

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

**Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος Βιοχημείας και
Βιοτεχνολογίας**

**«ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ – ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ»**

Αδαμοπούλου Μαρία

**Λειτουργική ανάλυση γονιδίων
που εμπλέκονται στο θηλυκό αναπαραγωγικό
σύστημα του δάκου της ελιάς**



Φεβρουάριος, 2017

Θέμα Διπλωματικής Μεταπτυχιακής Εργασίας :

Λειτουργική ανάλυση γονιδίων που εμπλέκονται
στο θηλυκό αναπαραγωγικό σύστημα του δάκου της ελιάς

Functional analysis of genes involved
in the female reproductive system of the olive fruit fly

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

- **Ματθιόπουλος Κωνσταντίνος (Επιβλέπων)** : Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- **Καρπούζας Δημήτριος** : Αναπληρωτής Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- **Παπαδοπούλου Καλλιόπη** : Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Καταρχήν θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον καθηγητή κ. Κωνσταντίνο Μαθιόπουλο για την τιμή που μου έκανε να εκπονήσω την μεταπτυχιακή μου διατριβή στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας. Πάντα διαθέσιμος να προσφέρει γνώσεις, συνεχή καθοδήγηση και πολύτιμες συμβουλές σε όλα τα μέλη του εργαστηρίου.

Εν συνεχεία, ευχαριστίες εκφράζονται, προς τον Αναπληρωτή Καθηγητή Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κ. Καρπούζα Δημήτριο και την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κ. Παπαδοπούλου Καλλιόπη για την συμμετοχή τους στη Τριμελή Συμβουλευτική Επιτροπή.

Ένα ιδιαίτερα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στην υποψήφια διδάκτορα Μαρία – Ελένη Γρηγορίου, η οποία ως υπεύθυνη της διπλωματικής εργασίας, ήταν πάντα διαθέσιμη για συμβουλές, για χρήσιμες και παραγωγικές συζητήσεις και για τυχόν απορίες μου. Η διαρκής καθοδήγησή της στον προγραμματισμό και εκτέλεση των πειραμάτων ήταν καθοριστική για την περάτωση της διατριβής. Την ευχαριστώ πολύ για την εξαιρετική υπομονή, καλή θέληση και εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα παιδιά στο εργαστήριο που με υποδέχτηκαν θερμά, για το ευχάριστο κλίμα αλληλεγγύης, κατανόησης και εμπύχωσης που υπήρχε κατά τη διάρκεια των ατελείωτων αλλά ευχάριστων ωρών που περάσαμε μαζί.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω το οικογενειακό και φιλικό περιβάλλον μου για την διαρκή τους συμπαράσταση καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της μεταπτυχιακής μου διατριβής.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο δάκος της ελιάς *Bactrocera oleae* (Rossi) (Diptera: Tephritidae) είναι ένας από τους σοβαρότερους εχθρούς της ελιάς με μεγάλες οικονομικές ζημιές κάθε χρόνο. Ο δάκος είναι ένα μονοφάγο έντομο, διαθέτει 3-4 γενεές το έτος και αναπτύσσεται αποκλειστικά στο μεσοκάρπιο της καλλιεργούμενης ελιάς και αγριελιάς. Ο κυριότερος τρόπος καταπολέμησης είναι η χρήση χημικών εντομοκτόνων και ειδικά οι δολωματικοί ψεκάσμοι από εδάφους. Λόγω των δυσμενών επιπτώσεων στο οικοσύστημα, έγιναν προσπάθειες ανάπτυξης νέων εναλλακτικών, φιλικών προς το περιβάλλον μεθόδων βιολογικού ελέγχου. Ένα σύστημα που αποτελεί στόχο των καινοτόμων μεθόδων είναι το αναπαραγωγικό. Η μελέτη του συστήματος αυτού εστιάζεται στον εντοπισμό γονιδίων-στόχων για μη λειτουργική αναπαραγωγική συμπεριφορά και μειωμένη ωαπόθεση.

Στην παρούσα διατριβή μελετώνται τα γονίδια *vitellogenin-1*, *tropenin C* και *lingerer*. Τα γονίδια αυτά εντοπίστηκαν σε διαθέσιμες αλληλουχίες μεταγραφώματος του εργαστηρίου που προέκυψαν μετά από σύγκριση ιστών του θηλυκού αναπαραγωγικού συστήματος πριν και δώδεκα ώρες μετά τη σύζευξη. Η παρουσία των γονιδίων αυτών υποδηλώνει την εμπλοκή τους στη συζευκτική και μετασυζευκτική συμπεριφορά του θηλυκού εντόμου του δάκου της ελιάς. Αρχικά, καθορίστηκαν τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων μέσω ποσοτικής Real-Time PCR σε αναπαραγωγικούς ιστούς θηλυκών εντόμων, σε συγκεκριμένες χρονικές στιγμές πριν και μετά τη σύζευξη. Τα προφίλ έκφρασης που προέκυψαν ενισχύουν την υπόθεση ότι τα γονίδια συμμετέχουν στην αναπαραγωγική διαδικασία. Για το λόγο αυτό, πραγματοποιήθηκε παροδική αποσιώπησή του γονιδίου *tropenin C*. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε παροδική σίγηση του με απευθείας έγχυση δίκλωνων μορίων (dsRNA) στην αιμολέμφο. Για να προσδιοριστεί το ποσοστό σίγησής του πραγματοποιήθηκε ποσοτική Real-Time PCR ενώ πραγματοποιήθηκε και καταμέτρηση της ωαπόθεσης των θηλυκών εντόμων. Παρατηρήθηκε μείωση της αναπαραγωγικής ικανότητας του θηλυκού δίνοντας μια πρώτη ένδειξη της συμμετοχής του γονιδίου στην αναπαραγωγή του *Bactrocera oleae*.

ABSTRACT

The olive fruit fly, *Bactrocera oleae* (Rossi) (Diptera: Tephritidae), is the most severe pest of olives, causing great economic losses every year. It is a monofagous insect with 3-4 generations per year and grows exclusively in the mesocarp of cultivated and wild olive fruits. The major means of controlling the pest population is with the use of chemical insecticides, especially bait sprays. Due to the adverse effects in the ecosystem, there were efforts to develop new alternative, environmentally friendly biological control methods. The reproductive system is an obvious target of such methods. The study of this system focuses on the identification of target genes for a non-functional reproductive behavior and reduced oviposition.

In this thesis, the genes *vitellogenin-1*, *troponin C* and *lingerer* are studied. These genes have been identified in the laboratory's available transcriptome analyses obtained by comparing RNAseq in female accessory glands (FAGs) / spermatheca before and twelve hours after copulation. The presence of these genes indicates their involvement in mating and post-mating behavior of the female insect olive fruit fly. At first, the expression levels of these genes were evaluated by quantitative Real-time PCR in female reproductive tissues, at specific time points, before and after mating. The resulting expression profiles reinforce the hypothesis that these genes are involved in the reproduction process. Therefore, transient silencing experiments of troponin C were performed. Specifically, these experiments were held by direct injection of double stranded molecules (dsRNA) of the selected genes into the insect's hemolymph. Quantitative Real-Time PCR was performed to determine the percentage of silencing, while oviposition of female insects was determined. A reduction in the reproductive capacity of the female was observed, giving a first indication of the gene's involvement in the reproduction of *Bactrocera oleae*.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	9
1.1 Συστηματική κατάταξη <i>Bactrocera oleae</i>	9
1.2 Μορφολογία του εντόμου και βιολογικός κύκλος.....	9
1.3 Γεωγραφική κατανομή.....	11
1.4 Ξενιστές του εντόμου.....	12
1.5 Οικονομική σημασία.....	12
1.6 Μέθοδοι καταπολέμησης.....	13
1.6.1 Χημική καταπολέμηση.....	13
1.6.2 Βιολογική καταπολέμηση.....	14
1.6.3 Εναλλακτικές μέθοδοι καταπολέμησης.....	14
1.7 Αναπαραγωγικό σύστημα του θηλυκού εντόμου.....	16
1.7.1 Μετασυζευκτικές αλλαγές στη δομή και διαμόρφωση του αναπαραγωγικού συστήματος.....	19
1.7.2 Μετασυζευκτικές αλλαγές στη συμπεριφορά του θηλυκού εντόμου.....	19
1.8 Γονίδια που εμπλέκονται στο θηλυκό αναπαραγωγικό σύστημα του Δάκου.....	21
1.8.1 Vitellogenin-1.....	22
1.8.2 Lingerer.....	24
1.8.3 Troponin C.....	26
1.9 RNAi.....	28
1.9.1 Μηχανισμός RNAi.....	28
2. ΣΚΟΠΟΣ.....	30
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	31
3.1 Πληθυσμός εντόμων.....	31
3.2 Απομόνωση RNA (RNA extraction) αναπαραγωγικών ιστών.....	31
3.3 Επεξεργασία DNase (DNase treatment).....	32
3.4 Σύνθεση cDNA με αντίστροφη μεταγραφή.....	33
3.5 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα (gel) αγαρόζης.....	33
3.6 Απομόνωση μορίων DNA από πήκτωμα αγαρόζης (gel extraction).....	34
3.7 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction-PCR).....	35
3.8 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real Time-PCR).....	38
3.9 Δημιουργία δίκλωνου RNA (dsRNA).....	40
3.10 Παροδική σίγηση γονιδίων (RNA silencing).....	41

3.11 Προγράμματα Βιοπληροφορικής και Στατιστικής.....	42
3.11.1 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)	42
3.11.2 Omiga	42
3.11.3 Graphpad Prism	42
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	43
4.1 Ανάλυση έκφρασης γονιδίων <i>vitellogenin-1</i> , <i>lingerer</i> , <i>troponin C</i>	43
4.1.1 Μελέτη έκφρασης γονιδίου <i>vitellogenin-1</i>	43
4.1.2 Μελέτη έκφραση γονιδίου <i>lingerer</i>	44
4.1.3 Μελέτη έκφρασης γονιδίου <i>troponin C</i>	45
4.2 Παροδική σίγηση γονιδίου <i>troponin C</i>	46
4.2.1 Μελέτη αποσιώπησης γονιδίου <i>troponin C</i>	47
4.2.2 Μελέτη επίδρασης της σίγησης γονιδίου <i>troponin C</i> μετασυζευκτικά – Ωοαπόθεση	47
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	50
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	54
6.1 Ελληνική	54
6.2 Ξενόγλωσση	54

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο δάκος της ελιάς, *Bactrocera oleae* (Rossi), αποτελεί ένα από τα μείζονα έντομα της ελληνικής γεωργίας, με ιδιαίτερο ενδιαφέρον ως προς τη μελέτη της μορφολογίας, φυσιολογίας και συμπεριφοράς των φυσικών πληθυσμών του, καθώς προσβάλλει την πλειονότητα των ελαιοκαλλιεργειών παγκοσμίως. Το έντομο αυτό είναι αποδιοργανωτικό και επιβλαβές, προκαλώντας σοβαρή καταστροφή στους καρπούς της ελιάς με αποτέλεσμα την μειωμένη απόδοση παραγωγής και ποιότητας των επιτραπέζιων ελιών και του ελαιόλαδου (Sagri et al, 2014). Ο δάκος ανήκει στην οικογένεια των Tephritidae, στις λεγόμενες «μύγες των φρούτων» (fruit flies), στην οποία ανήκουν και άλλα γένη (Ceratitis, Rhagoletis, Anastrepha) με έντομα οικονομικής σημασίας, όπως η μύγα της Μεσογείου, *Ceratitis Capitata* και η μύγα των κερασιών, *Rhagoletis cerasi* (Korneyev, 1999).

1.1 Συστηματική κατάταξη *Bactrocera oleae*

ΦΥΛΟ	Arthropoda
ΥΠΟΦΥΛΟ	Atelocerata
ΚΛΑΣΗ	Insecta
ΥΠΟΚΛΑΣΗ	Neoptera
ΔΙΑΙΡΕΣΗ	Holometabola
ΤΑΞΗ	Diptera
ΥΠΟΤΑΞΗ	Brachycera
ΔΙΑΙΡΕΣΗ	Schizophora
ΤΜΗΜΑ	Acalyptratae
ΥΠΕΡΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ	Tephritoidea
ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ	Tephritidae
ΥΠΟΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ	Dacinae
ΦΥΛΗ	Dacini
ΓΕΝΟΣ	<i>Bactrocera</i>
ΥΠΟΓΕΝΟΣ	Daculus
ΕΙΔΟΣ	<i>oleae</i>

Πρώτοι ο Rossi και ο Gmelin κατέταξαν τον δάκο της ελιάς ως *Musca oleae* (1790), στη συνέχεια *Dacus (Daculus) oleae*, *Dacus (Polistomimetes) oleae* και *Daculus oleae*, το οποίο καταλήξε στο σημερινό όνομα *Bactrocera* (*Daculus*) *oleae* (Drew, 1989). Το κριτήριο κατάταξης είναι η μορφολογία των κοιλιακών τεργίτων του εντόμου. Συγκεκριμένα τα είδη του γένους *Bactrocera*, φέρουν διακριτούς κοιλιακούς τεργίτες (White and Wang, 1992). Η συστηματική κατάταξη του δάκου κατά White and Elson – Haris 1992 και White and Wang 1992 όπως ορίζεται σήμερα παρουσιάζεται στον πίνακα 1.

Πίνακας 1: Συστηματική κατάταξη του *B.oleae* κατά White and Elson-Haris (1992) και White and Wang (1992)

1.2 Μορφολογία του εντόμου και βιολογικός κύκλος

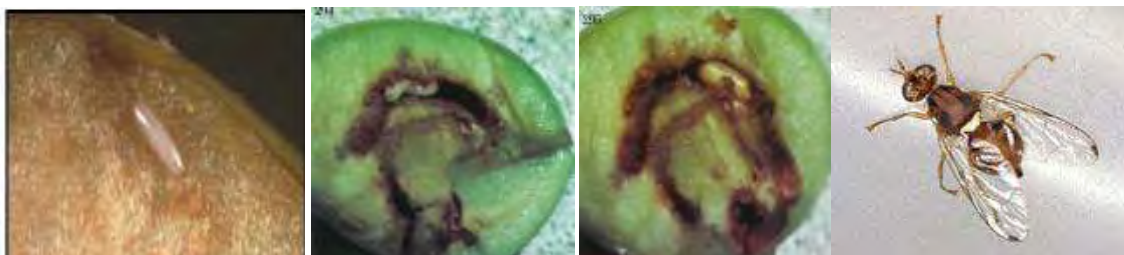
Το έντομο θεωρείται ότι είναι ένα από τα μικρότερα σε μέγεθος είδη του γένους *Bactrocera* (Weems and Nation, 2009).

Αυγό: Πολύ στενόμακρο, κάπως οξύ στον ένα πόλο, λευκού χρώματος, το οποίο εισάγεται μέσα στο μεσοκάρπιο της ελιάς (Τζανακάκης και Κατσόγιαννος, 2003).

Προνύμφη: Διακρίνονται 3 στάδια ανάπτυξης. Υπόλευκη ή ανοιχτοκίτρινη, τελικού μήκους 7-8 mm, με το πρόσθιο μέρος του σώματος στενότερο από το οπίσθιο. Χωρίς κεφαλική κάψα, όπως και τα άλλα Tephritidae και στο πρόσθιο μέρος του σώματος είναι σκοτεινόχρωμα μόνο τα στοματικά άγκιστρα και ο λοιπός κεφαλοφαρυγγικός σκελετός.

Νύμφη: Ελλειψοειδής, ανοιχτοκάστανη, με σκληρυμένο δερμάτιο στο περίβλημα της ανεπτυγμένης προνύμφης.

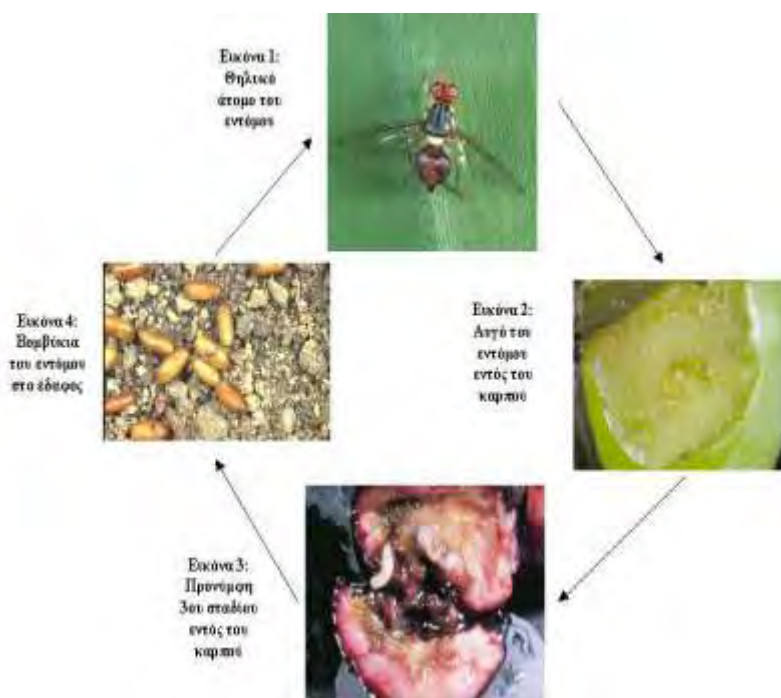
Τέλειο/Ακμαίο: Έχει μήκος ~ 5 mm με χρωματισμό ανοιχτοκάστανο ως σκοτεινοκάστανο. Ο θώρακας είναι στα νώτα σκοτεινότερος και έχει συνήθως 3 σκοτεινές γραμμές κατά μήκος, με υπόλευκο ή υποκίτρινο το θυρέο (scutellum) και με υπόλευκες ή υποκίτρινες κήλιδες στα πλάγια. Οι πτέρυγες είναι διαφανείς, ιριδίζουσες, με ένα σκοτεινό στίγμα στην άκρη. Τέλος, στα θηλυκά, η κοιλία καταλήγει σε έναν ισχυρό ευδιάκριτο ωothήτη.



Εικόνα 1: Αναπτυξιακά στάδια του Δάκου της ελιάς

Στον βιολογικό κύκλο του εντόμου περιλαμβάνονται 3-4 γενεές το έτος, στις πιο πολλές περιοχές της χώρας μας. Ανάλογα με τη περιοχή, διαχειμάζει ως ενήλικο σε προφυλαγμένες θέσεις ή ως νύμφη στο έδαφος. Σε περιοχές με ήπιο χειμώνα, όταν παραμένει στα δέντρα ο κατάλληλος καρπός, είναι δυνατόν να συνυπάρχουν στον ελαιώνα όλα τα στάδια του εντόμου, σπάνια όμως το αυγό. Την άνοιξη, με την άνοδο της θερμοκρασίας, από τις νύμφες του εδάφους, βγαίνουν τα πρώτα τέλεια άτομα του δάκου και έτσι δραστηριοποιείται η 1^η γενεά του εντόμου. Όταν ο καρπός πλησιάζει στο τελικό του μέγεθος και γίνεται τόσο μαλακός ώστε να μπορεί να τον τρυπήσει ο ωothήτης του θηλυκού, αρχίζει η ωοτοκία, συνήθως τον Ιούλιο. Το θηλυκό, αφού ανοίξει με τον ωothήτη του την οπή ωοτοκίας, προκαλώντας το χαρακτηριστικό «νύγμα», εισάγει στο μεσοκάρπιο ένα αυγό. Τα ενήλικα είναι σχετικά μακρόβια και η ωοτοκία από θηλυκά της ίδιας ή διαφορετικών γενεών συνεχίζεται επί εβδομάδες και μήνες, ώσπου η πτώση της θερμοκρασίας στα τέλη του φθινοπώρου ή το χειμώνα να εμποδίσει την ωοτοκία. Κατόπιν επώασης 2-4 ημερών εκκολάπτονται οι νεαρές προνύμφες, οι οποίες τρέφονται από τη σάρκα του ελαιοκάρπου. Η προνύμφη ορρύσει στοά στο μεσοκάρπιο και όταν συμπληρώσει την ανάπτυξή της, περίπου μετά από 12-14 ημέρες, νυμφώνεται το καλοκαίρι μέσα στο καρπό και το φθινόπωρο και τον χειμώνα στο έδαφος σε μικρό βάθος. Είναι γνωστό ότι η προνύμφη έχει ανάγκη της παρουσίας συμβιωτικών βακτηρίων στον πεπτικό της σωλήνα για να μπορέσει να χρησιμοποιήσει τις πρωτεΐνες του μεσοκάρπιου της ελιάς, όταν η ελιά είναι πράσινη. Κατά την

ωοτοκία, τα βακτήρια που βρίσκονται στο εσωτερικό του ωοθήτη του θηλυκού, επαλείφονται στο αυγό και από εκεί μπαίνουν στον πεπτικό σωλήνα της νεαρής προνύμφης. Προτού νυμφωθεί, δημιουργεί μια στρογγυλή τρύπα, τη λεγόμενη οπή εξόδου του ακμαίου. Εάν θα νυμφωθεί στο καρπό ή στο έδαφος, εξαρτάται από την κατάσταση ωριμότητας του καρπού. Η αναπτυγμένη προνύμφη συνήθως εγκαταλείπει τον καρπό και νυμφώνεται στο έδαφος όταν ο καρπός έχει προχωρήσει στην ωρίμανσή του. Τέλος, το τέλειο έντομο εμφανίζεται μετά από τη παρέλευση 9-12 ημερών και εξέρχεται από την οπή εξόδου που έχει σχηματίζει ως νύμφη. Με ευνοϊκές συνθήκες, ο βιολογικός κύκλος συμπληρώνεται σχεδόν σε ένα μήνα. Ο πληθυσμός του δάκου της ελιάς αυξάνει ιδιαίτερα το φθινόπωρο και κυρίως όταν ο καιρός είναι υγρός και σχετικά ζεστός ($\Theta \sim 23^{\circ}\text{C}$ & $\Sigma\Upsilon \sim 60\%$). Ενώ, οι υψηλές θερμοκρασίες το καλοκαίρι και η χαμηλή ατμοσφαιρική υγρασία δεν ευνοούν τον δάκο της ελιάς (Τζανακάκης και Κατσόγιαννος, 2003).



Εικόνα 2: Βιολογικός κύκλος του Δάκου

1.3 Γεωγραφική κατανομή

Ο δάκος της ελιάς είναι ευρέως διαδεδομένος στη λεκάνη της Μεσογείου και στις παραμεσόγειες χώρες, υπάρχουν όμως και αναφορές παρουσίας του σε διάφορες περιοχές σε όλο τον κόσμο, συμπεριλαμβανομένης της Νότιας και Κεντρικής Αφρικής (Rice, 2000), της Εγγύς και Μέσης Ανατολής, της Κεντρικής Αμερικής (Μεξικό) και της Καλιφόρνιας των ΗΠΑ (Nardi et al., 2005). Η παρουσία του εντόμου αναφέρθηκε και στη Σερβία η οποία πιθανώς αποτελεί και το βορειότερο όριο εξάπλωσης του εντόμου (Κωβαίος και συνεργάτες, 2001). Ωστόσο, δεν έχει αναφερθεί ακόμη η παρουσία του στην Νότια Αμερική, Αυστραλία και Κεντρική Κίνα (Tzanakakis, 2006).



Εικόνα 3: Γεωγραφική εξάπλωση του Δάκου της ελιάς

1.4 Ξενιστές του εντόμου

Ο δάκος χαρακτηρίζεται ως μονοφάγο και καρποφάγο είδος που προσβάλλει καρπούς τριών ειδών του γένους *Olea*: *Olea europaea* var. *Sativa* (L.), *Olea europaea* var. *cuspidata* (Link), *Olea europaea* var. *chrysophilla* (Lam) (Tzanakakis, 2006). Τα ενήλικα άτομα του δάκου τρέφονται με νέκταρ φυτών, γύρη και μελλιτώματα προερχόμενα από έντομα (κοκκοειδή) και από άλλες υγρές τροφές που εκκρίνονται από τραύματα καρπών, φύλλων και βλαστών (Mohammad, 2005). Τις παραπάνω ουσίες τα άτομα του δάκου δεν τις παίρνουν μόνο από τα ελαιόδεντρα, αλλά και από άλλα φυτά που βρίσκονται δίπλα ή μακριά από τους ελαιώνες (Tzanakakis, 2006).

1.5 Οικονομική σημασία

Ο δάκος είναι ένας από τους σοβαρότερους εχθρούς της ελιάς. Εκτιμάται ότι στις μεσογειακές χώρες κάθε χρόνο παρά τις προσπάθειες αντιμετώπισης του, προκαλεί μεγάλες οικονομικές ζημιές της τάξης του 15% στις ελαιοπαραγωγικές περιοχές (Mazomenos et al., 2002). Όταν οι συνθήκες ευνοούν μεγάλες πυκνότητες πληθυσμών σε αγροτεμάχια που δεν έχουν γίνει ενέργειες αντιμετώπισής τους, το ποσοστό οικονομικής ζημίας εκτοξεύεται έως 80% με μέσο όρο 40% με 50% (Haniotakis, 2005). Επίσης, έμμεσα η οπή της ωτοκίας του δάκου βοηθά την εγκατάσταση του μύκητα *Camarosporium dalmaticum* Berl. and Volg., γνωστού και ως *Spraeropsis* ή *Macrophoma dalmatica*, που προκαλεί την «ξεροβούλα» στις άγουρες και τη «σαποβούλα» στις ώριμες ελιές. Στη θέση ωτοκίας του εντόμου ακολουθεί συχνά ωτοκία του *Prolasioptera berlesiana*, που βοηθά στην εξάπλωση του μύκητα στον ελαιόκαρπο και πιθανότατα τον μεταφέρει εκεί (Τζανακάκης και Κατσόγιαννος, 2003).



Εικόνα 4: Οπή ωτοκίας-νύγμα (αριστερά), ξεροβούλα-κηλίδα του *Camarosporium dalmaticum* (μεσαία) και προνύμφη της *Prolasioptera berlesiana* σε θάλαμο ωτοκίας του δάκου, όπου άρχισε να αναπτύσσεται ο μύκητας (δεξιά)

1.6 Μέθοδοι καταπολέμησης

Για τη καταπολέμηση του δάκου της ελιάς εφαρμόζεται κυρίως η χημική μέθοδος. Η χημική μέθοδος χωρίζεται σε ψεκασμούς καλύψεως και δολωματικούς. Όμως, η αλόγιστη και μακροχρόνια χρήση των εντομοκτόνων έχει ως συνέπεια όλα τα αρνητικά της χρήσης χημικών στο περιβάλλον με αποτέλεσμα την ανάγκη για ανάπτυξη εναλλακτικών βιολογικών και βιοτεχνολογικών μεθόδων. Μερικές από τις μεθόδους που χρησιμοποιούνται είναι η μαζική παγίδευση, η εισαγωγή και εξαπόλυση φυσικών εχθρών του δάκου ενώ υπάρχει η προσπάθεια ανάπτυξης της μεθόδου SIT (Τζανακάκης και Κατσόγιαννος, 2003).

