιλιά του εντόμου διαχωρίζεται από το υπόλοιπο σώμα. Με την ομογενοποίηση προστέθηκαν επιπλέον 50μl Extrazol και ακολούθησε διαχωρισμός των συστατικών των δειγμάτων με χλωροφόρμιο με το RNA να βρίσκεται στην υδατική φάση, ενώ οι πρωτεΐνες βρίσκονται στην οργανική φάση. Έπειτα, έγινε κατακρήμνιση του συνολικού RNA των δειγμάτων με ισοπροπανόλη και δύο πλύσεις των δειγμάτων με την προσθήκη 70% αιθανόλης. Τέλος, έγινε πλήρης απομάκρυνση της αιθανόλης με την βοήθεια της πιπέτας και επαναδιάλυση των δειγμάτων με ζεστό ddH<sub>2</sub>O.

### 3.5. Ποσοτικοποίηση νουκλεϊκών οξέων (DNA, RNA)

Η ποσοτικοποίηση πραγματοποιείται φασματοφωτομετρικά με τη χρήση του μηχανήματος Quawell Q3000. Με τη μέθοδο αυτή γίνεται δυνατή η μέτρηση συγκέντρωσης σε δείγματα νουκλεϊκών οξέων ή πρωτεϊνών. Χρειάζεται μόνο μικρή ποσότητα δείγματος για την μέτρηση (1μl). Τα νουκλεϊκά οξέα απορροφούν στα 260nm και με βάση την απορρόφησή αυτή το μηχάνημα δίνει μία τιμή συγκέντρωσης, κάνοντας την μετατροπή χρησιμοποιώντας τον νόμο του Beer-Lambert. Οι αρωματικές πλευρικές αλυσίδες συγκεκριμένων αμινοξέων των πρωτεϊνών απορροφούν στα 280nm. Έτσι, το μηχάνημα εμφανίζει και τον λόγο A<sub>260/280</sub>, ο οποίος είναι ανάλογος της καθαρότητας του δείγματος των νουκλεϊκών οξέων. Ο λόγος αυτός θα πρέπει να είναι 1,6-1,8 για δίκλωνο DNA και 1,8-2,0 για μονόκλωνο RNA. Γίνεται ποσοτικοποίηση των δειγμάτων μετά την απομόνωση του RNA καθώς και μετά την επεξεργασία με DNase καθώς πρέπει να υπολογίζεται η αραίωση που πρέπει να υποστεί το κάθε δείγμα πριν ακολουθήσει η επόμενη μέθοδος. Επομένως, ο συνολικός όγκος του RNA δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 7000ng συνολικά μετά το RNA extraction και τα 1000ng μετά την κατεργασία με DNase.

### 3.6. Επεξεργασία με DNase

Ακολουθεί η κατεργασία με DNase I (Thermo Fischer Scientific), η οποία έχει δράση ενδονουκλεάσης και αποικοδομεί τα τμήματα DNA που μπορεί να υπάρχουν στο δείγμα αυξάνοντας έτσι την καθαρότητα του RNA. Ταυτόχρονα, προστίθεται στο mix και αναστολέας του ενζύμου RNase, προκειμένου να προστατευτεί το RNA από αποικοδόμηση.

Κάθε αντίδραση περιέχει τα απαραίτητα συστατικά που εξασφαλίζουν την σωστή λειτουργία του ενζύμου DNase I (10X Buffer, RNase-out, ddH<sub>2</sub>O) και το αντίστοιχο δείγμα. Ο τελικός όγκος της αντίδρασης είναι 30μl. Μετά από επώαση στους 37° C για 1 ώρα ακολουθεί κατακρήμνιση του RNA με Ammonium Acetate 7.5 M και ddH<sub>2</sub>O. Στην συνέχεια, γίνεται παύση της αντίδρασης με τη χρήση phenol-

chloroform και ομογενοποίηση των δειγμάτων έτσι ώστε να αναμιχθούν η υδατική και οργανική φάση. Η καθίζηση του RNA γίνεται με την προσθήκη 100% αιθανόλης, ενώ απαραίτητη είναι η μεταφορά τους στους  $-80^{\circ}\text{C}$  για τουλάχιστον 1 ώρα (συνήθως η καθίζηση πραγματοποιείται ολονύκτια). Ακολουθούν δύο πλύσεις του RNA με την προσθήκη 70% αιθανόλης και αφού απομακρυνθεί τελείως η αιθανόλη γίνεται επαναδιάλυση των δειγμάτων με ζεστό ddH<sub>2</sub>O.

### 3.7. Σύνθεση cDNA με αντίστροφη μεταγραφή

Για την σύνθεση του cDNA απαιτείται η κατεργασία με αντίστροφη μεταγραφάση MMLV-Reverse Transcriptase (Invitrogen). Η σύνθεσή του γίνεται με την χρήση εκκινητών oligo dTs, δηλαδή ολιγονουκλεοτιδικές αλληλουχίες θυμίνης, οι οποίες προσδένονται στις πολυαδενυλιωμένες ουρές των ώριμων μεταγράφων. Ο συνολικός όγκος της κάθε αντίδρασης είναι 20μl. Τα συστατικά της κάθε αντίδρασης αναφέρονται στον παρακάτω πίνακα.

*Πίνακας 2: Ποσότητες των συστατικών που απαιτούνται για κάθε αντίδραση στην σύνθεση cDNA*

|                         | Ανά αντίδραση |
|-------------------------|---------------|
| 5X Buffer               | 4μl           |
| DTT                     | 2 μl          |
| RNase-out               | 0,5 μl        |
| MMLV-RT                 | 1 μl          |
| Sample (+dNTPs/primers) | 12 μl         |
| WFI                     | 0,5 μl        |
| Total                   | 20 μl         |

1. Προσθήκη 1μl oligo dTs και 1μl dNTPs σε κάθε αντίδραση ή για συντομία δημιουργία ενός μίγματος με τα συνολικά oligo dTs και dNTPs και προσθήκη 2μl από το συγκεκριμένο mix σε κάθε αντίδραση
2. Ακολουθώντας, τα δείγματα τοποθετούνται στους  $65^{\circ}\text{C}$  για 5' και στην συνέχεια στον πάγο για 10'
3. Προσθήκη 8μl από το mix των συστατικών που αναγράφονται στον πίνακα και ακολουθεί επώαση για 2 ώρες στους  $37^{\circ}\text{C}$  ώστε να δράσει το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση
4. Προσθήκη 380μl ddH<sub>2</sub>O έτσι ώστε τα δείγματα να έχουν συγκέντρωση 2,5ng/μl και αποθήκευση στους  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 3.8. Ποσοτική Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (RT-qPCR)

Η συγκεκριμένη μέθοδος χρησιμοποιήθηκε για την σύγκριση των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου σε ενήλικα άτομα που είχαν δεχτεί κατεργασία με dsRNA έναντι του γονιδίου-στόχου σε σχέση με τα ενήλικα άτομα που δέχτηκαν κατεργασία με dsRNA έναντι της μη ενδογενούς αλληλουχίας GFP (control). Πιο

συγκεκριμένα, με την qPCR επιτυγχάνεται η ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης ενός γονιδίου.

Η μέθοδος βασίζεται στην λειτουργία της χρωστικής KAPA SYBR Green, η οποία φθορίζει όταν συνδεθεί με το δίκλωνο DNA. Το σήμα που εκπέμπει η χρωστική αυξάνεται καθώς αυξάνονται εκθετικά και τα δίκλωνα μόρια DNA που συντίθενται, μία διαδικασία παρόμοια με αυτή της απλής αντίδρασης RCR. Η μέθοδος πραγματοποιήθηκε στο μηχάνημα CFX Connect (Bio-Rad Laboratories), απ' όπου υπολογίστηκε η τιμή Ct (Cycle threshold), η οποία αντιπροσωπεύει την τιμή του κύκλου της PCR που χρειάζεται κάθε προϊόν να έχει ενισχυθεί, και αντίστοιχα το σήμα που πρέπει να εκπέμψει η χρωστική, για να ξεπεράσει το κατώφλι φθορισμού. Για την μελέτη της μείωσης της έκφρασης μετά την σίγηση μέσω RNAi χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος ανάλυσης των αποτελεσμάτων της qPCR, των Livak K.J. και Schmittgen T.D., η οποία χαρακτηρίζεται και ως μέθοδος 2-ΔΔCt. Όλες τις φορές που χρησιμοποιήθηκε η συγκεκριμένη μέθοδος χρησιμοποιήθηκε ως ιδιοσύστατο γονίδιο το γονίδιο της αφυδρογονάσης της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεύδης, *GAPDH*, που εμπλέκεται στην διαδικασία της γλυκόλυσης (Sagri et al., 2017). Με βάση την έκφραση του ιδιοσύστατου γονιδίου ελέγχθηκε και η έκφραση των γονιδίων μεταξύ των δύο διαφορετικών group που προέκυψαν από τις ενέσεις. Έτσι, δημιουργείται η τιμή ΔCt, ενώ η τιμή ΔΔCt αφορά την σύγκριση της έκφρασης του γονιδίου-στόχου στα δείγματα που έγινε χορήγηση του dsRNA για το γονίδιο αυτό σε σχέση με τα δείγματα που έγινε χορήγηση του dsRNA για το γονίδιο- μάρτυρα (*GFP*) . Η έκφραση του γονιδίου-στόχου στην δεύτερη ομάδα δειγμάτων ορίζεται ως 100%.

### 3.9. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

Η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης PCR χρησιμοποιήθηκε για απομόνωση και ενίσχυση του γονιδίου ενδιαφέροντος από το δείγμα που εμφάνισε την χαμηλότερη τιμή Ct στα αποτελέσματα της qPCR και επομένως το δείγμα με την μεγαλύτερη ποσότητα cDNA.

Η μέθοδος βασίζεται στην δράση μίας θερμοανθεκτικής DNA πολυμεράσης, την Taq DNA πολυμεράση ( αφού απομονώθηκε από το βακτήριο *Thermus aquaticus*) η οποία διατηρεί τη λειτουργία της ακόμη και σε υψηλές θερμοκρασίες που απαιτούνται για την αρχική αποδιάταξη του DNA (95° C). Η πολυμεράση ενισχύει το τμήμα του DNA, στο οποίο υβριδοποιούνται οι ειδικά σχεδιασμένοι primers και τα δίκλωνα μόρια DNA αυξάνονται με εκθετικό ρυθμό.

Ακολουθούν τα συστατικά και οι συνθήκες της αντίδρασης που χρησιμοποιήθηκαν.

| Συστατικά           | 25ul ανά αντίδραση | Τελική συγκέντρωση |
|---------------------|--------------------|--------------------|
| ddH <sub>2</sub> O  | 15,9ul             | N/A                |
| 10X KAPA Taq Buffer | 2,5ul              | 1X                 |

|                                |       |                 |
|--------------------------------|-------|-----------------|
| 10mM dNTP Mix                  | 0,5ul | 0,2mM το καθένα |
| 10μM Forward Primer            | 1ul   | 0.4 μM          |
| 10μM Reverse Primer            | 1ul   | 0.4 μM          |
| 5 U/μL KAPA Taq DNA Polymerase | 0,1ul | 0,5 U           |
| Template                       | 4ul   | -               |

| Βήμα              | Θερμοκρασία | Διάρκεια | Κύκλοι |
|-------------------|-------------|----------|--------|
| Αρχική αποδιάταξη | 95°C        | 3min     | 1      |
| Αποδιάταξη        | 95°C        | 30 sec   | 40     |
| Υβριδοποίηση      | 55°C ή 62°C | 30 sec   |        |
| Επέκταση          | 72°C        | 30sec    |        |
| Τελική επέκταση   | 72°C        | 3 min    | 1      |
| Σταθεροποίηση     | 4°C         | forever  | 1      |

Ο χρόνος επιμήκυνσης υπολογίζεται ανάλογα με το μέγεθος του προϊόντος, αφού για την ενίσχυση 1000 βάσεων απαιτείται 1 λεπτό. Το μέγεθος του γονιδίου ενδιαφέροντος είναι 350bp, οπότε χρειάζονται τουλάχιστον 20". Για να είμαστε βέβαιοι για την επιμήκυνση, το ρυθμίσαμε στα 30". Η θερμοκρασία υβριδοποίησης των εκκινητών διαφέρει ανάμεσα στα ζεύγη τους και υπολογίζεται από την μέση θερμοκρασία τήξης τους (melting temperature,  $T_m$ ) - 5° C. Για την πρώτη PCR η θερμοκρασία ήταν στους 55° C, ενώ στην rePCR θερμοκρασία έφτασε τους 62° C. Αυτό συμβαίνει, διότι στην πρώτη PCR οι αλληλουχίες που προσδένονται πρώτα στο DNA είναι οι συμπληρωματικές του και βρίσκονται καθοδικά και ανοδικά των άκρων T7 στον Forward και Reverse αντίστοιχα, ενώ τα άκρα T7 προεξέχουν. Στην re-PCR ενισχύεται και το τμήμα των άκρων T7 και απαιτείται μεγαλύτερη θερμοκρασία υβριδοποίησης καθώς έχουν και μεγαλύτερο % GC.

Προκειμένου να παραχθούν τα dsRNA που στοχεύουν στην μείωση της έκφρασης του γονιδίου-στόχου και του γονιδίου-μάρτυρα λόγω συμπληρωματικότητας έγινε αρχικά PCR, ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης και gel extraction των επιθυμητών ζωνών. Το προϊόν αυτό χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα για μία δεύτερη PCR (re-PCR), η οποία πραγματοποιείται σε μεγαλύτερη θερμοκρασία από την αρχική (62° C), διότι με την πρώτη γίνεται σύνδεση των T7 άκρων στο υπόστρωμα, ενώ η δεύτερη είναι αυτή που θα αντιγράψει συγκεκριμένα μόνο το γονίδιο-στόχο. Έτσι, όλες οι επιθυμητές ζώνες απομονώθηκαν από την δεύτερη ηλεκτροφόρηση και το τμήμα του γονιδίου που περιβάλλεται από τα T7 άκρα χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση του dsRNA.

