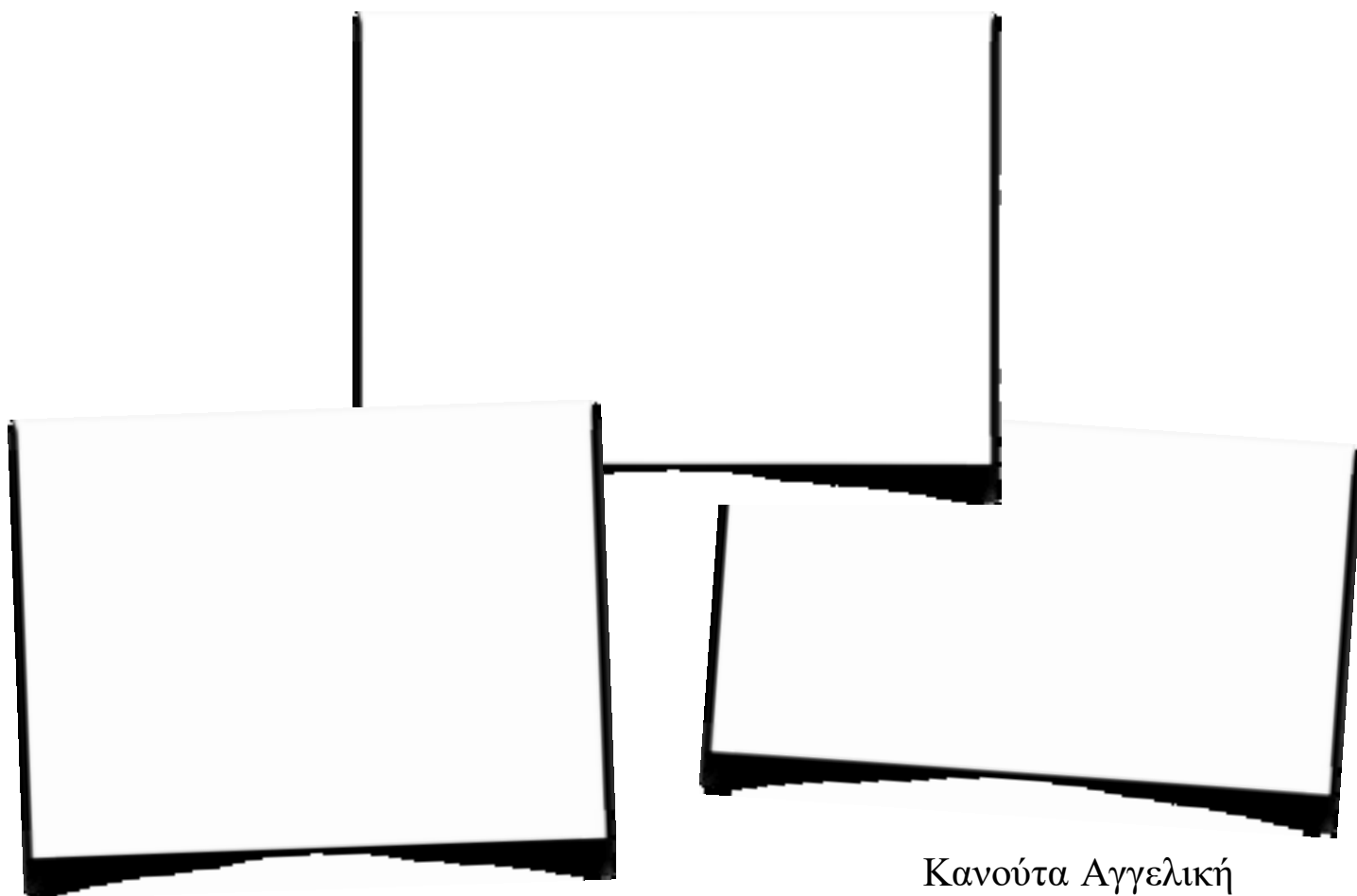




Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Σχολή Επιστημών Υγείας
Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας

Λειτουργική ανάλυση γονιδίου που εμπλέκεται στην αναπαραγωγή αρσενικών ατόμων του δάκου της ελιάς



Κανούτα Αγγελική

Λάρισα 2016

Θέμα Διπλωματικής Εργασίας:

Λειτουργική ανάλυση γονιδίου που εμπλέκεται στην αναπαραγωγή αρσενικών ατόμων στο δάκο της ελιάς

Functional analysis of gene possibly implicated in the male reproduction of the olive fruit fly

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας & Γονιδιωματικής του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, το διάστημα Μαρτίου 2015 - Σεπτεμβρίου 2015 υπό την επίβλεψη του κυρίου Ματθιόπουλου Κ., Καθηγητή Μοριακής Βιολογίας και της κυρίας Γρηγορίου Μ.Ε..

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Ματθιόπουλος Κωνσταντίνος: Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας

Τσουμάνη Κωνσταντίνα: Δρ Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστημιακή υπότροφος
ανάθεσης διδακτικού έργου

Σαραφίδου Θεολογία: Επίκουρος Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ζωικών Οργανισμών

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Κωνσταντίνο Μαθιόπουλο, για την ευκαιρία να εκπονήσω τη διπλωματική μου εργασία στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας & Γονιδιωματικής του τμήματός μας. Δε νομίζω ότι θα μπορούσα να συνεργαστώ με άλλο καθηγητή πιο προσιτό και πρόθυμο να βοηθήσει σε οποιοδήποτε πρόβλημα και να μας καθοδηγήσει.