1.6.1 Χημική καταπολέμηση

Μεταξύ των πολλών εντομοκτόνων που χρησιμοποιούνται εναντίον του δάκου είναι τα οργανοφωσφορικά (dimethoate, fenthion, formothion, malathion, phosphamidon). Τα περισσότερα μπαίνουν στον ελαιόκαρπο και σκοτώνουν τις προνύμφες του δάκου, έχουν δηλαδή και προνυφοκτόνο δράση, όταν χρησιμοποιούνται από ορισμένες δόσεις και πάνω. Ορισμένα, σε ψεκασμούς πλήρους κάλυψης δέντρων, μπορεί είναι φυτοτοξικά αλλά αυτό εξαρτάται και από τον υγρό διαλύτη των γαλακτωματοποιήσιμων σκευασμάτων (Τζανακάκης και Κατσόγιαννος, 2003).

Γίνεται με δύο μεθόδους :

1.6.1.a Προληπτική μέθοδος – Δολωματικοί ψεκασμοί

Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην εκτέλεση δολωματικών εντομοκτόνων ψεκασμών (εντομοκτόνο με ελκυστικό) με σκοπό την προσέλκυση, βρώση του ψεκαστικού μίγματος και θανάτωση των ενηλίκων πριν προλάβουν να ωστοκήσουν στον ελαιόκαρπο. Οι ψεκασμοί γίνονται με επινώτιους ψεκαστήρες με ακροφύσια χωρίς βελόνες από το έδαφος. Το ψεκαστικό υγρό περιέχει κατάλληλο οργανοφωσφορούχο εντομοκτόνο (dimethoate, fenthion κ.α.) και υδρολυμένη πρωτεΐνη ή άλλο προϊόν με παρόμοια ελκυστική δράση (Alma Dacus, Atropaz, Buminal κ.α.). Ο ψεκασμός γίνεται σε ένα τμήμα της κόμης κάθε τρίτου δέντρου, υπό μορφή χοντρών σταγόνων. Οι σημαντικότεροι παράγοντες που λαμβάνονται υπόψη στον καθορισμό του χρόνου διεξαγωγής του 1^{ου} δολωματικού ψεκασμού του έτους, ο οποίος πρέπει να είναι γενικός σε ολόκληρη περιοχή και να ολοκληρώνεται σε σύντομο χρονικό διάστημα, είναι : η πυκνότητα του πληθυσμού του δάκου, η αναλογία φύλου, η γονιμότητα των θηλυκών, η δεκτικότητα του καρπού για ωστοκία και οι καιρικές συνθήκες. Για την παρακολούθηση της πορείας του ενήλικου πληθυσμού χρησιμοποιούνται γυάλινες «δακοπαγίδες» τύπου McPhail. Ως ελκυστικό, περιέχουν υδατικό διάλυμα φωσφορικού ή θειικού αμμωνίου και σε ορισμένες περιπτώσεις διάλυμα υδρολυμένης πρωτεΐνης και βόρακα. Προϋπόθεση επιτυχίας της μεθόδου είναι να γίνονται οι ψεκασμοί στον σωστό χρόνο, ειδικά για τον πρώτο ψεκασμό ώστε να υπάρξει αποτελεσματικός έλεγχος της πρώτης γενεάς. Έπειτα, γίνεται καταμέτρηση των συλληφθέντων αρσενικών και θηλυκών δάκων, καθώς και έλεγχος για ώριμα ωάρια στις ωοθήκες των θηλυκών. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι δολωματικοί ψεκασμοί από εδάφους είναι μια πρακτική με ελάχιστες δυσμενείς επιπτώσεις στο οικοσύστημα γενικότερα και στην ωφέλιμη πανίδα ειδικότερα και είναι απολύτως συμβατή



Εικόνα 5: Γυάλινη δακοπαγίδα McPhail για σύλληψη ενηλίκων δάκων

με τις αρχές και τις επιδιώξεις της ολοκληρωμένης καταπολέμησης (Τζανακάκης και Κατσόγιαννος, 2003).

1.6.1.β Θεραπευτική ή κατασταλτική μέθοδος – ψεκασμοί καλύψεως

Η μέθοδος αυτή μπορεί να εφαρμόζεται από κάθε παραγωγό χωριστά. Έγκειται στη πλήρη κάλυψη της κόμης των δέντρων με ψεκαστικό υγρό από εδάφους, με σκοπό να σκοτωθούν τα ενήλικα και οι προνύμφες μέσα στον καρπό. Το ψεκαστικό υγρό περιέχει οργανοφωσφορούχο εντομοκτόνο. Οι ψεκασμοί γίνονται κυρίως με ψεκαστήρες υψηλού όγκου, σχεδόν μέχρις απορροής του ψεκαστικού υγρού. Ψεκάζουμε στο κατάλληλο ποσοστό «γόνιμης προσβολής» (αυγά, προνύμφες, νύμφες ή προνυμφικές στοές) για τις ελαιοποιήσιμες ή για τις βρώσιμες ελιές. Η θεραπευτική όμως μέθοδος έχει ως συνέπεια τη θανάτωση πολλών ωφέλιμων εντομοφάγων εντόμων σε μεγαλύτερο βαθμό από τη προληπτική μέθοδο (Τζανακάκης και Κατσόγιαννος, 2003).

1.6.2 Βιολογική καταπολέμηση

Η μέθοδος αυτή βασίζεται στη χρήση εντομοφάγων παρασίτων και αρπακτικών. Κύρια παράσιτα του δάκου είναι τα :

- *Eupelmus urozonous* Dalm (Eupelmidae : Hymenoptera)
- *Pnigalio mediterraneus* Masi (Eulophidae : Hymenoptera)
- *Eurytoma martelli* Domenichini (Eurytomidae : Hymenoptera)
- *Cyrtoptyx latipes* (Pteromalidae : Hymenoptera)

Τα παραπάνω παράσιτα είναι εκτοπαράσιτα, της υπεροικογένειας *Calcidoidea*, θεωρούνται πολυφάγα και τρέφονται με τις προνύμφες του δάκου. Ειδικότερα, τα παράσιτα αυτά αναπτύσσονται εξωτερικά με τα στοματικά τους μόρια βυθισμένα στο σώμα των ξενιστών τους.

Επίσης, προσπάθειες βιολογικής καταπολέμησης με μαζικές εξαπολύσεις με το εισαγόμενο παρασιτοειδές *Opius concolor* (Braconidae : Hymenoptera) πραγματοποιήθηκαν, το οποίο είναι ενδοπαράσιτο που αναπτύσσεται εντός των σωμάτων των προνυμφών, τρεφόμενο από το εσωτερικό τους (Τζανακάκης και Κατσόγιαννος, 2003 ; Θεριός, 2005).

Ακόμη, τα βασικά αρπακτικά έντομα, τα οποία τρέφονται με τις νύμφες του δάκου της ελιάς στο έδαφος είναι τα :

- *Carabus banozi* (Carabidae)
- *Licinus aegyptiacus* (Carabidae)
- *Pterostichus creticus* (Carabidae)
- *Ocybus oleus* (Staphylinidae)
- *Ocybus fulvipennis* (Staphylinidae) (Askew, 1971).

1.6.3 Εναλλακτικές μέθοδοι καταπολέμησης

1.6.3.α Μαζική παγίδευση (Mass trapping)

Ο σκοπός της μεθόδου είναι η σύλληψη όσο το δυνατόν μεγαλύτερου αριθμού εντόμων, ώστε να μειωθεί ο πληθυσμός σε επίπεδα που να μην επιφέρουν οικονομική ζημία. Η μέθοδος αυτή πραγματοποιείται με διάφορους τύπους παγίδων -τροφικών, χρωματικών, φερομονικών ή με συνδυασμό αυτών- σε αραιό πληθυσμό του δάκου. Αυτές συνδυάζουν ένα τροφικό ελκυστικό

και των 2 φύλων (δισανθρακικό αμμώνιο), μια ελκυστική φερομόνη για το αρσενικό έντομο, μια φερομόνη συνάθροισης και των δύο φύλων, μια διεγερτική ουσία (σακχαρόζη), μια υγροσκοπική ουσία (γλυκερίνη) και ένα εντομοκτόνο διάρκειας (πυρεθρίνη). Σήμερα, δύο τύποι παγίδων χρησιμοποιούνται : α) μια με όλες τις παραπάνω ουσίες και β) μια χωρίς φερομόνες. Η διάρκεια πλήρους δράσης των παγίδων είναι 3 μήνες. Η θανάτωση των εντόμων που ελκύονται στις παγίδες επιτυγχάνεται ανάλογα τον τύπο της παγίδας, με πνιγμό στο ελκυστικό υγρό, προσκόλληση στην κολλητική επιφάνεια, ή επαφή με εντομοκτόνο μεγάλης υπολλειματικής διάρκειας. Σε περιπτώσεις πυκνού πληθυσμού, πραγματοποιούνται και 1 ή 2 δολωματικοί ψεκασμοί με εντομοκτόνο, τη ροτενόνη (Τζανακάκης και Κατσόγιαννος, 2003 ; Θεριός, 2005).



Εικόνα 6: Κολλώδης παγίδα (αριστερά) και παγίδα Eco-Trap (δεξιά)

1.6.3.β Παρεμπόδιση σύζευξης

Η μέθοδος αυτή έχει ως στόχο τη συσσώρευση της φερομόνης του εντόμου στο περιβάλλον του, ώστε να προκαλεί σύγχυση και αποπροσανατολισμό στα αρσενικά άτομα του δάκου. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αδυναμία συνάντησης και σύζευξης του αρσενικού με το θηλυκό και συνεπώς την εναπόθεση μη γονιμοποιημένων αυγών (Montiel Bueno, 1986).

1.6.3.γ Τεχνική στείρου εντόμου (SIT)

Η τεχνική αυτή αφορά την μαζική εκτροφή, την στείρωση με ακτινοβολία και τις επαναλαμβανόμενες εξαπολύσεις στείρων αρσενικών εντόμων, τα οποία, έπειτα, θα ζευγαρώσουν με θηλυκά άγριου τύπου. Έτσι, τα μη γονιμοποιημένα αυγά δεν θα εκκολαφθούν, μειώνοντας τον αριθμό του πληθυσμού του δάκου της επόμενης γενεάς. Θεωρητικά, εάν οι συνεχόμενες απελευθερώσεις στείρων αρσενικών συνεχίσουν σε πολλές επακόλουθες γενιές, ο πληθυσμός θα μειωθεί προοδευτικά και τελικά μια ολική εξάλειψη μπορεί να συμβεί (Sagri et al., 2014). Το πλεονέκτημα της SIT είναι η ικανότητα των στείρων αρσενικών να ζευγαρώνουν με άγριου τύπου θηλυκά και να αναπτύσσουν μια μακρά μη σεξουαλική δεκτικότητα στα θηλυκά πριν την επανασύζευξη (Lentz et al., 2009). Απαραίτητη προϋπόθεση για την εξασφάλιση της επιτυχίας της μεθόδου, αποτελεί η παραγωγή μεγάλου αριθμού στείρων αρσενικών που θα μπορούν να συζευχθούν με τα γόνιμα θηλυκά του άγριου φυσικού πληθυσμού και να προάγουν τη μείωση του πληθυσμού των εντόμων της επόμενης γενεάς (Taylor et al., 2011).

Η εν λόγω μέθοδος πραγματοποιήθηκε με επιτυχία στη μύγα της Μεσογείου, *Ceratitis capitata* (Yuval et al., 2002 ; 2007) σε αντίθεση με τον δάκο της ελιάς, όπου οι προσπάθειες που καταγράφηκαν δεν είχαν ικανοποιητικά αποτελέσματα. Με βάση τα αποτελέσματα των προσπαθειών, αποκαλύπτονται διάφορα θέματα-κλειδιά για τη βιολογία του δάκου της ελιάς, που θα έπρεπε να είχαν διευθετηθεί πριν την υλοποίηση μιας επιτυχούς SIT. Το πρωταρχικό θέμα αφορά τις διαφορετικές ώρες σύζευξης των εντόμων που έχουν εξαπολυθεί και των άγριων πληθυσμών. Ειδικότερα, τα εργαστηριακά έντομα συζεύγνυνται κάποιες ώρες πριν τη σκοτόφαση, ενώ τα άγριου τύπου έντομα συζεύγνυνται στο τέλος της φωτόφασης. Πιθανώς, η μαζική εργαστηριακή εκτροφή προκάλεσε σημαντικές μεταβολές στη συμπεριφορά, αναπαραγωγή και φυσιολογία των εντόμων εξαιτίας του τεχνητού εργαστηριακού περιβάλλοντος. Ένα δεύτερο θέμα σχετίζεται με τη ποιότητα των ακτινοβολημένων στείρων εντόμων που εκτρέφονται μαζικά σε εργαστηριακό περιβάλλον. Συγκεκριμένα, η ακτινοβολία επηρεάζει την αντοχή τους με αποτέλεσμα τη μειωμένη ανταγωνιστικότητα των εργαστηριακών αρσενικών εντόμων συγκριτικά με των άγριων τύπου. Ένας πιθανός παράγοντας των χαμηλών επιπέδων αντοχής των εργαστηριακών εντόμων είναι η χρήση των αντιβιοτικών στη διατροφή τους, η οποία καταστρέφει τα ενδοσυμβιωτικά βακτήρια, που είναι πολύ σημαντικά στην υγεία των εντόμων (Sagri et al., 2014).



Εικόνα 7: Σχηματική απεικόνιση της SIT

Τα τελευταία χρόνια, πολλές μοριακές και γενετικές μελέτες άλλαξαν το ερευνητικό πεδίο του δάκου της ελιάς. Οι αποτυχημένες προσπάθειες της SIT στο δάκο της ελιάς οδήγησαν σε μια ενεργή έρευνα σχετικά με την ανάλυση των βιολογικών συστημάτων του εντόμου αυτού, με συγκεκριμένο ενδιαφέρον στο αναπαραγωγικό και οσφρητικό σύστημα. Το πρώτο σύστημα εμπλέκεται στην επιτυχή σύζευξη και ωοπαραγωγή και το δεύτερο στη διατροφή και στον εντοπισμό συντρόφου προς σύζευξη των εντόμων. Ένας πιθανός χειρισμός αυτών των συστημάτων θα οδηγούσε σε πιθανές δυσλειτουργίες των εντόμων (Sagri et al., 2014). Ειδικότερα, μέσω του αναπαραγωγικού συστήματος του δάκου, με παρεμπόδιση της σύζευξης καταστέλλονται λειτουργίες γονιδίων που εμπλέκονται στη παραγωγή, δραστηριότητα και αποθήκευση σπέρματος και στην ωοπαραγωγή και ωοαπόθεση, με αποτέλεσμα να συμβάλλουν στη μείωση του πληθυσμού των εντόμων (Ram and Wolfner, 2007).

1.7 Αναπαραγωγικό σύστημα του θηλυκού εντόμου

Η κύρια λειτουργία του αναπαραγωγικού συστήματος ενός θηλυκού εντόμου είναι η ωοπαραγωγή και η αποθήκευση των αρσενικών σπερματοζωαρίων μέχρι τα αυγά να είναι έτοιμα για γονιμοποίηση. Το αναπαραγωγικό σύστημά του αποτελείται από δύο ωοθήκες με πολλούς ωοφόρους σωλήνες, στους οποίους λαμβάνει χώρα η ανάπτυξη των ωαρίων. Από κάθε ωοθήκη ξεκινά ένας πλευρικός αγωγός. Οι δύο πλευρικοί αγωγοί ενώνονται σε έναν κοινό αγωγό (κόλπο). Δύο τύποι εκτοδερμικών αδένων ανοίγουν εντός του κοινού αγωγού. Ο πρώτος αδένας είναι η σπερματοθήκη, η οποία είναι ένας σάκος στον οποίο αποθηκεύονται τα σπερματοζωάρια μετά τη σύζευξη για τη γονιμοποίηση των αυγών και διαθέτει ένα εκκόλπωμα

που σχηματίζει έναν σωληνοειδή αδένα σπερματοθήκης, και ενώνεται με τον κοινό ωαγωγό. Επίσης, στον κοινό ωαγωγό εκβάλλουν συνήθως δύο προσαρτημένοι αδένες, που είναι ο δεύτερος τύπος εκτοδερμικών αδενών, οι οποίοι πολλές φορές εκκρίνουν ένα υλικό που περιβάλλει το ωάριο ή μια κολλώδη ουσία που βοηθά στη προσκόλληση του ωαρίου στο υπόστρωμα ωοτοκίας. Τέλος, ο εξωτερικός γεννητικός οπλισμός των θηλυκών ονομάζεται ωοθέτης και με τη βοήθεια του τα θηλυκά ωοαποθέτουν στο υπόστρωμα ωοτοκίας (Προφήτου-Αθανασιάδου και Κωβαίος και Λάμπρου, 2004).



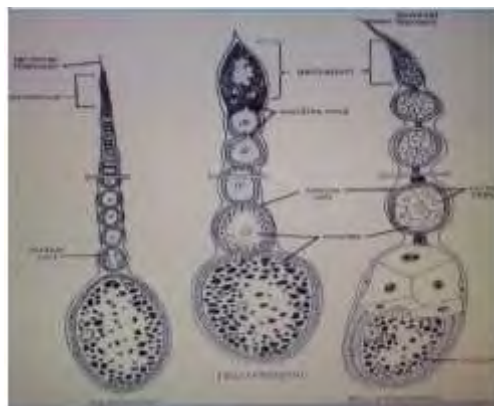
Εικόνα 8: Θηλυκό αναπαραγωγικό σύστημα του εντόμου *Bactrocera Oleae*. Από τη φωτογραφία απουσιάζουν οι ωοθήκες.

Τα ωοθηκάρια αποτελούν τις μονάδες παραγωγής των αυγών στην ωοθήκη, είναι σωληνοειδή και αποτελούνται τόσο από σωματικά όσο και από βλαστικά κύτταρα. Στη κορυφή της κάθε ωοθήκης βρίσκεται η βλαστική περιοχή (germarium), όπου υπάρχουν τα πρωταρχικά ωοκύτταρα. Εντός της περιοχής αυτής σχηματίζονται τα ωοθυλάκια που συνεχίζουν να ωριμάζουν κατά μήκος του ωοφόρου σωλήνα. Τρεις τύποι ωοφόρων σωλήνων (πανοϊστικός, πολυτροφικός, τελοτροφικός) υπάρχουν ανάλογα με την ύπαρξη ή μη και τη θέση των τροφοκυττάρων σε αυτούς :

- Πανοϊστικός : Οι ωοθήκες περιέχουν πανοϊστικά ωοθηκάρια με ωοθυλάκια που αποτελούνται από ωοκύτταρα περιβαλλόμενα από επιθήλιο.

Όταν η δομή των ωοθηκάρια είναι πιο πολύπλοκη, όπου ορισμένα βλαστικά κύτταρα προορίζονται για να σχηματίζουν τροφοκύτταρα που παράγουν τεράστιες ποσότητες πολυάριθμων προϊόντων για την ανάπτυξη των ωαρίων, έχουμε τους εξής τύπους :

- Τελοτροφικός : Κάθε ωοθηκάριο περιέχει ένα τροφοθυλάκιο με εκτενείς ομάδες τροφοκυττάρων, το οποίο, με τη σειρά του, είναι συνδεδεμένο με τα ωοθυλάκια μέσω θρεπτικών χορδών, τα οποία περιέχουν μόνο το ωοκύτταρο που περιβάλλεται από επιθήλιο.
- Πολυτροφικός : Κάθε ωοθυλάκιο περιέχει τη δική του ομάδα τροφοκυττάρων, τα οποία συνδέονται με το ωοκύτταρο που περιβάλλεται από επιθήλιο (Raikhel, 2005).



Εικόνα 9: Τύποι ωοφόρων σωλήνων

Εκτός από τις ωοθήκες, λιγότερο μελετημένα αλλά εξίσου σημαντικά για την αποδοτικότητα της αναπαραγωγής όργανα είναι οι βοηθητικοί αδένες (FAGs). Οι βοηθητικοί αδένες είναι πολύ εξειδικευμένα εκκριτικά όργανα, με μορφολογικά χαρακτηριστικά μεγάλης μεταβλητότητας και προσαρμοστικότητας στα έντομα (Laghezza Masci et al., 2015). Συγκεκριμένα, οι θηλυκοί αναπαραγωγικοί βοηθητικοί αδένες εκκρίνουν ποικίλες ουσίες εντός του κοινού αγωγού. Στην οικιακή μύγα, *Musca domestica*, έχει βρεθεί ότι οι αδένες παράγουν εκκρίσεις που προκαλούν τη συστολή του αγωγού κατά τη διάρκεια της ωοαπόθεσης. Επίσης συμβάλλουν στη διαδικασία της γονιμοποίησης, τροποποιώντας τη κορυφή της μικροπύλης που διαθέτουν τα αυγά, δια της οποίας εισέρχεται το σπερματοζώαριο. Τέλος, τα εκκριτικά υγρά των βοηθητικών αδένων συμμετέχουν στη διαδικασία της αντίδρασης του ακροσωματίου, κατά την οποία ένζυμα απελευθερώνονται στο πρόσθιο τμήμα της κεφαλής του σπερματοζωαρίου με αποτέλεσμα τη διεισδύση του σπέρματος στην εξωτερικό περίβλημα του αυγού και την έναρξη της γονιμοποίησης (Degrugillier and Leopold, 1973 ; 1976). Επιπλέον, στους αδένες της μεσογειακής μύγας, *Ceratitis capitata*, παρατηρείται έκκριση ουσιών των σερατοτοξίνων (ceratotoxins) (Marchini et al., 1991 ; 1993). Οι τοξίνες αυτές παράγονται υπό τον έλεγχο της ορμόνης νεότητας, juvenile hormone (JH) και η ύπαρξή τους στην επιφάνεια των αυγών υποδηλώνουν την εμπλοκή τους στον έλεγχο της βακτηριακής χλωρίδας στη θέση της ωοαπόθεσης, δημιουργώντας έτσι βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης των εμβρύων και των αρχικών προνυμφικών σταδίων (Manetti et al., 1997 ; Marchini et al., 1997). Ωστόσο, ένας πρόσθετος ρόλος των συνοδών υγρών των θηλυκών βοηθητικών αδένων είναι η προστασία του θηλυκού αναπαραγωγικού συστήματος από βακτηριακή εισβολή (M. Rosetto et al., 1999). Εκτός των λειτουργιών αυτών, οι θηλυκοί βοηθητικοί αδένες κατέχουν και άλλες βασικές λειτουργίες στην αναπαραγωγή των εντόμων που σχετίζονται με τη λίπανση των αυγών κατά τη διάρκεια του περάσμά τους δια μέσου του κόλπου, το ρόλο τους ως προστατευτικό ωοθηκικό κάλυμμα, τη προσκόλληση του εμβρύου στο υπόστρωμα της ωοτοκίας, τη μυϊκή σύσπαση της μήτρας κατά το περάσμα των αυγών, τις εκκρίσεις που προσδίδουν αντιμικροβιακή και αμυντική δραστηριότητα και τη φυσική προστασία του εμβρύου (Attardo et al., 2014).

Οι βοηθητικοί αδένες εντοπίζονται και στο αρσενικό έντομο παράγοντας εκκριτικά υγρά με σημαντικό ρόλο στην αναπαραγωγή. Συγκεκριμένα, μετά από μια επιτυχή ερωτοτροπία μεταξύ των 2 φύλων, ξεκινά η σύζευξη κατά τη διάρκειά της οποίας, μεταφέρονται σπέρμα και σπερματικά υγρά στα θηλυκά, τα οποία παράγονται από τους βοηθητικούς αδένες (MAGs) και τον εκσπερματικό αγωγό του αρσενικού αναπαραγωγικού συστήματος (Tram and Wolfner, 1997). Ειδικότερα, τα σπερματικά υγρά, που μεταφέρουν τα σπερματοζώαρια, είναι ένα σύμπλεγμα από πρωτεΐνες, ανόργανες διαλυτές ουσίες, υδατάνθρακες και λιπίδια. Οι μοριακές και φυσιολογικές λειτουργίες των ουσιών αυτών έχουν ερευνηθεί εκτενέστερα στη *Drosophila melanogaster*, εξαιτίας της εμπλοκής τους στη διαμόρφωση της μετασυζευκτικής απόκρισης των θηλυκών εντόμων. Οι πρωτεΐνες των συνοδών υγρών των βοηθητικών αδένων (Acps) αποτελούνται κυρίως από ρυθμιστές προτεόλυσης (προτεάσες και αναστολείς προτεάσεων), τροποποιητές λιπιδίων (λιπάσες), πρωτεΐνες δέσμησης σπέρματος (Cystein-Rich Secretory Proteins, CRISPs), αντιοξειδωτικά, πρωτεΐνες δέσμησης υδατανθράκων (λεκτίνες) και από πολλά μικρά πεπτιδία και προορμόνες (Scolari et al., 2014).

Τα τελευταία χρόνια, με τη βοήθεια της αλληλούχησης επόμενης γενιάς και των πρωτεομικών προσεγγίσεων, εκτενείς έρευνες στόχευσαν στην ταυτοποίηση και ανάλυση των προτεϊνών των σπερματικών υγρών σε κάποια είδη εντόμων, όπως στη *Drosophila melanogaster*, το *Anopheles gambiae*, το *Aedes aegypti* και το *Apis mellifera* (Scolari et al., 2014). Η ταυτοποίηση των

γονιδίων που εμπλέκονται στη σπερματογένεση και στις αλληλοεπιδράσεις μεταξύ του σπέρματος και των αυγών αποτελεί μια επιπρόσθετη σημαντική εξέλιξη στην κατανόηση της αναπαραγωγικής βιολογίας του δάκου της ελιάς, *Bactrocera oleae*.

1.7.1 Μετασυζευκτικές αλλαγές στη δομή και διαμόρφωση του αναπαραγωγικού συστήματος

Μετά την ολοκλήρωση της σύζευξης επάγονται σημαντικές αλλαγές στη συμπεριφορά του θηλυκού εντόμου. Για παράδειγμα, στον ωαγωγό της *Drosophila melanogaster* οι μετασυζευκτικές αλλαγές στο μέγεθος των ιστών περιλαμβάνουν διαφοροποίηση κυτταρικών συνδέσμων, αναδιαμόρφωση εξωκυττάριας μήτρας, αυξημένο σχηματισμό μυοϊνιδίου και αυξημένη νεύρωση. Οι αλλαγές στην νευρωνική δραστηριότητα του ωαγωγού εμφανίζονται με την μορφή απελευθέρωσης κυστιδίων, τα οποία διαμορφώνονται λόγω της σύζευξης και της λήψης των πρωτεϊνών των συνοδών υγρών και του σπέρματος από τα αρσενικά έντομα. Άμεση μετασυζευκτική αλλαγή στην νευρωνική απελευθέρωση κυστιδίων επέρχεται στον χαμηλότερο κοινό ωαγωγό, στο σπερματικό δοχείο και στη μήτρα. Τρεις ώρες μετά το πέρας της σύζευξης, όπου τα θηλυκά έντομα βρίσκονται σε υψηλά ποσοστά ωορρηξίας και η ωοπαραγωγή έχει φτάσει σε μέγιστα επίπεδα, η απελευθέρωση κυστιδίων αρχίζει να αναστέλλεται στον κοινό ωαγωγό (Avila et al., 2011). Μια άλλη σημαντική αλλαγή που παρατηρείται είναι η αλλαγή στη διαμόρφωση της μήτρας κατά τις πρώτες χρονικές στιγμές της σύζευξης βοηθώντας τη μετακίνηση του σπέρματος στις σπερματοθήκες (Adams and Wolfner, 2007). Αυτές οι αλλαγές έχουν παρατηρηθεί και στο αναπαραγωγικό σύστημα του θηλυκού *Anopheles gambiae* (Rogers DW et al., 2008).