### 3.10. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε για τον διαχωρισμό των προϊόντων της PCR που αναλύθηκε προηγουμένως, προκειμένου να εξακριβωθεί αν το cDNA που ενισχύθηκε είναι τμήμα του γονιδίου ενδιαφέροντος. Η μέθοδος βασίζεται στην ικανότητα των μορίων DNA να διαπερνούν τους πόρους που δημιουργεί η αγαρόζη και να διαχωρίζονται ανάλογα με το μέγεθός τους, αφού τα μικρότερα μόρια κινούνται πιο γρήγορα προς τον θετικό πόλο μετά την εφαρμογή του ηλεκτρικού πεδίου στη συσκευή ηλεκτροφόρησης. Χρησιμοποιούνται χρωστικές για την οπτικοποίηση του DNA (βρωμιούχο αιθίδιο στην πηκτή αγαρόζης που το καθιστά ορατό στην υπεριώδη ακτινοβολία και Loading Dye 6X στην φόρτωση των δειγμάτων). Με την χρήση του ladder, μάρτυρα μοριακού βάρους που περιλαμβάνει μόρια DNA γνωστού μοριακού βάρους, γίνεται ο χαρακτηρισμός των άγνωστων τμημάτων DNA που ενισχύθηκαν μέσω της PCR.

Η περιεκτικότητα της πηκτής αγαρόζης που κατασκευάστηκαν για τα προϊόντα της PCR είναι 1% w/v. Η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε και για τον διαχωρισμό και ακρίβεια του dsRNA που σχηματίστηκε μετά την in vitro μεταγραφή. Τα προϊόντα είχαν μέγεθος 390bp και 410bp (dsGFP) αντίστοιχα. Τα συστατικά που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα εξής: Ρυθμιστικό διάλυμα TBE 0,5X, το οποίο παρασκευάζεται από πυκνό διάλυμα TBE 5X και περιέχει Tris, EDTA 0,5M pH=8 και Boric acid), αγαρόζη, EtBr, Ladder 100bp (EnzyQuest) και η χρωστική φόρτωσης (Loading Dye 6X).

### 3.11. Ανάκτηση μορίων DNA/RNA από πήκτωμα αγαρόζης (Gel extraction)

Με την χρήση της συγκεκριμένης μεθόδου επιτυγχάνεται η απομόνωση ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA γνωστού μεγέθους που χρησιμοποιήθηκε στη συνέχεια για τον σχηματισμό του δίκλωνου RNA, συμπληρωματικό του τμήματος DNA με σκοπό την σίγηση της έκφρασης του τελευταίου. Τα συστατικά που χρησιμοποιήθηκαν, περιέχονταν στο kit της εταιρίας MACHEREY-NAGEL και ονομάζεται NucleoSpin<sup>®</sup> Gel and RCR Clean-up. Αφού γίνει η αφαίρεση της επιθυμητής ζώνης από το gel αγαρόζης με την χρήση αποστειρωμένης λεπίδας, έγινε απομόνωση του επιθυμητού DNA με βάση τις οδηγίες του κατασκευαστή.

### 3.12. In vitro μεταγραφή για την δημιουργία του dsRNA

Για την in vitro μεταγραφή προστέθηκαν κατάλληλα T7 άκρα στους primers που σχεδιάστηκαν έτσι ώστε να είναι συμπληρωματικά ως προς το υπόστρωμα DNA που ενισχύθηκε και χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο T7 πολυμεράση της εταιρίας Thermo Fischer Scientific.

Ακολουθούν αναλυτικά τα συστατικά που χρησιμοποιήθηκαν για την συγκεκριμένη αντίδραση.

| ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ | ΌΓΚΟΣ           |
|---------------|-----------------|
| BUFFER 5X     | 4ul             |
| DNTPS         | 4ul             |
| DNA           | 0.4ug           |
| RNASE OUT     | 0.5ul (20Units) |
| T7 POLYMERASE | 0.6ul (12Units) |
| H2O           | 0,9ul           |
| TOTAL         | 20ul            |

Στη συνέχεια, τα δείγματα επωάζονται για 2 ώρες στους 37° C, θερμοκρασία που επιτρέπει την δράση της T7 πολυμεράσης. Ακολουθεί προσθήκη DNase I και μετά η προσθήκη EDTA 0,5mM pH=8 με την οποία σταματάει η λειτουργία και των 2 ενζύμων. Προκειμένου να σταματήσει οποιαδήποτε αντίδραση, προστίθεται ο διπλάσιος όγκος από φαινόλη-χλωροφόρμιο, ενώ ταυτόχρονα επιτυγχάνεται και ο καθαρισμός των δειγμάτων. Ακολουθεί διαχωρισμός υδατικής και οργανικής φάσης, καθώς το RNA βρίσκεται στην υδατική φάση. Με αυτό τον τρόπο τα λιπίδια συγκεντρώνονται στην οργανική φάση, οι πρωτεΐνες στην μεσόφαση και τα νουκλεικά οξέα στην υδατική φάση. Στη συνέχεια, γίνεται κατακρήμνιση του dsRNA με την προσθήκη Sodium acetate 0,1M και 100% αιθανόλης και αποθήκευση του δείγματος στους -80° C. Το δείγμα είναι έτοιμο για τις 2 πλύσεις με 70% αιθανόλη, έτσι ώστε να επιτευχθεί όσο το δυνατόν καλύτερος καθαρισμός και συμπύκνωση του δίκλωνου RNA. Γίνεται προσεκτική αφαίρεση του υπερκειμένου με την χρήση πιπέτας μετά από τις διαδοχικές φυγοκεντρήσεις χωρίς να διαταραχθεί η πελέτα και επώαση του δείγματος σε θερμοκρασία δωματίου προκειμένου να εξατμιστούν τυχόν υπολείμματα αιθανόλης που περιέχει το δείγμα. Τέλος, γίνεται επαναδιάλυση του δείγματος με προσθήκη ζεστού ddH<sub>2</sub>O και μέτρηση της συγκέντρωσης στο Quawell Q3000 αφού γίνει αραιώση 1:4 (1μl dsRNA και 3μl ddH<sub>2</sub>O). Από τα 4μl αραιωμένου δείγματος, το 1μl χρησιμοποιήθηκε για την μέτρηση συγκέντρωσης και τα υπόλοιπα 3μl φορτώνονται σε 1% gel αгарόζης μαζί με μάρτυρα γνωστού μοριακού βάρους που μας δίνει την επιβεβαίωση της επιτυχημένης σύνθεσης του dsRNA από το αναμενόμενο μοριακό του βάρος.

Για την χορήγηση του dsRNA έγιναν ενέσεις σε 30 σεξουαλικά ώριμα ενήλικα αρσενικά έντομα του στελέχους EGII την 4<sup>η</sup> ημέρα μετά την μεταμόρφωση των εντόμων από το στάδιο της νύμφης σε ενήλικο άτομο. Τα έντομα τρέφονταν με την τυπική εργαστηριακή διατροφή. Τα dsRNA που σχεδιάστηκαν σύμφωνα με τον κανόνα της συμπληρωματικότητας με τα mRNA του γονιδίου-στόχου *CG2811* και του γονιδίου- μάρτυρα *GFP* είχαν συγκέντρωση 10,5 μg/ul. Στη συνέχεια, τα έντομα επιστρέφουν σε δύο ξεχωριστά κλουβιά που το καθένα περιέχει 15 έντομα και συνεχίζουν να τρέφονται με την τυπική εργαστηριακή τροφή. Η δειγματοληψία πραγματοποιείται τις επόμενες 24, 48, 72, 96 και 120 ώρες. Για κάθε ημέρα,

χρησιμοποιήθηκαν 3 βιολογικές επαναλήψεις και τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -80°C παρουσία Extrazol.

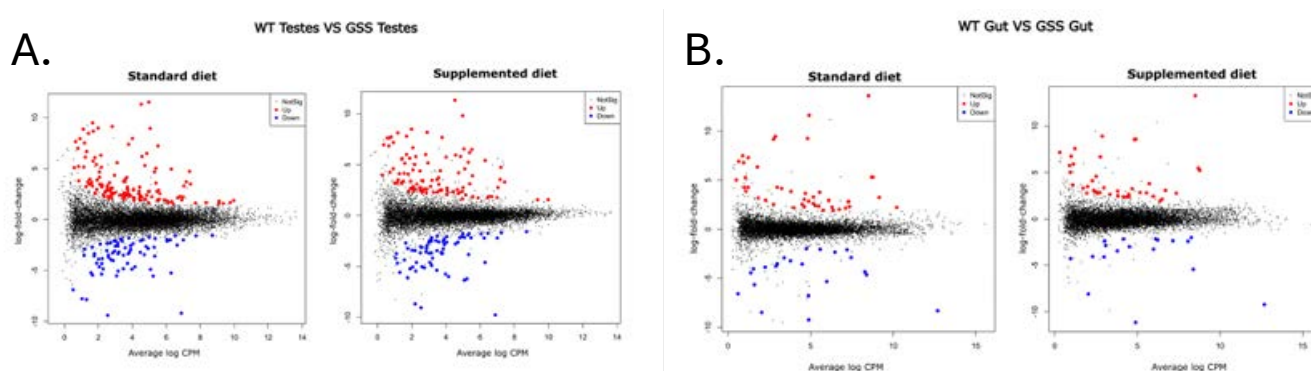
## 4. Αποτελέσματα

### 4.1. Αποτελέσματα RNA-seq

Προκειμένου να εντοπιστούν διαφορές στην έκφραση που θα μπορούσαν να σχετίζονται με την ποιότητα των στείρων αρσενικών *Terphritid* που παράγονται σε μονάδες μαζικής εκτροφής, έγιναν συγκρίσεις μεταγραφωμάτων διαφορετικών ιστών του στελέχους VIENNA 8 και του αγρίου-τύπου εργαστηριακού EGII, ενώ οι προυνύμφες και των δύο στελεχών είχαν υποβληθεί στην συμβατική διατροφή με σκόνη καρότου και σε μία διατροφή εμπλουτισμένη με νεκρά βακτήρια του γένους *Enterobacter*.

Δείγματα ιστών από όρχεις, ωοθήκες και FAGs (Female Accessory Glands), αρσενικά έντερα και MAGs (Male Accessory Glands) απομονώθηκαν από σεξουαλικά ώριμους πληθυσμούς EGII και VIENNA 8 που ανατράφηκαν και με τις δύο διατροφές, τη συμβατική και την εμπλουτισμένη με προβιοτικά. Μελετήθηκε το μεταγραφικό προφίλ των συγκεκριμένων ιστών καθώς είναι άμεσα εμπλεκόμενοι στην πέψη και στην σεξουαλική αναπαραγωγή των αρσενικών εντόμων. Τα δείγματα υποβλήθηκαν σε αλληλούχιση RNA και αναλύθηκαν για διαφορική γονιδιακή έκφραση υπό μία μόνο διατροφή ή συγκρίσεις στελεχών.

Μέσω της συγκεκριμένης ανάλυσης εντοπίστηκαν συνολικά 501 γονίδια που σχετίζονται με στελέχη και έχουν διαφοροποιημένη έκφραση σε όλους τους τέσσερις ιστούς. Αυτή η λίστα περιορίστηκε σε 182 γονίδια που ήταν σταθερά διαφοροποιημένα στη σύγκριση EGII με VIENNA 8, τόσο στην τυπική δίαιτα όσο και στη ενισχυμένη με προβιοτικά. Μεταξύ αυτών, 12 γονίδια παρουσίασαν διαφορική έκφραση σε περισσότερους από δύο ιστούς.



Εικόνα 13: Ανάλυση διαφορικής έκφρασης γονιδίων ανάμεσα στα στελέχη EGII και VIENNA 8 που εκτρέφονται στην συμβατική και ενισχυμένη με προβιοτικά διατροφή σε 2 διαφορετικούς ιστούς: Α. Όρχεις, Β. Έντερο

## 4.2. Επιλογή γονιδίων- στόχων

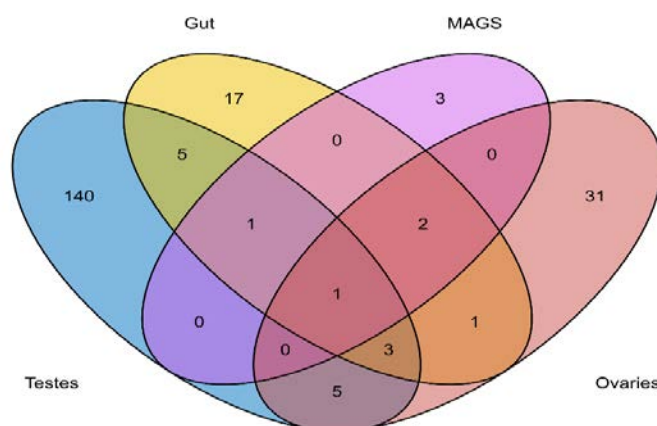
Αρχικά, έγινε έλεγχος των διαφορικά εκφραζόμενων γονιδίων από διαφορετικούς ιστούς με βάση κριτήρια έκφρασης και στατιστικής σημαντικότητας και επιλέχθηκαν συγκεκριμένοι στόχοι με βάση την δράση τους, λαμβάνοντας υπόψιν την χρήση τους ως δείκτες στον έλεγχο ποιότητας των αρσενικών που εκτρέφονται σε εγκαταστάσεις μαζικής εκτροφής, αλλά και στην εύκολη παρατήρηση του φαινοτύπου τους μετά από ενδεχόμενη σίγηση της έκφρασής τους.