Επίσης, τουλάχιστον ένα υπερ-τεράστιο ευχαριστώ στην Μαρία - Ελένη Γρηγορίου. Σε ευχαριστώ για την απίστευτη υπομονή σου. Ήσουν πάντα πρόθυμη να απαντήσεις σε όλες τις απορίες μου. Ήσουν πάντα εκεί. Και μου έμαθες πρακτικά τα πάντα στο εργαστήριο. Αυτή η εργασία δε θα είχε τελειώσει ποτέ χωρίς τη δική σου καθοδήγηση. Ειλικρινά, δεν υπάρχουν αρκετά ευχαριστώ. Και πραγματικά συγνώμη για όλες τις φορές που σε τρόμαξα.

Μια άλλη κοπέλα σε αυτό το εργαστήριο η οποία κόντεψε να πάθει καρδιακό εξαιτίας μου, και συγνώμη, ήταν η μεταπτυχιακή Μαρία Αδαμοπούλου. Μαρία ήσουν κυριολεκτικά δίπλα μου σε όλη τη διάρκεια των πειραμάτων. Άντεξες λάθη, αναφωνήματα και απίστευτη φλυαρία εκ μέρους μου. Επίσης, χωρίς ποτέ να δείξεις δυσφορία!! Ήσουν πάντα πρόθυμη να μου δείξεις ό,τι μου ξέφυγε και να με βοηθήσεις να βελτιωθώ. Ειλικρινά σε ευχαριστώ για όλα.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλα τα μέλη του εργαστηρίου, που πάντα ήταν πρόθυμοι να βοηθήσουν και ήταν πάντα απίστευτα συνεργάσιμοι.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο δάκος της ελιάς, *Bactrocera oleae*, αποτελεί τον μεγαλύτερο εχθρό των ελαιόκαρπων προκαλώντας κάθε χρόνο μεγάλες καταστροφές στις ελαιοκαλλιέργειες. Τα θηλυκά προκαλούν την καταστροφή των ελαιόκαρπων καθώς τους δημιουργούν νύγματα προκειμένου να αποθέσουν τα αυγά τους. Η διαδικασία αυτή προκαλεί την ποσοτική και ποιοτική υποβάθμιση τεράστιων εκτάσεων ελαιοκαλλιεργειών κάθε χρόνο. Η αντιμετώπιση του εντόμου πραγματοποιείται κυρίως με τη χρήση εντομοκτόνων και πλέον υπάρχει η ανάγκη αντικατάστασής τους. Μέχρι στιγμής δεν έχει βρεθεί η κατάλληλη εναλλακτική μέθοδος για την αντιμετώπιση του εντόμου. Λόγω του τρόπου με τον οποίο ο δάκος καταστρέφει τους ελαιοκαρπούς η διακοπή της διαδικασίας της αναπαραγωγής του αποτελεί κύριο στόχο μελετών για την καταπολέμησή του. Στα έντομα, ο κύριος ρόλος του αναπαραγωγικού συστήματος του αρσενικού είναι η παραγωγή και διατήρηση του σπέρματος και των ουσιών οι οποίες εκκρίνονται από τους βοηθητικούς αδένες καθώς και η επιτυχής μεταφορά τους στο θηλυκό κατά τη διάρκεια της σύζευξης. Τα υγρά των βοηθητικών αδένων περιέχουν μεταξύ άλλων και πρωτεΐνες οι οποίες συμβάλλουν στην μετα-συζευκτική συμπεριφορά του θηλυκού. Επομένως, η μελέτη αυτών των πρωτεϊνών μπορεί να δώσει υποψήφια μόρια-στόχους για την ανάπτυξη νέων μεθόδων καταπολέμησης του εντόμου.

Στην παρούσα εργασία εξετάστηκε το γονίδιο της λυσοσωμικής πρωτεάσης του ασπαρτικού το οποίο ταυτοποιήθηκε μέσω RNAseq ότι εκφράζεται στους βοηθητικούς αδένες του αρσενικού. Μελετήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου με ποσοτική Real-Time PCR στον ιστό αυτό, στο χρονικό διάστημα από την εκκόλαψη του ενηλικίου εντόμου έως και την 7^η ημέρα όπου πραγματοποιήθηκε η σύζευξη για τα πειράματά μας. Επιπλέον πραγματοποιήθηκε παροδική αποσιώπηση του γονιδίου με απευθείας έγχυση δίκλωνων μορίων RNA (dsRNA) στην αιμολέμφο του εντόμου και έλεγχος του ποσοστού παρεμπόδισης με ποσοτική Real-Time PCR, η οποία έδειξε ότι η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε είχε σημαντικό ποσοστό επιτυχίας.