1.7.2 Μετασυζευκτικές αλλαγές στη συμπεριφορά του θηλυκού εντόμου

1.7.2.a Αύξηση της ωοπαραγωγής, ωορρηξίας και ωοαπόθεσης

Η ωοαπόθεση είναι αποτέλεσμα μιας αλληλουχίας που περιλαμβάνει την ωοπαραγωγή, την ωορρηξία, τη γονιμοποίηση και τελικά την ωοαπόθεση στο υπόστρωμα της ελιάς. Δύο πρωτεΐνες που έχουν χαρακτηριστεί για τη συμμετοχή τους σε αυτά τα γεγονότα είναι το *sex peptide* (SP) και η *ovulin* στα συζευγμένα θηλυκά. Το *sex peptide* δρά στο στάδιο της ωογένεσης και πιθανώς και στην ωοτοκία, ενώ η *ovulin* διεγείρει την ωορρηξία (Ram and Wolfner, 2007).

Ειδικότερα, το *sex peptide* είναι ένα πεπτίδιο 36 αμινοξέων, το οποίο αυξάνει την παραγωγή της ορμόνης της νεότητας, juvenile hormone BIII (JHBIII). Η ορμόνη αυτή προάγει την ωρίμανση των ωοθηκών και την παραγωγή και πρόσληψη των πρωτεϊνών της λεκίθου (YPs) στα ωοκύτταρα σε όλα τα Δίπτερα. Συγκεκριμένα, το *sex peptide* αυξάνει τα επίπεδα της ορμόνης της νεότητας (JHBIII) στα συζευγμένα θηλυκά, οδηγώντας σε συσσώρευση της λεκίθου στα ωοκύτταρα, με αποτέλεσμα την έναρξη της ωογένεσης. Αν και η N-τελική περιοχή του *sex peptide* είναι υπεύθυνη για τις επιδράσεις της στην παραγωγή της ορμόνης της νεότητας (JHBIII), και η C-τελική επηρεάζει την ωοπαραγωγή και την ωοαπόθεση, πιθανότατα δεσμευόμενη σε συγκεκριμένους στόχους στο κεντρικό νευρικό σύστημα (CNS) (Ram and Wolfner, 2007).

Η πρωτεΐνη που παράγεται από την *ovulin* είναι ένα πολυπεπτίδιο προορμόνης 264 αμινοξέων. Η οβουλίνη διεγείρει την απελευθέρωση των ώριμων ωοκυττάρων από την ωοθήκη, που έχουν συσσωρευτεί στις ωοθήκες των παρθένων θηλυκών, διευκολύνοντας έτσι την ακόλουθη αύξηση

του ποσοστού της ωογένεσης που ενεργοποιείται από άλλες πρωτεΐνες των σπερματικών υγρών. Στα συζευγμένα θηλυκά, εντοπίζεται κυρίως στη βάση της ωοθήκης, δρώντας τοπικά, πιθανώς στο μυϊκό σύστημα. Μερική ποσότητα της πρωτεΐνης εισάγεται στο κυκλοφορικό σύστημα των συζευγμένων θηλυκών, υποδηλώνοντας την πιθανή δράση μέσω νευροενδοκρινικών στόχων (Ram and Wolfner, 2007).

1.7.2.β Επίδραση στη διατροφική συμπεριφορά

Η ωοπαραγωγή είναι μια ενδεδειγμένη διαδικασία. Εντός του θηλυκού εντόμου, οι διατροφικοί πόροι κατανέμονται μεταξύ της ωοπαραγωγής, της σωματικής συντήρησης και άλλων αναπαραγωγικών φαινομένων. Από τη στιγμή που η ωοπαραγωγή αυξάνεται δραματικά μετά τη σύζευξη, τα συζευγμένα θηλυκά πρέπει να αναζητούν περισσότερους πόρους παράλληλα με την ωοπαραγωγή, για το λόγο ότι μπορεί να αποβεί εις βάρος της σωματικής συντήρησής τους. Έτσι, με την πρόσληψη περισσότερης τροφής μετά τη σύζευξη, προμηθεύονται επιπλέον πόρους. (Ram and Wolfner, 2007).

1.7.2.γ Επίπεδα δραστηριότητας και μακροβιότητα

Η αύξηση της τροφοληψίας και της ωοαπόθεσης που παρατηρείται στα θηλυκά έντομα μετά τη σύζευξη συμπίπτει με την μείωση της ανάπαυσης. Αυτή η επίδραση μεσολαβεί λόγω της λήψης των εκκρινόμενων υγρών, η οποία μειώνει την ανάπαυση κατά 70%. Η μείωση της ανάπαυσης και η αύξηση των επιπέδων στρες και της κινητικής δραστηριότητας προκαλεί την μείωση του χρόνου ζωής. Ωστόσο, οι μηχανισμοί με τους οποίους οι πρωτεΐνες των συνοδών υγρών μειώνουν τη μακροζωία είναι άγνωστοι, υποδηλώνοντας ότι τα αποτελέσματα της μακροζωίας που συνδέονται με τη σύζευξη μπορεί να είναι μια έμμεση επίδραση (Avila et al., 2011).

1.7.2.δ Μείωση της σεξουαλικής δεκτικότητας για επανασύζευξη

Μια άλλη σημαντική αλλαγή στη μετασυζευκτική αναπαραγωγική συμπεριφορά των θηλυκών εντόμων αφορά την σεξουαλική δεκτικότητα τους για επανασύζευξη. Τα θηλυκά καθίστανται λιγότερο δεκτικά απορρίπτοντας τις προσπάθειες ερωτοτροπίας άλλων επακόλουθων αρσενικών εντόμων και ο λόγος αυτών αποδίδεται στην αποθήκευση του σπέρματος και ειδικότερα στις πρωτεΐνες του (Ram and Wolfner, 2007).

1.7.2.Αποθήκευση και αξιοποίηση σπέρματος

Το αναπαραγωγικό σύστημα ενός θηλυκού εντόμου περιέχει τις σπερματοθήκες και το σπερματικό δοχείο ως όργανα αποθήκευσης σπέρματος. Το θηλυκό έντομο της *D. melanogaster* αποθηκεύει ~ 20% από τη συνολική ποσότητα σπέρματος που λαμβάνει κατά τη διάρκεια της σύζευξης και το διατηρεί για περισσότερο από δύο εβδομάδες. Συγκεκριμένα, το σπερματικό δοχείο περιέχει το 65-80% του αποθηκευμένου σπέρματος ενώ η σπερματοθήκη εξυπηρετεί ως μακροπρόθεσμο όργανο αποθήκευσης (Lefevre and Jonsson 1962; Gilbert 1981). Η διαδικασία αποθήκευσης του σπέρματος αποτελείται από τα εξής στάδια: μεταφορά του σπέρματος διαμέσου του αναπαραγωγικού συστήματος αμέσως μετά τη σύλληψη, είσοδο του σπέρματος στα αποθηκευτικά όργανα, διατήρηση του ζωτικού σπέρματος και απελευθέρωση του από τα όργανα αυτά για τη γονιμοποίηση. Στη διαδικασία αυτή συμβάλλουν και τα δύο φύλα. Το θηλυκό αναπαραγωγικό σύστημα υφίσταται μια χαρακτηριστική σειρά αλλαγών στο σχήμα που φαίνεται να είναι υπεύθυνο για τη κίνηση της μάζας του σπέρματος και την είσοδό του στα αποθηκευτικά όργανα (Ram and Wolfner, 2007). Από την άλλη, τα συνοδά υγρά που προέρχονται από το αρσενικό αναπαραγωγικό σύστημα συμβάλλουν στην αποθήκευση

σπέρματος. Τα θηλυκά που δέχονται σπέρμα χωρίς ή με μειωμένα επίπεδα ποσότητας των συνοδών υγρών, αποθηκεύουν 90% λιγότερο ποσοστό σπέρματος με αποτέλεσμα τη μη αποθήκευση σπέρματος (Tram and Wolfner, 1999). Τουλάχιστον μια πρωτεΐνη συνοδών υγρών, η Acp36DE, έχει αναγνωρισθεί ότι είναι υπεύθυνη για την αποθήκευση σπέρματος και για τη διέγερση των μορφολογικών αλλαγών, η οποία εισέρχεται στα όργανα αποθήκευσης και δεσμεύεται στο σπέρμα (Avila et al., 2011).

1.7.2.στ Σχηματισμός συζευκτικού πώματος (mating plug) κατά τη σύζευξη

Σε αρκετές περιπτώσεις έχει παρατηρηθεί ο σχηματισμός ενός συζευκτικού πώματος (mating plug) εντός του θηλυκού αναπαραγωγικού συστήματος διαφόρων εντόμων, όπως στη *D. melanogaster* και στο *An. gambiae* (Lung and Wolfner MF, 2001; Rogers DW, 2009). Αυτό το φαινόμενο δεν παρατηρείται στο δάκο της ελιάς. Η μάζα που σχηματίζεται περιέχει πρωτεΐνες των σπερματικών υγρών και ο σχηματισμός του πώματος αυτού εξαρτάται από τη λήψη τους. Συγκεκριμένα, διαθέτει ένα ευρύ φάσμα λειτουργιών, όπως τον σχηματισμό ενός φυσικού εμποδίου για επανασύζευξη και την απενεργοποίηση της δεκτικότητας εξ ολοκλήρου στα θηλυκά έντομα. Στη *Drosophila melanogaster*, το πώμα αυτό σχηματίζεται λίγο μετά την έναρξη της σύζευξης. Η δομή του έχει δύο βασικές περιοχές : μια οπίσθια που αποτελείται από πρωτεΐνες της εκσπερματικής βαλβίδας και μια πρόσθια που αποτελείται από τις πρωτεΐνες των συνοδών υγρών (Lung and Wolfner MF, 2001). Τέλος, διευκολύνει την αποθήκευση σπέρματος αποτρέποντας την ανάστροφη ροή του σπέρματος μακριά από τα όργανα αποθήκευσης (Avila et al., 2011).

1.7.2.η Αύξηση της ανοσολογικής απόκρισης

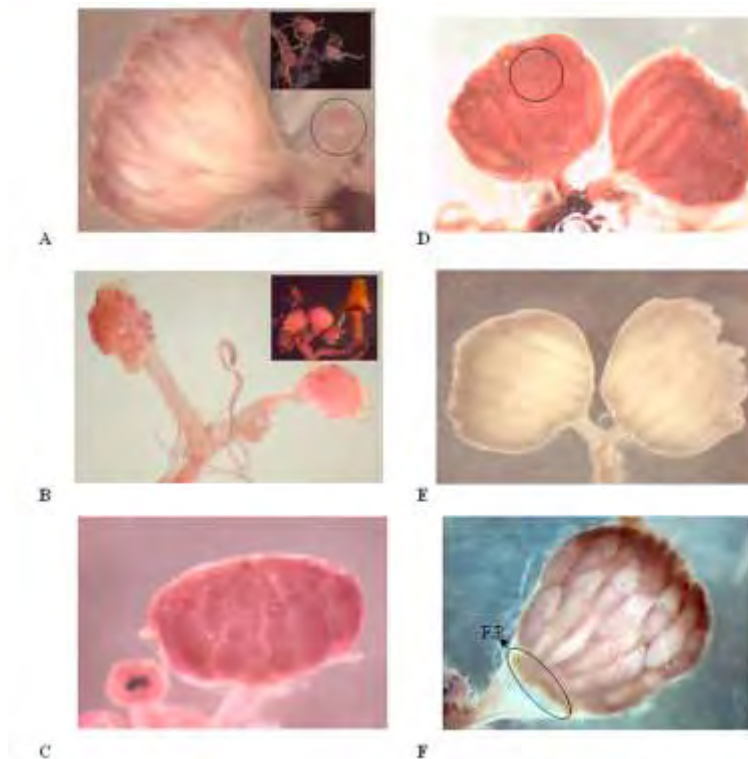
Μια ακόμη εξίσου σημαντική μετασυζευκτική αλλαγή στα θηλυκά, είναι η διαφοροποίηση της ανοσοποιητικής απόκρισης. Κάποιες πρωτεΐνες που παράγονται στους βοηθητικούς αδένες κατέχουν μια ενδογενή αντιμικροβιακή λειτουργία. Συγκεκριμένα, αυξάνεται η ικανότητα των θηλυκών να αντιστέκονται στις μικροβιακές μολύνσεις. Δεδομένης της δυνατότητας ότι μικροβιακά παθογόνα μπορούν να εισαχθούν στα θηλυκά κατά τη διάρκεια της σύζευξης, η είσοδος αντιμικροβιακών πεπτιδίων μέσω του εισερχόμενου σπέρματος μπορούν να προστατεύσουν τα θηλυκά από μικροβιακές μολύνσεις. Εναλλακτικά, η διέγερση της ανοσολογικής απόκρισης ή των αντιμικροβιακών πεπτιδίων θα μπορούσε να είναι μια απόκριση σε « nonself » πρωτεΐνες και κύτταρα που εισάγονται από τα αρσενικά έντομα. Έτσι, στην ανοσολογική απόκριση των συζευγμένων θηλυκών εντόμων, μια αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο φύλων λαμβάνει χώρα: με τη ταυτόχρονη είσοδο των αντιμικροβιακών πεπτιδίων / πρωτεϊνών από το αρσενικό αναπαραγωγικό σύστημα στο θηλυκό, προάγεται η έκφραση των αντιμικροβιακών γονιδίων στα συζευγμένα θηλυκά. Κύριος στόχος είναι η προστασία του σπέρματος, η προστασία των μελλοντικών αυγών και γενικότερα η προστασία του θηλυκού από μικροβιακές μολύνσεις του περιβάλλοντος (Ram and Wolfner, 2007; Avila et al., 2011).

1.8 Γονίδια που εμπλέκονται στο θηλυκό αναπαραγωγικό σύστημα του Δάκου

Από διαθέσιμες αλληλουχίες μεταγραφώματος του εργαστηρίου έχουν εντοπιστεί γονίδια που συμμετέχουν στο θηλυκό αναπαραγωγικό σύστημα. Στη συνέχεια, θα αναφερθούμε λεπτομερώς στη λειτουργική ανάλυση των γονιδίων της *vitellogenin-1*, της *lingerer* και της *troponin C*, τα οποία επίλεχθηκαν από αυτά τα διαθέσιμα δεδομένα του εργαστηρίου.

1.8.1 Vitellogenin-1

Η λεκιθογένεση αποτελεί ένα σημαντικό γεγονός στην ανάπτυξη των ωοθηκών, η οποία προκύπτει από τη σύνθεση των γονιδίων της vitellogenin (Vg genes) (Giorgi and Macchi, 1980). Τα γονίδια αυτά κωδικοποιούν τις μείζωνες πρόδρομες πρωτεΐνες της λεκίθου (yolk proteins, YPs) στα αυγά, οι οποίες ανήκουν σε μια μεγάλη υπεροικογένεια μορίων, γνωστές και ως μεγάλες πρωτεΐνες μεταφοράς λιπιδίων. Οι πρωτεΐνες αυτές (~200kDa) κωδικοποιούνται από ένα μόνο γονίδιο 6-7 kbp. Τα μόρια αυτά υφίστανται πρωτεολική διάσπαση, πριν την έκκρισή τους στην αιμολέμφο, σε μικρότερα πολυπεπτίδια που κυμαίνονται στα 50-180 kDa. Συγκεκριμένα, αυτά τα μικρά πολυπεπτίδια συναρμολογούνται μεταξύ τους, ύστερα από εκτενείς συν- και μετα- μεταφραστικές τροποποιήσεις και ακολούθως εκκρίνονται ως μεγάλες ολιγομερείς φωσφογλυκολιποπρωτεΐνες (400-600 kDa). Αυτή η μετα-μεταφραστική επεξεργασία τα καθιστά ικανά να φέρουν υδρογονάνθρακες, λιπίδια και άλλα θρεπτικά συστατικά στις ωοθήκες. Μόλις εκκριθούν στην αιμολέμφο, απορροφούνται μέσω ενδοκυττάρωσης από τα ωοκύτταρα μέσω του υποδοχέα VgReceptor (VgR) και αποθηκεύονται ως λεκιθίνη, Vitellin (Vn), το κύριο θρεπτικό απόθεμα στις ωοθήκες για τα αναπτυσσόμενα έμβρυα.



Εικόνα 10 : Στάδια ανάπτυξης ωοθηκών στο θηλυκό *Bactrocera dorsalis*. Στάδιο 1 (A, μαύρος κύκλος) και στάδιο 2 (B) : προλεκιθογένεση. Στάδιο 3 (C) : έναρξη της λεκιθογένεσης. Στάδιο 4 (D) : όψιμη λεκιθογένεση, με τη παρουσία της λεκίθου να καταλαμβάνει περισσότερο από το ήμισυ του θηλάκιου και τα τροφοκύτταρα (μαύρος κύκλος) να βρίσκονται στο πρόσθιο άκρο του ωοκυττάρου. Το πρώτο ώριμο ωοκυττάρο χαρακτηρίζεται από τη παρουσία του χορίου (χοριονογένεση) και υποδηλώνει την έναρξη του σταδίου 5 (E). Στάδιο 6 (F) : έναρξη της ωοαπόθεσης (Chou et al., 2012).

Η ρύθμιση του γονιδίου *vitellogenin-1* γίνεται υπό ορμονικό έλεγχο σε μεταγραφικό επίπεδο. Συγκεκριμένα, οι ορμόνες που εμπλέκονται είναι: α) η ορμόνη νεότητας, *juvenile hormone* (JH), η οποία υπάγεται στα τερπενοειδή (sesquiterpenoids), συντίθεται και εκκρίνεται από τον

ενδοκρινή αδένα, corpus allatum (CA). Είναι υπεύθυνη για την (αρνητική) ρυθμιστική δράση της στη μεταμόρφωση των εντόμων και παίζει σημαντικό ρόλο ως μια γοναδοτροπίνη στο ενήλικο στάδιο πολλών εντόμων β) η εκδυσόνη (προϊόν των ωοθηκών), μια στεροειδής ορμόνη που μετατράπηκε στην πιο ενεργή μορφή της, την 20-υδροξυεκδυσόνη (20E) και γ) κάποια νευροπεπτίδια, τα οποία διαδραματίζουν βασικό ρόλο ρυθμίζοντας τη παραγωγή των εκδυστεροειδών και της ορμόνης της νεότητας (Tufail et al., 2014).

Στα Δίπτερα, τα εκδυστεροειδή έχουν τον κυρίαρχο ρόλο ως ορμονικοί ρυθμιστές της vitellogenin και η ορμόνη νεότητας, *juvenile hormone* (JH) αποτελεί έναν σημαντικό ρυθμιστή στη προετοιμασία των αναπαραγωγικών ιστών για τις διεργασίες όπου μεσολαβούν τα εκδυστεροειδή, όπως η λεκιθογένεση (Raikhel, 2005). Η 20-υδροξυεκδυσόνη ρυθμίζει την έκφραση της vitellogenin τόσο στην ωοθήκη όσο και στον λιπώδη ιστό (Tufail et al., 2014).

1.8.1.α Μηχανισμοί λειτουργίας της JH και της 20E στη λεκιθογένεση

Γενικά, η διεγερτική δράση της ορμόνης της νεότητας (JH) τροποποιείται ανάλογα με τα επίπεδα της 20-υδροξυεκδυσόνης. Συνεπώς, μια ισορροπία μεταξύ των δύο ορμονών είναι καίριας σημασίας για την αποτελεσματική εξέλιξη και ανάπτυξη των ωοκυττάρων. Οι ορμόνες αυτές έχουν διαφορετικούς ρόλους κατά την έναρξη της λεκιθογένεσης στα σεξουαλικά μη ώριμα θηλυκά συγκριτικά με τη ρύθμιση της λεκιθογένεσης στα σεξουαλικά ώριμα θηλυκά. Ειδικότερα, στα σεξουαλικά ώριμα παρθένα θηλυκά, η διέγερση της παραγωγής των πρωτεϊνών της λεκίθου (YPs) στον λιπώδη ιστό από την ορμόνη νεότητας ή την 20-υδροξυεκδυσόνη, φαίνεται να είναι αμελητέα, ενώ, στα σεξουαλικά μη ώριμα θηλυκά, η σύνθεση των πρωτεϊνών της λεκίθου διεγείρεται είτε από την μία ορμόνη ή την άλλη. Επιπλέον, η δράση της 20-υδροξυεκδυσόνης στην επαναρρόφιση των ωοκυττάρων και στο σχηματισμό των αυγών στα σεξουαλικά ώριμα παρθένα θηλυκά εξαρτάται από τα κατάλληλα επίπεδα της ορμόνης της νεότητας. Τέλος, η 20-υδροξυεκδυσόνη πιθανόν να είναι απαραίτητη στην ανάπτυξη της προλεκιθογένεσης, της οποίας ο ρόλος είναι ανεξάρτητος της ορμόνης της νεότητας στα σεξουαλικά ώριμα παρθένα θηλυκά (Soler, Bownes and Kubli, 1999).

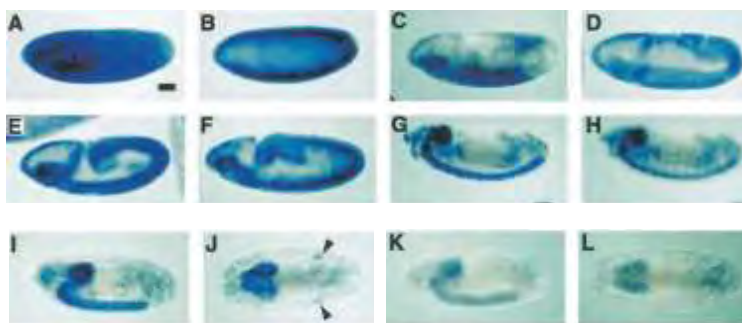
1.8.1.β Νευροπεπτίδια

Η ορμόνη νεότητας και τα εκδυστεροειδή θεωρούνται ότι είναι οι πρωταρχικές ορμόνες που επηρεάζουν την αναπαραγωγή των θηλυκών εντόμων δρώντας ξεχωριστά ή συντονισμένα για τη διέγερση της ωογένεσης και της λεκιθογένεσης. Συγκεκριμένα, νευροπεπτίδια είτε διεγείρουν είτε αναστέλλουν την σύνθεση της ορμόνης της νεότητας ή της 20-υδροξυεκδυσόνης. Στη πραγματικότητα, τα νευροπεπτίδια, ρυθμίζοντας την έκκριση των δύο ορμονών, μπορούν να θεωρηθούν «κύριες» ορμόνες, γιατί η έκκρισή τους κατευθύνεται από το κεντρικό νευρικό σύστημα (CNS) ως ολοκληρωμένη απόκριση σε εξωτερικά και εσωτερικά ερεθίσματα, όπως η διάρκεια της ημέρας και τα θρεπτικά αποθέματα (Taghert and Veenstra, 2003). Ακόμη, πεπτίδια που ενεργούν ως ορμόνες ή νευροδιαβιβαστές έχουν αναρίθμητες επιπτώσεις στη συμπεριφορά, στην ομοίωση ιόντων και μεταβολιτών και στη μετακίνηση, τα οποία είναι βασικά κλειδιά για μια επιτυχημένη αναπαραγωγή. Τέλος, οι πεπτιδικές ορμόνες εμπλέκονται στη μετάβαση από τη λεκιθογένεση στη χοριογένεση έτσι ώστε η ωρίμανση των ωαρίων και η ωοαπόθεση να μπορούν να λάβουν χώρα. Στη μετάβαση αυτή, ωοστατικοί παράγοντες που προέρχονται από τις ωοθήκες, μπορεί να παίζουν ρόλο μέσω ευδιάκριτων διαφορετικών δράσεων, συμπεριλαμβανομένης της αναχαίτησης της εκδυστεροειδογένεσης των ωοθηκών, η οποία μπορεί να τερματίσει τη λεκιθογένεση (Raikhel, 2005).

1.8.2 Lingerer

Το γονίδιο της *lingerer* (*Lig*) έχει βρεθεί ότι εμπλέκεται στην έναρξη και στο τερματισμό της σύζευξης στη *Drosophila melanogaster* (Hall et al., 1980 ; 1994). Η *lingerer* κωδικοποιεί ένα σύνολο νέων κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών και υπάρχει σε διάφορα αναπτυξιακά στάδια του εντόμου με έμφαση στο ενήλικο για μια φυσιολογική και ομαλή σύζευξη. Ο γονιδιακός τόπος της *lingerer* εντοπίζεται στο πολυταινικό τμήμα 44A στο 2^ο χρωμόσωμα και κωδικοποιεί τρία εναλλακτικά ενωμένα μετάγραφα που παράγουν δύο τύπους πρωτεϊνών (~150 kD), τις: *Lig-A* και *Lig-B*, διαφέροντας μόνο στη C-τελική περιοχή. Το γονίδιο αυτό εκφράζεται στο κεντρικό νευρικό σύστημα (CNS), στους γεννητικούς αδένες (ωθήκες, όρχις), στους εμβρυϊκούς δίσκους συμπεριλαμβανομένων των κεραίων-ματιών, ποδιών, φτερών και των δίσκων με τους αλτήρες (*halter discs*) (Kuniyoshi et al., 2002). Εκτενέστερα :

- ❖ Η *lingerer* παρουσιάζει υψηλά επίπεδα έκφρασης καθ'όλη τη διάρκεια της ανάπτυξης. Ειδικότερα, σε πρώιμα διασπασμένα έμβρυα, τα μετάγραφα της *lingerer* κατανέμονται ομοιόμορφα. Η ζυγωτική έκφρασή της ξεκινά στο στάδιο του κυτταρικού βλαστοδέρματος. Λίγο μετά τη γαστριδίωση, είναι παρούσα σε σχετικά χαμηλά επίπεδα, έπειτα αυξάνεται αισθητά στο στάδιο όπου οι νευροβλάστες διαχωρίζονται από το εξώδερμα. Στη συνέχεια, η έκφραση περιορίζεται κυρίως στους νευροβλάστες. Μετά τη σύμπτυξη, η έκφραση παρατηρείται κυρίως στο κεντρικό νευρικό σύστημα (CNS) συμπεριλαμβανομένων των εγκεφαλικών και κοιλιακών νευρικών χορδών, καθώς και στο περιφερειακό νευρικό σύστημα (PNS) (Kuniyoshi et al., 2002). Ειδικότερα, το κεντρικό νευρικό σύστημα είναι δομοστοιχειωτό, με σχηματισμένα συμπλέγματα διασυνδεδεμένων νευρώνων οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για συγκεκριμένες συμπεριφορές. Υπάρχουν δύο τύποι ενδονευρώνων: α) οι τοπικού κυκλώματος ενδονευρώνες στο προθωρακικό γάγγλιο, που συντονίζουν τη κίνηση των ποδιών και / ή των φτερών, και στο κοιλιακό γάγγλιο, που μεσολαβούν στη κάμψη της κοιλίας και / ή στη δραστηριότητα των αναπαραγωγικών οργάνων και β) οι ενδογαγγλιακοί νευρώνες, οι οποίοι παίζουν ρόλο στο συντονισμό των νευρικών τοπικών κυκλωμάτων, όπως στη διευκόλυνση της κίνησης των ποδιών και της κοιλίας για επιτυχημένη σύζευξη. Συνεπώς, είναι πιθανόν ότι αυτοί οι νευρώνες εμπλέκονται στα κυκλώματα, που είναι υπεύθυνα για τις αναπαραγωγικές λειτουργίες στα θηλυκά έντομα, αφού και αυτά συντονίζουν τις κινήσεις με τα πόδια κατά το ζευγάρισμα και την ωοαπόθεση (Latham et al., 2013).