Από την συγκεκριμένη ανάλυση απομονώθηκαν δύο γονίδια που έχουν ιστο-ειδική έκφραση και εκφράζονται κυρίως στους όρχεις.

Πίνακας 3: Αποτελέσματα σύγκρισης της έκφρασης των γονιδίων CCAP1982\_LOCUS21470, CCAP1982\_LOCUS20471 στους όρχεις μεταξύ των EGII και VIENNA 8 που έχουν υποβληθεί στην συμβατική διατροφή

| Target name         | logFC | unshrunk.logFC | logCPM | PValue   |
|---------------------|-------|----------------|--------|----------|
| CCAP1982_LOCUS21470 | 4,253 | 4,309          | 1,619  | 5,00E-06 |
| CCAP1982_LOCUS20471 | 3,060 | 3,077          | 2,474  | 2,54E-05 |

Στη συνέχεια, απομονώθηκαν 3 επιπλέον γονίδια που είναι διαφορικά εκφραζόμενα ανάμεσα σε διαφορετικούς ιστούς και σε διαφορετικές διατροφές με μία εναλλακτική ανάλυση των DEG αυτήν την φορά. Με βάση το Venn Diagram (Εικόνα 14), ελέγχθηκαν γονίδια που έχουν διαφορετική έκφραση σε περισσότερους



Εικόνα 14: Venn Diagram που απεικονίζει τον αριθμό των γονιδίων που εκφράζονται σε διαφορετικούς συνδυασμούς ιστών ανάμεσα στα στελέχη EGII και VIENNA 8

από έναν ιστούς. Με αυτόν τον τρόπο, απεικονίζεται ο αριθμός αυτών των γονιδίων και οι συνδυασμοί των διαφορετικών ιστών που μπορεί να εκφράζεται το καθένα από αυτά.

Έτσι, επιλέχθηκαν ακόμα 3 γονίδια των οποίων η διαφορετική έκφραση είναι  $>2$

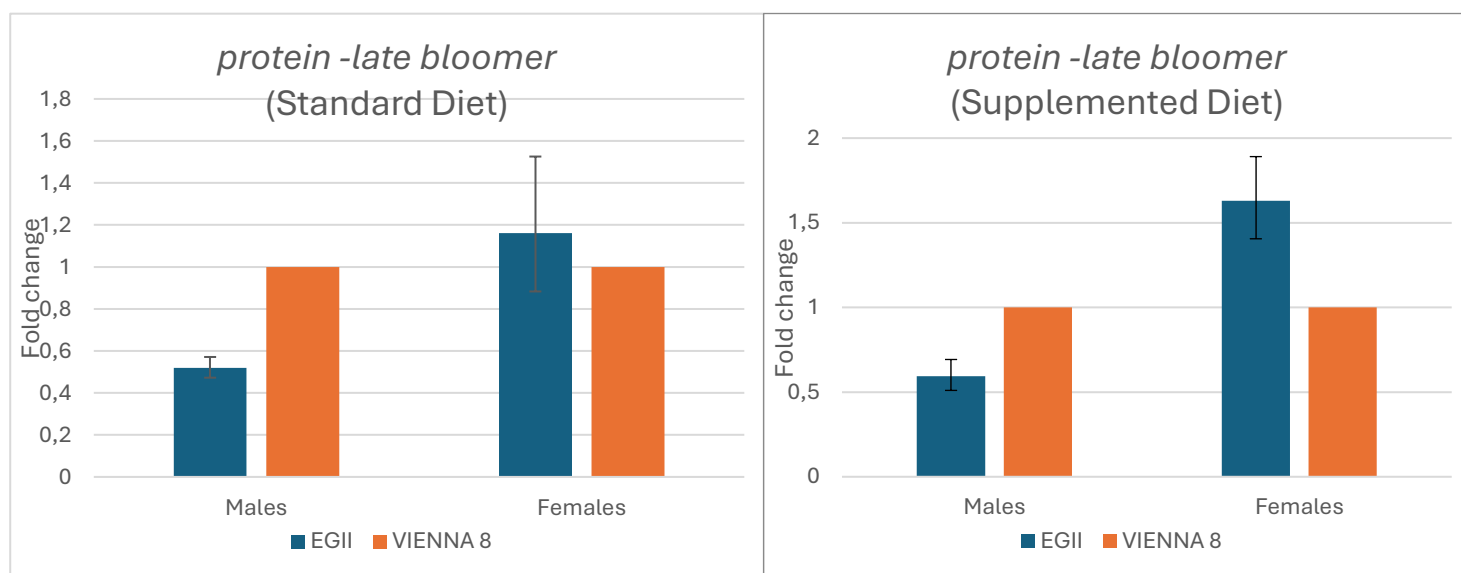
(logFC $>2$ ).

### 4.3. Προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης επιλεγμένων γονιδίων

Από τα αποτελέσματα RNA-seq επιλέχθηκαν ορισμένα γονίδια που εμφάνιζαν διαφορετική έκφραση σε συγκεκριμένους ιστούς ανάμεσα στα 2 στελέχη, EGII και VIENNA 8. Προκειμένου να προσδιορίσουμε τα επίπεδα έκφρασης των συγκεκριμένων γονιδίων σε θηλυκά και αρσενικά άτομα EGII και VIENNA 8 που έχουν υποβληθεί σε τυπική διαίτα αλλά και σε διαίτα εμπλουτισμένη με προβιοτικά χρησιμοποιήθηκε η ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου.

#### 4.3.1. Γονίδιο *Protein- late bloomer*

Το γονίδιο CCAP1982\_LOCUS21470 εμφανίζει ομολογία με το γονίδιο *protein -late bloomer* της *D.melanogaster*, το οποίο έχει βρεθεί να εμπλέκεται στον σχηματισμό νευρομυικών συνάψεων και κατ' επέκταση την ανάπτυξη του εντόμου από το εμβρυϊκό στάδιο. Το γονίδιο επιλέχθηκε, διότι έχει 4 φορές μεγαλύτερη έκφραση περισσότερο στα EGII σε σχέση με τα VIENNA 8 ( $\log FC = 4,253$ ) σε δείγματα από αρσενικούς όρχεις υπό την συμβατική διαίτα και 2 φορές περισσότερο ( $\log FC = 2,651$ ) υπό την εμπλουτισμένη διαίτα (Πίνακας 3). Από τα αποτελέσματα της qPCR παρατηρούμε ότι εκφράζεται περίπου 2 φορές περισσότερο στα VIENNA 8 σε σχέση με τα EGII στην τυπική διαίτα και 40% περισσότερο στα VIENNA 8 σε σχέση με τα EGII στην εμπλουτισμένη με προβιοτικά διατροφή (Εικόνα 15.A,B). Το μοτίβο αυτό, δεν διατηρείται στα θηλυκά των στελεχών, διότι φαίνεται ότι εκφράζεται με τον ίδιο τρόπο στα VIENNA 8 και EGII στην τυπική διατροφή και 1,5 φορές περισσότερο στα EGII στην ενισχυμένη διατροφή (Εικόνα 15.Γ,Δ). Παρατηρούμε ότι τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου και

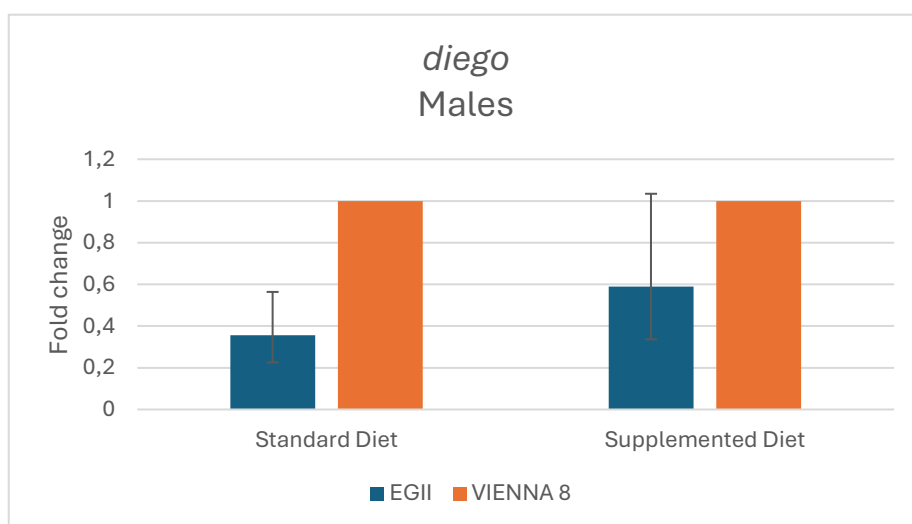


Εικόνα 15: Προφίλ έκφρασης του γονιδίου CCAP1982\_LOCUS21470

τα αποτελέσματα του RNA-seq δεν συμφωνούν με αποτέλεσμα αυτή η διαφορά να μην είναι αναπαράξιμη για την παρούσα διπλωματική.

#### 4.3.2. Γονίδιο *diego*

Το γονίδιο CCAP1982\_LOCUS20471 εμφανίζει ομολογία με το γονίδιο *diego* της *D.melanogaster*, το οποίο εμπλέκεται στην διάταξη των τριχιδίων στα φτερά και στην εγκαθίδρυση της πολικότητας των κυττάρων των imaginal disc. Το γονίδιο επιλέχθηκε, διότι εκφράζεται 3 φορές περισσότερο στα EGII σε σχέση με τα VIENNA 8 ( $\log_{2}FC = 3,06$ ) σε δείγματα από αρσενικούς όρχεις υπό την συμβατική διαίτα και σχεδόν 2 φορές περισσότερο ( $\log_{2}FC = 1,532$ ) υπό την εμπλουτισμένη διαίτα (Πίνακας 3). Μετά από ανάλυση των αποτελεσμάτων της qPCR παρατηρούμε ότι το γονίδιο CCAP1982\_LOCUS20471 εκφράζεται >60% περισσότερο στα VIENNA 8 σε σχέση με τα EGII στην τυπική διαίτα και 40% περισσότερο στα VIENNA 8 σε σχέση με τα EGII στην εμπλουτισμένη με προβιοτικά διατροφή (Εικόνα 16.A, B). Το γονίδιο φαίνεται να εκφράζεται μόνο στα αρσενικά άτομα, καθώς σε δείγματα θηλυκών εντόμων δεν ενισχύθηκε κατά την qPCR.

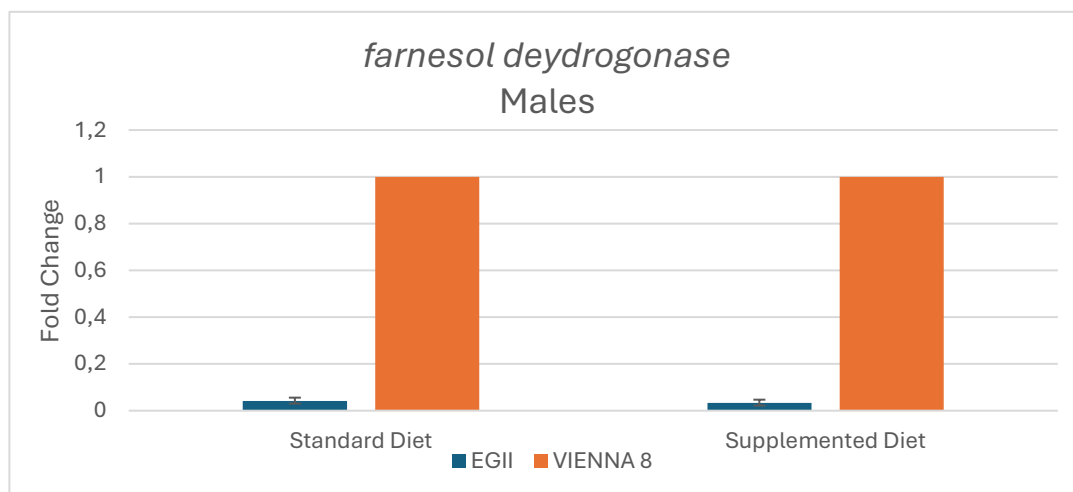


Εικόνα 16: Προφίλ έκφρασης του γονιδίου CCAP1982\_LOCUS20471

#### 4.3.3. Γονίδιο *farnesol dehydrogenase*

Το γονίδιο CCAP1982\_LOCUS14281 εμφανίζει ομολογία με το γονίδιο *farnesol dehydrogenase* της *D.melanogaster* και εμπλέκεται στην βιοσύνθεση της νεανικής ορμόνης με αποτέλεσμα η μείωση της έκφρασής του να προκαλεί πρόωρη μεταμόρφωση, μειωμένη γονιμότητα ή στειρώση. Το γονίδιο επιλέχθηκε, διότι εκφράζεται 2 φορές περισσότερο στα VIENNA 8 σε σχέση με τα EGII στους όρχεις ( $\log_{2}FC = -2,814$ ), 3 φορές περισσότερο σε MAGS ( $\log_{2}FC = -3,253$ ) και 5 φορές περισσότερο στο έντερο των αρσενικών ( $\log_{2}FC = -5,568$ ) υπό την συμβατική διαίτα (Πίνακας 4,8,10, Παράρτημα 6.2). Τα αποτελέσματα του RNA-seq επιβεβαιώνονται από τα αποτελέσματα της qPCR, αφού παρατηρήθηκε ότι το γονίδιο CCAP1982\_LOCUS14281 εκφράζεται 96% περισσότερο στα VIENNA 8 σε σχέση με τα EGII τόσο στην τυπική διαίτα όσο και στην εμπλουτισμένη με προβιοτικά διατροφή (Εικόνα 17.A, B). Το γονίδιο φαίνεται να εκφράζεται μόνο στα αρσενικά