ABSTRACT

The olive fruit fly, *Bactrocera oleae*, is the major pest of commercial olive production, causing extensive damage to olive crops every year. After mating the female insect, *Bactrocera oleae*, deposits its eggs in the olive fruit where the developing larvae feed and grow. In insects, mating is a physiological process that is critical to population maintenance and species perpetuation. With regard to males, among the main functions of the reproductive system is the production and storage of sperm and seminal fluids, and their transport in a viable state to the reproductive tract of the female. A control method that targets these functions could be used as an effective method for pest population control. Seminal fluids play a major role in female behavior after mating and studying them could reveal molecules of major importance at the efforts against the *Bactrocera oleae*. A gene encoding a *lysosomal aspartic protease* was identified through transcriptomic analysis. In this study, the expression level of the gene was evaluated with quantitative Real-Time PCR at that tissue from adult hatching (DAY 0) until mating (DAY 7). Additionally, the gene was transiently silenced by injecting dsRNA directly into the hemolymph. The inhibition level was further evaluated with quantitative Real-Time PCR, which confirmed the success of the approach.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ	9
1. Ο Δάκος της ελιάς (<i>Bactrocera oleae</i>)	9
1.1 Βιολογικός κύκλος	9
1.2 Προκαλούμενη ζημιά	10
2. Καταπολέμηση του δάκου της ελιάς	11
2.1 Χημικές και μη χημικές μέθοδοι αντιμετώπισης	11
2.2.1 Τεχνική στείρου εντόμου (S.I.T)	12
2.2.2 Μέθοδος απελευθέρωσης εντόμων που φέρουν επικρατές θνησιγόνο γονίδιο (RIDL)	15
3. Αναπαραγωγικό σύστημα των αρσενικών εντόμων	17
4. Τρανσκριπτομική ανάλυση	19
5. Πρωτεάσες	20
ΣΚΟΠΟΣ	21
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	22
Απομόνωση RNA (RNA extraction)	22
Επεξεργασία με DNase (DNase Treatment)	24
Σύνθεση cDNA (cDNA Treatment)	25
Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης	26
Απομόνωση μορίων DNA από πηκτή αγαρόζης (gel DNA recovery)	27
Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	28
Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real Time PCR)	29
Δημιουργία δίκλωνου RNA (dsRNA)	31
Παροδική αποσιώπηση γονιδίων (RNA silencing)	33
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	34
Μελέτη έκφρασης λυσοσωμικής πρωτεάσης του ασπαρτικού	34
Παροδική σίγηση γονιδίου λυσοσωμικής ασπαρτικής πρωτεάσης	36
Μελέτη αποτελεσμάτων της αποσιώπησης στα συζευγμένα θηλυκά έντομα <i>B. oleae</i>	

ΣΥΖΗΤΗΣΗ	40
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	42
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	49

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.Ο Δάκος της ελιάς (*Bactrocera oleae*)

1.1 Βιολογικός κύκλος

Ο δάκος της ελιάς, *Bactrocera oleae* (Εικόνα 1), ανήκει στην οικογένεια Tephritidae των δίπτερων εντόμων. Κατά την περίοδο του χειμώνα το έντομο βρίσκεται σε χειμερία νάρκη, συνήθως με τη μορφή νύμφης στο έδαφος και σε βάθος 1-6 εκατοστά. Την άνοιξη, από τις νύμφες του εδάφους, προέρχονται τα πρώτα ενήλικα άτομα (1η γενιά), τα οποία συνήθως ζουν για ένα μήνα αν και μπορούν να φτάσουν και μέχρι τους δύο [1]. Στα τέλη της άνοιξης και με τις κατάλληλες περιβαλλοντικές συνθήκες τα αρσενικά αρχίζουν να προσελκύουν τα θηλυκά προκειμένου να συζευχθούν [2]. Μετά την επιτυχή σύζευξη το θηλυκό αποθέτει τα αυγά του στο μεσοκάρπιο του ανώριμου ακόμα καρπού της ελιάς. Σε κάθε καρπό αποθέτεται ένα αυγό ενώ, συνήθως, ένα θηλυκό γεννά 12 αυγά την ημέρα και μπορεί να γεννήσει συνολικά έως και 250 αυγά. Μετά από διάστημα 2-4 ημερών το αυγό εκκολάπτεται σε προνύμφη, η οποία χρησιμοποιεί τη σάρκα του ελαιόκαρπου ως τροφή. Το έντομο παραμένει σε αυτή τη μορφή για 14-16 ημέρες. Μέσα σε αυτό το χρόνο η προνύμφη δημιουργεί μια στρογγυλή τρύπα στον καρπό, την “οπή εξόδου του ακμαίου”, η οποία χρησιμοποιείται, σε μετέπειτα



Εικόνα 1: Αρσενικό (πάνω) και θηλυκό (κάτω) έντομο *Bactrocera oleae*

στάδιο, από το ενήλικο άτομο για την έξοδο του από τον καρπό. Η αναπτυσσόμενη προνύμφη υφίσταται τρεις διαδοχικές εκδύσεις και εν τέλει μεταμορφώνεται σε νύμφη. Το έντομο βρίσκεται βομβυκιωμένο (σε κουκούλι) για διάστημα 12-14 ημερών στο τέλος των οποίων, εφόσον υπάρχουν οι κατάλληλες περιβαλλοντικές συνθήκες, εξέρχεται ως ενήλικο άτομο από τον καρπό, όπως προαναφέρθηκε [Εικόνα 2]. Ο δάκος χαρακτηρίζεται επίσης ως έντομο πολικυκλικό καθώς εμφανίζει 4-5 γενιές το χρόνο ανάλογα με τις καιρικές συνθήκες με την τελευταία να εμφανίζεται τους μήνες Σεπτέμβρη και Οκτώβρη στην περιοχή της Μεσογείου [3].