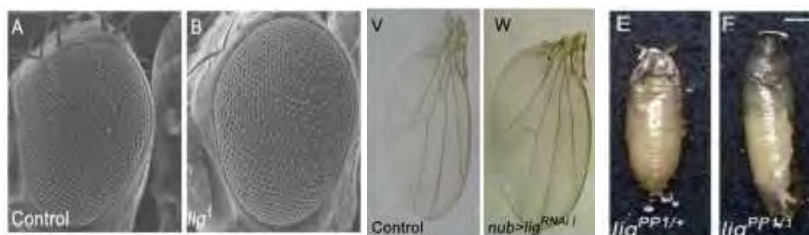


Εικόνα 11: Πρότυπο έκφρασης της *Lig* κατά την εμβρυογένεση (A-J) και έκφραση με μετάλλαξη της (K και L). (A) Στάδιο 4; (B) Στάδιο 5; (C) Στάδιο 6; (D) Στάδιο 8; (E) Στάδιο 9; (F) Στάδιο 11; (G) Στάδιο 13, στο CNS; (H) Στάδιο 13, στο PNS; (I και J) Στάδιο 16, στους γεννητικούς αδένες εκτός του CNS; (K και L) Στάδιο 16, μειωμένη έκφραση λόγω μετάλλαξης

Η *lingerer*, ως μια πρωτεΐνη που περιλαμβάνει ουμπικιτίνη στη περιοχή της (UBA-domain containing protein), συνδέεται με τέσσερις RNA-δεσμευτικές πρωτεΐνες: την *Orb*, μια κυτταροπλασματική πρωτεΐνη δέσμησης πολυαδενυλίωσης (CPEB), τη Fragile-X mental Retardation 1 (*FMR1*) πρωτεΐνη, την *Caprin* (*Capr*) και την *Rasputin* (*Rin*) σε ένα RNase-resistant messenger ribonucleoprotein (mRNP) σύμπλοκο, με αποτέλεσμα τη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των ιστών, όπως μάτια και φτερά. (Baumgardner, 2013).

Παράλληλα, η *lingerer*, έχει βρεθεί ότι παρουσιάζει υψηλά επίπεδα έκφρασης στο κεφάλι της *D. melanogaster* (Dong et al., 2015). Το γονίδιο συνεργάζεται με την *Orb2*, την 2^η πρωτεΐνη της οικογένειας των CPEBs, για τον σχηματισμό της μακροπρόθεσμης μνήμης, επηρεάζοντας τη σύζευξη λόγω της N-τελικής περιοχής της, η οποία είναι πλούσια σε γλουταμίνη (Keleman, 2007). Ειδικότερα, τα προσφάτως συζευγμένα θηλυκά είναι απρόθυμα για επανασύζευξη και παρουσιάζουν μια συμπεριφορά απόρριψης όταν πολιορκούνται από τα αρσενικά. Τα αρσενικά αυτά, στη συνέχεια, λόγω της απόρριψης για σύζευξη από τα συζευγμένα θηλυκά, μειώνουν τις προσπάθειες ερωτοτροπίας όχι μόνο προς τα συζευγμένα αλλά και προς τα παρθένα θηλυκά έντομα. Αυτή η καταστολή ερωτοτροπίας εξακολουθεί να υφίσταται περισσότερο από μία ημέρα, και έτσι αντιπροσωπεύει την μακροπρόθεσμη μνήμη. Μεταλλάξεις στην *Orb2* δείχνουν διαταραγμένη μακροπρόθεσμη μνήμη στην ερωτοτροπία, αλλά με δυνατότητα αποκατάστασης μειώνοντας τη δραστηριότητα της *lingerer* λόγω του συμπλόκου που σχηματίζεται μεταξύ τους. Μία μείωση των επιπέδων της *lingerer* αντισταθμίζει την έλλειψη της *Orb2* μετριάζοντας την αρνητική ανατροφοδότηση της *Orb2* και ως εκ τούτου μειώνει τα ελαττώματα της μακροπρόθεσμης μνήμης (Kimura et al., 2015).

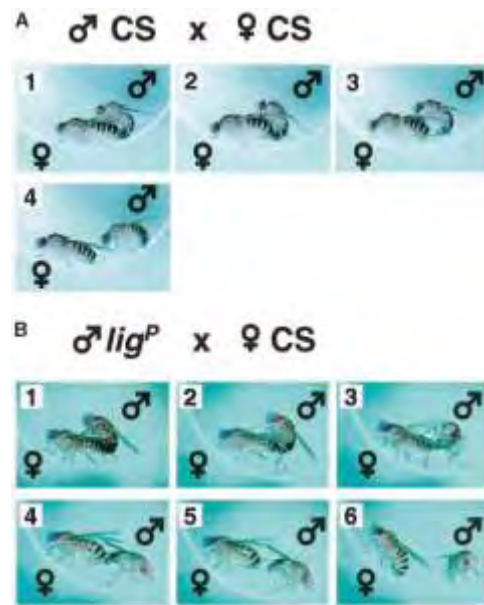
Σε πειράματα στη *D. melanogaster* παρατηρήθηκε ότι μεταλλάξεις, που επιφέρουν σημαντική μείωση της συγκέντρωσης της *lingerer*, προκαλούν ελαττωματική σεξουαλική συμπεριφορά στα ενήλικα έντομα και επαναλαμβανόμενες απόπειρες ζευγαρώματος χωρίς επιτυχία. Ενώ, μια πλήρης απώλεια της λειτουργίας της *lingerer* αποβαίνει σε θνησιμότητα κατά τη διάρκεια των πρώιμων νυμφικών σταδίων, σχηματίζοντας μακριές και λεπτές νύμφες (Kuniyoshi et al., 2002).



Εικόνα 12: Σύγκριση μορφολογίας οργάνων (μάτια και φτερά) και νυμφών μάρτυρα και μετάλλαξης της *Lig*

Ειδικότερα, η συζευκτική συμπεριφορά χαρακτηρίζεται από μια σταθερή ακολουθία ενεργειών: προσανατολισμό προς το θηλυκό έντομο, παρακολούθηση, ελαφρύ κτύπο της κοιλίας και παραγωγή τραγουδιών ερωτοτροπίας από εναλλασσόμενες δονήσεις των φτερών. Ως συνέπεια της εν λόγω ερωτοτροπίας, η σεξουαλική δεκτικότητα αυξάνεται στο θηλυκό έντομο, με αποτέλεσμα τη μείωση στη μετακίνησή της. Αυτή η μείωση επιτρέπει στο αρσενικό να ανεβαίνει στη πλάτη του θηλυκού και να προσπαθεί να συζευχθούν στρίβοντας τη κοιλία του για να προσκολληθεί στα γεννητικά όργανα του θηλυκού εντόμου. Λίγο πριν τον τερματισμό της σύζευξης, το θηλυκό συνήθως κλωτσάει τα πόδια του αρσενικού με τα οπίσθια πόδια και τότε το αρσενικό αποσύρει το σώμα του και κατεβαίνει από το θηλυκό (Kuniyoshi et al., 2002).

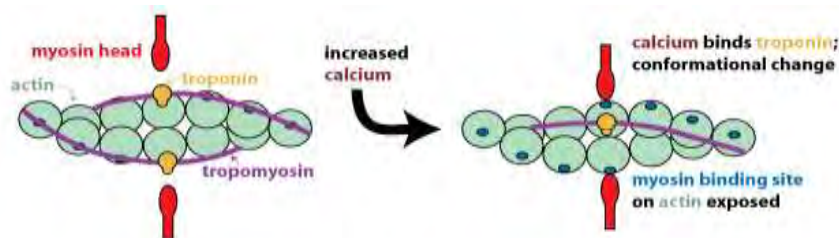
Σε περιπτώσεις μεταλλάξεων στο γονίδιο *lingerer* προκαλείται μη φυσιολογική σύζευξη. Συγκεκριμένα, το αρσενικό κινεί τη διαδικασία της σύζευξης φυσιολογικά, αλλά συχνά αποτυγχάνει να αποσύρει ομαλά τα γεννητικά του όργανα στο τέλος της σύζευξης. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα, το αρσενικό και το θηλυκό να σέρνει το ένα τ'άλλο, τραβώντας προς αντίθετες κατευθύνσεις. Αυτό μπορεί να διαρκέσει για αρκετά δευτέρα έως 10 λεπτά, μέχρι που τελικά καταφέρνουν να διαχωριστούν. Το γεγονός αυτό ονομάζεται «stuck» φαινότυπος. Επιπλέον, μια περαιτέρω μείωση της δραστηριότητας της *lingerer* καταλήγει σε ένα επιπρόσθετο ελάττωμα στην ικανότητα του αρσενικού να ξεκινά τη σύζευξη, αναφερόμενο ως «non-copulating» φαινότυπος. Παραδόξως, τα θηλυκά έντομα που φέρουν κάποια μετάλλαξη στο γονίδιο της *lingerer* δεν δείχνουν να έχουν κάποια ανωμαλία στη συμπεριφορά της ερωτοτροπίας, αλλά υπάρχει μείωση στη γονιμότητά τους λόγω πιθανής διαταραχής των γεννητικών αδένων (Kuniyoshi et al., 2002).



Εικόνα 13: Συμπεριφορά τερματισμού σύζευξης αρσενικού άγριου τύπου (A) και αρσενικού με μετάλλαξη της *Lig* (B) με θηλυκά άγριου τύπου

1.8.3 Troponin C

Η τροπονίνη C είναι ένα από τα τρία πολυπεπίδια στο μυϊκό λεπτό νημάτιο και αποτελεί ένα βασικό σημείο ελέγχου της μυϊκής σύσπασης (Agianian et al., 2004). Η τροπονίνη είναι ένα σύμπλοκο που αποτελείται από τρεις υπομονάδες : την Ca^{2+} - δεσμευτική πρωτεΐνη (TnC), την ανασταλτική πρωτεΐνη (TnI) και την δεσμευτική πρωτεΐνη τροπομυοσίνης (TnT). Κατά την ενεργοποίηση του συμπλόκου, ιόντα ασβεστίου δεσμεύονται στην τροπονίνη C, και επάγουν διαμορφωτικές αλλαγές στη δομή του με αποτέλεσμα τη μετακίνηση της τροπομυοσίνης εκθέτοντας τις θέσεις πρόσδεσης στην ακτίνη (actin) στα μυϊκά λεπτά νημάτια (Agianian et al., 2004). Η μυοσίνη με τη σειρά της ενεργοποιεί τα λεπτά νημάτια και προκαλεί την μυϊκή σύσπαση (Eldred et al., 2014). Απουσία των ιόντων ασβεστίου, η τροπομυοσίνη, μπλοκάρει τις θέσεις πρόσδεσης της μυοσίνης που υπάρχουν στα λεπτά νημάτια.



Εικόνα 14: Σχηματική απεικόνιση μυϊκού λεπτού νημάτιου αποτελούμενο από Tm, actin, myosin και το σύμπλοκο της Tpn

Η τροπονίνη C είναι μια 18kDa πρωτεΐνη και αποτελείται από τέσσερα μοτίβα σύνδεσης EF-hands καταναμημένα στις δύο σφαιρικές περιοχές, την N- και C-τελική περιοχή. Η C-τελική περιοχή περιέχει δύο θέσεις υψηλής συγγένειας, οι οποίες δεσμεύουν ιόντα ασβεστίου και μαγνησίου και είναι υπεύθυνες για την ενσωμάτωση της τροπονίνης C στο σύμπλοκο της

τροπονίνης. Η Ν-τελική περιοχή περιέχει μικρότερης συγγένειας θέσεις πρόσδεσης ρύθμισης ιόντων ασβεστίου (Eldred et al., 2014 ; Martin et al., 2011).

Τα Δίπτερα όπως τα *Drosophilidae* και το *Anopheles gambiae* έχουν δύο διαφορετικά σετ μυϊκών συστημάτων: το πρώτο που σχηματίζεται κατά την εμβρυογένεση για τις προνύμφες και το δεύτερο που σχηματίζεται κατά την νυμφοποίηση για τα ενήλικα έντομα. Στα ενήλικα έντομα υπάρχουν οι ασύγχρονοι πτητικοί μύες (IFMs), υπεύθυνοι για τον χτύπο των φτερών και στο 2^ο πόδι υπάρχει ο νωτιαίος καταστολέας του μυϊκού τροχαντήρα (TDT) και είναι υπεύθυνος για το άλμα κατά την απογείωση της πτήσης (Herranz et al., 2005 ; 2005 ; Lovato et al., 2001). Οι δύο σημαντικές ιδιότητες της «δια τάσης» ενεργοποίησης (Stretch Actovation, SA) και της ισομετρικής συστολής (Isometric Tension, IT) των πτητικών μυών ελέγχονται ανάλογα την συγκέντρωση του ασβεστίου (Agiarian et al., 2004 ; Eldred et al., 2014 ; Singh et al., 2014).

Υπάρχουν τέσσερις διαφορετικές ισομορφές της TnC, οι οποίες εκφράζονται στα εμβρυϊκά, προνυμφικά, νυμφικά και ενήλικα στάδια της *Drosophila melanogaster*. Ειδικότερα :

- η TnC1 εκφράζεται μόνο στις νύμφες και στα ενήλικα,
- η TnC2 εκφράζεται στα έμβρυα τελικού σταδίου και καθ'όλη τη διάρκεια των προνυμφικών και νυμφικών σταδίων,
- η TnC3 εκφράζεται στα έμβρυα, σε υπολογίσιμα επίπεδα στο στάδιο των προνυμφών και λιγότερο στα ενήλικα και
- τέλος, η TnC4 εκφράζεται σε προνύμφες και παρουσιάζει τα υψηλότερα επίπεδα στις νύμφες και στα ενήλικα (Qiu, 2003).

1.8.3.a Μηχανισμός λειτουργίας της *troponin C* στο *Pieris rapae*

Ενδιαφέρον προκαλεί ένα ομόλογο της τροπονίνης C, το οποίο έχει βρεθεί να εκφράζεται στο όργανο, bursa copulatrix (bc), του θηλυκού αναπαραγωγικού συστήματος, στο Λεπιδόπτερο *Pieris rapae*. Συγκεκριμένα, στα πλαίσια της πραγματοποίησης RNAseq, βρέθηκε η έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων στο όργανο αυτό, περιλαμβάνοντας μια φωσφατάση, μια λιπάση, ένα ομόλογο της τροπονίνης C και έναν διαμεμβρανικό υποδοχέα (Meslin et al., 2015).

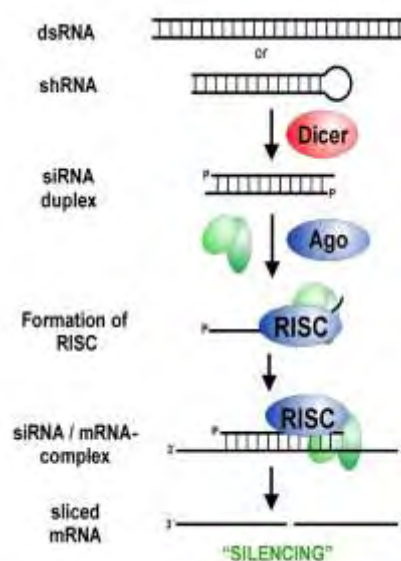
Το όργανο αυτό έχει την ικανότητα να πέπτει και να απορροφά τα θρεπτικά συστατικά, που προέρχονται από τα σπερματικά υγρά, παραγόμενα από τους βοηθητικούς αδένες (MAGs) των αρσενικών. Τα σπερματικά υγρά λαμβάνονται με τη μορφή σπερματοφόρας και απαιτούνται για την ωοπαραγωγή και τη σωματική συντήρηση αυξάνοντας την αναπαραγωγική απόδοση και τη διάρκεια ζωής των θηλυκών εντόμων. Η σπερματοφόρα ποικίλει σε σύνθεση ανάλογα με τη διατροφή των αρσενικών αλλά συνήθως περιέχει πρωτεΐνες, υδατάνθρακες, λιπίδια, ιόντα και μεταλλικά στοιχεία. Αμέσως μετά τη σύζευξη, το σπέρμα μετακινείται προς τα όργανα αποθήκευσης μέσα στο θηλυκό αναπαραγωγικό σύστημα (Meslin et al., 2015). Έπειτα, η bursa copulatrix (bc) επεξεργάζεται τη σπερματοφόρα μέσω της μεσολάβησης υποδοχών διάτασης, οι οποίοι ανιχνεύουν την εμφύσηση της bursa copulatrix (bc) που προκαλείται από τη μεταφορά της σπερματοφόρας. Αυτοί οι υποδοχείς θέτουν σε ενέργεια νευρικές αποκρίσεις που οδηγούν σε μείωση της σεξουαλικής δεκτικότητας των θηλυκών και επακόλουθη άρνηση ερωτοτροπίας με άλλα αρσενικά μέχρις ότου η σπερματοφόρα να ξεφουσκώσει επαρκώς (Sagawara T. 1979 ; 1980).

1.9 RNAi

Η παρεμβολή του RNAi ή RNA interference (RNAi) είναι ένα από τα πιο ευρέως ισχυρά εργαλεία στη κυτταρική βιολογία και στο γενετικό έλεγχο (Grishok, 2005 ; Flockhart, 2006). Συγκεκριμένα, είναι ένας εξελικτικά συντηρημένος μηχανισμός γενετικής ρύθμισης που επιτρέπει τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης σε πολλούς ευκαρυωτικούς οργανισμούς, συμπεριλαμβανομένων των εντόμων. Οι αρχικές μελέτες του RNAi στα μοντέλα οργανισμοί *C.elegans* και *D.melanogaster* διεξήχθησαν με έγχυση dsRNA εντός των γεννητικών αδένων ή της σωματικής κοιλότητας και με εξέταση του φαινότυπου στην επόμενη γενιά (Grishok, 2005). Η παρεμβολή του RNAi είναι ένας ρυθμιστικός μηχανισμός που ελέγχει το κωδικοποιημένο επίπεδο μεταγραφής (mRNA) είτε με τη καταστολή της μεταγραφής (μεταγραφική γονιδιακή σίγηση, transcriptional gene silencing ή TGS) ή ενεργοποιώντας μια διαδικασία ειδικής αλληλουχίας RNA αποδόμησης (μετά-μεταγραφική γονιδιακή σίγηση, post-transcriptional gene silencing ή PTGS) (Kola et al., 2015). Ο χειρισμός της μετά-μεταγραφικής γονιδιακής σίγησης (PTGS) έχει αποδειχθεί στα γενετικά συστήματα των μοντέλων οργανισμών *C.elegans* και *D.melanogaster* και παρέχουν ένα ισχυρό αντίστροφο γενετικό εργαλείο για τη διασαφήνιση και ανάλυση της λειτουργίας των γονιδίων (Gu, 2013).

1.9.1 Μηχανισμός RNAi

Η εισαγωγή του εξωγενούς δίκλωνου RNA (double-stranded RNA ή dsRNA) στα κύτταρα των διαφόρων ευκαρυωτικών οργανισμών έχει αποδειχθεί ότι επάγει ταχεία και διαρκή αποδόμηση των mRNAs που περιέχουν αλληλουχίες συμπληρωματικές προς το dsRNA. Το μονοπάτι του RNAi εντός των κυττάρων αρχίζει με ένα ένζυμο RNase III, το Dicer, το οποίο διασπά τα dsRNAs σε μικρά (21-25 νουκλεοτίδια) επεμβατικά RNAs (siRNAs). Τα siRNAs, στη συνέχεια, ενσωματώνονται σε ένα πρωτεϊνικό σύμπλοκο πολλαπλών υπομονάδων, γνωστό ως RNA επαγόμενο σύμπλοκο σίγησης (RNA induced silencing complex, RISC). Μόλις συγκροτηθεί, το σύμπλοκο οδηγείται σε ένα ειδικό mRNA που είναι συμπληρωματικό προς το siRNA προκαλώντας την αποδόμηση του. Η πρωτεΐνη Argonaute, η οποία είναι το βασικό καταλυτικό συστατικό του συμπλόκου, χρησιμοποιεί το siRNA για την αναγνώριση και διάσπαση του στόχου (Gu, 2013 ; Kola et al., 2015). Τα επιμήκη dsRNAs είναι συνήθως 200-500 νουκλεοτίδια σε μήκος και τα συνθετικά siRNAs είναι μικρά RNAs δίπολα, αποτελούμενα από 19 συμπληρωματικά ζεύγη βάσεων και από 2-νουκλεοτίδια 3' άκρα (Perimmon, 2010).



Εικόνα 15: Μηχανισμός RNAi

Υπάρχουν τρεις τύποι απόκρισης RNAi: η κυτταρικά αυτόνομη, η περιβαλλοντική και η συστημική απόκριση. Οι δύο τελευταίες αναφέρονται ως μη κυτταρικά αυτόνομες. Στο κυτταρικά αυτόνομο RNAi, η επίδραση της σίγησης επέρχεται εντός των κυττάρων, όπου το dsRNA εκφράζεται ή εισάγεται εξωγενώς, ενώ στο περιβαλλοντικό RNAi, το έναυσμα της σίγησης ξεκινά από τα κύτταρα του άμεσου περιβάλλοντος, όπως το έντερο ή την αιμόλεμφο.

Εάν το σήμα της σίγησης διαδίδεται σε γειτονικά κύτταρα από το επίκεντρο των κυττάρων, τότε το συστημικό *RNAi* τίθεται σε λειτουργία. Αυτό λαμβάνει χώρα μόνο σε πολυκύτταρους οργανισμούς. Στους πολυκύτταρους οργανισμούς, το συστημικό *RNAi* ακολουθείται από το περιβαλλοντικό *RNAi* και το μη κυτταρικά αυτόνομο *RNAi* ακολουθείται πάντα από το κυτταρικά αυτόνομο *RNAi*. Ειδικά, το σήμα της σίγησης μπορεί να λαμβάνεται και να μετακυλιέται ακόμη και μεταξύ των κυττάρων, όταν τα γονίδια-στόχοι είναι απόντα (Gu, 2013 ; Huvenne, 2010).

Κατά τα τελευταία χρόνια, η τεχνική αυτή είναι μια από τις πιο συναρπαστικές ανακαλύψεις της μοριακής βιολογίας, για την υψηλή εξειδίκευση και την ακρίβεια και θεωρείται ως μια πιθανή στρατηγική καταπολέμησης επιβλαβών εντόμων. Η επιτυχία της τεχνικής στηρίζεται κυρίως στην ταυτοποίηση των κατάλληλων υποψηφίων γονιδίων, για την αξιοποίησή τους ως στόχοι. Αρκετά ένζυμα και πρωτεΐνες έχουν ταυτοποιηθεί και χαρακτηρισθεί στα έντομα, τα οποία μπορεί να είναι χρήσιμοι στόχοι του *RNAi*. Η σίγηση της έκφρασης των γονιδίων μέσω *RNAi* έχει αποδειχθεί σε διάφορες τάξεις εντόμων, όπως Δίπτερα, Λεπιδόπτερα, Κολεόπτερα, Ορθόπτερα, Υμενόπτερα και Ημίπτερα (Kola et al., 2015).

Προκειμένου να επιτευχθεί η μέθοδος του *RNAi*, αρκετές μέθοδοι παράδοσης dsRNA/siRNA έχουν αναπτυχθεί για τη στόχευση πρωτεϊνών/ενζύμων-κλειδιά των εντόμων. Οι επιδράσεις του *RNAi* παρουσιάζονται μόλις το dsRNA εισέλθει στα κύτταρα. Οι μέθοδοι παράδοσης του dsRNA που χρησιμοποιούνται μέχρι σήμερα είναι η δια στόματος διατροφή, οι μικροενέσεις, οι *RNAi* διαγονιδιακές καλλιέργειες, ο εμποτισμός (μούλιασμα) και οι μέθοδοι επιμόλυνσης. Η δια στόματος παράδοση του dsRNA είναι μια από τις πιο απλές και αποτελεσματικές προσεγγίσεις *RNAi*, όμως με πολλά μειονεκτήματα όπως θέματα σταθερότητας. Η μικροένεση είναι άλλη μια κοινή χρησιμοποιούμενη μέθοδος παράδοσης dsRNA. Αν και παρουσιάζει ακριβή τρόπο παράδοσης, απαιτεί τεχνογνωσία και ειδικό εξοπλισμό, και γι'αυτό δεν είναι και πολύ δημοφιλής σε συστήματα πολλών εντόμων. Τα τελευταία χρόνια, η διαβροχή του οργανισμού σε διάλυμα με dsRNA φαίνεται να είναι μια αρκετά δημοφιλής μέθοδο παράδοσης *RNAi* κυρίως λόγω της εύκολης πραγματοποίησής του (Kola et al., 2015).

2. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η μελέτη γονιδίων που εμπλέκονται στο θηλυκό αναπαραγωγικό σύστημα του δάκου της ελιάς, *Bactrocera oleae*, τα οποία κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες *vitellogenin-1*, *lingerer* και *troponin C*. Τα τρία γονίδια-στόχοι εντοπίστηκαν σε διαθέσιμες μεταγραφόμενες αλληλουχίες που προέκυψαν με σύγκριση RNAseq στους θηλυκούς βοηθητικούς αδένες (FAGs) / σπερματοθήκη πριν και δώδεκα ώρες μετά τη σύζευξη. Στο πλαίσιο αυτό, καθορίστηκαν τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων με ποσοτική Real-time PCR σε ιστούς που προήλθαν από το θηλυκό αναπαραγωγικό σύστημα θηλυκών δάκων. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε παροδική σίγησή του του γονιδίου *troponin C* μέσω *RNAi*, με σκοπό την διερεύνηση του ρόλου του γονιδίου τόσο στα αναπτυξιακά στάδια του εντόμου όσο και στην αναπαραγωγική διαδικασία.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Πληθυσμός εντόμων

Αρχικά, ο εργαστηριακός πληθυσμός του δάκου της ελιάς διαβίωνε στο εντομοτροφείο του Εργαστηρίου Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιοματικής του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας σε κλουβιά σε συνθήκες περιβαλλοντικής θερμοκρασίας ~ 25°C και σχετικής υγρασίας 60-63%.