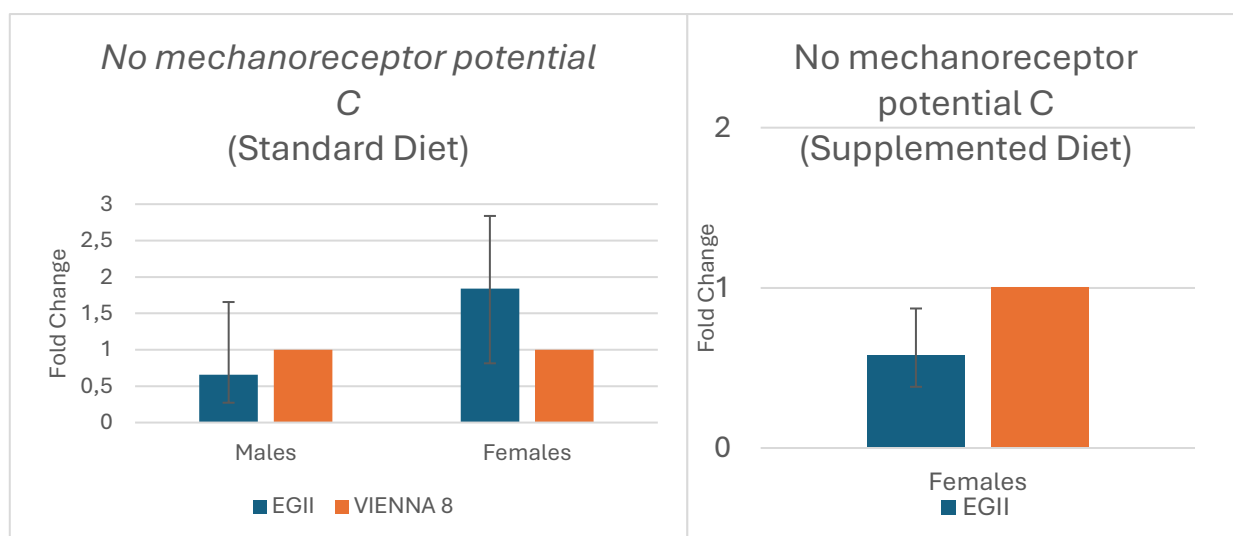
άτομα, καθώς παρατηρήθηκε στα αποτελέσματα RNA-seq ( $\log FC = -0,087$  σε ωοθήκες) και επιβεβαιώθηκε με την qPCR, διότι το γονίδιο δεν ενισχύθηκε σε δείγματα θηλυκών ωοθηκών.



Εικόνα 17: Προφίλ έκφρασης του γονιδίου CCAP1982\_LOCUS14281

#### 4.3.4. Γονίδιο *no mechanoreceptor potential C*

Το γονίδιο CCAP1982\_LOCUS6834 εμφανίζει ομολογία με το γονίδιο *no mechanoreceptor potential C* της *D.melanogaster* όπου εκφράζεται σε αισθητήρια κύτταρα των τριχιδίων και άρα εμπλέκεται στην αντίληψη ερεθισμάτων, όπως η αφή, δόνηση και ακοή. Το γονίδιο επιλέχθηκε, διότι εκφράζεται 6 φορές περισσότερο στα EGII σε σχέση με τα VIENNA 8 στους όρχεις ( $\log FC = 6,205$ ), αλλά εκφράζεται 8 φορές περισσότερο στα VIENNA 8 σε σχέση με τα EGII στο έντερο των αρσενικών ( $\log FC = -8,244$ ) υπό την συμβατική διαίτα (Πίνακας 4,10, Παράρτημα 6.2). Όσον αφορά τα αποτελέσματα της qPCR το γονίδιο CCAP1982\_LOCUS6834 παρατηρούμε ότι εκφράζεται περίπου 30%



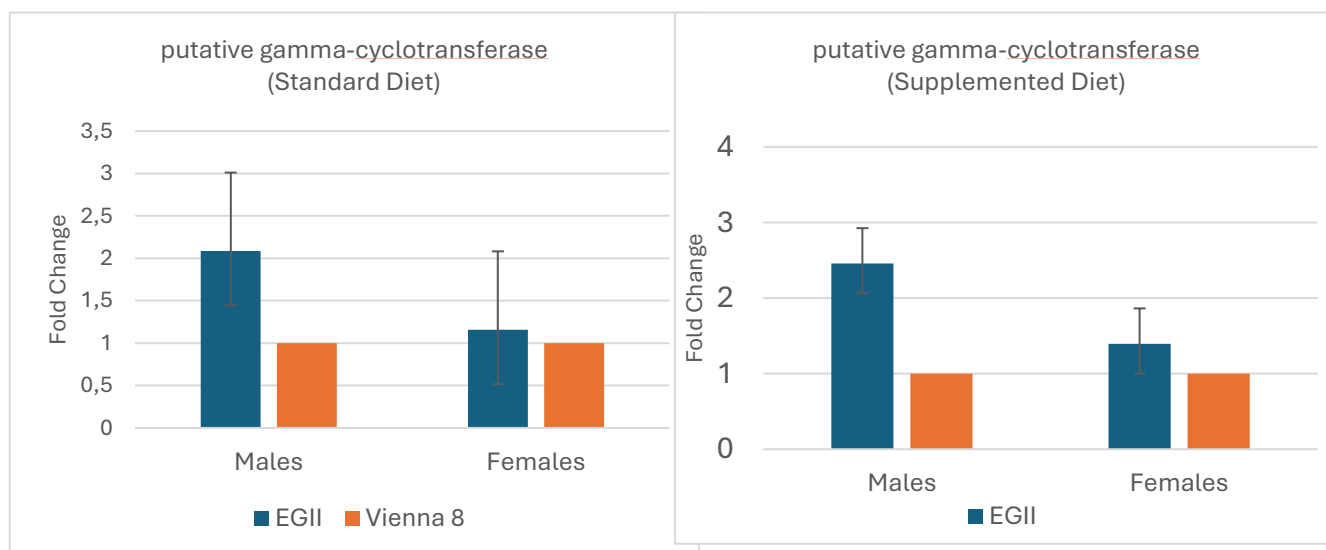
Εικόνα 18: Προφίλ έκφρασης του γονιδίου CCAP1982\_LOCUS6834

περισσότερο στα VIENNA 8 σε σχέση με τα EGII στην τυπική διαίτα, ενώ δεν

εμφάνισε κανένα αποτέλεσμα στα δείγματα VIENNA 8 και EGII στην εμπλουτισμένη με προβιοτικά διατροφή (Εικόνα 18.A). Το μοτίβο αυτό, δεν διατηρείται στα θηλυκά των στελεχών, διότι φαίνεται ότι εκφράζεται 2 φορές περισσότερο στα EGII σε σχέση με τα VIENNA 8 στην τυπική διατροφή, ενώ στην ενισχυμένη διατροφή εμφανίζει αντίστροφο μοτίβο έκφρασης (Εικόνα 18.B,Γ).

#### 4.3.5. Γονίδιο *putative gamma-glutamylcyclotransferase* CG2811

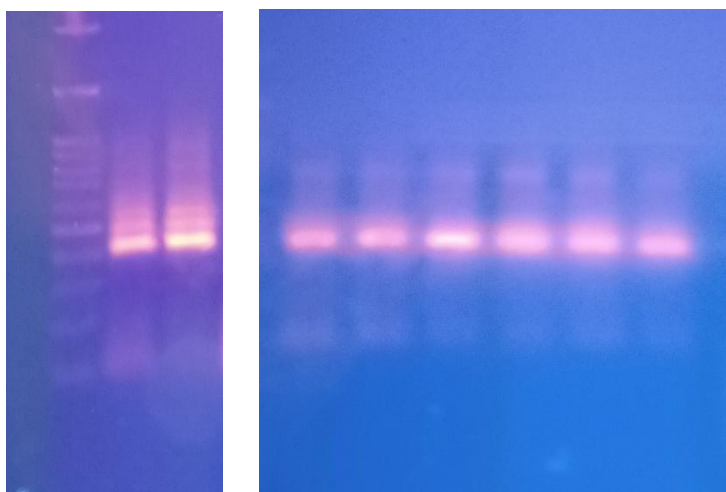
Το γονίδιο CCAP1982\_LOCUS22924 εμφανίζει ομολογία με το γονίδιο *putative gamma-glutamylcyclotransferase* CG2811 της *D.melanogaster* και είναι υπεύθυνο για την ανάπτυξη και απόκριση στο στρες. Το γονίδιο επιλέχθηκε, διότι εκφράζεται 2 φορές περισσότερο στα EGII σε σχέση με τα VIENNA 8 στους όρχεις (logFC= 2,687) και 3 φορές περισσότερο στο έντερο των αρσενικών (logFC= 3,287) υπό την συμβατική δίαιτα με το ίδιο μοτίβο έκφρασης να ακολουθείται και στην ενισχυμένη δίαιτα (Πίνακας 4,5,10,11, Παράρτημα 6.2). Από τα αποτελέσματα της qPCR παρατηρούμε ότι εκφράζεται περίπου 2 φορές περισσότερο στα EGII σε σχέση με τα VIENNA 8 στην τυπική δίαιτα και 2,5 φορές περισσότερο στα EGII σε σχέση με τα VIENNA 8 στην εμπλουτισμένη με προβιοτικά διατροφή (Εικόνα 19.A,B). Το μοτίβο αυτό, δεν διατηρείται στα θηλυκά των στελεχών, διότι φαίνεται ότι εκφράζεται με τον ίδιο τρόπο στα VIENNA 8 και EGII τόσο στην τυπική διατροφή όσο στην ενισχυμένη διατροφή περίπου (Εικόνα 19.Γ,Δ). Επομένως, φαίνεται να εμφανίζει διαφορετική έκφραση μεταξύ των 2 στελεχών, η οποία είναι συνδεδεμένη με το φύλο.



Εικόνα 19: Προφίλ έκφρασης του γονιδίου CCAP1982\_LOCUS22924

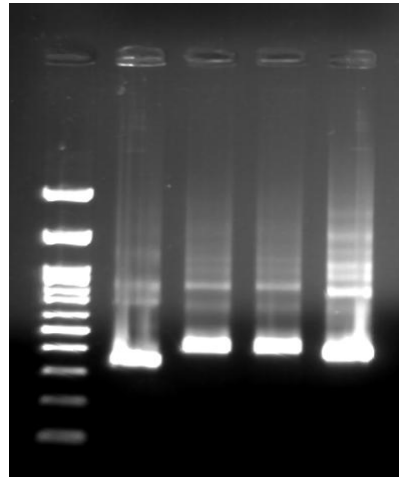
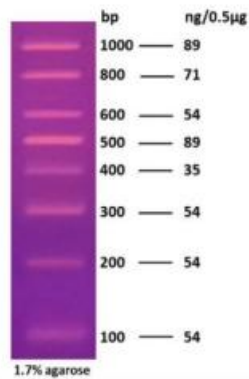
#### 4.4. Σίγηση της έκφρασης του γονιδίου *CG2811* μέσω χορήγησης dsRNA

Καθώς η διαφορά της έκφρασης για το γονίδιο *CG2811* ήταν επαναλήψιμη και το γονίδιο εμφάνιζε μια αρρενοειδική έκφραση προχωρήσαμε στην λειτουργική μελέτη του. Για τον σκοπό αυτό δημιουργήθηκε dsRNA έχοντας ως υπόστρωμα cDNA από τους όρχεις ενός εντόμου EGII, ενώ στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε PCR και ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Η αναμενόμενη ζώνη για το συγκεκριμένο γονίδιο είναι στα 400 bp. Ο ladder που χρησιμοποιήθηκε φαίνεται στην εικόνα 21. Οι 2 ζώνες που φαίνονται στην εικόνα 20 (αριστερά) απομονώθηκαν ώστε να ανακτηθεί DNA από αυτές. Το προϊόν αυτό χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα για την re-PCR. Έτσι, όλες οι ζώνες απομονώθηκαν από την δεύτερη ηλεκτροφόρηση (Εικόνα 20, δεξιά) και το τμήμα του γονιδίου που περιβάλλεται από τα T7 άκρα χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση του dsRNA. Για την ενίσχυση του *GFP* πραγματοποιήθηκε η ίδια διαδικασία και το επιθυμητό προϊόν που χρησιμοποιήθηκε στη συνέχεια βρίσκεται στις 400 bp (Εικόνα 21). Οι επιθυμητές ζώνες αφαιρέθηκαν με νυστέρι, ώστε να ανακτηθεί το DNA από αυτές για την ακόλουθη σύνθεση δίκλωνων μορίων RNA.



Εικόνα 20: Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης της πρώτης PCR (αριστερά) και της re-PCR (δεξιά) με σκοπό την ενίσχυση του γονιδίου *CG2811*

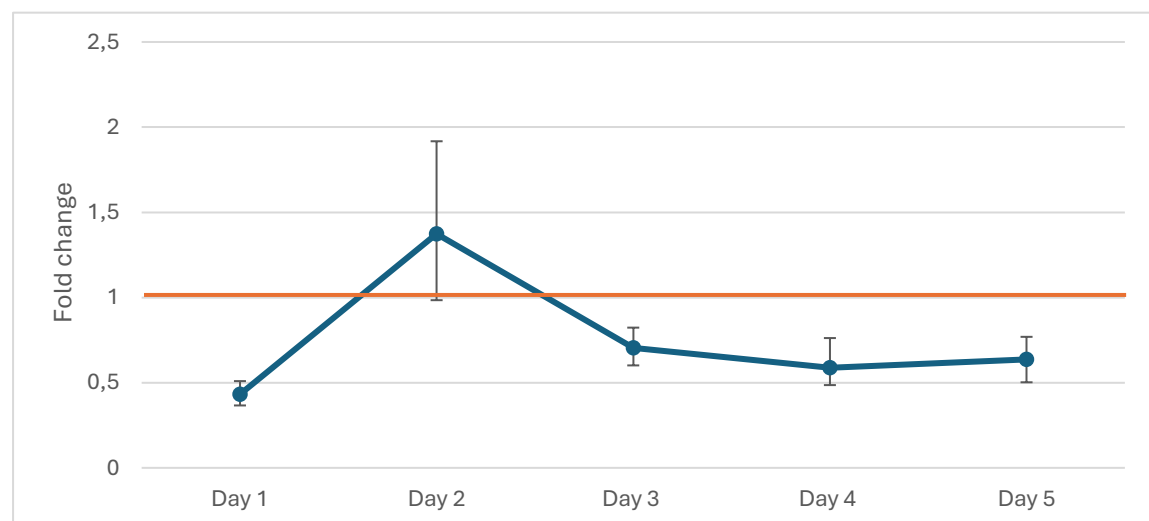
Η ακόλουθη φωτογραφία επιβεβαιώνει την επιτυχημένη σύνθεση των δίκλωνων μορίων RNA, μέσω της εμφάνισής τους σε πήκτωμα αγαρόζης. Το τμήμα των γονιδίων που ενισχύθηκε έχει μήκος 400bp.