Εικόνα 2: Βιολογικός κύκλος του εντόμου

1.2 Προκαλούμενη ζημιά

Ο δάκος της ελιάς θεωρείται το κυριότερο παράσιτο των ελαιοκαλλιεργειών παγκοσμίως. Σε περιόδους έξαρσης του εντόμου η ζημιά μπορεί να φτάσει και το 50% της συνολικής παραγωγής στις ελαιοπαραγωγικές περιοχές της Μεσογείου [42], ενώ οικονομικά το μέσο κόστος της καταστροφής υπολογίζεται σε τουλάχιστον 800 εκατομμύρια δολάρια ετησίως [44]. Η καταστροφή που επιφέρει το είδος *Bactrocera oleae* στον ελαιόκαρπο οφείλεται κυρίως στο ότι ως προνύμφη χρησιμοποιεί το



Εικόνα 3: Προσβεβλημένες και ακατάλληλες προς βρώση ελιές

μεσοκάρπιο προκειμένου να τραφεί, με αποτέλεσμα ο καρπός να καταστρέφεται και να πέφτει στο έδαφος.

Μια προνύμφη μπορεί να καταναλώσει το 1/5- 1/4 ενός μέσου καρπού, ενώ οι στοές που δημιουργεί στους άγουρους καρπούς εμφανίζονται εξωτερικά σαν σκούρες ελαιώδεις κηλίδες. Σε συνθήκες υγρασίας τα σημεία εκείνα, ξεραίνονται ή σαπίζουν αν ο καρπός είναι υγρός. Επιπλέον τα νύγματα που δημιουργεί το θηλυκό στους καρπούς προκειμένου να ελέγξει αν το περιβάλλον τους είναι κατάλληλο για να αποθέσει τα αυγά του, ακόμα και αν δε χρησιμοποιηθούν, αποτελούν σημεία προσβολής από μύκητες, όπως το *Camarosporium dalmaticum*, το οποίο προκαλεί την ασθένεια της ξηροβούλας με αποτέλεσμα τη σήψη και πτώση του καρπού [119], συνέπειες εξίσου καταστρεπτικές με την παρουσία αυγού στον καρπό (Εικόνα 4).



Εικόνα 4: Ελαιόκαρπος προσβεβλημένος από *Camarosporium dalmaticum*

Τα παραπάνω προκαλούν τόσο ποσοτική όσο και ποιοτική υποβάθμιση του ελαιόκαρπου καθώς ακόμα και όταν ο καρπός φαίνεται υγιής το εσωτερικό του έχει έρθει σε επαφή με τον ατμοσφαιρικό αέρα, με αποτέλεσμα την οξείδωση του και κατά συνέπεια την αύξηση της περιεκτικότητας σε οξέα του λαδιού που παράγεται, καθιστώντας την ελιά ακατάλληλη για κατανάλωση είτε σε μορφή λαδιού είτε ως επιτραπέζια [43] (Εικόνα 3).

2. Καταπολέμηση του δάκου της ελιάς

2.1 Χημικές και μη χημικές μέθοδοι αντιμετώπισης

Η καταπολέμηση του δάκου πραγματοποιείται με βιολογικές ή χημικές μεθόδους οι οποίες χρησιμοποιούνται ανεξάρτητα ή σε συνδυασμό. Όσον αφορά τους βιολογικούς τρόπους αντιμετώπισης του δάκου, αυτοί ως επί το πλείστον περιλαμβάνουν τη χρήση άλλων οργανισμών οι οποίοι μπορεί να είναι είτε παρασιτικοί προς το δάκο, π.χ. *Eupelmus urozonus* [120] (Εικόνα 5), είτε θηρευτές του, οι οποίοι εισάγονται στο οικοσύστημα, π.χ. *Prolasioptera berlesiana* [121]. Ένας άλλος τρόπος καταπολέμησης είναι η μαζική παγίδευση. Σε αυτή τη μέθοδο χρησιμοποιούνται διαφόρων τύπων παγίδες, όπως τροφικές, χρωματικές ή φερομονικές προκειμένου να προσελκύσουν το έντομο, οι οποίες είναι επαλειμμένες με ειδική κολλώδη ουσία προκειμένου εν τέλει να θανατώνονται τα ενήλικα [122]. Η χρήση παγίδων είναι αποτελεσματική σε αραιούς πληθυσμούς του δάκου. Σε μεγαλύτερα μεγέθη πληθυσμών είναι αναποτελεσματικές και για αυτό το λόγο η χρήση τους συνδυάζεται με την πραγματοποίηση ενός ή δυο ψεκασμών με εντομοκτόνο.