Οι αναπαραγωγικοί ιστοί που συλλέχθηκαν για την μετέπειτα λειτουργική ανάλυση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων ήταν οι εξής :

- Θηλυκοί βοηθητικοί αδένες (Female Accessory Glands)
- Σπερματοθήκες (spermathecae)
- Μήτρα (uterus)

3.2 Απομόνωση RNA (RNA extraction) αναπαραγωγικών ιστών

Η απομόνωση του ολικού RNA των αναπαραγωγικών ιστών πραγματοποιήθηκε με βάση το πρωτόκολλο TRIsure™ της BIOLINE (Chomczynski and Sacchi, 1987 ; Chomczynski, 1993). Όλες οι διεργασίες πραγματοποιούνται στον πάγο και σε αποστειρωμένες συνθήκες. Η διαδικασία είχε ως εξής:

1. Ξεπαγώνουμε τα δείγματα, αφού έχουν διατηρηθεί στους -80°C και τα τοποθετούμε στον πάγο μέχρι να λιώσουν.
2. Αφού ξεπαγώσουν, πραγματοποιείται quick spin στα δείγματα για συλλογή του υλικού στον πυθμένα
3. Ομογενοποίηση των δειγμάτων με αποστειρωμένα έμβολα (pestles)
4. Επιπλέον λιотρίβιση με έμβολα (pestles) με σταδιακή προσθήκη Trisure έως ότου ομογενοποιηθούν οι ιστοί για τελικό όγκο 300μl Tri
5. Ανάδευση σε Vortex και Quickspin μηχανήματα
6. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου (RT) για πέντε (5) λεπτά
7. Ελαφριά ανάδευση (Vortex) και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου (RT) για άλλα πέντε (5) λεπτά
8. Φυγοκέντρηση στους 4°C, στα 12.000 rpm για δέκα (10) λεπτά για απομάκρυνση όλων των κυτταρικών υπολειμμάτων
9. Μεταφορά υπερκείμενου σε νέο αποστειρωμένο eppendorf tube των 1,5ml
10. Προσθήκη 30μl (0,1 Tri vol) BCP και συνεχής ανάδευση με το χέρι για δεκαπέντε (15) δευτερόλεπτα
11. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου (RT) για δύο-τρία (2-3) λεπτά
12. Φυγοκέντρηση στους 4°C, στα 12.000g για δεκαπέντε (15) λεπτά
13. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για άλλα πέντε (5) λεπτά για καλύτερο διαχωρισμό
14. Προσεκτική μεταφορά του υπερκείμενου σε καθαρό eppendorf tube 1,5ml και διατήρηση στον πάγο. (40-60% Tri vol)
15. Προσθήκη 0,5x όγκο (150μl) παγωμένης ισοπροπανόλης (500ul/ml Tri) και 0,5μl γλυκογόνου

16. Ανάδευση (Vortex) και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου (RT) για σαράντα πέντε (45) λεπτά
17. Φυγοκέντρηση στους 4°C, στα 12.000g για σαράντα πέντε (45) λεπτά για κατακρήμνιση του RNA
18. Αφαίρεση υπερκείμενου σε τρυβλίο Petri και πλύση του ιζήματος με 200μl παγωμένης αιθανόλης 75% και ελαφρύ χτύπημα
19. Φυγοκέντρηση στους 4°C, στα 12000g για πέντε (5) λεπτά
20. Αφαίρεση υπερκείμενου και πλύση του ιζήματος με 200μl παγωμένης αιθανόλης 75%
21. Φυγοκέντρηση στους 4°C, στα 12.000g για πέντε (5) λεπτά.
22. Επανάληψη του 20^{ου} βήματος
23. Απομάκρυνση της αιθανόλης και στέγνωμα του ιζήματος (pellet) σε ξηρό αέρα για δέκα (10) λεπτά
24. Αναδιάλυση του ιζήματος σε 15,2μl καθαρό νερό, το οποίο έχει θερμανθεί στους 50°C για πιο εύκολη αναδιάλυση.

3.3 Επεξεργασία DNase (DNase treatment)

Μετά την απομόνωση του ολικού RNA πραγματοποιείται επεξεργασία των δειγμάτων με DNase για την απομάκρυνση τυχόν υπολειμμάτων του DNA σύμφωνα με το πρωτόκολλο της ambion, Life Technologies Corporation, 2012.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	ΠΟΣΟΤΗΤΑ
RNA	15μl
H ₂ O	2,5μl
10x Turbo DNase Buffer	2μl
DNase Inactivation Buffer	2,5μl
Τελικός όγκος	20μl

Μεθοδολογία

1. Μεταφορά του RNA σε PCR 0,5ml tube, το οποίο έχει προκύψει από την απομόνωση RNA
2. Προσθήκη H₂O, ρυθμιστικό διάλυμα (10x DNase Buffer) και το ένζυμο DNase σύμφωνα με τη σειρά και τις συγκεντρώσεις του πίνακα
3. Επώαση στους 37°C για τριάντα (30) λεπτά στο θερμοκυκλοποιητή
4. Προσθήκη διαλύματος απενεργοποίησης DNase (DNase inactivation buffer)
5. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου (RT) για πέντε (5) λεπτά
6. Φυγοκέντρηση στα 11.000g για δύο (2) λεπτά
7. Μεταφορά υπερκείμενου σε καθαρό PCR tube.

3.4 Σύνθεση cDNA με αντίστροφη μεταγραφή

Το μονόκλωνο RNA μετατρέπεται σε δίκλωνο, το οποίο συντίθεται μέσω της αντίδρασης της αντίστροφης μεταγραφής. Το ένζυμο που καταλύει την αντίδραση είναι η αντίστροφη μεταγραφή. Η διαδικασία αυτή γίνεται για την καλύτερη προστασία του γενετικού υλικού και για την ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης, αφού το μονόκλωνο RNA είναι αρκετά ασταθές.

Πραγματοποιήθηκε το πρωτόκολλο για το ένζυμο RT-MMUVL, της Biolabs (Verma, 1975 ; Gerard and Grandgenett, 1975 ; Roth, Tanese and Goff, 1985 ; Sambrook, Fritsch and Maniatis, 1989) :

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	ΠΟΣΟΤΗΤΑ
RNA	20μl
Random Primers	2μl
dH ₂ O	61μl
10x Buffer	10μl
dNTPs	5μl
RNase inhibitor	1μl
RT-MMUVL	1μl
Τελικός όγκος	100μl

Μεθοδολογία

1. Προσθήκη του RNA και των τυχαίων εκκινήτων σε PCR tube.
2. Επώαση σε θερμοκρασία 70°C για δέκα (10) λεπτά στον θερμοκυκλοποιητή
3. Επώαση των δειγμάτων στον πάγο για πέντε (5) λεπτά
4. Προσθήκη των υπόλοιπων αντιδραστηρίων, με βάση την ακόλουθη σειρά του πίνακα
5. Επώαση στους 42°C για μια (1) ώρα και στους 70°C για δέκα (10) λεπτά στον θερμοκυκλοποιητή
6. Διατήρηση στους 4°C επ'άοριστον

3.5 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα (gel) αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση είναι το φαινόμενο της κίνησης χημικών ενώσεων (κυρίως πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων) ενσωματωμένων μέσα σε ένα πήκτωμα (gel) με την επίδραση ηλεκτρικού ρεύματος. Η κίνηση των ουσιών μέσα στο ηλεκτρικό πεδίο εξαρτάται από το ηλεκτρικό φορτίο και το μοριακό βάρος των ουσιών. Τα δείγματα τοποθετούνται σε ηλεκτρικό πεδίο που προκαλεί τη κίνηση των φορτισμένων ουσιών του προς την άνοδο ή την κάθοδο ανάλογα με το ηλεκτρικό φορτίο τους. Η κατεύθυνση της κίνησης εξαρτάται από το ηλεκτρικό φορτίο της ένωσης και η ταχύτητα τους από το βάρος ή το μέγεθος κάθε ουσίας. Πριν τη τοποθέτηση του δείγματος στη συσκευή ηλεκτροφόρησης αραιώνεται σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα, το οποίο συνήθως προσδίδει σε όλες τις ενώσεις το ίδιο φορτίο έτσι ώστε η κίνηση των ουσιών μέσα στη συσκευή ηλεκτροφόρησης να εξαρτάται αποκλειστικά από το μοριακό της βάρος. Κατά τη διοχέτευση ηλεκτρικού ρεύματος μέσω ηλεκτροδίων, τα φορτισμένα σωματίδια κινούνται προς τα ηλεκτρόδια με διαφορετικές ταχύτητες ανάλογα με το φορτίο τους και αντιστρόφως ανάλογα με το μέγεθός τους. Επομένως, τα περισσότερο φορτισμένα και μικρότερα μόρια απομακρύνονται

περισσότερο από το αρχικό σημείο, ενώ τα μεγαλύτερα και λιγότερο φορτισμένα λιγότερο. Μετά τη λήξη εφαρμογής του ηλεκτρικού πεδίου οι ενώσεις, που προηγουμένως κινούνταν σε αυτό, σταματούν την κίνηση τους και συσσωρεύονται σε μεγάλες συγκεντρώσεις σε ευδιάκριτες ζώνες (μπάντες). Τέλος, η διεξαγωγή της ηλεκτροφόρησης παρακολουθείται με γυμνό μάτι, λόγω των συστατικών του διαλύματος φόρτωσης (μπλε βρωμοφαινόλης και κυανό ξυλόλης), ή με έκθεση του πηκτώματος σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV) (Verma, 1975 ; Gerard and Grandgenett, 1975 ; Roth, Tanese and Goff, 1985 ; Sambrook, Fritsch and Maniatis, 1989) .

Μεθοδολογία

Για την παρασκευή 160μl πηκτώματος αγαρόζης 1%, 0,5x TBE πραγματοποιήθηκε η εξής διαδικασία:

1. Ζύγιση 1,6gr αγαρόζης και προσθήκη σε κωνική φιάλη
2. Αραίωση του TBE 5x σε TBE 0,5x
3. Προσθήκη 160ml TBE 0,5x στην κωνική φιάλη με την αγαρόζη
4. Θέρμανση του διαλύματος για λίγα λεπτά, με ανάδευση ανά τακτά χρονικά διαστήματα, έως ότου διαλυθεί πλήρως η αγαρόζη
5. Ψύξη της κωνικής φιάλης σε τρεχούμενο νερό με συνεχή ανάδευση
6. Προσθήκη 7μl βωμιούχου αιθιδίου και ανακίνηση
7. Μεταφορά του πηκτώματος σε καλούπια για τη διαμόρφωση και στερεοποίησή του και δημιουργία μικρών οπών-πηγαδιών στο πήκτωμα
8. Αναμονή μέχρι τη στερεοποίηση του πηκτώματος
9. Τοποθέτηση του πηκτώματος στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και προσθήκη 0,5x TBE εως ότου καλυφθεί η επιφάνεια του πηκτώματος
10. Φόρτωση των δειγμάτων σε κάθε οπή ύστερα από την προσθήκη 1μl χρωστικής σε κάθε δείγμα και φόρτωση 2μl μάρτυρα Ladder (Blue DNA Ladder) μοριακού βάρους 1kb/1000bp
11. Παραμονή του πηκτώματος στη συσκευή ηλεκτροφόρησης για περίπου είκοσι πέντε (25) λεπτά στα 100 volts

3.6 Απομόνωση μορίων DNA από πήκτωμα αγαρόζης (gel extraction)

Η απομόνωση από πήκτωμα αγαρόζης είναι μια τεχνική, η οποία χρησιμοποιείται για την απομόνωση επιθυμητού τμήματος DNA από ένα πήκτωμα αγαρόζης μετά από την ηλεκτροφόρησή του. Συγκεκριμένα, αφού τα δείγματα ηλεκτροφορηθούν στο πήκτωμα αγαρόζης, η απομόνωση περιλαμβάνει τέσσερα βασικά στάδια:

- Τον εντοπισμό των επιθυμητών τμημάτων
- Την απομόνωση των αντίστοιχων ζωνών του πηκτώματος
- Την απομόνωση του DNA από αυτές τις ζώνες
- Την απομάκρυνση των συνοδευτικών αλάτων και προσμίξεων

Μεθοδολογία

Αρχικά, το πήκτωμα αγαρόζης εκτίθεται σε UV ακτινοβολία για τον εντοπισμό των επιθυμητών ζωνών DNA. Έπειτα, αφαιρούνται με μια λεπίδα. Η έκθεση σε ακτινοβολία πρέπει να γίνεται με

προσοχή και στο χρόνο που απαιτείται για αποτροπή πιθανής μεταλλαξιγένεσης του DNA. Η απομόνωση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του kit GF-1, Nucleic Acid Extraction Kit της Vivantis.

1. Τοποθέτηση της ζηγισμένης ζώνης σε eppendorf 1,5 ml
2. Υπολογισμός καθαρού βάρους της ζώνης
3. Προσθήκη ίσου όγκου Buffer GB ανάλογα με τη μάζα της ζώνης
4. Τοποθέτηση του eppendorf στους 50°C στο υδατόλουτρο μέχρι να διαλυθεί το πήκτωμα
5. Μεταφορά του περιεχομένου του eppendorf σε ειδικά column tubes
6. Φυγοκέντρηση στα 10.000g για ένα (1) λεπτό
7. Απομάκρυνση του εκλούσματος
8. Προσθήκη 650μl Wash Buffer και φυγοκέντρηση στα 10.000g για ένα (1) λεπτό
9. Απομάκρυνση του εκλούσματος
10. Φυγοκέντρηση στα 10.000g για ένα (1) λεπτό ώστε να απομακρυνθεί πλήρως η αιθανόλη
11. Μεταφορά του επάνω μέρους του column tube σε καινούριο eppendorf
12. Προσθήκη 30μl ζεστού H₂O (65-70°C) στο κέντρο της στήλης
13. Αναμονή για δύο (2) λεπτά
14. Φυγοκέντρηση στα 10.000g για ένα (1) λεπτό
15. Επανάληψη των βημάτων 12,13 και 14

3.7 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction-PCR)

Η Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR) είναι μια πολύ γνωστή μέθοδος βιοχημείας και μοριακής βιολογίας για την απομόνωση και τον ενζυμικό πολλαπλασιασμό μιας στοχευμένης νουκλεοτιδικής αλληλουχίας. Με την PCR, μια συγκεκριμένη περιοχή του γονιδιώματος μπορεί να πολλαπλασιαστεί μέχρι και δισεκατομμύρια φορές, δεδομένου ότι είναι γνωστή η νουκλεοτιδική αλληλουχία. Η αλληλουχία του γονιδίου ή «θραύσματος DNA» είναι απαραίτητη για τον σχεδιασμό των συνθετικών DNA ολιγονουκλεοτιδίων, το καθένα συμπληρωματικό με μία από τις αλυσίδες του δίκλωνου DNA. Τα ολιγονουκλεοτίδια που θα χρησιμοποιηθούν ως εκκινητές πρέπει να δεσμεύονται σε θέσεις αντίθετες από την αλληλουχία που πρόκειται να ενισχυθεί, με άλλα λόγια καθορίζουν τα άκρα του θραύσματος DNA που πρόκειται να ενισχυθεί (Bartlett and Stirling, 2003).

Ένας πλήρης κύκλος μιας PCR αντίδρασης περιλαμβάνει τρία στάδια:

- Αποδιάταξη του DNA (denaturation)
- Προσαρμογή των εκκινητών στο DNA εκμαγείο (annealing)
- Επιμήκυνση των εκκινητών (extension).

Ειδικότερα, ένας πλήρης κύκλος περιλαμβάνει επώαση των δειγμάτων σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες και γίνεται αυτόματα από ειδικά μηχανήματα τους θερμοκυκλωτές (thermal cyclers). Σε μια τυπική αντίδραση, το δίκλωνο DNA αποδιάσσεται με θέρμανση στους 95°C. Στη συνέχεια οι εκκινητές προσαρμόζονται με υβριδισμό στις συμπληρωματικές αλληλουχίες του DNA εκμαγείου με ψύξη του δείγματος στους 50-60°C. Ακολουθεί επώαση στους 72°C για

την επιμήκυνση των εκκινητών από μία θερμοαντοχή πολυμεράση, παρουσία των τεσσάρων νουκλεοτιδίων (Sambrook and Russel, 2001).

Καθώς η διαδικασία επαναλαμβάνεται, οι νεοσύστατοι κλώνοι με τη σειρά τους χρησιμοποιούνται ως εκμαγεία για την *in vitro* σύνθεση του DNA. Μετά από μερικούς κύκλους το επικρατές προϊόν είναι ένα DNA θραύσμα που το μέγεθός του αντιστοιχεί στην απόσταση μεταξύ των δύο αρχικών εκκινητών. Πρακτικά, ~ 20-30 κύκλοι της αντίδρασης είναι αρκετοί για την αποτελεσματική ενίσχυση του DNA θραύσματος. Σε κάθε κύκλο που διαρκεί περίπου πέντε λεπτά, η ποσότητα του DNA διπλασιάζεται. Επομένως, με τους επαναλαμβανόμενους κύκλους, η αλληλουχία-στόχος πολλαπλασιάζεται με εκθετικό ρυθμό.

Η PCR είναι εξαιρετικά επιλεκτική και ευαίσθητη μέθοδος, έχει δυνατότητα ανίχνευσης και ενός μόνο DNA μορίου σε ένα μείγμα. Μικροποσότητες RNA μπορούν επίσης να αναλυθούν με τον ίδιο τρόπο, μετά τη μεταγραφή τους σε DNA από την ανάστροφη τρανσκριπτάση (RT-PCR, reverse transcription-PCR).

Στάδια PCR: 1. Στάδιο εκκίνησης (*initialization step*):

Απαιτείται μόνο για τις DNA πολυμεράσες που απαιτούν ενεργοποίηση με θερμότητα μέσω της hot-start PCR. Το βήμα συνιστάται εφαρμογή υψηλής θερμοκρασίας (94-96°C) για θέρμανση της αντίδρασης με σκοπό την ενεργοποίηση της DNA πολυμεράσης, η οποία πραγματοποιείται για 1-9 λεπτά.

2. Στάδιο αποδιάταξης (*denaturation step*):

Σε αυτό το στάδιο πραγματοποιείται ο πρώτος τακτικός κύκλος της αντίδρασης με θέρμανση στους 94-98°C για 20-30 δευτερόλεπτα. Προκαλεί την τήξη του DNA με τη διάσπαση των δεσμών υδρογόνου μεταξύ των συμπληρωματικών βάσεων παράγοντας μόρια μονόκλωνου DNA.

3. Στάδιο υβριδοποίησης (*annealing step*):

Μείωση της θερμοκρασίας της αντίδρασης στους 50-65°C για 20-40 δευτερόλεπτα, ώστε να επιτραπεί η υβριδοποίηση των εκκινητών στο μονόκλωνο DNA. Η θερμοκρασία αυτή ονομάζεται T_{an} και πρέπει να είναι αρκετά χαμηλή. Εάν η θερμοκρασία είναι πολύ πιο χαμηλή από ότι πρέπει, ο εκκινητής θα δεσμεύει ατελώς και εάν είναι πάρα πολύ υψηλή, ο εκκινητής μπορεί να μην δεσμεύει. Τυπικά, η T_{an} είναι περίπου 3-5 βαθμούς χαμηλότερη από την T_m των εκκινητών που χρησιμοποιούνται.

4. Στάδιο επιμήκυνσης (*extension/elongation step*):

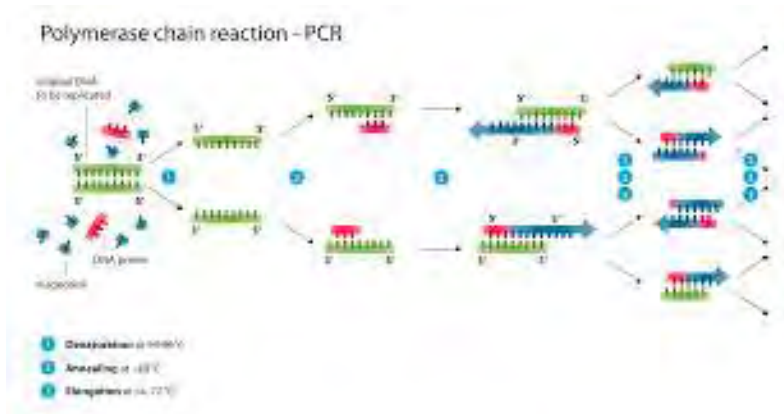
Η θερμοκρασία σε αυτό το στάδιο εξαρτάται από τη DNA πολυμεράση που συνθέτει έναν νέο συμπληρωματικό κλώνο DNA για κάθε μονόκλωνο κομμάτι προσθέτοντας το κατάλληλο νουκλεοτίδιο κάθε φορά. Συνήθως κυμαίνεται στους 72-80°C. Ο χρόνος επιμήκυνσης εξαρτάται τόσο από την DNA πολυμεράση, όσο και από το μέγεθος του θραύσματος του DNA που ενισχύει. Έτσι, τελειώνει ο πρώτος κύκλος της αντίδρασης.

5. Στάδιο τελικής επιμήκυνσης (*final elongation*):

Αυτό το μεμονωμένο στάδιο περιστασιακά εκτελείται σε θερμοκρασία 70-74°C για 5-15 λεπτά μετά τον τελευταίο κύκλο της PCR για να έχει επιμηκυνθεί πλήρως κάθε απομείνον μονόκλωνο DNA.

6. Στάδιο διατήρησης (*final hold*):

Ψύξη στους 4°C επ' αόριστον για βραχυπρόθεσμη αποθήκευση μικρού χρονικού διαστήματος (Lawyer et al., 1993).



Εικόνα 16: Στάδια PCR

Μεθοδολογία

Σε PCR tubes προστίθενται τα αντιδραστήρια με βάση την ακόλουθη σειρά του πίνακα:

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	ΠΟΣΟΤΗΤΑ
Template DNA	2μl
ddH ₂ O	14μl
Buffer	2μl
dNTPs	0,4μl
Primer F	0,7μl
Primer R	0,7μl
Taq DNA Polymerase	0,2μl
Τελικός όγκος	20μl

Στη συνέχεια εισάγονται στο θερμοκυκλοποιητή και ξεκινάνε τα στάδια της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης με βάση το Γενικό Πρωτόκολλο θερμοκυκλοποιητή :

STEP	TIME	TEMPERATURE
Initial denaturation	2-5 min	94-95°C
25-30 Cycles:		
Denaturation	10-25 sec	94-95°C
Annealing	10-25 sec	55-65°C
Extension	60 sec	72°C per 1kb
Final extension	5 min	72°C

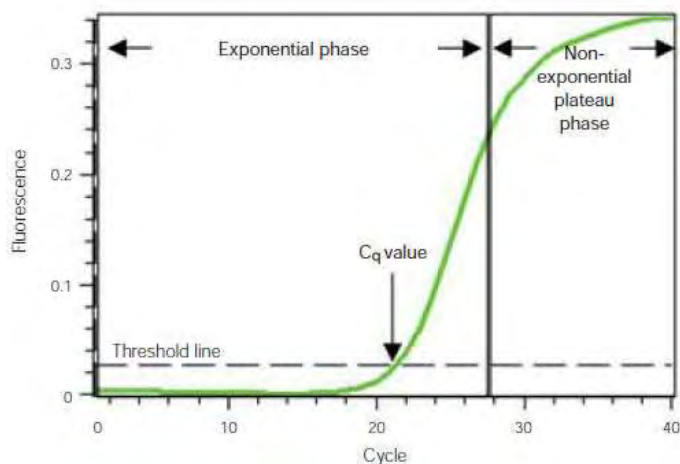
3.8 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real Time-PCR)

Η ποσοτική Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (qPCR), γνωστή και ως Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real-Time PCR, RT-PCR) είναι μία τεχνική μοριακής βιολογίας που βασίζεται στις αρχές της Αλυσιδωτής Αντίδρασης της Πολυμεράσης (PCR). Παρακολουθεί την ενίσχυση ενός στοχευμένου μορίου DNA κατά τη διάρκεια της PCR σε πραγματικό χρόνο και όχι στο τέλος όπως στην κοινή PCR. Επίσης, χρησιμοποιείται για την ποσοτικοποίηση μίας ή περισσότερων ειδικών αλληλουχιών σε ένα δείγμα DNA. Η Real-Time PCR χρησιμεύει στον ακριβή προσδιορισμό της ποσότητας DNA ή RNA που βρίσκεται αρχικά σε ένα δείγμα, καθώς και στη σύγκριση των ποσοτικών τιμών της ίδιας αλληλουχίας μεταξύ διαφορετικών δειγμάτων. Η ποσότητα αυτή μπορεί να είναι είτε ένας απόλυτος αριθμός των αντιγράφων ή μία σχετική ποσότητα μετά από κανονικοποίηση (Watson et al., 2004).

Ο πιο κοινός τρόπος παρακολούθησης της σύνθεσης του DNA με RT-PCR είναι η χρήση μη ειδικών φθορίζουσων χρωστικών, όπως το SYBR Green, που παρεμβάλλονται σε οποιοδήποτε δίκλωνο DNA που συντίθεται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης, παράγοντας φθορισμό. Ωστόσο, παρουσιάζει ένα βασικό μειονέκτημα. Από τη στιγμή που η χρωστική αυτή ενσωματώνεται μη ειδικά σε οποιοδήποτε δίκλωνο DNA που παράγεται, δεσμεύεται και σε τμήματα DNA εκτός του μορίου-στόχου, συμπεριλαμβανομένων και των διμερών των εκκινητών ή των μη ειδικών προϊόντων που πιθανόν να ενισχύονται, με αποτέλεσμα την αύξηση του συνολικού φθορισμού. Επιπλέον, η ιδιότητα αυτή της χρωστικής ενδεχομένως να παρεμβαίνει ή να αποτρέπει την ακριβή παρακολούθηση της επιδιωκόμενης αλληλουχίας-στόχου. Το SYBR Green διεγείρεται με τη χρήση μπλε ακτινοβολίας και εκπέμπει πράσινο φως. (Ponchel et al., 2003).