Εικόνα 21: Απεικόνιση του ladder 100b (αριστερά) και των dsRNA του γονιδίου CG2811 (ζώνη 4) και του γονιδίου GFP (ζώνες 2,3)

Επομένως, μετά την δημιουργία των dsRNA με συγκέντρωση 21,2 μg/ul πραγματοποιήθηκε χορήγησή τους έναντι του υποψηφίου γονιδίου- δείκτη CG2811 αλλά και για το εξωγενές γονίδιο GFP (συνθήκη-μάρτυρα) με την ίδια συγκέντρωση dsRNA. Πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία τις αμέσως επόμενες 5 μέρες μετά την ένεση και απομονώθηκαν μόνο οι κοιλίες των εντόμων για μελέτη της σίγησης του γονιδίου μέσω του μηχανισμού RNAi. Για κάθε ημέρα δειγματοληψίας λήφθηκαν 3 βιολογικές επαναλήψεις. Ακόμη, όλες οι παρακάτω κανονικοποιημένες τιμές έκφρασης, υπολογίστηκαν με βάση το ιδιοσυστατο γονίδιο GAPDH.

Την πρώτη ημέρα δειγματοληψίας μετά την χορήγηση του dsRNA φαίνεται να έχει πετύχει η σίγηση της έκφρασης του γονιδίου-στόχου σε ποσοστό 67%, ενώ την δεύτερη μέρα δεν παρατηρείται σίγηση αλλά βλέπουμε ότι το γονίδιο-στόχος εκφράζεται 30% περισσότερο στα δείγματα που χορηγήθηκε το dsRNA για το γονίδιο CG2811 σε σχέση με τα δείγματα που είχαν το dsRNA για το γονίδιο GFP.



Εικόνα 22: Αποτελέσματα σίγησης της έκφρασης του γονιδίου CG2811

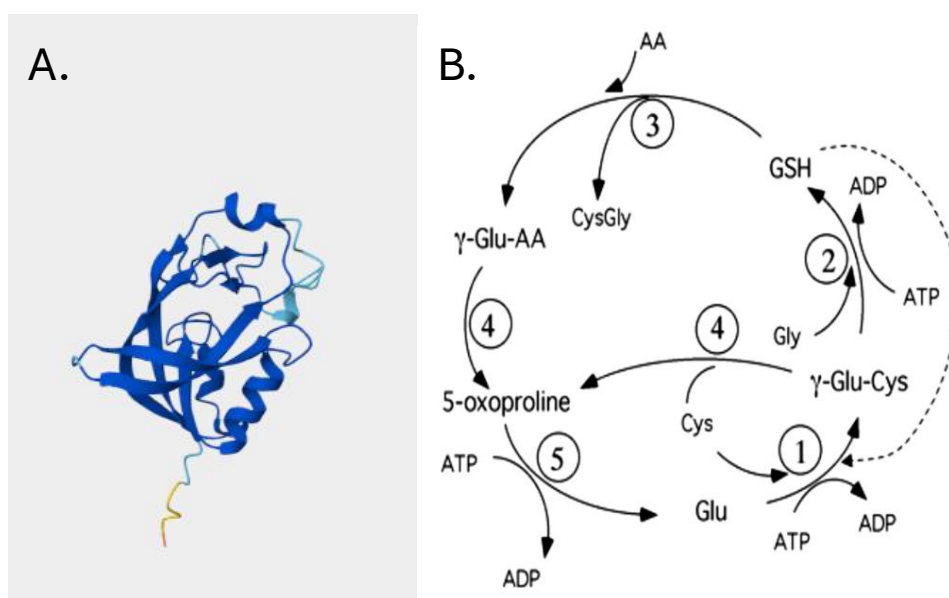
Από την τρίτη μέχρι και την πέμπτη μέρα, παρατηρούμε πάλι μείωση της έκφρασης του γονιδίου- στόχου σε ποσοστό 30%, 42% και 37% αντίστοιχα. Αυτή η πτώση της έκφρασης του γονιδίου παραμένει σταθερή για όσες μέρες διαρκεί η δειγματοληψία (εκτός της δεύτερης ημέρας), ενώ μετά από υπολογισμό των error bars παρατηρείται και η συνέπεια των επιπέδων έκφρασης ανάμεσα στα δείγματα των περισσότερων ημερών (Εικόνα 22).

### 3 Συζήτηση

Η SIT είναι μια μέθοδος που χρησιμοποιείται για τον περιορισμό του πληθυσμού της *C. capitata* με αποτελεσματικότητα, η οποία εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από ποιότητα των αρσενικών εντόμων που απελευθερώνονται. Η υποβάθμιση της ποιότητας των αρσενικών έχει βρεθεί ότι προέρχεται από ανεπιθύμητες μεταλλάξεις στο γονιδίωμα των αρσενικών λόγω της χρήσης ακτινοβολίας αλλά και από την τεχνητή δίαιτα που χορηγείται στα έντομα σε συνθήκες μαζικής εκτροφής. Στην παρούσα διπλωματική εργασία προτείνεται μια μέθοδος για τον εντοπισμό γονιδίων που ευθύνονται για το fitness των στείρων εντόμων και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως QC markers των GSS που δημιουργούνται με προηγμένες εναλλακτικές τεχνικές. Σε αποτελέσματα του RNA-seq που επιβεβαιώθηκαν με qPCR ακολούθησαν λειτουργικές αναλύσεις μέσω RNAi. Η επιλογή των υποψήφιων γονιδίων-δεικτών έγινε μέσω επεξεργασίας των αποτελεσμάτων μεταγραφομικής με βάση κριτήρια έκφρασης και στατιστικής σημαντικότητας. Ταυτόχρονα, τα γονίδια επιλέχθηκαν με βάση την πιθανή δράση τους, αλλά και κατά πόσο εύκολη θα ήταν η παρατήρηση του φαινοτύπου τους μετά από ενδεχόμενη σίγηση της έκφρασής τους. Έτσι, επιλέχθηκαν 5 γονίδια, τα οποία εμφανίζουν διαφορετική έκφραση κυρίως στους όρχεις αλλά και σε MAGS (Male accessory glands) και το έντερο των αρσενικών και έγινε προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασής τους στους συγκεκριμένους ιστούς.

Αρχικά, παρατηρήθηκε ότι τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *protein late-bloomer* και τα αποτελέσματα του RNA-seq δεν συμφωνούν. Αυτή η διαφορά πιθανώς να οφείλεται στο γεγονός ότι πρωτεΐνη late bloomer (από την *D. melanogaster*) εκφράστηκε νωρίτερα στα EGII από την ημέρα που έγινε η συλλογή των δειγμάτων. Το γονίδιο *diego* επίσης δεν επιλέχθηκε για περαιτέρω μελέτη της έκφρασής του διότι παρατηρήθηκε ότι τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου και τα αποτελέσματα του RNA-seq δεν συμφωνούν, αφού τα αποτελέσματα του RNA-seq δείχνουν ότι το γονίδιο εκφράζεται 3 φορές περισσότερο στα EGII σε σχέση με τα VIENNA 8, ενώ από τα αποτελέσματα της qPCR φαίνεται ότι εκφράζεται >60% περισσότερο στα VIENNA 8 σε σχέση με τα EGII στην τυπική δίαιτα. Όσον αφορά το γονίδιο *farnesol dehydrogenase*, φαίνεται ότι θα μπορούσε να αποτελέσει πιθανό QC marker αλλά για να μελετηθεί η έκφραση του συγκεκριμένου γονιδίου θα έπρεπε να χορηγηθεί το dsRNA στα έντομα VIENNA 8, τα οποία είναι αρκετά ευαίσθητα και δεν υπάρχει μεγάλη πιθανότητα επιβίωσής τους μετά την ένεση, κάτι που τελικά αποφεύχθηκε. Το

γονίδιο *no mechanoreceptor potential C* εμφάνιζε διαφορετική έκφραση στους όρχεις (logFC= 6,205) και στο έντερο των αρσενικών (logFC= -8,244) υπό την συμβατική διαίτα αλλά η έκφραση αυτή δεν θα μπορούσε να αποτυπωθεί και στην qPCR, διότι η μελετάται η κοιλιά των αρσενικών που περιλαμβάνει τους όρχεις και το έντερο και σε αυτούς τους ιστούς η έκφραση είναι αντίστροφη ανάμεσα στα δύο στελέχη. Γι' αυτό το λόγο, το συγκεκριμένο γονίδιο δεν επιλέχθηκε για περαιτέρω μελέτη του φαινοτύπου του μετά από σίγηση της έκφρασής του με τον μηχανισμό RNAi. Τα αποτελέσματα μεταγραφομικής που αφορούν το γονίδιο *putative gamma-glutamylcyclotransferase CG2811* φαίνεται να συμφωνούν με τον προσδιορισμό της έκφρασης του μέσω της qPCR, με αποτέλεσμα να εμφανίζεται διαφορετική έκφραση μεταξύ των 2 στελεχών και αφού η έκφρασή του είναι αυξημένη στα αρσενικά του EGII, αποτελεί καλό υποψήφιο γονίδιο για μελέτη της έκφρασης του μέσω σίγησης με RNAi έτσι ώστε να προσδιοριστεί εάν εμπλέκεται στην αρμοστικότητα του εντόμου και μπορεί να δράσει ως QC marker. Η γ-γλουταμυλοκυκλοτρανσφεράση CG2811 (putative gamma-glutamylcyclotransferase, γ-GCT) είναι ένα ένζυμο που ανήκει στην οικογένεια των γ-γλουταμυλοκυκλοτρανσφερασών CHAC/GGCT. Τα μέλη της οικογένειας καταλύουν την αντίδραση διάσπασης της γλουταθειόνης (GSH) σε L-cysteinylglycine και 5-οξοπρολίνη (Εικόνα 23.B) (Kaur et al., 2017; Nguyen & Han, 2020). Το γονίδιο CG2811 εκφράζεται σε ενήλικα πρόδρομα ενδοκρινικά κύτταρα του εντέρου και σε άλλους 156 ιστούς στην *D.melanogaster*. Το ένζυμο καταλύει την αντίδραση epsilon-(L-gamma-glutamyl)-L-lysine = L-lysine + 5-oxo-L-proline. Τέτοιοι δεσμοί epsilon-(L-gamma-glutamyl)-L-lysine σχηματίζονται στα έντομα κατά την σκλήρυνση και σταθεροποίηση διάφορων περιβλημάτων, όπως το χόριο του αυγού, το κουκούλι, ο σπερματοφόρος και άλλες αναπαραγωγικές δομές. Έτσι,



Εικόνα 23: A. Δομή του ενζύμου CG2811 (Uniprot: Q9W0Y2), B. Αντιδράσεις στον γ-γλουταμυλικό κύκλο του *H.sapiens* που καταλύονται από τα ένζυμα: 1) συνθετάση της γ-γλουταμυλ-κυστείνης, 2) συνθετάση της γλουταθειόνης, 3) γ-γλουταμυλοτρανσπεπτιδάση, 4) γ-γλουταμυλοκυκλοτρανσφεράση, 5) 5-οξοπρολινάση (Oakley et al., 2008)

η γ-GCT προλαμβάνει τη συσσώρευση τέτοιων δύσκολα αποικοδομήσιμων γ-γλουταμυλικών παραγώγων, επιτρέποντας την ανακύκλωση των αμινοξέων, ενώ συμβάλλει στην καταβολική οδό της γλουταθειόνης και στην ρύθμιση της ομοιόστασής της (Fink et al., 1980; Oakley et al., 2010).

Ο μοναδικός εύκαμπτος βρόχος του ενζύμου φαίνεται να λειτουργεί ως ειδική θέση δέσμευσης της GSH στο ενεργό του κέντρο και μπορεί να διατηρεί σταθερό τον ρυθμό αποικοδόμησής της (Εικόνα 23.A). Το συγκεκριμένο γονίδιο φαίνεται ότι συμβάλλει συγκεκριμένα στην ανακύκλωση του αμινοξέος λυσίνη, ενώ στην σύνθεση του ίδιου αμινοξέος φαίνεται να δρα και το γονίδιο *LysRS* (*Lysyl-tRNA synthetase*), το οποίο ταυτίστηκε με το γονίδιο *tsl*. Η παρατήρηση αυτή αποτέλεσε μία από τις παραμέτρους επιλογής του συγκεκριμένου γονιδίου για περαιτέρω διερεύνηση του ρόλου του στον ποιοτικό έλεγχο του στελέχους VIENNA 8.