Εικόνα 5: Ενήλικο *Eupelmus urozonus*

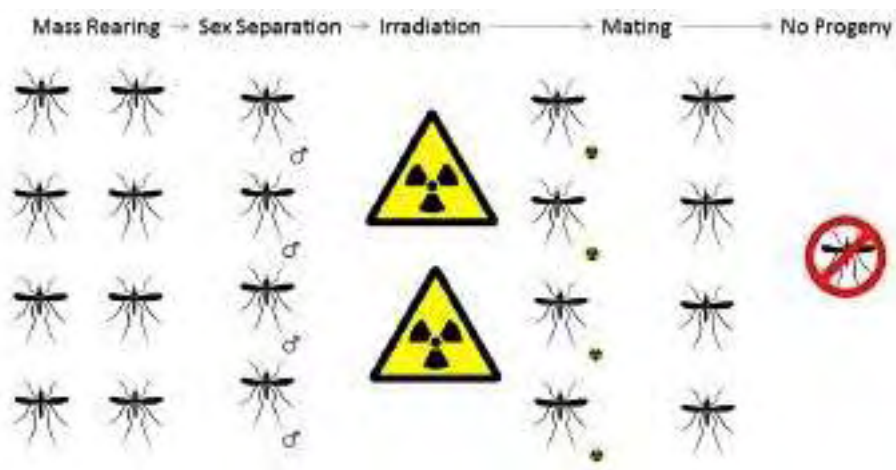
Η καταπολέμηση του δάκου πραγματοποιείται κυρίως με χημικούς τρόπους. Ένας βασικός τρόπος χημικής καταπολέμησης είναι ο δολωματικός ψεκασμός όπου πραγματοποιείται ψεκασμός με δολωματικά εντομοκτόνα (δηλ. περιέχουν ελκυστικό) σε σκιερό μέρος της ελιάς. Συνήθως ψεκάζεται ένα κλαδί ή ορισμένο μέρος του φυλλώματος της ελιάς σε κάθε δένδρο ή ανά δύο με τρία δένδρα ανάλογα με την πυκνότητα του ελαιώνα. Σκοπός είναι η προσέλκυση και θανάτωση του ενήλικου ατόμου πριν αποθέσει τα αυγά του. Μια άλλη χημική μέθοδος είναι ο ψεκασμός κάλυψης, όπου η κόμη του δένδρου καλύπτεται με εντομοκτόνα με σκοπό να σκοτωθούν τα ενήλικα άτομα και οι προνύμφες που βρίσκονται εντός του καρπού.

Η μακροχρόνια χρήση των εντομοκτόνων έχει επιβλαβείς επιπτώσεις τόσο στον άνθρωπο όσο και στο περιβάλλον [45]. Επίσης, η ανεξέλεγκτη χρήση τους οδηγεί στην εμφάνιση ανθεκτικότητας στα είδη τα οποία στοχεύουν. Για αυτούς τους λόγους, φαίνεται αναγκαία η ανάπτυξη νέων τεχνικών καταπολέμησης των εντόμων. Θεωρείται ότι η βιοτεχνολογική προσέγγιση στο πρόβλημα μπορεί να δώσει λύση. Στόχος των μεθόδων που έχουν αναπτυχθεί, είναι η μείωση της αναπαραγωγικής ικανότητας του πληθυσμού, δηλαδή η μείωση του μέσου όρου των απογόνων ενός ενήλικου που θα επιβιώσουν και θα δώσουν απογόνους. Εάν η μέση αναπαραγωγική ικανότητα μειωθεί κάτω της μονάδας τότε ο πληθυσμός δεν ανανεώνεται και μειώνεται σε μέγεθος. Οι περισσότεροι πληθυσμοί εξαρτώνται από την πυκνότητα τους όπου μια μέτρια μείωση της αναπαραγωγής τους έχει ως αποτέλεσμα να επέλθει ένα νέο χαμηλότερο ισοζύγιο. Έτσι υπάρχει μείωση του πληθυσμού άλλα όχι εξάλειψή του. Ανάλογα με τον πληθυσμό είναι διαφορετικός ο βαθμός στον οποίο μπορεί να ανεχθεί την στείρωση και τη θνησιμότητα. Εάν ξεπεραστεί αυτό το όριο τότε υπάρχει εξάλειψη του πληθυσμού. Μια πολλά υποσχόμενη, φιλική προς το περιβάλλον, εναλλακτική μέθοδος αντιμετώπισης των επιβλαβών εντόμων είναι η μέθοδος στέρων εντόμων (S.I.T.)

2.2 Εναλλακτικές μέθοδοι αντιμετώπισης

2.2.1 Τεχνική στείρου εντόμου (S.I.T)

Η τεχνική του στείρου εντόμου (sterile insect technique, S.I.T.) περιλαμβάνει την απελευθέρωση μεγάλου αριθμού στείρων εντόμων σε μια συγκεκριμένη περιοχή με στόχο τη μείωση της αναπαραγωγής των εντόμων του ίδιου είδους σε αυτή. Ο αριθμός των απογόνων του εντόμου-παρασίτου μειώνεται καθώς τα αγρίου τύπου άτομα ζευγαρώνουν με έντομα τα οποία έχουν καταστεί στείρα. Ο πιο διαδεδομένος τρόπος στείρωσης των εντόμων είναι η ακτινοβόλησή τους, στο στάδιο της νύμφης [8], με ιονίζουσα ακτινοβολία (ακτίνες X ή γ) (Εικόνα 6). Η S.I.T έχει αποδειχθεί μια πολύ αποτελεσματική μέθοδος καταπολέμησης καθώς μπορεί να πραγματοποιήσει ακόμη και εξάλειψη ενός πληθυσμού αν στην περιοχή επαναληφθούν οι απελευθερώσεις στείρων ατόμων. Η συγκεκριμένη τεχνική θεωρείται μια από τις πιο φιλικές περιβαλλοντικά μεθόδους αντιμετώπισης των παρασίτων καθώς: 1) τα στείρα έντομα δεν μπορούν να εδραιωθούν στο περιβάλλον όπου εισάγονται αφού δεν αναπαράγονται, 2) η μέθοδος είναι ειδική ως προς ένα συγκεκριμένο είδος εντόμου και 3) δεν εισάγεται στο οικοσύστημα ένα νέο είδος που θα διαγωνιστεί [4].