Η Real-Time PCR επιτρέπει την παρακολούθηση του επιθυμητού προϊόντος σε οποιοδήποτε σημείο της διαδικασίας ενίσχυσης με μέτρηση φθορισμού (στη πραγματικότητα, η μέτρηση γίνεται από το επίπεδο από ένα συγκεκριμένο όριο). Μια κοινώς χρησιμοποιούμενη μέθοδος ποσοτικοποίησης DNA βασίζεται στη σχεδίαση φθορισμού έναντι αριθμού κύκλων σε λογαριθμική κλίμακα. Κατά τους πρώτους κύκλους της, ο φθορισμός είναι ασθενής. Στους επόμενους κύκλους, το DNA πολλαπλασιάζεται και η αντίδραση περνά στην εκθετική φάση, αφού μετά από κάθε κύκλο το προϊόν διπλασιάζεται. Όταν το προϊόν είναι αρκετά ενισχυμένο ώστε να δώσει σήμα φθορισμού, τότε ο κύκλος στον οποίο συμβαίνει αυτό ονομάζεται κύκλος ποσοτικοποίησης (quantification cycle, C_q) και το όριο ανίχνευσης φθορισμού ονομάζεται threshold ή threshold cycle (C_T). Κατά τους τελευταίους κύκλους, σημειώνεται μία γραμμική φάση όπου περιορίζεται η συγκέντρωση των αντιδρώντων και το ένζυμο έχει ελαττωμένη δραστηριότητα, έως ότου φτάσει σε ένα plateau, όπου η αντίδραση φτάνει σε κορεσμό και

σταματάει. Το προϊόν που παράγεται στην αντίδραση Real-Time PCR, πρέπει να είναι από 80-120bp, ώστε για την εξασφάλιση της ειδικότητας και της υψηλής απόδοσης της ενίσχυσης. Συγκεκριμένα, η ειδικότητα της ενίσχυσης μπορεί να διαπιστωθεί μέσω της καμπύλης αποδιάταξης (melting curve analysis) μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης. Στη καμπύλη αυτή προσδιορίζεται η θερμοκρασία τήξης (T_m) των προϊόντων της αντίδρασης, η οποία είναι ειδική για τα ενισχυμένα τμήματα και συνεπώς μπορεί να διαπιστωθεί ο πιθανός σχηματισμός διμερών των εκκινητών ή μη ειδικών προϊόντων, που λόγω μικρότερου μεγέθους παρουσιάζουν χαμηλότερη θερμοκρασία τήξης (Sambrook and Russel 2001).



Εικόνα 17: Σχηματική απεικόνιση καμπύλης φθορισμού Real-time PCR

Τέλος, για την ποσοτικοποίηση της γονιδιακής έκφρασης είναι απαραίτητη η χρήση γονιδίου αναφοράς (reference gene ή housekeeping gene, hkg). Τα συγκεκριμένα γονίδια χρησιμοποιούνται ευρέως ως εσωτερικοί μάρτυρες (controls) για την κανονικοποίηση της έκφρασης του γονιδίου στόχου σε μεθόδους όπως η RT-PCR, γιατί θεωρητικά τα γονίδια αυτά απαιτούνται για τη διατήρηση της βασικής κυτταρικής λειτουργίας ως συστατικά γονίδια.

Στη παρούσα διαδικασία η αντιδράσεις διεξάχθησαν με χρήση του θερμοκυκλοποιητή Bio-Rad Real-Time thermal cycler CFX96 και η ανάλυση όλων των δεδεμένων έγινε με τη χρήση του προγράμματος CFX Manager™. Τέλος η σχετική ποσοτικοποίηση πραγματοποιείται με τη μέθοδο σύγκρισης των C_T ($\Delta\Delta C_T$ Method Using a Reference Gene).

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ
H ₂ O
Primer F
Primer R
iTaq Universal SYBR Green Supermix
cDNA

Μεθοδολογία

Αρχικά πραγματοποιείται υπολογισμός των ποσοτήτων των αντιδραστηρίων που θα χρειαστούν σε τελικό όγκο αντίδρασης 15μl. Σε PCR tube strips τοποθετούνται τα αντιδραστήρια και στη συνέχεια, εισάγονται στον θερμοκυκλοποιητή και ξεκινά η αντίδραση της RT-PCR. Επίσης, πραγματοποιείται και μία αντίδραση με τους εκκινητές του γονιδίου αναφοράς, house keeping gene. Ως γονίδια αναφοράς χρησιμοποιήσαμε την *a-tubulin* και το *GAPDH*.

Η qRT-PCR ακολουθεί 4 συγκεκριμένα στάδια:

- ◆ Ενεργοποίηση της πολυμεράσης και DNA αποδιάταξη στους 50°C για 4 λεπτά (ένας κύκλος)
- ◆ Αποδιάταξη στους 95°C για 30 δευτερόλεπτα
- ◆ Υβριδοποίηση/Επιμήκυνση σε συγκεκριμένη T_{an} για 30 δευτερόλεπτα
- ◆ Καμπύλη αποδιάταξης με σταδιακή μείωση της θερμοκρασίας με εύρος 95-55°C (ένας κύκλος)

3.9 Δημιουργία δίκλωνου RNA (dsRNA)

Για τη δημιουργία δίκλωνων τμημάτων RNA χρησιμοποιήθηκε ως εκμαγείο DNA προϊόν PCR που φέρει την αλληλουχία του υποκινητή T7 και αποτελεί θέση πρόσδεσης της RNA Πολυμεράσης για την αντίστροφη μεταγραφή. Η μετατροπή των προϊόντων PCR σε δίκλωνο RNA πραγματοποιήθηκε με βάση το πρωτόκολλο του Invitrogen™ Ambion™ MEGAscript™ T7 Transcription Kit (Milligan et al., 1987 ; Schenborn and Mierindorf, 1985).

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	ΠΟΣΟΤΗΤΑ
10x Reaction Buffer	4μl
4 ριβονουκλεοτίδια (ATP, CTP, GTP, UTP)	4μl από το καθένα
RNA Polymerase Enzyme Mix	4μl
Nuclease-free Water	9μl
Προϊόν PCR	7μl
Τελικός όγκος	40μl

Μεθοδολογία

Ξεπαγώνουμε τα αντιδραστήρια, τοποθετημένα στον πάγο, εκτός από το 10x Reaction Buffer που πρέπει να είναι στον πάγκο σε θερμοκρασία δωματίου (RT). Η διαδικασία έχει ως εξής :

1. Προσθήκη των αντιδραστηρίων σε tube σε θερμοκρασία δωματίου (RT) για να αποτραπεί η καθίζηση του DNA με βάση τη σειρά και τις ποσότητες του πίνακα και καλή ανάμειξη με πιπέτα

2. Επώαση στους 37° C για δεκαέξι (16) ώρες
3. Προσθήκη 2μl TURBO DNase
4. Επώαση στους 37° C για δέκα πέντε (15) λεπτά
5. Προσθήκη 115μl Nuclease-free Water και 15μl διαλύματος οξικού αμμωνίου (Ammonium Acetate Stop Solution) και καλή ανάμειξη
6. Προσθήκη ίσης ποσότητας φαινόλης / χλωροφορμίου (150μl/150μl)
7. Φυγοκέντρηση για τρία (3) λεπτά σε μέγιστη ταχύτητα
8. Μεταφορά του υπερκείμενου σε καθαρό tube
9. Προσθήκη 1x όγκου χλωροφόρμιου
10. Φυγοκέντρηση για τρία (3) λεπτά σε μέγιστη ταχύτητα
11. Μεταφορά του υπερκείμενου σε καθαρό tube
12. Προσθήκη 1x όγκου παγωμένης ισοπροπανόλης για καθίζηση του RNA και καλή ανάμειξη
13. Επώαση στον πάγο για τριάντα (30) λεπτά
14. Φυγοκέντρηση στους 4° C για σαράντα πέντε (45) λεπτά
15. Προσεκτική αφαίρεση του υπερκείμενου
16. Πλύση με ίσο όγκο καθαρής αιθανόλης 70%
17. Φυγοκέντρηση στους 4° C για πέντε (5) λεπτά
18. Αφαίρεση της αιθανόλης και στέγνωμα του ιζήματος για περίπου δέκα πέντε (15) λεπτά
19. Αναδιάλυση του RNA σε 25μl H₂O, το οποίο έχει ζεσταθεί στους 50°C
20. Ηλεκτροφόρηση μικρής ποσότητας του RNA για ποσοτικοποίηση

3.10 Παροδική σίγηση γονιδίων (RNA silencing)

Όπως προαναφέρθηκε στην εισαγωγή, η γονιδιακή σίγηση είναι μια διαδικασία κατά την οποία εισάγεται το δίκλωνο RNA (dsRNA) στον οργανισμό και οδηγεί στην αποσιώπηση του γονιδίου- στόχου. Στη παρούσα πειραματική διαδικασία, η σίγηση των γονιδίου έγινε με μικροέγχυση του dsRNA σε ενήλικα θηλυκά έντομα του δάκου της ελιάς με τη χρήση του μηχανήματος Nanoject II.

Μεθοδολογία

1. Καθαρίζουμε τη περιοχή όπου θα γίνουν οι μικροεγχύσεις με αιθανόλη 70%
2. Συνδέουμε όλα τα εξαρτήματα του μηχανήματος
3. Καθαρίζουμε όλα τα εξαρτήματα με αιθανόλη
4. Τοποθέτηση των εξαρτημάτων στο έμβολο
5. Επιλέγουμε γυάλινη βελόνα quartz και την κόβουμε κατάλληλα με τη βοήθεια του μικροσκοπίου έτσι ώστε να χρησιμοποιηθεί για την έγχυση
6. Γεμίζουμε τη βελόνα με mineral oil αργά και σταθερά για να αποφύγουμε τις φυσαλίδες
7. Τοποθετούμε κατάλληλα τη βελόνα στο μηχανήμα
8. Γεμίζουμε τη βελόνα με το dsRNA
9. Αναισθητοποιούμε τα θηλυκά έντομα στους 4°C για 3-4 λεπτά
10. Εγχύουμε το dsRNA σε διπλή δόση (69nl) απευθείας στην αιμολέμφο στα αναισθητοποιημένα έντομα για σίγουρα επιτυχή αποτελέσματα

11. Μετά τις μικροεγχύσεις, τα έντομα μεταφέρονται σε κλουβιά για την περαιτέρω ανάπτυξή τους και μέχρι το πέρας της σεξουαλικής τους ωρίμανσης για την επερχόμενη σύζευξή τους.
12. Τέλος, καθαρίζουμε και αποσυνθέτουμε τα εξαρτήματα του μηχανήματος

3.11 Προγράμματα Βιοπληροφορικής και Στατιστικής

Για τη διεξαγωγή του πειραματικού μέρους χρησιμοποιήθηκαν τα εξής προγράμματα :

3.11.1 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)

Το συγκεκριμένο πρόγραμμα είναι ένα από τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα προγράμματα βιοπληροφορικής για την αναζήτηση αλληλουχιών και αποτελείται από έναν αλγόριθμο για την σύγκριση νουκλεοτιδικών και πρωτεϊνικών αλληλουχιών. Μια αναζήτηση επιτρέπει στον ερευνητή να συγκρίνει μια αλληλουχία που εισάγει, με μια βιβλιοθήκη ή μια βάση δεδομένων αλουλληχιών και να προσδιορίσει τις αλληλουχίες βιβλιοθήκης που μοιάζουν με την εισαγόμενη αλληλουχία. Το βασικό πλεονέκτημα στην έρευνα της βιοπληροφορικής είναι ότι η αναζήτηση με αλγόριθμο είναι πολύ γρήγορη και πρακτική λόγω των ευρέων βάσεων δεδομένων γονιδιώματος που διατίθενται σήμερα. Διάφορες κατηγορίες του προγράμματος υπάρχουν ανάλογα το είδος της αναζήτησης :

- ◆ Nucleotide-nucleotide BLAST (blastn): γίνεται σύγκριση νουκλεοτιδικών αλληλουχιών
- ◆ Protein-protein BLAST (blastp): γίνεται σύγκριση πρωτεϊνικών αλληλουχιών
- ◆ Nucleotide 6-frame translation-protein (blastx): γίνεται σύγκριση νουκλεοτιδικών αλληλουχιών μεταφρασμένων σε 6 αναγνωστικά πλαίσια με πρωτεϊνικές αλληλουχίες
- ◆ Protein-nucleotide 6-frame translation (tblastn): σύγκριση πρωτεϊνικών αλληλουχιών με νουκλεοτιδικές αλληλουχίες μεταφρασμένες σε 6 αναγνωστικά πλαίσια.

3.11.2 Omiga

Το πρόγραμμα Omiga είναι ένα πρόγραμμα που βασίζεται στην ανάλυση νουκλεοτιδικών και πρωτεϊνικών αλληλουχιών. Ο χρήστης έχει τη δυνατότητα της δημιουργίας, εισαγωγής, ανάλυσης και επεξεργασίας αλληλουχιών. Ακόμη, το πρόγραμμα επιτρέπει τον προσδιορισμό θέσεων περιορισμού, μοτίβων, αναγνωστικών πλαισίων και άλλων χαρακτηριστικών των αλληλουχιών και τέλος, επιτρέπει τη σύγκριση αλληλουχιών με τη χρήση αλγορίθμου BLAST και των διαθέσιμων βάσεων δεδομένων.

3.11.3 Graphpad Prism

Το Graphpad Prism είναι ένα πρόγραμμα που έχει σχεδιαστεί για επεξεργασίες επιστημονικών και πειραματικών αποτελεσμάτων, αναλύσεις, γραφικές παραστάσεις και παρουσιάσεις επιστημονικών δεδομένων. Τα πιο ευρέως γνωστά και χρησιμοποιούμενα τεστ είναι το paired και το unpaired t-test, τα οποία συγκρίνουν τους μέσου όρους τιμών δύο ομάδων. Στο paired test οι τιμές αυτές αφορούν τον ίδιο πληθυσμό και είναι αντιστοιχισμένες μεταξύ τους αφού λαμβάνονται σε δύο διαφορετικές χρονικές στιγμές ενώ, στο unpaired t-test, οι τιμές αφορούν δύο διαφορετικούς πληθυσμούς και δεν είναι αντιστοιχισμένες μεταξύ τους.

Η ανάλυση και η παρουσίαση των αποτελεσμάτων του πειραματικού μέρους της εργασίας έγινε με unpaired t-test μέσω του προγράμματος αυτού.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Ανάλυση έκφρασης γονιδίων *vitellogenin-1*, *lingerer*, *troponin C*

Με βάση τις διαθέσιμες αλληλουχίες που προέκυψαν από σύγκριση δεδομένων RNAseq πριν και δώδεκα ώρες μετά από τη σύζευξη, επιλέχθηκαν τα γονίδια *vitellogenin-1*, *lingerer*, *troponin C*. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε μελέτη των επιπέδων της έκφρασης τους με την εξής διαδικασία:

Μετά την έκδυση των τέλειων εντόμων, πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός τους με βάση το φύλο. Η ημέρα αυτή θεωρείται ως η μηδέν (0) ημέρα ζωής των εντόμων. Έπειτα, την 7^η ημέρα ζωής τους, κατά την οποία θεωρείται ότι τα έντομα είναι ώριμα σεξουαλικά, συλλέχθηκαν αναπαραγωγικοί ιστοί βοηθητικών αδένων (FAGs) / σπερματοθήκες (spermathecae) [(timepoint: Before Mating (BM)]. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε η σύζευξη των υπολοίπων θηλυκών με αρσενικά έντομα. Μετά το τέλος της σύζευξης, συλλέχθηκαν πάλι αναπαραγωγικοί ιστοί συζευγμένων θηλυκών εντόμων σε διάφορες χρονικές στιγμές. Για κάθε περίπτωση συλλέχθηκαν 2 βιολογικά δείγματα τα οποία αποτελούνταν από ιστούς 10 θηλυκών εντόμων το καθένα. Ειδικότερα, η πρώτη λήψη έγινε αμέσως μετά τη σύζευξη, δηλαδή στις 0 ώρες [timepoint: (0H)]. Οι υπόλοιπες πραγματοποιήθηκαν στις 3 ώρες [timepoint: (3H)], στις 6 ώρες [timepoint: (6H)], στις 9 ώρες [timepoint: (9H)], στις 12 ώρες [timepoint: (12H)] και στις 24 ώρες [timepoint: (24H)] μετά το πέρας της σύζευξης.

Έπειτα, ακολούθησε απομόνωση του RNA αυτών των αναπαραγωγικών ιστών, μετατροπή σε cDNA και έλεγχος των επιπέδων έκφρασης μέσω Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (RT-PCR).

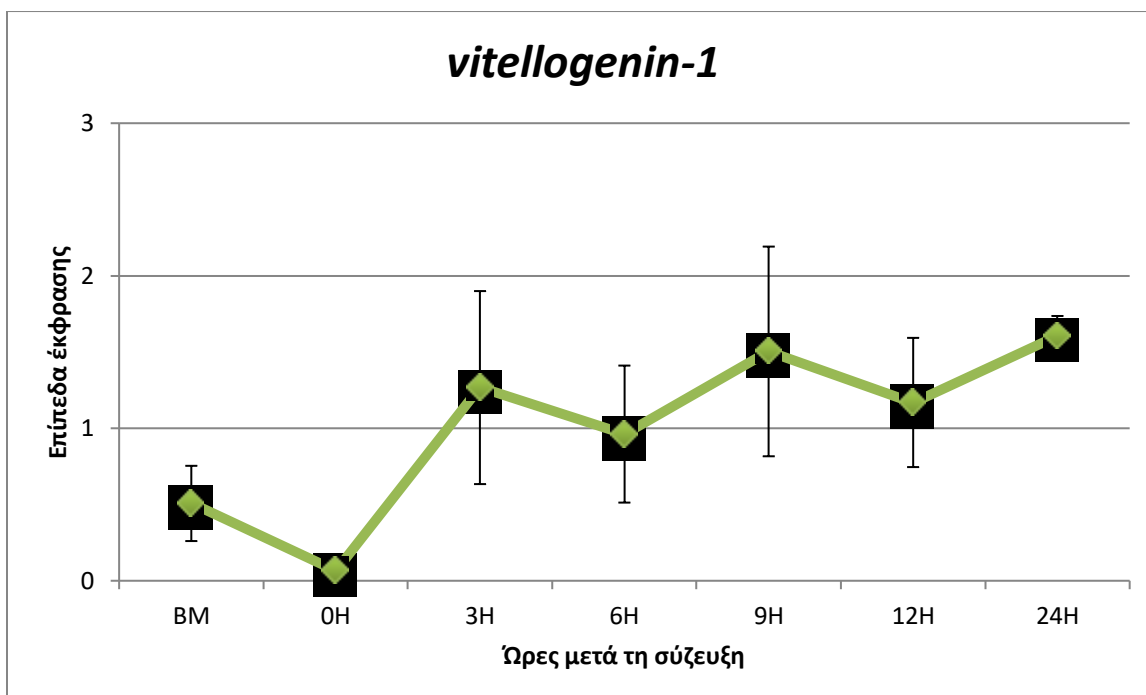
4.1.1 Μελέτη έκφρασης γονιδίου *vitellogenin-1*

Αρχικά, για τον καθορισμό του προφίλ έκφρασης του γονιδίου πραγματοποιήθηκε σχεδιασμός ενός ζεύγους εκκινητών χρησιμοποιώντας ως μήτρα την αλληλουχία του γονιδίου :

Εκκινητής F (5'→3')	Εκκινητής R (5'→3')	Ta	Μέγεθος προϊόντος (bp)
CGCGTATAGCCTAAAACCCAC	TGCAGGGTGATATCCTCCAC	55°C	80

Πίνακας 2: Ακολουθίες, θερμοκρασία υβριδισμού και μέγεθος προϊόντος

Στο γράφημα που ακολουθεί παρουσιάζεται το προφίλ έκφρασης του γονιδίου από την 7^η ημέρα ενηλικίωσης του θηλυκού εντόμου (BM) πριν τη σύζευξη του μέχρι και 24 ώρες (24H) μετά το πέρας της σύζευξης. Τα επίπεδα έκφρασης έχουν προκύψει από δύο βιολογικά δείγματα. Ειδικότερα, πριν τη σύζευξη και μέχρι τη στιγμή της σύζευξης (0H) παρατηρείται μια μικρή μείωση, έπειτα παρατηρείται μια σχετική αύξηση (~1,5x) την 3^η ώρα μετά τη σύζευξη. Στη συνέχεια παρατηρείται μια μικρή διακύμανση γύρω από την αυξημένη αυτή τιμή μέχρι και το πέρας των 24 ωρών, χωρίς όμως να είναι στατιστικά σημαντική.



Γράφημα 1 : Πρότυπο έκφρασης του γονιδίου *vitellogenin-1* σε ιστούς βοηθητικών αδένων / σπερματοθήκης θηλυκών εντόμων όπως προέκυψε από τη μελέτη δύο βιολογικών δειγμάτων. Για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο αναφοράς *α-tub*. Οι μπάρες σφάλματος υποδεικνύουν τη διακύμανση των επιπέδων έκφρασης ανάμεσα στα δύο βιολογικά δείγματα.

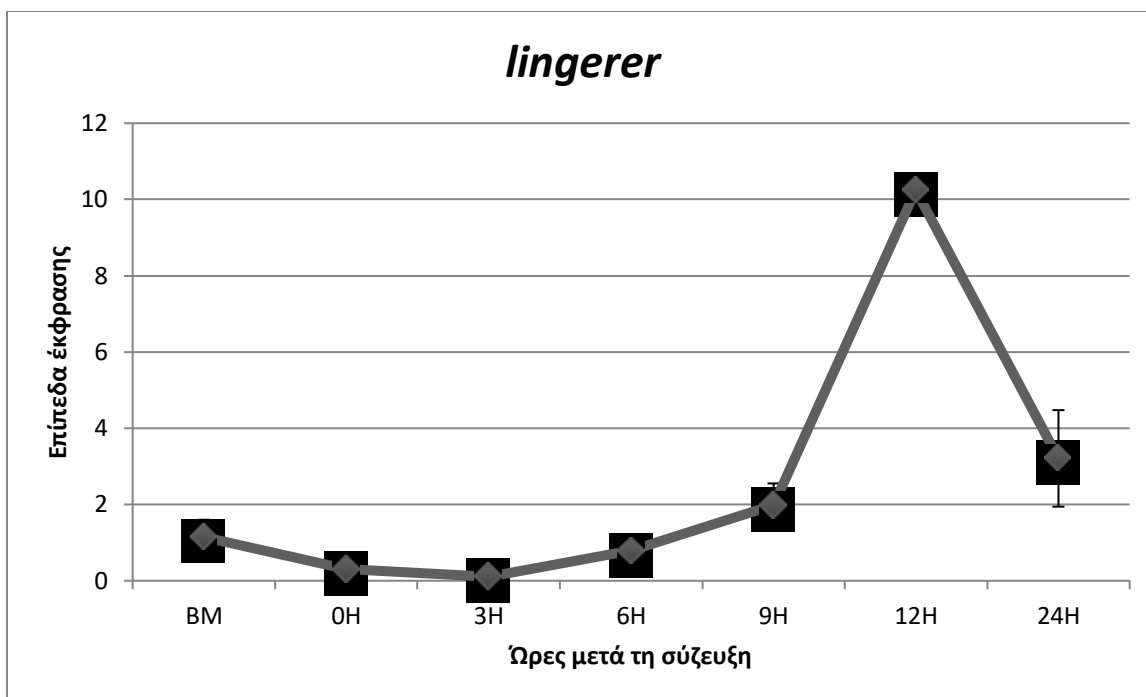
4.1.2 Μελέτη έκφραση γονιδίου *lingerer*

Πρώτα, για τον καθορισμό του προφίλ έκφρασης του γονιδίου πραγματοποιήθηκε σχεδιασμός ζεύγους εκκινητών χρησιμοποιώντας ως μήτρα την αλληλουχία του γονιδίου :

Εκκινητής F (5'→3')	Εκκινητής R (5'→3')	Ta	Μέγεθος προϊόντος (bp)
CGCGTATAACTCGAGCGACTCC	GCGGCAGCTAATCGTCAATGC	55°C	124

Πίνακας 3: Ακολουθίες, θερμοκρασία υβριδισμού και μέγεθος προϊόντος

Σε αυτό το προφίλ που ακολουθεί παρουσιάζονται τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου της *lingerer*, τα οποία έχουν προκύψει από δύο βιολογικά δείγματα. Συγκεκριμένα, παρατηρείται σταδιακή μείωση των επιπέδων μέχρι και τις 3 ώρες (3H) μετά τη σύζευξη. Μετά το τέλος των 3 ωρών, η έκφραση αρχίζει σταδιακά να αυξάνεται, και στη συνέχεια παρατηρείται μια στατιστικά σημαντική αύξηση (~10x) μεταξύ των 9 και 12 ωρών. Τέλος, η αύξηση αυτή μειώνεται ξανά και φτάνει περίπου στα επίπεδα έκφρασης που είχε στις 9 ώρες.



Γράφημα 2: Πρότυπο έκφρασης του γονιδίου *lingerer* σε ιστούς βοηθητικών αδένων / σπερματοθήκης θηλυκών εντόμων όπως προέκυψε από τη μελέτη δύο βιολογικών δειγμάτων. Για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο αναφοράς *α-tub*. Οι μπάρες σφάλματος υποδεικνύουν τη διακύμανση των επιπέδων έκφρασης ανάμεσα στα δύο βιολογικά δείγματα.