Επιπλέον, η παρούσα διπλωματική παρέχει πληροφορίες για την αποτελεσματικότητα της σίγησης των γονιδίων με την χορήγηση ενέσεων, και κατ' επέκταση την αποτελεσματικότητα του μηχανισμού σίγησης RNAi στην *C. capitata*. Η μέθοδος χορήγησης των ενέσεων φαίνεται να είναι σταθερά αποτελεσματική από την τρίτη μέρα και μετά, κάτι που υποδηλώνει τον χρόνο μεταξύ της εισαγωγής του dsRNA από το σημείο της ένεσης στον ιστό που θα κοπεί από την πρωτεΐνη Dicer, την έναρξη της δράσης του στον συγκεκριμένο ιστό αλλά και την διασπορά των siRNA που θα προκύψουν στο υπόλοιπο σώμα του εντόμου. Η σίγηση της μεταγραφής του γονιδίου έχει ως αποτέλεσμα την μειωμένη σύνθεση της αντίστοιχης πρωτεΐνης συνήθως σε μικρότερο ποσοστό, διότι αυτή η μείωση εξαρτάται από διάφορους παράγοντες. Η σταθερότητα και ο ρυθμός αποικοδόμησης της πρωτεΐνης ποικίλλει, ενώ ορισμένες έχουν μεγάλο χρόνο ημιζωής και μπορούν να παραμένουν λειτουργικές ακόμα και αν η παραγωγή των mRNA μειωθεί σημαντικά (Bellés, 2010). Η σίγηση της έκφρασης του γονιδίου-στόχου θα μπορούσε να είναι περισσότερο αποτελεσματική με κάποιες παραλλαγές, όπως η χρήση μόρια ενίσχυσης, τα οποία προστατεύουν το RNA ή/και το σύστημα CRISPR από διαφόρων ειδών απώλειες (καταστροφή από νουκλεάσες, αποδόμηση στο περιβάλλον) και βελτιώνουν τη μεταφορά τους μέσα στα κύτταρα-στόχους. Παραδείγματα τέτοιων μορίων είναι οι νανοφορείς (nanoparticles) όπως χιτοσάνη (chitosan), νανοσωματίδια με θετικό φορτίο που συνδέονται ηλεκτροστατικά με το dsRNA και το προστατεύουν, λιπόσωματα ή άλλα πολυμερή (He et al., 2022). Επίσης, χημικές τροποποιήσεις των νουκλεοτιδίων (π.χ. φωσφοθειατο-σύνδεση, 2'-fluoro ομάδες) μπορούν να μειώσουν την αποδόμηση του dsRNA από νουκλεάσες (Howard et al., 2022).

Το γονίδιο *CG2811* σιγήθηκε σε ποσοστό περίπου 40% και πιθανόν αυτή η σίγηση να επηρεάζει τον φαινότυπο των αρσενικών EGII, καθώς εμπλέκεται στον καταβολισμό της γλουταθειόνης και θα έχει ως αποτέλεσμα την μείωση της 5-οξοπρολίνης και τη συσσώρευση των γ-γλουταμυλ -πεπτιδίων. Με αυτόν τον τρόπο, υπάρχει η πιθανότητα να παρατηρηθεί χαμηλότερο βάρος, μειωμένη επιβίωση προνυμφών ή γενικότερα αναστολή της κυτταρικής αύξησης (Afrin et al.,

2023). Εκτός αυτού, το γονίδιο εμπλέκεται και στην ανάκτηση του αμινοξέος λυσίνη από ενδιάμεσους μεταβολίτες, στην σύνθεση του οποίου συμβάλλει και το γονίδιο *LysRS*, το οποίο έχει ταυτιστεί με το γονίδιο *tsl*. Η μειωμένη δραστηριότητα του γονιδίου *LysRS* λόγω αύξησης της θερμοκρασίας σε συνδυασμό με την μειωμένη έκφραση του *CG2811* ενδέχεται να διαταράσσουν την διαθεσιμότητα της Λυσίνης σε έντομα VIENNA 8.

Μετά από μελέτη της έκφρασης του γονιδίου *CG2811* μέσω RNAi παρατηρείται ότι το dsRNA εισήλθε και ενεργοποίησε τον μηχανισμό RNAi από την πρώτη κιόλας μέρα (σίγηση 60%). Ωστόσο, την δεύτερη ημέρα παρατηρείται μία αστάθεια, καθώς φαίνεται ότι το γονίδιο-στόχος υπερεκφράζεται, κάτι που δεν συνεχίζεται τις επόμενες ημέρες. Την τρίτη ημέρα παρατηρείται και πάλι σίγηση της έκφρασης του γονιδίου στο 30%, η οποία συνεχίζεται και την τέταρτη και πέμπτη ημέρα με ποσοστό 40%. Επιπλέον, πέραν της πέμπτης ημέρας δεν υπάρχουν δεδομένα, οπότε παραμένει άγνωστο αν η σίγηση συνεχίζεται, αν υποχωρεί ή αν αντισταθμίζεται από μηχανισμούς ανάκαμψης του εντόμου.

Αυτό που θα μπορούσε να ακολουθήσει με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η μελέτη της σίγησης της έκφρασης του συγκεκριμένου γονιδίου-στόχου και στον θώρακα του εντόμου, καθώς το γονίδιο αναμένεται να εκφράζεται και στον θώρακα των αρσενικών, αφού εμπλέκεται στον μεταβολισμό της γλουταθειόνης. Τέλος, προκειμένου να συμπεριληφθεί το συγκεκριμένο γονίδιο στους δείκτες ελέγχου ποιότητας θα πρέπει να ακολουθήσει και ένας δεύτερος γύρος ενέσεων σε έντομα EGII στον οποίο θα παρατηρηθεί αν επηρεάζεται ο φαινότυπος των εντόμων που έχει πετύχει η σίγηση. Τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά που ενδέχεται να επηρεαστούν είναι η μειωμένη διάρκεια ζωής, η ικανότητα πτήσης, η διαταραχή του εντερικού μικροβιώματος αλλά και η αρμοστικότητα και ανταγωνιστικότητα των στείρων αρσενικών.

Η καταπολέμηση των εντόμων οικονομικής σημασίας που προκαλούν τεράστιες ζημιές στις καλλιέργειες αποτελεί προτεραιότητα για τους ανθρώπους (επιστήμονες και μη) που ασχολούνται με αγροδιατροφικές δραστηριότητες. Η χρήση των χημικών εντομοκτόνων και άλλων μεθόδων. επιβλαβών για την υγεία του ανθρώπου και το περιβάλλον, ενέχει τον κίνδυνο επιβίωσης ανθεκτικών εντόμων που αναπαράγονται και πολλαπλασιάζονται. Η Τεχνική Στείρων εντόμων (SIT) αποτελεί μία μέθοδο περιορισμού του πληθυσμού επιβλαβών εντόμων και βασίζεται στην μαζική εκτροφή, την επιλογή και στείρωση των αρσενικών και την απελευθέρωσή τους στον αγρό. Η ενσωμάτωση νέων τεχνολογιών (QC markers, βελτιωμένα Genetic Sexing Strains, εφαρμογές ευρείας κλίμακας) μπορούν να βελτιώσουν την διαδικασία φυλετικού διαχωρισμού και κατ' επέκταση την γενετική σταθερότητα και ανταγωνιστικότητα των απελευθερωμένων αρσενικών. Μέσω τέτοιων προσεγγίσεων και προηγμένων μοριακών μεθόδων, η εφαρμογή της SIT μπορεί να γίνει πιο στοχευμένη, αποδοτική και ευρέως εφαρμόσιμη σε διαφορετικά είδη.

## 4 Παράρτημα

### 4.1 Αλληλουχίες εκκινήτων

| Γονίδιο-στόχος      | Αλληλουχίες εκκινήτων |                                                                               |
|---------------------|-----------------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| CCAP1982_LOCUS21470 | qPCR-F<br>qPCR-R      | TCGTAAACCATCGATCCCCA<br>AACGCCCCACCAAAGTCCAAT                                 |
| CCAP1982_LOCUS20471 | qPCR-F<br>qPCR-R      | TCTCTCTCTCTCTCGCTGGGG<br>ACGCACTAGAGCCATGTGAGC                                |
| CCAP1982_LOCUS14281 | qPCR-F<br>qPCR-R      | TGAAAGCTAGTTTGCCCGCT<br>GATGCCACCCAGCTCTTTGA                                  |
| CCAP1982_LOCUS6834  | qPCR-F<br>qPCR-R      | GGAAGCTCTGGCGTGGCTCAC<br>TGAAGCCGATCCAAACGGGC                                 |
| CCAP1982_LOCUS22924 | qPCR-F                | AGTGTTTCGTTTACGGCACCC                                                         |
|                     | qPCR-R                | TGCTTCGCACAGGAAACGGG                                                          |
|                     | PCR-F                 | TAATACGACTCACTATAGGGAGA-                                                      |
|                     | PCR-R                 | TGGAGAGTGAGTTGGGTAGTTGC<br>TAATACGACTCACTATAGGGAGA-<br>TGTGGGACTGCTTAGCTCGACC |

### 4.2 Αποτελέσματα σύγκρισης της έκφρασης των 5 επιλεγμένων γονιδίων

Πίνακας 4: Αποτελέσματα σύγκρισης της έκφρασης των συγκεκριμένων γονιδίων στους όρχεις μεταξύ των EGII και VIENNA 8 που έχουν υποβληθεί στην συμβατική διατροφή

| Target name         | logFC     | unshrunk.logFC | logCPM   | PValue   |
|---------------------|-----------|----------------|----------|----------|
| CCAP1982_LOCUS14281 | -2,814    | -2,82339976    | 3,016584 | 7,30E-05 |
| CCAP1982_LOCUS6834  | 6,2046816 | 6,237031542    | 4,274618 | 1,84E-09 |
| CCAP1982_LOCUS22924 | 2,6872213 | 2,691434707    | 3,931881 | 4,97E-06 |

Πίνακας 5: Αποτελέσματα σύγκρισης της έκφρασης των συγκεκριμένων γονιδίων στους όρχεις μεταξύ των EGII και VIENNA 8 που έχουν υποβληθεί στην ενισχυμένη με προβιοτικά διατροφή

| Target name         | logFC    | unshrunk.logFC | logCPM   | PValue   |
|---------------------|----------|----------------|----------|----------|
| CCAP1982_LOCUS14281 | -2,56377 | -2,571353629   | 3,016584 | 0,000122 |
| CCAP1982_LOCUS6834  | 5,985033 | 6,02897453     | 4,274618 | 3,79E-09 |
| CCAP1982_LOCUS22924 | 2,15214  | 2,155029385    | 3,931881 | 4,19E-05 |

Πίνακας 6: Αποτελέσματα σύγκρισης της έκφρασης των συγκεκριμένων γονιδίων στις ωοθήκες των θηλυκών μεταξύ των EGII και VIENNA 8 που έχουν υποβληθεί στην συμβατική διατροφή

| Target name | logFC | unshrunk.logFC | logCPM | PValue |
|-------------|-------|----------------|--------|--------|
|-------------|-------|----------------|--------|--------|

|                     |           |              |          |          |
|---------------------|-----------|--------------|----------|----------|
| CCAP1982_LOCUS14281 | -2,318666 | -2,365127523 | 1,3491   | 0,01423  |
| CCAP1982_LOCUS6834  |           |              |          |          |
| CCAP1982_LOCUS22924 | -0,965486 | -0,967361222 | 3,776662 | 0,308046 |

Πίνακας 7: Αποτελέσματα σύγκρισης της έκφρασης των συγκεκριμένων γονιδίων στις ωοθήκες των θηλυκών μεταξύ των EGII και VIENNA 8 που έχουν υποβληθεί στην ενιαχυμένη με προβιοτικά διατροφή

| Target name         | logFC    | unshrunk.logFC | logCPM   | PValue   |
|---------------------|----------|----------------|----------|----------|
| CCAP1982_LOCUS14281 | -0,08737 | -0,088526879   | 1,3491   | 0,933109 |
| CCAP1982_LOCUS6834  |          |                |          |          |
| CCAP1982_LOCUS22924 | 1,294315 | 1,297401686    | 3,776662 | 0,164269 |

Πίνακας 8: Αποτελέσματα σύγκρισης της έκφρασης των συγκεκριμένων γονιδίων στα MAGS μεταξύ των EGII και VIENNA 8 που έχουν υποβληθεί στην συμβατική διατροφή

| Target name         | logFC     | unshrunk.logFC | logCPM   | PValue   |
|---------------------|-----------|----------------|----------|----------|
| CCAP1982_LOCUS14281 | -3,253474 | -3,265167299   | 5,086277 | 2,52E-05 |
| CCAP1982_LOCUS6834  | -0,518545 | -0,525180586   | 1,501455 | 0,628609 |
| CCAP1982_LOCUS22924 | 1,1216555 | 1,122573627    | 5,208242 | 0,111979 |

Πίνακας 9: Αποτελέσματα σύγκρισης της έκφρασης των συγκεκριμένων γονιδίων στα MAGS μεταξύ των EGII και VIENNA 8 που έχουν υποβληθεί στην ενισχυμένη διατροφή

| Target name         | logFC    | unshrunk.logFC | logCPM   | PValue   |
|---------------------|----------|----------------|----------|----------|
| CCAP1982_LOCUS14281 | -3,55949 | -3,565084153   | 5,086277 | 6,30E-06 |
| CCAP1982_LOCUS6834  | -2,49845 | -2,556907164   | 1,501455 | 0,025873 |
| CCAP1982_LOCUS22924 | 1,4365   | 1,438260868    | 5,208242 | 0,008187 |

Πίνακας 10: Αποτελέσματα σύγκρισης της έκφρασης των συγκεκριμένων γονιδίων στο έντερο των αρσενικών EGII και VIENNA 8 που έχουν υποβληθεί στην συμβατική διατροφή

| Target name         | logFC     | unshrunk.logFC | logCPM   | PValue   |
|---------------------|-----------|----------------|----------|----------|
| CCAP1982_LOCUS14281 | -5,568006 | -5,570407721   | 8,337379 | 6,86E-09 |
| CCAP1982_LOCUS6834  | -8,244195 | -144269486,7   | 1,882979 | 3,22E-05 |
| CCAP1982_LOCUS22924 | 3,2873206 | 3,288726132    | 6,286152 | 7,64E-07 |