Εικόνα 6: Τυπικό πρόγραμμα S.I.T.: Μαζική παραγωγή εντόμων, διαχωρισμός τους με βάση το φύλο, ακτινοβόληση και στείρωση των αρσενικών και απελευθέρωση τους για σύζευξη με θηλυκά χωρίς να δώσουν απογόνους.

Η επιτυχία της μεθόδου εξαρτάται από πολλές παραμέτρους πριν και μετά την απελευθέρωσή των εντόμων. Όσον αφορά τις φάσεις που προηγούνται της απελευθέρωσης, αρχικά πρέπει να εξεταστεί το ποσό της ακτινοβολίας που χρησιμοποιείται για τη στείρωση, το οποίο εξαρτάται από το είδος ή το γένος του εντόμου. Για παράδειγμα, είναι πλέον γνωστό ότι τα λεπιδόπτερα απαιτούν πολύ μεγαλύτερο ποσό ιονίζουσας ακτινοβολίας από τα δίπτερα προκειμένου να επιτευχθεί η πλήρης στείρωσή τους [9, 10, 11]. Η χρονική στιγμή στην οποία θα πραγματοποιηθεί η ακτινοβόληση είναι πολύ σημαντική για τη βιωσιμότητα και την ικανότητα του εντόμου να συζευχθεί [12]. Στο τελευταίο, πολύ σημαντικό ρόλο έχει η ικανότητα των στείρων εντόμων να μπορούν να εντοπίσουν και να συναγωνιστούν τα αγρίου τύπου άτομα για σύζευξη [7]. Αυτή η ικανότητα μπορεί να επηρεαστεί αρνητικά σε μεγάλο βαθμό λόγω της μαζικής παραγωγής των εντόμων ή/και της ακτινοβόλησής τους. Όσον αφορά τη χρήση ακτινοβολίας, αυτή προκαλεί βλάβες στα σωματικά κύτταρα με τρόπο εξαρτώμενο της δόσης της, ο οποίος εξαρτάται και από την ηλικία/μέρα που γίνεται η ακτινοβόληση [12, 13, 14]. Μελέτες έχουν δείξει ότι η ακτινοβόληση των αρσενικών σε όσο το δυνατόν μετέπειτα στάδιο της ζωής τους μπορεί να δώσει πολύ ικανοποιητικά

αποτελέσματα. Η ευαισθησία των κυττάρων στην ακτινοβολία μειώνεται λόγω του τερματισμού των μιτωτικών τους διαιρέσεων και έτσι αν και στείρα αυτά τα έντομα φαίνεται να μπορούν να ανταγωνιστούν σχεδόν ισάξια τα αγρίου τύπου αρσενικά. Οι επιδράσεις τις ακτινοβολήσης είναι πολύ μεγαλύτερες όταν αυτή πραγματοποιείται στο στάδιο της νύμφης, όμως αυτό το στάδιο προτιμάται κατά κόρον καθώς ο χειρισμός των νυμφών είναι πολύ ευκολότερος και τα ενήλικα άτομα είναι πολύ πιο ευαίσθητα σε αυτόν [15, 16, 17, 18, 19]. Οι βλάβες που προκαλεί η ακτινοβολήση είναι αντιληπτές μέσω της μείωσης της μακροβιότητας, της σεξουαλικής ορμής και της γενικότερης δραστηριότητας που παρουσιάζουν τα έντομα [20]. Παρόλα αυτά, η μείωση του ποσού της ακτινοβολίας που χρησιμοποιείται για τη στείρωση μπορεί να οδηγήσει και σε σημαντική μείωση της στειρότητας που επέρχεται στα έντομα και άρα να απελευθερωθούν και γόνιμα άτομα. Για αυτό είναι σημαντικό για κάθε διαφορετικό είδος στο οποίο γίνεται χρήση της κλασικής S.I.T. να πραγματοποιείται η ανάλογη βελτιστοποίηση των εργαλείων, των πρωτοκόλλων και κυρίως η εύρεση του κατάλληλου ποσού ακτινοβολίας [21]. Επίσης, για την αποφυγή αυτού του ενδεχόμενου, είναι σημαντικό το ίδιο ποσό ακτινοβολήσης να δίνει στείρα άτομα και στα δύο φύλα καθώς ο διαχωρισμός τους μπορεί να μην είναι πάντα ακριβής.