4.1.3 Μελέτη έκφρασης γονιδίου *troponin C*

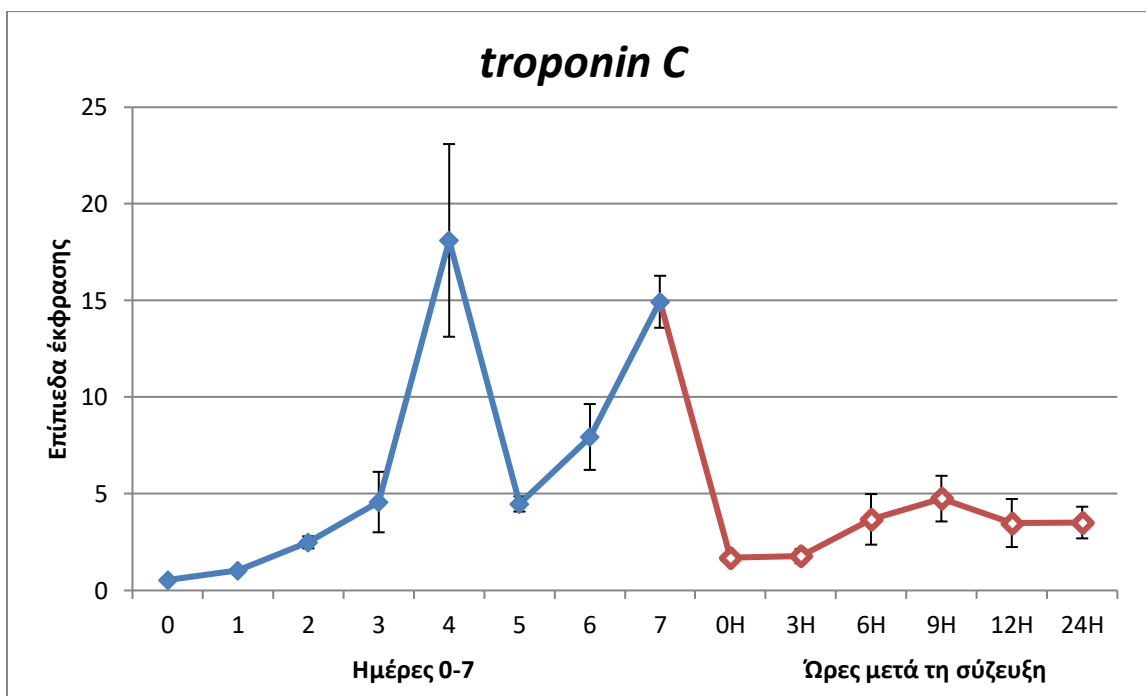
Αρχικώς, για τον καθορισμό του προτύπου έκφρασης του γονιδίου πραγματοποιήθηκε σχεδιασμός ενός ζεύγους εκκινητών χρησιμοποιώντας ως μήτρα την αλληλουχία του γονιδίου :

Εκκινητής F (5'→3')	Εκκινητής R (5'→3')	Ta	Μέγεθος προϊόντος (bp)
AAAACCAAGCCCATCCACC	GCGATTTGTTCTGGGAGTCAG	55°C	98

Πίνακας 4: Ακολουθίες, θερμοκρασία υβριδισμού και μέγεθος προϊόντος

Στο πρότυπο έκφρασης του γονιδίου της *troponin C* που ακολουθεί, το οποίο επίσης έχει προκύψει από δύο βιολογικά δείγματα, παρουσιάζεται η έκφρασή του από την ημέρα έκδυσης του εντόμου σε ενήλικο (ημέρα 0) μέχρι και τις συγκεκριμένες χρονικές στιγμές 0, 3, 6, 9, 12 και 24 ώρες μετασυζευκτικά. Για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο αναφοράς *GAPDH* για τις ημέρες ενηλικίωσης του εντόμου και το γονίδιο αναφοράς *α-tub* για τις ώρες μετά τη σύζευξη. Η αλλαγή του γονιδίου αναφοράς παρουσιάζεται στο γράφημα με χρωματική διαφορά. Συγκεκριμένα, παρατηρούμε μια σταδιακή μικρή αύξηση μέχρι την τρίτη ημέρα, η οποία την επόμενη ημέρα αυξάνεται σημαντικά (~18x). Στη συνέχεια, την πέμπτη ημέρα επανέρχεται στα επίπεδα της τρίτης ημέρας, τα οποία αυξάνονται πάλι απότομα (~15x) την έβδομη ημέρα, πριν τη σύζευξη. Έπειτα, όσον αφορά τις χρονικές στιγμές μετά τη

σύζευξη, παρατηρείται μια σημαντικά μειωμένη έκφραση του γονιδίου (~15x) κατά τις 0 και 3 ώρες. Μετά το πέρας των 3 ωρών και μέχρι και τις 9 ώρες μετά τη σύζευξη, παρουσιάζεται μια ελαφρώς μικρή αύξηση, η οποία κατά τις 12 και 24 ώρες, επανέρχεται στα επίπεδα των 6 ωρών.



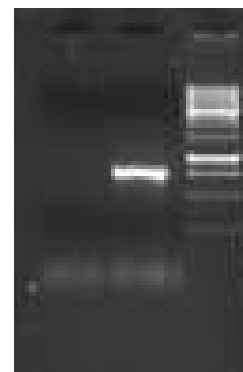
Γράφημα 3: Πρότυπο έκφρασης γονιδίου *troponin C* σε ιστούς βοηθητικών αδένων / σπερματοθήκης θηλυκών εντόμων όπως προέκυψε από τη μελέτη δύο βιολογικών δειγμάτων. Για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο αναφοράς *GAPDH* για τις ημέρες ενηλικίωσης του εντόμου και το γονίδιο αναφοράς *α-tub* για τις ώρες μετά τη σύζευξη, όπου η χρωματική διαφορά αντιστοιχεί στην αλλαγή του γονιδίου αναφοράς. Οι μπάρες σφάλματος υποδεικνύουν τη διακύμανση των επιπέδων έκφρασης ανάμεσα στα δύο βιολογικά δείγματα

Εν συνεχεία, πραγματοποιήθηκε παροδική αποσιώπηση του συγκεκριμένου γονιδίου για να διερευνηθεί ο τυχόν λειτουργικός ρόλος του στα θηλυκά έντομα του δάκου της ελιάς.

4.2 Παροδική σίγηση γονιδίου *troponin C*

Για τη δημιουργία δίκλωνων τμημάτων RNA (dsRNA) χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα το προϊόν ενίσχυσης cDNA που προέκυψε μετά από αντίστροφη μεταγραφή του RNA αναπαραγωγικών ιστών από θηλυκά έντομα. Για την ενίσχυση του επιθυμητού τμήματος σχεδιάστηκαν εκκινητές βάση του προγράμματος E-RNAi, οι οποίοι φέρουν στο 5' άκρο τους την αλληλουχία του T7 υποκινητή, έτσι ώστε η T7 Πολυμεράση να ξεκινήσει τη διαδικασία μεταγραφής. Τα προϊόντα της PCR ηλεκτροφορήθηκαν με σκοπό τη ποσοτικοποίησή τους και την εξακρίβωση τυχόν ύπαρξης παραπροϊόντων.

Για να ελεγχθεί ο λειτουργικός ρόλος του υπό μελέτη γονιδίου ακολούθησε παροδική αποσιώπηση του γονιδίου *troponin C* σε

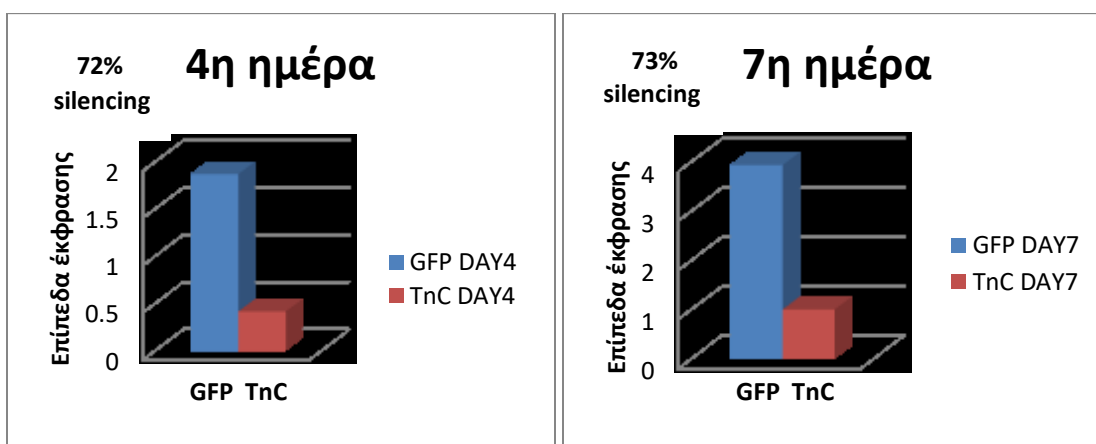


Εικόνα 18: Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης του PCR προϊόντος TnC

θηλυκά έντομα. Έτσι, τα δίκλωνα τμήματα RNA (dsRNA) του εκάστοτε γονιδίου που δημιουργήθηκαν, εγχύθηκαν απευθείας στην αιμολέμφο σε θηλυκά έντομα τις ημέρες μηδέν (0) και ένα (1) της ανάπτυξής τους. Παράλληλα, σε ίδιο αριθμό εντόμων εγχύθηκε και δίκλωνο τμήμα RNA του γονιδίου *GFP* (dsGFP), το οποίο λειτουργεί ως δείγμα ελέγχου (control). Για τη διερεύνηση πιθανής αποσιώπησης των γονιδίων απομονώθηκαν ιστοί την τέταρτη (4) ημέρα της ανάπτυξής τους μετά την έγχυση, η οποία επιλέχθηκε με βάση το προφίλ έκφρασης του γονιδίου. Επιπλέον, παραγματοποιήθηκε λήψη δείγματος την έβδομη (7) ημέρα, η οποία είναι η ημέρα διεξαγωγής της σύζευξης. Τέλος, τα επίπεδα έκφρασης μελετήθηκαν με Real-Time PCR χρησιμοποιώντας ως γονίδιο αναφοράς, το *GAPDH*, για την κανονικοποίηση των τιμών.

4.2.1 Μελέτη αποσιώπησης γονιδίου *troponin C*

Στα παρακάτω γραφήματα παρουσιάζεται η έκφραση των επιπέδων του γονιδίου *troponin C* σε θηλυκά έντομα που ενέθηκαν με dsTnC σε σύγκριση με τα θηλυκά έντομα που ενέθηκαν με dsGFP. Ειδικότερα, παρατηρείται ότι την 4^η ημέρα η έκφραση του γονιδίου έχει μειωθεί κατά 72%. Ακόμη, την 7^η ημέρα συνεχίζει να παρουσιάζει παρόμοιο ποσοστό μείωσης με το ποσοστό σίγησης της τέταρτης ημέρας. Σημειώνεται ότι το ποσοστό της τέταρτης ημέρας προέκυψε από δύο βιολογικά δείγματα, ενώ το ποσοστό της έβδομης ημέρας από ένα.



Γράφηματα 4 και 5 : Επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *troponin C* σε θηλυκά έντομα *B. oleae* την 4^η ημέρα και την 7^η ημέρα ανάπτυξής τους μετά την έκδυση. Το ποσοστό της 4^{ης} ημέρας προέκυψε από τη μελέτη δύο βιολογικών δειγμάτων, ενώ το ποσοστό της 7^{ης} ημέρας από ένα βιολογικό δείγμα. Για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο αναφοράς *GAPDH*.

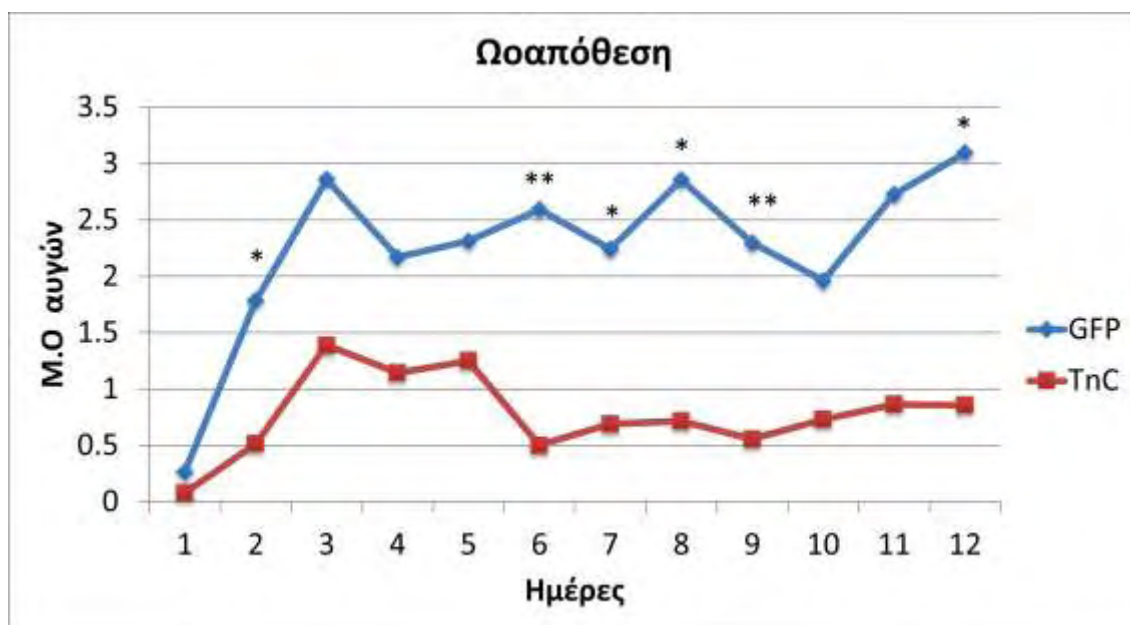
4.2.2 Μελέτη επίδρασης της σίγησης γονιδίου *troponin C* μετασυζευκτικά – Ωοαπόθεση

Αφού διεξήχθη η λήψη των δειγμάτων, πραγματοποιήθηκε σύζευξη μεταξύ αρσενικών και παρθένων θηλυκών που είχαν ενεθεί με dsTnC και dsGFP για περαιτέρω μελέτη πιθανής μείωσης των επιπέδων της ωοαπόθεσης.

Συγκεκριμένα, όπως έχει προαναφερθεί, αρχικά, γίνεται διαχωρισμός των αρσενικών και θηλυκών εντόμων την ημέρα έκδυσής τους και διατηρούνται σε ξεχωριστά κλουβιά μέχρι την ημέρα της σεξουαλικής ωρίμανσής τους. Την έβδομη ημέρα, τα έντομα που θεωρούνται πλέον σεξουαλικά ώριμα, τοποθετούνται σε ένα κλουβί για να συζευχθούν και όσα τελικά,

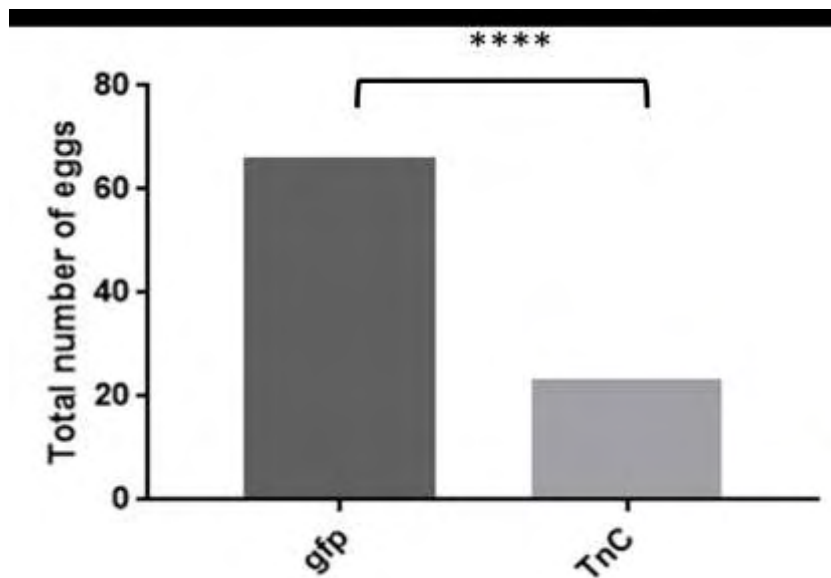
συζεύγνυνται, απομονώνονται από τον υπόλοιπο πληθυσμό. Επιτυχής σύζευξη θεωρείται όταν είναι συνεχής και δεν διαχωρίζονται τα έντομα για περισσότερο από μια ώρα. Με το πέρας της σύζευξης, τα συζευγμένα θηλυκά έντομα απομονώνονται σε ξεχωριστά κλουβιά και ακολουθεί η καταγραφή της ωοαπόθεσης για δώδεκα ημέρες.

Στο γράφημα 6 που ακολουθεί, παρουσιάζεται ο μέσος όρος ωοαπόθεσης / ημέρα 39 θηλυκών εντόμων της ομάδας GFP και 39 θηλυκών εντόμων της ομάδας TnC. Παρατηρείται ότι η ωοαπόθεση των θηλυκών που ενέθηκαν με dsTnC παραμένει περισσότερο μειωμένη σε σχέση με των θηλυκών που ενέθηκαν με dsGFP σε όλο το διάστημα των δώδεκα ημερών. Η στατιστική σημαντικότητα των αποτελεσμάτων καθορίστηκε μέσω του προγράμματος Graphpad prism 7 και απεικονίζεται με *, για $p < 0,05$ και επίπεδο εμπιστοσύνης : 95%.



Γράφημα 6: Μέσος όρος αυγών ανά ημέρα θηλυκών, στα οποία έγινε έγχυση dsTnC και dsGFP, και έχουν συζευχθεί με αρσενικά έντομα. Το * χρησιμοποιείται ως ένδειξη στατιστικής σημαντικότητας για $p < 0,05$ και επίπεδο εμπιστοσύνης : 95%

Τέλος, στο γράφημα 7 παρουσιάζεται ο συνολικός αριθμός των εναποθετημένων αυγών των θηλυκών εντόμων των δύο ομάδων, όπου παρατηρείται μειωμένος ο αριθμός των αυγών των θηλυκών που ενέθηκαν με dsTnC συγκριτικά με των θηλυκών που ενέθηκαν με dsGFP. Η στατιστική σημαντικότητα των αποτελεσμάτων καθορίστηκε μέσω του προγράμματος Graphpad prism 7 και απεικονίζεται με *, για $p < 0,05$ και επίπεδο εμπιστοσύνης : 95%.



Γράφημα 7 : Συνολικός αριθμός αυγών των θηλυκών στα οποία έγινε έγχυση dsTnC και dsGFP. Το * χρησιμοποιείται ως ένδειξη στατιστικής σημαντικότητας για $p < 0,05$ και επίπεδο εμπιστοσύνης : 95%.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο δάκος της ελιάς, *Bactrocera oleae*, αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους εχθρούς της ελαιοκαλλιέργειας. Μέχρι σήμερα, οι βασικότεροι μέθοδοι καταπολέμησης του εντόμου στηρίζονται σε χημικές μεθόδους π.χ. ψεκασμούς δολωματικούς και καλύψεως. Λόγω της φυτοτοξικότητας και των βλαβερών επιπτώσεων που έχουν στο περιβάλλον, η έρευνα έχει εστιάσει στην παραγωγή νέων καινοτόμων βιολογικών και βιοτεχνολογικών μεθόδων. Στόχος των μεθόδων αυτών θα μπορούσε να είναι το αναπαραγωγικό σύστημα. Συγκεκριμένα, μια ελλειπής ή ελαττωματική δραστηριότητα των πρωτεϊνών που συμμετέχουν σε αυτή τη διαδικασία θα μπορούσε να επηρεάσει τη φυσιολογική, συζευκτική και μετασυζευκτική συμπεριφορά των θηλυκών εντόμων και κατ'επέκταση τη μείωση του πληθυσμού των επόμενων γενεών του δάκου της ελιάς. Στόχος της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι η λειτουργική ανάλυση των γονιδίων *vitellogenin-1*, *lingerer* και *troponin C* που εμπλέκονται στο θηλυκό αναπαραγωγικό σύστημα. Τα γονίδια αυτά επιλέχθηκαν από διαθέσιμες αλληλουχίες του εργαστηρίου που είχαν προκύψει με σύγκριση RNAseq πριν και δώδεκα ώρες μετά το πέρας της σύζευξης.

Με βάση τις διαθέσιμες αλληλουχίες σχεδιάστηκαν εκκινητές για τη δημιουργία των προτύπων έκφρασής τους. Για το σκοπό αυτό, συλλέχθηκαν αναπαραγωγικοί ιστοί θηλυκών βοηθητικών αδένων (FAGs) / σπερματοθήκης από την 7^η ημέρα πριν, αμέσως μετά τη σύζευξη (0) ώρες και 3, 6, 9, 12 και 24 ώρες μετά τη σύζευξη.

Το πρώτο γονίδιο που μελετήθηκε ήταν το *vitellogenin-1*. Το γονίδιο αυτό συμμετέχει στην ανάπτυξη των ωοθηκών και στη διέγερση της σύνθεσης των πρωτεϊνών της λεκίθου (YPs) στα αναπτυσσόμενα αυγά. Η ρύθμιση του γονιδίου ελέγχεται ορμονικά από την ορμόνη νεότητας, juvenile hormone (JH), τα εκδυστεροειδή (20E) και κάποια νευροπεπτίδια, όπως αλατοτροπίνες. Συγκεκριμένα, η ορμόνη νεότητας είναι σημαντική για την προετοιμασία των αναπαραγωγικών ιστών ώστε να δράσουν τα εκδυστεροειδή στη λεκιθογένεση ενώ και οι δυο αυτές ορμόνες ελέγχονται από τα νευροπεπτίδια. Μεταλλάξεις του γονιδίου έχουν δείξει ότι επηρεάζονται οι διαδικασίες της λεκιθογένεσης και ωογένεσης με αποτέλεσμα τη μειωμένη γονιμότητα των θηλυκών και κατ'επέκταση την μειωμένη ωοαπόθεση (Tufail et al., 2014).

Στο πρότυπο έκφρασης του γονιδίου αυτού, παρατηρήθηκε ότι αμέσως μετά τη λήξη της σύζευξης, στις 0 ώρες, η έκφρασή του είναι ασθενώς μειωμένη συγκριτικά με την έκφραση πριν τη σύζευξη. Έπειτα, η έκφραση του γονιδίου παρουσιάζει μια μικρή (~1,5x) αύξηση στις 3 ώρες και στη συνέχεια παρατηρείται μια μη στατιστικά σημαντική αυξομείωση μέχρι και το πέρας των 24 ωρών (Γράφημα 1). Σύμφωνα με τις παρατηρήσεις του προφίλ, ο συγκεκριμένος τρόπος έκφρασης πιθανώς να σχετίζεται με την έναρξη της γονιμοποίησης των αυγών μετά τη λήξη της σύζευξης. Αυτή η διαδικασία είναι καθαρά μετα-συζευκτική δραστηριότητα του θηλυκού εντόμου (Tufail et al., 2014).

Στη συνέχεια, το δεύτερο γονίδιο που μελετήθηκε είναι η *lingerer*. Η πρωτεΐνη Lingerer είναι ρυθμιστής της ανάπτυξης ιστών και οργάνων. Έχει εμφανιστεί να εμπλέκεται στην έναρξη και στον τερματισμό της σύζευξης. Συγκεκριμένα, μειωμένη ή ελλειπής συγκέντρωση της πρωτεΐνης στο αρσενικό της *D. melanogaster* προκάλεσε το φαινόμενο του «stuck» και «non-copulating» φαινότυπου. Ενώ, στο θηλυκό της *D. melanogaster* παρατηρήθηκε μείωση της ωαπόθεσης λόγω της μη φυσιολογικής λειτουργίας των αναπαραγωγικών οργάνων (Kuniyoshi et al., 2002). Παράλληλα, στα συγκεκριμένα θηλυκά έντομα παρατηρήθηκε αδυναμία συντονισμού

των κινήσεων της κοιλίας και των ποδιών κατά τη διάρκεια της σύζευξης και ωοαπόθεσης (Latham et al., 2013).

Στο πρότυπο έκφρασης του γονιδίου αυτού έχουμε ελαφρώς μειωμένη έκφραση στις 3 ώρες, σε σύγκριση με τη συγκέντρωση πριν τη σύζευξη. Μετά το τέλος των 3 ωρών, η έκφραση αρχίζει σταδιακά να αυξάνεται. Έπειτα, παρουσιάζεται μια σημαντική αύξηση (~10x) μεταξύ των ωρών 9 και 12, η οποία τις επόμενες 12 ώρες μειώνεται ξανά (Γράφημα 2). Η αυξημένη έκφραση ανάμεσα στο χρονικό διάστημα των 9 και 12 ωρών ίσως να υποδηλώνει την απαραίτητη παρουσία της πρωτεΐνης για την έναρξη της ωαπόθεσης. Αυτό είναι πιθανό καθώς έχει αποδειχθεί ότι η πρωτεΐνη αυτή είναι υπεύθυνη για το συντονισμό των κινήσεων του εντόμου ώστε να επιτύχει η ωαπόθεση (Latham et al., 2013).

Το τρίτο γονίδιο που μελετήθηκε είναι το γονίδιο της *troponin C*. Όπως έχει αναλυθεί στην εισαγωγή, η πρωτεΐνη που κωδικοποιεί το γονίδιο αποτελεί μια από τις κυριότερες υπομονάδες του συμπλόκου της τροπονίνης. Το σύμπλοκο αυτό είναι υπεύθυνο για τη σύσπαση των μυϊκών συστημάτων που διαθέτονται στα διάφορα μέρη του σώματος των εντόμων της τάξης των Δίπτερων όπως *D. melanogaster*, *An. gambiae* και *Apis mellifera*. Συγκεκριμένα, η τροπονίνη C εξαρτάται από τη συγκέντρωση του ασβεστίου και είναι υπεύθυνη για τις δραστηριότητες της «δια τάσης» και της ισομετρικής συστολής στους πτητικούς μύες των εντόμων. Ακόμη, μέλετες του Meslin (2015), στο θηλυκό αναπαραγωγικό σύστημα του Λεπιδόπτερου *Pieris rapae*, έχουν εντοπίσει ένα ομόλογο του γονιδίου της *troponin C* στο όργανο, bursa copulatrix. Ειδικότερα, το όργανο αυτό, λόγω της πεπτικής και απορροφητικής του ικανότητας, επεξεργάζεται τα θρεπτικά συστατικά των σπερματικών υγρών που λαμβάνονται κατά τη σύζευξη ενεργοποιώντας τη μετα-συζευκτική δραστηριότητα του θηλυκού εντόμου.

Στο πρότυπο έκφρασης του γονιδίου της *troponin C*, το οποίο έχει προκύψει από δύο βιολογικά δείγματα, παρουσιάζεται η έκφρασή του από την ημέρα έκδυσης του εντόμου σε ενήλικο (ημέρα 0) μέχρι και τις χρονικές στιγμές 0, 3, 6, 9, 12 και 24 ώρες μετασυζευκτικά. Για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο αναφοράς *GAPDH* για τις ημέρες ενηλικίωσης του εντόμου και το γονίδιο αναφοράς *α-tub* για τις ώρες μετά τη σύζευξη. Η χρωματική διαφορά που παρουσιάζεται στο γράφημα αντιστοιχεί στην αλλαγή του γονιδίου αναφοράς. Αρχικά, παρατηρήθηκε σταδιακή αύξηση της έκφρασης μέχρι και την τρίτη ημέρα ενηλικίωσης του εντόμου. Έπειτα, την τέταρτη ημέρα παρουσιάζεται το μέγιστο επίπεδο έκφρασης του ενώ την επόμενη ημέρα ελαττώνεται σημαντικά (~18x) και επανέρχεται στα επίπεδα της τρίτης ημέρας. Εν συνεχεία, παρατηρείται μια ακόμη σημαντική αύξηση (~15x) την έβδομη μέρα, την ημέρα σύζευξης. Μετά τον τερματισμό της σύζευξης τα υψηλά επίπεδα έκφρασης ελαττώνονται κατακόρυφα (~15x) και παραμένουν σε χαμηλά επίπεδα για τις 3 πρώτες ώρες. Έπειτα, η έκφραση αυξάνεται σταδιακά μέχρι και τις 9 ώρες και τελικώς επανέρχεται στα επίπεδα των 6 ωρών έως και το πέρας των 24 ωρών (Γράφημα 3). Σύμφωνα με το πρότυπο αυτό, η πρωτεΐνη παράγεται κατά την σεξουαλική ωρίμανση του εντόμου ώστε να είναι παρούσα κατά τη σύζευξη. Μετά τη πραγματοποίηση της σύζευξης, η πρωτεΐνη χρησιμοποιείται από το θηλυκό για την επίτευξη των αναπαραγωγικών γεγονότων. Η αύξηση της μεταγραφής του γονιδίου ώστε να παραχθεί ξανά η πρωτεΐνη στο αναπαραγωγικό σύστημα, στο χρονικό διάστημα μεταξύ των 6 και 12 ωρών, ίσως να υποδηλώνει έναν σημαντικό ρόλο σε αυτό. Ένας ειδικός ρόλος της πρωτεΐνης στον μηχανισμό αφομοίωσης των αναγκαίων για γονιμοποίηση θρεπτικών συστατικών από τα συνοδά υγρά του σπέρματος στο όργανο, bursa copulatrix, του Λεπιδόπτερου, *Pieris rapae*, έχει αποδειχθεί (Meslin et al., 2015). Ένα πιθανό

σενάριο είναι, κατά την εξέλιξη, λόγω της διαφοροποίησης των ειδών ενώ στο λεπιδόπτερο έχει εμφανιστεί ένα άλλο οργανίδιο για την αφομοίωση των πρωτεϊνών αυτών, στο δάκο της ελιάς η διαδικασία αν επιτελείται από την ίδια τη μήτρα, τότε και τα αντίστοιχα γονίδια που βρίσκονται στο bursa copulatrix του λεπιδόπτερου, να εντοπίζονται στο αναπαραγωγικό ιστό του δάκου της ελιάς.