Πίνακας 11: Αποτελέσματα σύγκρισης της έκφρασης των συγκεκριμένων γονιδίων στο έντερο των αρσενικών EGII και VIENNA 8 που έχουν υποβληθεί στην ενισχυμένη διατροφή

| Target name         | logFC    | unshrunk.logFC | logCPM   | PValue   |
|---------------------|----------|----------------|----------|----------|
| CCAP1982_LOCUS14281 | -4,81236 | -4,813414536   | 8,337379 | 2,71E-08 |

|                     |          |             |          |          |
|---------------------|----------|-------------|----------|----------|
| CCAP1982_LOCUS6834  | -8,58689 | -144269487  | 1,882979 | 6,12E-06 |
| CCAP1982_LOCUS22924 | 2,220241 | 2,221287337 | 6,286152 | 0,00013  |

## 5 Βιβλιογραφία

- Abd-Alla, A. M. M., Bergoin, M., Parker, A. G., Maniania, N. K., Vlak, J. M., Bourtzis, K., Boucias, D. G., & Aksoy, S. (2013). Improving Sterile Insect Technique (SIT) for tsetse flies through research on their symbionts and pathogens. *Journal of Invertebrate Pathology*, 112, S2–S10. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2012.07.009>
- Abd-Elgawad, M. M. M. (2021). The Mediterranean Fruit Fly (Diptera: Tephritidae), a Key Pest of Citrus in Egypt. *Journal of Integrated Pest Management*, 12(1). <https://doi.org/10.1093/jipm/pmab025>
- Abdel-Razek, A. S., & Abd-Elgawad, M. M. M. (2021). Spinosad combined with entomopathogenic nematode for biocontrol of the Mediterranean fruit fly (*Ceratitis capitata* [Wiedemann]) on citrus. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 31(1), 112. <https://doi.org/10.1186/s41938-021-00458-7>
- Afrin, W., Yamada, N., Furuya, S., & Yamamoto, K. (2023). Characterization of glutathione-specific gamma glutamyl cyclotransferase (ChaC) in *Bombyx mori*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 114(1). <https://doi.org/10.1002/arch.22027>
- Augustinos, A. A., Kyritsis, G. A., CáCeres, C., & Bourtzis, K. (2021). Insect Symbiosis in Support of the Sterile Insect Technique. In *Sterile Insect Technique* (pp. 605–630). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781003035572-18>
- Augustinos, A. A., Kyritsis, G. A., Papadopoulos, N. T., Abd-Alla, A. M. M., Cáceres, C., & Bourtzis, K. (2015). Exploitation of the Medfly Gut Microbiota for the Enhancement of Sterile Insect Technique: Use of *Enterobacter* sp. in Larval Diet-Based Probiotic Applications. *PLOS ONE*, 10(9), e0136459. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136459>
- Augustinos, A. A., Targovska, A., Cancio-Martinez, E., Schorn, E., Franz, G., Cáceres, C., Zacharopoulou, A., & Bourtzis, K. (2017). *Ceratitis capitata* genetic sexing strains: laboratory evaluation of strains from mass-rearing facilities worldwide. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 164(3), 305–317. <https://doi.org/10.1111/eea.12612>
- Aumann, R. A., Gouvi, G., Gregoriou, M. E., Rehling, T., Sollazzo, G., Bourtzis, K., & Schetelig, M. F. (2025). Decoding and engineering temperature-sensitive lethality in *Ceratitis capitata* for pest control. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 122(28). <https://doi.org/10.1073/pnas.2503604122>
- Aumann, R. A., Häcker, I., & Schetelig, M. F. (2020). Female-to-male sex conversion in *Ceratitis capitata* by CRISPR/Cas9 HDR-induced point mutations in the sex

- determination gene transformer-2. *Scientific Reports*, 10(1), 18611. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75572-x>
- Baumhover, A. H., Graham, A. J., Bitter, B. A., Hopkins, D. E., New, W. D., Dudley, F. H., & Bushland, R. C. (1955). Screw-Worm Control Through Release of Sterilized Flies1. *Journal of Economic Entomology*, 48(4), 462–466. <https://doi.org/10.1093/jee/48.4.462>
- Bellés, X. (2010). Beyond Drosophila: RNAi In Vivo and Functional Genomics in Insects. *Annual Review of Entomology*, 55(1), 111–128. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-112408-085301>
- Benedict, M. (2003). The first releases of transgenic mosquitoes: an argument for the sterile insect technique. *Trends in Parasitology*, 19(8), 349–355. [https://doi.org/10.1016/S1471-4922\(03\)00144-2](https://doi.org/10.1016/S1471-4922(03)00144-2)
- Boutjaguat, I., Hmimid, F., Errami, A., Bouharroud, R., Qessaoui, R., Etahiri, S., & Benba, J. (2022). Chemical composition and insecticidal effects of brown algae (*Fucus spiralis*) essential oil against *Ceratitis capitata* Wiedemann (Diptera: Tephritidae) pupae and adults. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 40, 102308. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2022.102308>
- Cáceres, C., Bourtzis, K., Gouvi, G., Vreysen, M. J. B., Bimbilé Somda, N. S., Hejníčková, M., Marec, F., & Meza, J. S. (2023). Development of a novel genetic sexing strain of *Ceratitis capitata* based on an X-autosome translocation. *Scientific Reports*, 13(1), 16167. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-43164-0>
- Cai, Z., Yao, Z., Li, Y., Xi, Z., Bourtzis, K., Zhao, Z., Bai, S., & Zhang, H. (2018). Intestinal probiotics restore the ecological fitness decline of *Bactrocera dorsalis* by irradiation. *Evolutionary Applications*, 11(10), 1946–1963. <https://doi.org/10.1111/eva.12698>
- Calcagno, G. E., & Vilardi. (n.d.). *COMPARISON OF MATING PERFORMANCE OF MEDFLY (DIPTERA: TEPHRITIDAE) GENETIC SEXING AND WILD TYPE STRAINS: FIELD CAGE AND VIDEO RECORDING EXPERIMENTS*. <https://doi.org/10.1653/0015>
- Calla, B., Hall, B., Hou, S., & Geib, S. M. (2014). A genomic perspective to assessing quality of mass-reared SIT flies used in Mediterranean fruit fly (*Ceratitis capitata*) eradication in California. *BMC Genomics*, 15(1), 98. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-98>
- Capinera, J. L. (n.d.). *Area-wide Control of Insect Pests: From Research to Field Implementation*. <https://doi.org/10.1653/0015>
- Capuzzo, C., Firrao, G., Mazzon, L., Squartini, A., & Girolami, V. (2005). ‘Candidatus *Erwinia dacicola*’, a coevolved symbiotic bacterium of the olive fly *Bactrocera oleae* (Gmelin). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(4), 1641–1647. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63653-0>
- Cooper, A. M., Silver, K., Zhang, J., Park, Y., & Zhu, K. Y. (2019). Molecular mechanisms influencing efficiency of RNA interference in insects. *Pest Management Science*, 75(1), 18–28. <https://doi.org/10.1002/ps.5126>

- Couso-Ferrer, F., Arouri, R., Beroiz, B., Perera, N., Cervera, A., Navarro-Llopis, V., Castañera, P., Hernández-Crespo, P., & Ortego, F. (2011). Cross-Resistance to Insecticides in a Malathion-Resistant Strain of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Journal of Economic Entomology*, 104(4), 1349–1356. <https://doi.org/10.1603/EC11082>
- Darrington, M., Dalmay, T., Morrison, N. I., & Chapman, T. (2017). Implementing the sterile insect technique with <scp>RNA</scp> interference – a review. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 164(3), 155–175. <https://doi.org/10.1111/eea.12575>
- Davydova, S., Liu, J., Kandul, N. P., Braswell, W. E., Akbari, O. S., & Meccariello, A. (2023). Next-generation genetic sexing strain establishment in the agricultural pest *Ceratitis capitata*. *Scientific Reports*, 13(1), 19866. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-47276-5>
- Davydova, S., Liu, J., Liu, Y., Prince, K., Mann, J., Kandul, N. P., Braswell, W. E., Champer, J., Akbari, O. S., & Meccariello, A. (2025). A self-limiting sterile insect technique alternative for *Ceratitis capitata*. *BMC Biology*, 23(1), 97. <https://doi.org/10.1186/s12915-025-02201-2>
- Davydova, S., Yu, D., & Meccariello, A. (2025). Genetic engineering for SIT application: a fruit fly-focused review. *Insect Science*. <https://doi.org/10.1111/1744-7917.70038>
- Demirel, N. (2007). Behavior Paradigms in the Mediterranean Fruit Fly, *Ceratitis capitata* (Weidemann). *Journal of Entomology*, 4(2), 129–135. <https://doi.org/10.3923/je.2007.129.135>
- Deutscher, A. T., Chapman, T. A., Shuttleworth, L. A., Riegler, M., & Reynolds, O. L. (2019). Tephritid-microbial interactions to enhance fruit fly performance in sterile insect technique programs. *BMC Microbiology*, 19(S1), 287. <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1650-0>
- Dominiak, B. C., & Taylor-Hukins, R. (2022). Priority host plants for *Ceratitis capitata*, mediterranean fruit fly, based on the host reproduction number for surveillance, trade and eradication programs. *International Journal of Tropical Insect Science*, 42(6), 3721–3727. <https://doi.org/10.1007/s42690-022-00894-4>
- Dyck, V. A., Hendrichs, J., & Robinson, A. S. (Eds.). (2005). *Sterile Insect Technique*. Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/1-4020-4051-2>
- Elbashir, S. M. (2001). Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *The EMBO Journal*, 20(23), 6877–6888. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.23.6877>
- Fink, M. L., Chung, S. I., & Folk, J. E. (1980). gamma-Glutamylamine cyclotransferase: specificity toward epsilon-(L-gamma-glutamyl)-L-lysine and related compounds. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 77(8), 4564–4568. <https://doi.org/10.1073/pnas.77.8.4564>
- Franz, G. (2005). Genetic Sexing Strains in Mediterranean Fruit Fly, an Example for Other Species Amenable to Large-Scale Rearing for the Sterile Insect Technique. In *Sterile Insect Technique* (pp. 427–451). Springer-Verlag. [https://doi.org/10.1007/1-4020-4051-2\\_16](https://doi.org/10.1007/1-4020-4051-2_16)

- Gavriel, S., Jurkevitch, E., Gazit, Y., & Yuval, B. (2011). Bacterially enriched diet improves sexual performance of sterile male Mediterranean fruit flies. *Journal of Applied Entomology*, 135(7), 564–573. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.2010.01605.x>
- Gonzalez, J., & Troncoso, P. (n.d.). The Fruit Fly Exclusion Programme in Chile. In *Area-Wide Control of Insect Pests* (pp. 641–651). Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6059-5\\_59](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6059-5_59)
- Guerfali, M. M., Parker, A., Fadhl, S., Hemdane, H., Raies, A., & Chevrier, C. (2011). Fitness and Reproductive Potential of Irradiated Mass-Reared Mediterranean Fruit Fly Males *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae): Lowering Radiation Doses. *Florida Entomologist*, 94(4), 1042–1050. <https://doi.org/10.1653/024.094.0443>
- Guillem-Amat, A., Sánchez, L., López-Erassquín, E., Ureña, E., Hernández-Crespo, P., & Ortego, F. (2020). Field detection and predicted evolution of spinosad resistance in *Ceratitis capitata*. *Pest Management Science*, 76(11), 3702–3710. <https://doi.org/10.1002/ps.5919>
- Guillén, D., & Sánchez, R. (n.d.). Expansion of the National Fruit Fly Control Programme in Argentina. In *Area-Wide Control of Insect Pests* (pp. 653–660). Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6059-5\\_60](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6059-5_60)
- Hajarnis, S., Lakhia, R., & Patel, V. (2015). MicroRNAs and Polycystic Kidney Disease. In *Polycystic Kidney Disease* (pp. 313–334). Codon Publications. <https://doi.org/10.15586/codon.pkd.2015.ch13>
- He, L., Huang, Y., & Tang, X. (2022). RNAi-based pest control: Production, application and the fate of dsRNA. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.1080576>
- Hendrichs, Robinson, J., & Enkerlin. (2002). *MEDFLY AREAWIDE STERILE INSECT TECHNIQUE PROGRAMMES FOR PREVENTION, SUPPRESSION OR ERADICATION: THE IMPORTANCE OF MATING BEHAVIOR STUDIES*. <https://doi.org/10.1653/0015>
- Howard, J. D., Beghyn, M., Dewulf, N., De Vos, Y., Philips, A., Portwood, D., Kilby, P. M., Oliver, D., Maddelein, W., Brown, S., & Dickman, M. J. (2022). Chemically modified dsRNA induces RNAi effects in insects in vitro and in vivo: A potential new tool for improving RNA-based plant protection. *Journal of Biological Chemistry*, 298(9), 102311. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.102311>
- Juan-Blasco, M., Sabater-Muñoz, B., Pla, I., Argilés, R., Castañera, P., Jacas, J. A., Ibáñez-Gual, M. V., & Urbaneja, A. (2014). Estimating SIT-driven population reduction in the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*, from sterile mating. *Bulletin of Entomological Research*, 104(2), 233–242. <https://doi.org/10.1017/S0007485313000692>
- Kaur, A., Gautam, R., Srivastava, R., Chandel, A., Kumar, A., Karthikeyan, S., & Bachhawat, A. K. (2017). ChaC2, an Enzyme for Slow Turnover of Cytosolic Glutathione. *Journal of Biological Chemistry*, 292(2), 638–651. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.727479>