Πέραν της ακτινοβολίας, η εργαστηριακή εκτροφή των εντόμων φαίνεται πως επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό την αναπαραγωγική ικανότητα τους αλλά και τη βιωσιμότητα τους [22]. Η οποιαδήποτε εργαστηριακή παραγωγή εντόμων, πόσο μάλλον η μαζική, η οποία χρησιμοποιείται για την S.I.T., εκθέτει τα έντομα σε συνθήκες πολύ διαφορετικές από αυτές του φυσικού τους περιβάλλοντος. Οι κυριότερες είναι η έλλειψη γενετικής ποικιλότητας που συναντάται συχνά στους εργαστηριακούς πληθυσμούς [23], η τεχνητή διαίτα, οι σταθερές συνθήκες περιβάλλοντος και η υψηλής πυκνότητας εκτροφή οι οποίες φαίνεται να επηρεάζουν την συνολική ποιότητα των ενήλικων εντόμων που παράγονται καθώς και να υπονομεύουν την ικανότητα τους να ενσωματωθούν στους φυσικούς πληθυσμούς, να ανταγωνιστούν επαρκώς και να συζευχθούν επιτυχώς με τα αγρίου τύπου άτομα [24].

Κατά την απελευθέρωση των εντόμων στη φύση, κεντρικής σημασίας είναι η αναλογία των στείρων προς τα αγρίου τύπου άτομα. Στη φύση δε γίνεται εύκολα επιλογή των στείρων εντόμων από τα αγρίου τύπου γεγονός που θεωρείται ότι κατά κύριο λόγο οφείλεται στη μειωμένη ανταγωνιστικότητα που παρουσιάζουν λόγω της ακτινοβολήσής τους. Έτσι για να επιτύχει η μέθοδος πρέπει η αναλογία των στείρων προς τα αγρίου τύπου άτομα να είναι πολύ μεγάλη. Σε εφαρμογές της μεθόδου στη *Ceratits capitata* πολλές φορές η αναλογία φτάνει στα 50-100 στείρα αρσενικά ανά 1 αγρίου τύπου αρσενικό [25]. Επίσης μελέτες έχουν δείξει ότι υπάρχει μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα της S.I.T όταν σε μια περιοχή απελευθερώνονται άτομα μόνο ενός γένους. Σε αυτή την περίπτωση, προτιμάται η χρήση αρσενικών ατόμων καθώς τα θηλυκά αν και στείρα διατηρούν την ικανότητα απόθεσης αυγών, και αρά στις περισσότερες περιπτώσεις εξακολουθούν να μπορούν να προκαλέσουν καταστροφές στους καρπούς ενώ, επιπλέον, είναι εκείνα τα οποία είναι φορείς ασθeneιών (π.χ. στα κουνούπια ο δάγκειος πυρετός και η ελονοσία [21]). Έχουν πραγματοποιηθεί πολλές προσπάθειες ανάπτυξης τεχνικών διαχωρισμού των εντόμων ανάλογα με το φύλο τους, σε όσο το δυνατόν πρωιμότερο στάδιο, κυρίως για λόγους μείωσης κόστους, καθώς εν τέλει γίνεται χρήση μόνο του μισού πληθυσμού (η αναλογία θηλυκών και αρσενικών ατόμων που γεννιούνται είναι ίση). Για αυτόν τον σκοπό οι κύριες τεχνικές οι οποίες χρησιμοποιούνται αναφέρονται ως GSSs (genetic sexing systems) [26]. Σε αυτές γίνεται διαχωρισμός των θηλυκών με βάση μια φαινοτυπική διαφορά, όπως το χρώμα της νύμφης [27], την ανοχή στην αλκοόλη [28] ή την θερμική ευαισθησία [29], η οποία συνδέεται με το φύλο. Η σύνδεση αυτή συνήθως γίνεται εφικτή με μεταθέσεις αυτοσωμικών γονιδίων στο Y χρωμόσωμα το οποίο καθορίζει το αρσενικό φύλο [26]. Η γενετική τροποποίηση και η



Εικόνα 7: Μηχάνημα ακτινοβολήσης εντόμων

αγωγή, σε συνήθως ακραίες συνθήκες ώστε να επιτευχθεί ο διαχωρισμός μπορεί να αποτελέσει έναν ακόμα επιβαρυντικό παράγοντα για τον εργαστηριακό πληθυσμό [30]. Επίσης αξίζει να σημειωθεί ότι κάποιες από τις χημικές ουσίες οι οποίες χρησιμοποιούνται για το διαχωρισμό των θηλυκών από τα αρσενικά φαίνεται ότι μπορεί να προσδίδουν ένα είδος προστασίας στην ακτινοβολία, καθώς οδηγούν στην ενεργοποίηση μηχανισμών αντίστασης στο stress οι οποίοι συμβάλλουν στην άμεση ενεργοποίηση των μηχανισμών οι οποίοι προστατεύουν από την ακτινοβολία [31].