Λόγω των πιθανών αυτών λειτουργιών και των υψηλών επιπέδων έκφρασης του γονιδίου της *troropin C* πριν τη σύζευξη επιλέχθηκε το γονίδιο της *troropin C* για την πραγματοποίηση παροδικής σίγησης για να παρατηρηθεί τυχόν φαινοτυπική επίδρασή του στα έντομα.

Κατά τη παροδική σίγηση του γονιδίου, πραγματοποιήθηκε έγχυση δίκλωνων τμημάτων RNA (dsRNA) τις ημέρες μηδέν και ένα, χρησιμοποιώντας ως γονίδιο ελέγχου το GFP. Κατόπιν, λήφθηκαν δείγματα αναπαραγωγικών ιστών θηλυκών βοηθητικών αδένων (FAGs) / σπερματοθήκης την τέταρτη ημέρα (μέγιστη έκφραση του γονιδίου σύμφωνα με το πρότυπο του Γραφήματος 4) και την έβδομη, την ημέρα επίτευξης της σύζευξης, ώστε να διαπιστωθεί αν η σίγηση ήταν εφικτή. Με βάση τα αποτελέσματα των Γραφημάτων 4 και 5, παρατηρήθηκε επιτυχία της σίγησης με ποσοστό 72% την τέταρτη ημέρα και 73% την έβδομη ημέρα. Το ποσοστό της τέταρτης ημέρας προέκυψε από δύο βιολογικά δείγματα ενώ της έβδομης από ένα. Το αποτέλεσμα αυτό, της έβδομης ημέρας, προέκυψε από ένα βιολογικό δείγμα καθώς δεν υπήρχε επαρκής αριθμός εντόμων για την συλλογή δυο βιολογικών δειγμάτων. Η συλλογή τουλάχιστον δυο βιολογικών δειγμάτων είναι απαραίτητη για την διεξαγωγή τελικών αποτελεσμάτων.

Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε σύζευξη μεταξύ αρσενικών εντόμων εργαστηριακού πληθυσμού και παρθένων θηλυκών που είχαν ενεθεί με dsTnC και dsGFP. Στόχος ήταν η παρατήρηση φαινοτύπου που να υποδεικνύει τη συμμετοχή του γονιδίου αυτού σε μια μετα-συζευκτική δραστηριότητα.

Τα συζευγμένα θηλυκά απομονώθηκαν σε ξεχωριστά κλουβιά και ακολούθησε καταγραφή της ωοαπόθεσής τους για 12 συνεχόμενες ημέρες (Γράφημα 6). Σε όλο το χρονικό διάστημα, η ωοαπόθεση των θηλυκών που ενέθηκαν με dsTnC εμφανίζεται να είναι μειωμένη με στατιστικά σημαντική διαφορά τις ημέρες 2, 6-9 και 12. Η μειωμένη αυτή ωοαπόθεση επιβεβαιώνει τους παραπάνω πιθανούς ρόλους της *troropin C* στο αναπαραγωγικό σύστημα του εντόμου.

Μελλοντικές προοπτικές

Σύμφωνα με τα δεδομένα που αναπτύχθηκαν παραπάνω, προκύπτει ότι κρίνεται αναγκαία η περαιτέρω μελέτη των γονιδίων με αποτέλεσμα την διερεύνηση των ρόλων τους στην αναπαραγωγική βιολογία του δάκου της ελιάς. Αναγκαία κρίνεται η συλλογή περισσότερων βιολογικών δειγμάτων για τον καθορισμό ακριβούς ποσοστού σίγησης του γονιδίου της *Troropin C*.

Επίσης, ενώ το ποσοστό σίγησης του γονιδίου είναι αρκετά υψηλό, περίπου 70%, εντούτοις το εναπομείναν ποσοστό έκφρασης του γονιδίου μπορεί να είναι αρκετό για να επιτελέσει το ρόλο του στην αναπαραγωγή. Για την αύξηση του ποσοστού σίγησης θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί:

- επανάληψη της έγχυσης του dsRNA την τρίτη ημέρα, η οποία είναι η προηγούμενη της ημέρας με την μέγιστη έκφραση του γονιδίου
- έγχυση μεγαλύτερης συγκέντρωσης dsRNAs έτσι ώστε να αυξηθούν τα ποσοστά επιτυχίας της σίγησης

Επιπλέον, όσον αφορά τη πειραματική διαδικασία της σύζευξης, η αξιοποίηση ψηφιακών καμερών υψηλής ανάλυσης και η μαγνητοσκόπηση της διαδικασίας θα συνείσφερε στην ενδεδειγμένη έρευνα και παρακολούθηση της συμπεριφοράς των εντόμων κατά τη διάρκεια της σύζευξης. Έπειτα, χρήσιμη θα μπορούσε να θεωρηθεί η καταγραφή των εναποθετημένων μη γονιμοποιημένων αυγών, των νυμφών, των τελικώς εκδυόμενων απογόνων και της αναλογίας φύλου των απογόνων αυτών.

Καταλήγοντας, οι επιπτώσεις της αποσιώπησης του γονιδίου της *tropoin C* στην αναπαραγωγική ικανότητα του εντόμου το καθιστούν ως ένα υποψήφιο γονίδιο-στόχο για το σχεδιασμό καινοτόμων μεθόδων ελέγχου του πληθυσμού του δάκου. Επίσης, θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί αντίστοιχη πειραματική διαδικασία και για τα άλλα δυο γονίδια, *vitellogenin-1* και *lingerer*, ώστε να διερευνηθεί η τυχόν φαινοτυπική τους επίδραση στα θηλυκά έντομα του δάκου της ελιάς.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

6.1 Ελληνική

- Θεριός Ι.Ν. (2005). Ελαιοκομία. Εκδόσεις Δ. Γαρταγάνη, Θεσσαλονίκη, Ελλάς, Ε.Ε.
- Κωβαίος, Δ. Σ., Μπρούφας, Γ. Δ., και Γεωργαντζή, Δ., (2001). Ταχύς εγκλιματισμός στο κρύο του δάκου της ελιάς *Bactrocera oleae* (Rossi), σε συνθήκες εργαστηρίου και υπαίθρου. Πρακτικά 9ου Πανελληνίου Εντομολογικού Συνεδρίου, Ιωάννινα
- Δ.Α. Προφήτου-Αθανασιάδου και Δ.Σ. Κωβαίος και Φ.Δ. Λάμπρου. (2004). Εργαστηριακές Σημειώσεις Γενικής Εντομολογίας: Στοιχεία Μορφολογίας Εντόμων. Εκδ. Επιτρ. Δημοσιευμ. Αριστοτ. Πανεπ. Θεσ/νίκης
- Μ.Ε. Τζανακάκης και Β.Ι. Κατσόγιαννος. (2003). Έντομα Καρποφόρων Δέντρων και Αμπέλου. Αθήνα, Εκδόσεις ΑγροΤύπος

6.2 Ξενόγλωσση

- Adams EM, Wolfner MF. (2007). Seminal proteins but not sperm induce morphological changes in the *Drosophila melanogaster* female reproductive tract during sperm storage. *J. Insect Physiol.* 53:319–31
- Agianian B, Krzic U, Qiu F., Linke WA, Leonard K. and Bullard B. (2004): A troponin switch that regulates muscle contraction by stretch instead of calcium. *The EMBO Journal* 23, 772–779
- Askew R.R. (1971): Parasitic insects. *Heinemann Educational Books*, London, 316p
- Attardo GM, Benoit JB, Michalkova V, Patrick KR, Krause TB, Aksoy S. (2014). The Homeodomain Protein Ladybird Late Regulates Synthesis of Milk Proteins during Pregnancy in the Tsetse Fly (*Glossina morsitans*). *PLoS Negl Trop Dis* 8(4): e2645. doi:10.1371/journal.pntd.0002645
- Avila FW, Sirot LK, LaFlamme BA, Rubinstein CD, and Wolfner MF. (2011). Insect Seminal Fluid Proteins: Identification and Function. *Annu. Rev. Entomol.* 56:21–40
- Bartlett, JMS. Stirling, D. (2003). "A Short History of the Polymerase Chain Reaction". *PCR Protocols. Methods in Molecular Biology.* 226 (2nd ed.). pp. 3–6.
- Baumgartner R, Stocker H, Hafen E. (2013). The RNA-binding Proteins FMR1, Rasputin and Caprin Act Together with the UBA Protein Lingerer to Restrict Tissue Growth in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Genet* 9(7): e1003598. doi:10.1371/journal.pgen.1003598
- Bueno MA, (1986). The use of sex pheromone for monitoring and control of olive fruit fly. Fruit flies Proceedings of the Second International Symposium 16-21 September 1986, Colymbari, Crete, Greece
- Chomczynski, P. and Sacchi, N. *Anal. Biochem.* 162, 156. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162:156-9
- Chomczynski, P. (1993). *Biotechniques* 15, 532
- Chou MY, Mau RFL, Jang EB, Vargas RI, Piñero JC. (2012). Morphological features of the ovaries during oogenesis of the Oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis*, in relation to

the physiological state. *Journal of Insect Science* 12:144. Available online: <http://www.insectscience.org/12.144>

- Degrugillier, ME and Leopold, RA (1973). Sperm penetration of housefly eggs: evidence for involvement of a female accessory secretion. *Science* **181**: 555–557
- Degrugillier, ME. and Leopold, RA (1976). Ultrastructure of sperm penetration of house fly eggs. *J Ultrastr Res* **56**: 312–325
- Dong L., Li J., Huang H, Yin MX, Xu J, Li P, Lu Y, Wu W, Yang H, Zhao Y, and Zhang L. (2015). Growth suppressor *lingerer* regulates bantam microRNA to restrict organ size. *Journal of Molecular Cell Biology* 0(0), 1–14. doi:10.1093/jmcb/mjv045
- Drew, R.A.I. (1989). Chapter 1.1 Taxonomic Characters used in identifying Tephritidae. pp 3-7 In A.S. Robinson and G.H.S. Hooper “Fruit Flies, their biology, Natural Enemies and Control”, Elsevier Science Publishers, Amsterdam
- Eldred et al. (2014). The roles of troponin C isoforms in the mechanical function of *Drosophila* indirect flight muscle. *J Muscle Res Cell Motil.* ; 35(0): 211–223. doi:10.1007/s10974-014-9387-8
- Flockhart I, Booker M, Kiger A, Boutros M, Armknecht S, Ramadan N, Richardson K, Xu A, Perrimon N. and Mathey-Prevot B. (2006). FlyRNAi: the *Drosophila* RNAi screening center database. *Nucleic Acids Research*, 2006, Vol. 34, Database issue D489–D494. doi:10.1093/nar/gkj114
- Gerard, GF. and Grandgenett, DP. (1975). Purification and characterization of the DNA polymerase and RNase H activities in Moloney murine sarcoma-leukemia virus. *J. Virol.* 15, 785-797
- Gilbert DG. (1981). Sperm counts and initial sperm storage in *D. melanogaster*. *Dros Inf Serv* 56:46–7.
- Giorgi F. and Macchi F. (1980). Vitellogenesis in the stick insect *Carausius Morosus* I. specific protein synthesis during ovarian development. *J. Cell Sri.* 46, 1-16
- Grishok A. (2005). RNAi mechanisms in *Caenorhabditis elegans*. *Federation of European Biochemical Societies (FEBS) Letters* 579 (2005) 5932–5939. doi:10.1016/j.febslet.2005.08.001
- Gu L, Knipple DC. (2013). Recent advances in RNA interference research in insects: Implications for future insect pest management strategies. *Crop Protection* 45, 36e40
- Hall, J. C., R. W. Siegel, L. Tomkins and C. P. Kyriacou. (1980). Neurogenetics of courtship in *Drosophila*. *Stadler Genet. Symp.* **12**: 43–82
- Hall, J. C. (1994). The mating of a fly. *Science* **264**: 1702–1714
- Haniotakis G.E. (2005). Olive pest control: Present status and prospects *Integrated Protection of Olive Crops IOBC/wprs Bull.* 28(9), pp. 1-9
- Herranz R., Diaz-Castillo C., Nguyen TP, Lovato TL, Cripps RM, Marco R. (2004). Expression patterns of the whole troponin C gene repertoire during *Drosophila* development. *Gene Expression Patterns* 4, 183–190. doi:10.1016/j.modgep.2003.09.008
- Herranz R., Mateos J., Mas JA, Garcia-Zaragoza E., Cervera M., and Marco R. (2005). The Coevolution of Insect Muscle TpnT and TpnI Gene Isoforms. *Mol. Biol. Evol.* 22(11): 2231–2242. 2005. doi:10.1093/molbev/msi223
- Herranz R., Mateos J., Marco R. (2005). Diversification and Independent Evolution of troponin C Genes in Insects. *J Mol Evol* (2005) 60:31–44. DOI:10.1007/s00239-004-0031-x

- Huvenne H., Smagghe G. (2010). Mechanisms of dsRNA uptake in insects and potential of RNAi for pest control: A review. *Journal of Insect Physiology* 56, 227–235. doi:10.1016/j.jinsphys.2009.10.004
- Keleman K, (2007). Function of the *Drosophila* CPEB protein Orb2 in long-term courtship memory. *Nat Neurosci*; 10 (12):1587-93. DOI:[10.1038/nm1996](https://doi.org/10.1038/nm1996)
- Kimura S, Sato K, Ote M, Ito H, Koganezawa M, Yamamoto D. (2015). The *Drosophila* lingerer protein cooperates with Orb2 in long-term memory formation. *J Neurogenet*; 29(1):8-17. doi: 10.3109/01677063.2014.917644
- Kola V.S.R, Renuka P., Madhav MS and Mangrauthia ST, (2015). Key enzymes and proteins of crop insects as candidate for RNAi based gene silencing. *Front. Physiol.* 6:119. doi: 10.3389/fphys.2015.00119
- Korneyev VA. (1999). Phylogenetic relationships among higher groups of Tephritidae, p. 73-113. In M. Aluja & A. L. Norrbom, eds., *Fruit flies (Tephritidae): Phylogeny and evolution of behavior*. CRC Press, Boca Raton. [16] + 944 p
- Kuniyoshi H., Baba K., Ueda R., Kondo S., Awano W., Juni N. and Yamamoto D. (2002). *lingerer*, a *Drosophila* Gene Involved in Initiation and Termination of Copulation, Encodes a Set of Novel Cytoplasmic Proteins. *Genetics* 162: 1775–1789
- Latham KL, Liu YS and Taylor BJ. (2013). A small cohort of FRUM and Engrailed-expressing neurons mediate successful copulation in *Drosophila melanogaster*. *BMC Neuroscience*, 14:57 <http://www.biomedcentral.com/1471-2202/14/57>
- Lawyer, F. ; Stoffel, S. ; Saiki, R. ; Chang, S. ; Landre, P. ; Abramson, R. ; Gelfand, D. (1993). "High-level expression, purification, and enzymatic characterization of full-length *Thermus aquaticus* DNA polymerase and a truncated form deficient in 5' to 3' exonuclease activity". *PCR methods and applications*. 2 (4): 275–287. doi:[10.1101/gr.2.4.275](https://doi.org/10.1101/gr.2.4.275). PMID [8324500](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8324500/)
- Lefevre G, Jonsson UB. (1962). Sperm transfer, storage, displacement, and utilization in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 47:1719–36.
- Lentz AJ, Miller JR, Spencer JL and Keller JE. (2009). Effect of Male Accessory Gland Extracts on Female Oviposition and Sexual Receptivity of the Caribbean Fruit Fly (Diptera:Tephritidae). *Florida Entomologist*, 92(3):415-420. URL: <http://www.bioone.org/doi/full/10.1653/024.092.0301>
- Lovato, T.L., Meadows, S.M., Baker, P.W., Sparrow, J.C., Cripps, R.M. (2001). Characterization of muscle actin genes in *Drosophila virilis* reveals significant molecular complexity in skeletal muscle types. *Insect Mol. Biol.* 10, 333–340.
- Lung O, Wolfner MF. (2001). Identification and characterization of the major *Drosophila melanogaster* mating plug protein. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 31:543–51
- Manetti, A.G.O., Rosetto, M., de Filippis, T., Marchini, D., Baldari, C.T. and Dallai, R. (1997) Juvenile hormone regulates the expression of the gene encoding ceratotoxin A, an antibacterial peptide from the female reproductive accessory glands of the medfly *Ceratitis capitata*. *J Insect Physiol* 43: 1161–1167.
- Marchini, D., Bernini, L.F., Marri, L., Giordano, P.C. and Dallai, R. (1991) The female reproductive accessory glands of the medfly *Ceratitis capitata*: antibacterial activity of the secretion fluid. *Insect Biochem* 21: 597–605.
- Marchini, D., Giordano, P.C., Amons, R., Bernini, L.F. and Dallai, R. (1993) Purification and primary structure of ceratotoxin A and B, two antibacterial peptides from the female

reproductive accessory glands of the medfly *Ceratitis capitata* (Insecta: Diptera). *Insect Biochem Mol Biol* **5**: 591–598.

- Marchini, D., Marri, L., Rosetto, M., Manetti, A.G.O. and Dallai, R. (1997) Presence of antibacterial peptides on the laid egg chorion of the medfly *Ceratitis capitata*. *Biochem Biophys Res Commun* **240**: 657–663.
- Martin SR, Avella G, Adrover M, Nicola GF, Bullard B and Pastore A, (2011). Binding Properties of the Calcium-Activated F2 Isoform of *Lethocerus* troponin C. *Biochemistry*, 50, 1839–1847. DOI: 10.1021/bi102076s
- Masci VL, Luca M, Gambellini G, Taddei AR, Belardinelli MC, Guerra L, Mazzini M, Fausto AM. (2015). Reproductive biology in Anophelinae mosquitoes (Diptera, Culicidae): Fine structure of the female accessory gland. *Arthropod Structure & Development* 1-10. <http://dx.doi.org/10.1016/j.asd.2015.04.003>
- Mazomenos, B. E., Pantazi-Mazomenou, A., Stefanou, D. (2002). Attract and kill of the olive fruit fly. *IOBC wprs Bulletin* Vol. 25(•) 2002
- Meslin C, Melissa S. Plakke, Aaron B. Deutsch, Brandon S. Small, Nathan I. Morehouse and Nathan L. Clark. (2015). Digestive Organ in the Female Reproductive Tract Borrows Genes from Multiple Organ Systems to Adopt Critical Functions. *Mol. Biol. Evol.* doi:10.1093/molbev/msv048
- Milligan JF, Groebe DR, Witherell GW, and Uhlenbeck OC. (1987). Oligoribonucleotide synthesis using T7 RNA polymerase and synthetic DNA template. *Nucl. Acids Res.* 15:8783–8798.
- Mohammad A. (2005). Infestation of Olive Fruit Fly, *Bactrocera oleae*, in California and Taxonomy of its Host Trees *Agric. conspec. sci.* Vol. 70 (2005) No. 4
- Nardi F., A. Carapelli, R. Dallai, G.K. Roderick, F. Frati. (2005). Population structure and colonization history of the olive fly, *Bactrocera oleae* (Diptera, Tephritidae). *Mol Ecol.* (9): 2729-38
- Ponchel F ; Toomes C ; Bransfield K ; Leong F.T ; Douglas S.H ; Field S.L ; Bell S.M ; Combaret V ; Puisieux A ; Mighell A.J (2003). *BMC Biotechnol.* **3**: 18. [doi:10.1186/1472-6750-3-18](https://doi.org/10.1186/1472-6750-3-18).
- Perrimon N, Ni JQ, and Perkins L. (2010). In vivo RNAi: Today and Tomorrow. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010;2:a003640 doi:10.1101/cshperspect.a003640
- Qiu F, Lakey A, Agianian B, Hutchings A, Butcher GW, Labeit S, Leonard K and Bullard B. (2003). troponin C in different insect muscle types: identification of two isoforms in *Lethocerus*, *Drosophila* and *Anopheles* that are specific to asynchronous flight muscle in the adult insect. *Biochem. J.* 371, 811–821
- Radhakrishnan P, Marchini D, Taylor PW. (2009). Ultrastructure of male reproductive accessory glands and ejaculatory duct in the Queensland fruit fly, *Bactrocera tryoni* (Diptera: Tephritidae). *Arthropod Structure & Development* 38, 216–226. doi:10.1016/j.asd.2008.09.004
- Raikhel (2005). Hormonal Control of Reproductive Processes
- Ram KR and Wolfner MF. (2007). Seminal influences: *Drosophila* Acps and the molecular interplay between males and females during reproduction. *Integrative and Comparative Biology*, volume 47, number 3, pp. 427–445. doi:10.1093/icb/icm046
- Rice, R. E. (2000). Bionomics of the olive fruit fly *Bactrocera (Dacus) oleae*. *KAC. Plant Protection Quarterly* 10: 1–5

- Rogers DW, Whitten MM, Thailayil J, Soichot J, Levashina EA, Catteruccia F. (2008). Molecular and cellular components of the mating machinery in *Anopheles gambiae* females. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105:19390–95
- Rogers DW, Baldini F, Battaglia F, Panico M, Dell A, et al. (2009). Transglutaminase-mediated semen coagulation controls sperm storage in the malaria mosquito. *PLoS Biol.* 7:e1000272
- Rosetto M, Filippis T, Manetti A, G O, Marchini D and Dallai R. (1999). FST, a female-specific transcript from the medfly *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). Blackwell Science Ltd, *Insect Molecular Biology*, 8, 545–550
- Roth, M.J., Tanese, N. and Goff, S.P. (1985). *J. Biol. Chem.* 260, 9326-9335.
- Sagri E, Reczko M, Tsoumani KT, Gregoriou ME, Harokopos V, Mavridou AM, Tastsoglou S, Athanasiadis K, Ragoussis J, Mathiopoulos KD. (2014). The molecular biology of the olive fly comes of age. *BMC Genetics*, 15(Suppl 2):S8 <http://www.biomedcentral.com/1471-2156/15/S2/S8>
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd Ed.). 5.52-5.55, 8.11-8.17.
- Sambrook J and Russel DW. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd ed.). Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press. Chapter 8: In vitro Amplification of DNA by the Polymerase Chain Reaction
- Schenborn ET and Mierendorf RC. (1985). A novel transcription property of SP6 and T7RNA polymerases: dependence on template structure. *Nucl. Acids Res.* 13: 6223–6236.
- Scolari F, Gomulski LM, Gabrieli P, Manni M, Savini G, Gasperi G, Malacrida AR. (2014). How functional genomics will impact fruit fly pest control: the example of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*. *BMC Genetics* 2014, 15(Suppl 2):S11 <http://www.biomedcentral.com/1471-2156/15/S2/S11>
- Singh SH, Kumar P, Ramachandra NB, Nongthomba U. (2014). Roles of the troponin isoforms during indirect flight muscle development in *Drosophila*. *Journal of Genetics*, Vol. 93, No. 2, 379–388
- Soler M, Bownes M and Kubli E. (1999). Control of Oocyte Maturation in Sexually Mature *Drosophila* Females. *Developmental Biology* 208, 337–351 (1999) Article ID dbio.1999.9210
- Sugawara T. (1979). Stretch reception in the bursa copulatrix of the butterfly, *Pieris rapae crucivora*, and its role in behaviour. *J Comp Physiol.* 130:191–199
- Sugawara T. (1981). Fine structure of the stretch receptor in the bursa copulatrix of the butterfly, *Pieris rapae crucivora*. *Cell Tissue Res.* 217: 23–36
- Taghert, P.H., Veenstra, J.A. (2003). *Drosophila* neuropeptide signaling. *Adv. Genet.* 49, 1–65.
- Taylor PW, Perez-Staples D, Weldon CW, Collins SR, Fanson BG, Yap S and Smallridge C. (2011). Post-teneral nutrition as an influence on reproductive development, sexual performance and longevity of Queensland fruit flies. *J. Appl. Entomol.* 137 (Suppl. 1) 113–125 Blackwell Verlag, GmbH. doi: 10.1111/j.1439-0418.2011.01644.x
- Tram U and Wolfner MF. (1998). Seminal fluid regulation of female sexual attractiveness in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 95, pp. 4051–4054, *Physiology*

- Tufail M, Nagaba Y, Elgendy AM and Takeda M. (2014). Regulation of vitellogenin genes in insects. *Entomological Science* 17, 269–282 doi:10.1111/ens.12086
- Tzanakakis, M.E. (2006). Insect and mites feeding on olive. Brill. Leiden. Boston, pp. 85-106
- Verma, I.M. (1975). Studies on reverse transcriptase of RNA tumor viruses III. Properties of purified Moloney murine leukemia virus DNA polymerase and associated RNase H. *J. Virol.* 15, 843-854.
- Watson, J D ; Baker, T A ; Bell, S P; Gann, A ; Levine, M ; Losick, R (2004). *Molecular Biology of the Gene* (Fifth ed.). San Francisco: Benjamin Cummings.
- Weems, H. V., and Nation, J. L. (2009). Olive Fruit Fly, *Bactrocera oleae* (Rossi) (Insecta: Diptera: Tephritidae). University of Florida Extension, IFAS, EENY–113 document (originally published as DPI entomology circular no.44) Available online at <http://creatures.ifas.ufl.edu>
- White H.M. and Wang X.J. (1992). Taxonomic notes on some dacine (Diptera: Tephritidae) fruit flies associated with citrus, olives and cucurbits. *Bulletin of Entomological Research*, 82: 275-279
- Yuval B, Kaspi R, Field SA, Blay S, Taylor PW. (2002). Effects of post-teneral nutrition on reproductive success of male Mediterranean fruit flies. *Fla. Entomol.* 85, 165–170
- Yuval B, Maor M, Levy K, Kaspi R, Taylor PW, Shelly T. (2007). Breakfast of champions or kiss of death? Survival and sexual performance of protein fed sterile Mediterranean fruit flies. *Fla. Entomol.* 90, 115–122