- Knipling, E. F. (1955). Possibilities of Insect Control or Eradication Through the Use of Sexually Sterile Males<sup>1</sup>. *Journal of Economic Entomology*, 48(4), 459–462.  
<https://doi.org/10.1093/jee/48.4.459>
- Kouloussis, N. A., Mavraganis, V. G., Damos, P., Ioannou, C. S., Bempelou, E., Koveos, D. S., & Papadopoulos, N. T. (2022). Trapping of *Ceratitis capitata* Using the Low-Cost and Non-Toxic Attractant Biodelear. *Agronomy*, 12(2), 525.  
<https://doi.org/10.3390/agronomy12020525>
- Leitão, A. L., & Enguita, F. J. (2022). A Structural View of miRNA Biogenesis and Function. *Non-Coding RNA*, 8(1), 10. <https://doi.org/10.3390/ncrna8010010>
- Mastrangelo, T., Parker, A. G., Jessup, A., Pereira, R., Orozco-Dávila, D., Islam, A., Dammalage, T., & Walder, J. M. M. (2010). A New Generation of X Ray Irradiators for Insect Sterilization. *Journal of Economic Entomology*, 103(1), 85–94.  
<https://doi.org/10.1603/EC09139>
- Morrow, J. L., Frommer, M., Shearman, D. C. A., & Riegler, M. (2015). The Microbiome of Field-Caught and Laboratory-Adapted Australian Tephritid Fruit Fly Species with Different Host Plant Use and Specialisation. *Microbial Ecology*, 70(2), 498–508.  
<https://doi.org/10.1007/s00248-015-0571-1>
- Nguyen, T. K. Y., & Han, B. W. (2020). Crystal structural of human glutathione-specific gamma-glutamylcyclotransferase 2 (ChaC2). In *Worldwide Protein Data Bank*.  
<https://doi.org/10.2210/pdb6k95/pdb>
- Oakley, A. J., Coggan, M., & Board, P. G. (2010). Identification and Characterization of  $\gamma$ -Glutamylamine Cyclotransferase, an Enzyme Responsible for  $\gamma$ -Glutamyl- $\epsilon$ -lysine Catabolism. *Journal of Biological Chemistry*, 285(13), 9642–9648.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M109.082099>
- Oakley, A. J., Yamada, T., Liu, D., Coggan, M., Clark, A. G., & Board, P. G. (2008). The Identification and Structural Characterization of C7orf24 as  $\gamma$ -Glutamyl Cyclotransferase. *Journal of Biological Chemistry*, 283(32), 22031–22042.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M803623200>
- Pane, A., Salvemini, M., Bovi, P. D., Polito, C., & Saccone, G. (2002). The transformer gene in *Ceratitis capitata* provides a genetic basis for selecting and remembering the sexual fate. *Development*, 129(15), 3715–3725.  
<https://doi.org/10.1242/dev.129.15.3715>
- Pérez-Staples, D., Shelly, T. E., & Yuval, B. (2013). Female mating failure and the failure of ‘mating’ in sterile insect programs. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 146(1), 66–78. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2012.01312.x>
- Perrotta, M. M., Lucibelli, F., Mazzucchiello, S. M., Fucci, N., Hay Mele, B., Giordano, E., Salvemini, M., Ruggiero, A., Vitagliano, L., Aceto, S., & Saccone, G. (2023). Female Sex Determination Factors in *Ceratitis capitata*: Molecular and Structural Basis of TRA and TRA2 Recognition. *Insects*, 14(7), 605.  
<https://doi.org/10.3390/insects14070605>
- Plá, I., García de Oteyza, J., Tur, C., Martínez, M. Á., Laurín, M. C., Alonso, E., Martínez, M., Martín, Á., Sanchis, R., Navarro, M. C., Navarro, M. T., Argilés, R., Briasco, M.,

- Dembilio, Ó., & Dalmau, V. (2021). Sterile Insect Technique Programme against Mediterranean Fruit Fly in the Valencian Community (Spain). *Insects*, 12(5), 415. <https://doi.org/10.3390/insects12050415>
- Primo, P., Meccariello, A., Inghilterra, M. G., Gravina, A., Del Corsano, G., Volpe, G., Sollazzo, G., Aceto, S., Robinson, M. D., Salvemini, M., & Saccone, G. (2020). Targeting the autosomal *Ceratitis capitata* transformer gene using Cas9 or dCas9 to masculinize XX individuals without inducing mutations. *BMC Genetics*, 21(S2), 150. <https://doi.org/10.1186/s12863-020-00941-4>
- Rahman, T., & Broughton, S. (2016). Suppressing Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) with an attract-and-kill device in pome and stone fruit orchards in Western Australia. *Crop Protection*, 80, 108–117. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2015.11.005>
- Rao, J., Zhang, Y., Zhao, H., Guo, J., Wan, F., Xian, X., Yang, N., & Liu, W. (2024). Projecting the Global Potential Geographical Distribution of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) under Current and Future Climates. *Biology*, 13(3), 177. <https://doi.org/10.3390/biology13030177>
- Robinson, A. S. (2002). Genetic Sexing Strains in Medfly, *Ceratitis Capitata*, Sterile Insect Technique Programmes. *Genetica*, 116(1), 5–13. <https://doi.org/10.1023/A:1020951407069>
- Rodovitis, V. G., Verykoui, E., Zarpas, K. D., Papanastasiou, S. A., Moraiti, C. A., Patronis, N., & Papadopoulos, N. T. (2024). Mediterranean fruit fly population phenological patterns are strongly affected by elevation and host presence. *Scientific Reports*, 14(1), 6010. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-56714-x>
- Rodriguez, C. C., Jofré Barud, F., Gómez, M. P., Sayra, J., & López, M. L. (2024). Host influence on life history traits of *Ceratitis capitata* Wiedemann in an arid region of Argentina. *Bulletin of Entomological Research*, 114(6), 729–736. <https://doi.org/10.1017/S0007485324000506>
- Sagri, E., Koskinioti, P., Gregoriou, M.-E., Tsoumani, K. T., Bassiakos, Y. C., & Mathiopoulos, K. D. (2017). Housekeeping in Tephritid insects: the best gene choice for expression analyses in the medfly and the olive fly. *Scientific Reports*, 7(1), 45634. <https://doi.org/10.1038/srep45634>
- Sagri, E., Reczko, M., Tsoumani, K. T., Gregoriou, M.-E., Harokopos, V., Mavridou, A.-M., Tastsoglou, S., Athanasiadis, K., Ragoussis, J., & Mathiopoulos, K. D. (2014). The molecular biology of the olive fly comes of age. *BMC Genomic Data*, 15(S2), S8. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-15-S2-S8>
- Sánchez-Rosario, M., Pérez-Staples, D., Toledo, J., Valle-Mora, J., & Liedo, P. (2017). Artificial selection on mating competitiveness of *Anastrepha ludens* for sterile insect technique application. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 162(2), 133–147. <https://doi.org/10.1111/eea.12540>
- Schuster, S., Miesen, P., & van Rij, R. P. (2019). Antiviral RNAi in Insects and Mammals: Parallels and Differences. *Viruses*, 11(5), 448. <https://doi.org/10.3390/v11050448>

- Sciarretta, A., Tabilio, M. R., Lampazzi, E., Ceccaroli, C., Colacci, M., & Trematerra, P. (2018). Analysis of the Mediterranean fruit fly [*Ceratitis capitata* (Wiedemann)] spatio-temporal distribution in relation to sex and female mating status for precision IPM. *PLOS ONE*, 13(4), e0195097. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195097>
- Scolari, F., Gomulski, L. M., Gabrieli, P., Manni, M., Savini, G., Gasperi, G., & Malacrida, A. R. (2014). How functional genomics will impact fruit fly pest control: the example of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*. *BMC Genomic Data*, 15(S2), S11. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-15-S2-S11>
- Sim, S. B., Ruiz-Arce, R., Barr, N. B., & Geib, S. M. (2017). A New Diagnostic Resource for *Ceratitis capitata* Strain Identification Based on QTL Mapping. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 7(11), 3637–3647. <https://doi.org/10.1534/g3.117.300169>
- Sollazzo, G., Gouvi, G., Nikolouli, K., Aumann, R. A., Djambazian, H., Whitehead, M. A., Berube, P., Chen, S.-H., Tsiamis, G., Darby, A. C., Ragoussis, J., Schetelig, M. F., & Bourtzis, K. (2023). Genomic and cytogenetic analysis of the *Ceratitis capitata* temperature-sensitive lethal region. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 13(6). <https://doi.org/10.1093/g3journal/jkad074>
- Sollazzo, G., Nikolouli, K., Gouvi, G., Aumann, R. A., Schetelig, M. F., & Bourtzis, K. (2024). Deep orange gene editing triggers temperature-sensitive lethal phenotypes in *Ceratitis capitata*. *BMC Biotechnology*, 24(1). <https://doi.org/10.1186/s12896-024-00832-x>
- Suarez, L., Murua, F., Lara, N., Escobar, J., Taret, G., Rubio, J. L., Nieuwenhove, G. Van, Bezdjian, L., Schliserman, P., & Ovruski, S. M. (2014). Biological Control of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) in Argentina: Releases of *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae) in Fruit-Producing Semi-Arid Areas of San Juan. *Natural Science*, 06(09), 664–675. <https://doi.org/10.4236/ns.2014.69066>
- Szyniszewska, A. M., & Tatem, A. J. (2014). Global Assessment of Seasonal Potential Distribution of Mediterranean Fruit Fly, *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *PLoS ONE*, 9(11), e111582. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111582>
- Thomas, M. C., Heppner, J. B., Woodruff, R. E., Weems, Jr., H. V., Steck, G. J., & Fasulo, T. R. (1969). Mediterranean Fruit Fly, *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Insecta: Diptera: Tephritidae). *EDIS*, 2004(8). <https://doi.org/10.32473/edis-in371-2001>
- Tsitsipis, J. A. (1977). An improved method for the mass rearing of the olive fruit fly, *Dacus oleae* (Gmel.) (Diptera, Tephritidae). *Zeitschrift Für Angewandte Entomologie*, 83(1–4), 419–426. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.1977.tb02419.x>
- Voudouris, C. Ch., Mavridis, K., Kalaitzaki, A., Skouras, P. J., Kati, A. N., Eliopoulos, P. A., Vontas, J., & Margaritopoulos, J. T. (2018). Susceptibility of *Ceratitis capitata* to deltamethrin and spinosad in Greece. *Journal of Pest Science*, 91(2), 861–871. <https://doi.org/10.1007/s10340-017-0913-5>

- Vreysen, M. J. B., Abd-Alla, A. M. M., Bourtzis, K., Bouyer, J., Caceres, C., de Beer, C., Oliveira Carvalho, D., Maiga, H., Mamai, W., Nikolouli, K., Yamada, H., & Pereira, R. (2021). The Insect Pest Control Laboratory of the Joint FAO/IAEA Programme: Ten Years (2010–2020) of Research and Development, Achievements and Challenges in Support of the Sterile Insect Technique. *Insects*, 12(4), 346. <https://doi.org/10.3390/insects12040346>
- Vreysen, M. J. B., Gerardo-Abaya, J., & Cayol, J. P. (n.d.). Lessons from Area-Wide Integrated Pest Management (AW-IPM) Programmes with an SIT Component: an FAO/IAEA Perspective. In *Area-Wide Control of Insect Pests* (pp. 723–744). Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6059-5\\_66](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6059-5_66)
- Vreysen, M. J. B., Saleh, K. M., Ali, M. Y., Abdulla, A. M., Zhu, Z.-R., Juma, K. G., Dyck, V. A., Msangi, A. R., Mkonyi, P. A., & Feldmann, H. U. (2000). <i>Glossina austeni</i> (Diptera: Glossinidae) Eradicated on the Island of Unguja, Zanzibar, Using the Sterile Insect Technique. *Journal of Economic Entomology*, 93(1), 123–135. <https://doi.org/10.1603/0022-0493-93.1.123>
- Ward, C. M., Aumann, R. A., Whitehead, M. A., Nikolouli, K., Leveque, G., Gouvi, G., Fung, E., Reiling, S. J., Djambazian, H., Hughes, M. A., Whiteford, S., Caceres-Barrios, C., Nguyen, T. N. M., Choo, A., Crisp, P., Sim, S. B., Geib, S. M., Marec, F., Häcker, I., ... Schetelig, M. F. (2021). White pupae phenotype of tephritids is caused by parallel mutations of a MFS transporter. *Nature Communications*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20680-5>
- Wilson, R. C., & Doudna, J. A. (2013). Molecular Mechanisms of RNA Interference. *Annual Review of Biophysics*, 42(1), 217–239. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-083012-130404>
- Woruba, D. N., Morrow, J. L., Reynolds, O. L., Chapman, T. A., Collins, D. P., & Riegler, M. (2019). Diet and irradiation effects on the bacterial community composition and structure in the gut of domesticated teneral and mature Queensland fruit fly, *Bactrocera tryoni* (Diptera: Tephritidae). *BMC Microbiology*, 19(S1), 281. <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1649-6>
- YAN, Y., AUMANN, R. A., HÄCKER, I., & SCHETELIG, M. F. (2023). CRISPR-based genetic control strategies for insect pests. *Journal of Integrative Agriculture*, 22(3), 651–668. <https://doi.org/10.1016/j.jia.2022.11.003>
- Zacharopoulou, A., Augustinos, A. A., Drosopoulou, E., Tsoumani, K. T., Gariou-Papalexiou, A., Franz, G., Mathiopoulos, K. D., Bourtzis, K., & Mavragani-Tsipidou, P. (2017). A review of more than 30 years of cytogenetic studies of <scp>T</scp> ephritidae in support of sterile insect technique and global trade. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 164(3), 204–225. <https://doi.org/10.1111/eea.12616>