Τέλος, είναι σημαντικό να συνυπολογιστούν οι συνέπειες της πολυανδρίας (ένα θηλυκό ζυγαρώνει επιτυχώς με παραπάνω του ενός αρσενικά) που συναντάται σε κάποια είδη εντόμων, π.χ. *Tribolium castaneum* [109, 110]. Σε αυτό το σημείο, πρέπει να σημειωθεί ότι τα θηλυκά του είδους *Bactrocera oleae* είναι ολιγογαμικά και πραγματοποιούν 1-3 συζεύξεις καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής τους [127, 128]. Σε μονογαμικά είδη, το βασικό χαρακτηριστικό είναι τα αρσενικά να βρίσκονται σε θέση να πραγματοποιήσουν επιτυχή σύζευξη και να αναστείλουν τη δεκτικότητα των θηλυκών σε άλλα αρσενικά όπως θα πραγματοποιούσαν και τα αγρίου τύπου αρσενικά. Σε είδη στα οποία συναντάται πολυανδρία, ο ανταγωνισμός του σπέρματος για την γονιμοποίηση των ωαρίων, ο αριθμός των σπερματοζωαρίων και η ικανότητα των αρσενικών να πραγματοποιούν επαναλαμβανόμενες συζεύξεις αποκτούν πολύ σημαντικό ρόλο [111, 112]. Μελέτες δείχνουν ότι η πολυανδρία μπορεί να μην αποτελεί αρνητικό παράγοντα στην επιτυχία αυτών των προγραμμάτων υπό τις προϋποθέσεις ότι δεν πραγματοποιείται αντικατάσταση σπέρματος μετά από κάθε διαδοχική σύζευξη και το σπέρμα και των δυο αρσενικών είναι εξίσου ανταγωνιστικό [111, 113, 114, 115]. Πληθυσμοί πολυγαμικών εντόμων έχουν εξαιρεθεί επιτυχώς με τη χρήση της S.I.T όπως του είδους *Dacus cucurbitae* [116].

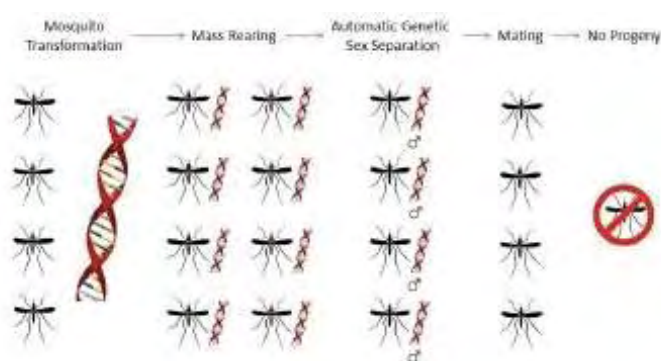
Η S.I.T. έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία σε πολλές περιοχές για την καταπολέμηση διαφόρων ειδών εντόμων-παρασίτων (area-wide integrated pest management, AW-IPM) τα τελευταία 50 χρόνια, όπως η Μεσογειακή μύγα (*Ceratitis capitata*), η μύγα τσε τσε (*Glossina spp*) κ.α [6]. Παρόλα αυτά, στο δάκο δεν έχει παρουσιάσει την ίδια επιτυχία. Έχουν καταγραφεί δυο προσπάθειες χρήσης της τεχνικής στο παρελθόν [47, 48]. Και στις δυο πραγματοποιήθηκε απελευθέρωση, σε συγκεκριμένες περιοχές, θηλυκών και αρσενικών ατόμων (κατά την πρώτη απόπειρα απελευθερώθηκαν 150.000 έντομα), τα οποία είχαν ακτινοβοληθεί με ακτίνες γ. Στο τέλος της εποχής συγκομιδής έγινε σύγκριση του ποσοστού προσβολής από το δάκο ανάμεσα σε ελαιοκαλλιέργειες στις οποίες είχαν απελευθερωθεί ή όχι στείρα έντομα και παρατηρήθηκε ότι δεν υπήρχε μείωση της προσβολής του καρπού. Η αποτυχία της μεθόδου σε αυτές τις περιπτώσεις θεωρήθηκε ότι οφειλόταν κυρίως στο γεγονός ότι τα ακτινοβολημένα-στείρα έντομα τα οποία παράγονταν μαζικά παρουσίαζαν πολύ χαμηλότερη ανταγωνιστικότητα σε σχέση με τα αγρίου τύπου έντομα. Ένας ακόμα σημαντικός παράγοντας ο οποίος, εν τέλει, αποδείχθηκε ήταν πως η ώρα κατά την οποία τα έντομα προτιμούσαν να συζευχθούν διέφερε ανάμεσα στους φυσικούς και τους εργαστηριακούς πληθυσμούς με αποτέλεσμα η επιθυμητή διασταύρωση μεταξύ των δύο πληθυσμών να είναι δύσκολη έως ανύπαρκτη. Τέλος, πρέπει να σημειωθεί ότι η ακτινοβολία και παραγωγή ενός μεγάλου πληθυσμού αυτών των εντόμων ήταν οικονομικά ασύμφορη για αυτό και δεν ακολούθησαν νέες προσπάθειες βελτίωσης και εφαρμογής της S.I.T. [5].

2.2.2 Μέθοδος απελευθέρωσης εντόμων που φέρουν επικρατές θνησιγόνο γονίδιο (RIDL)

Μια παραλλαγή της S.I.T. η οποία αντιμετωπίζει κάποια από τα παραπάνω προβλήματα είναι η RIDL (Release of Insects carrying a Dominant Lethal). Σε αυτή την τεχνική απελευθερώνονται στο περιβάλλον άτομα ομόζυγα ως προς ένα επικρατές θνησιγόνο γονίδιο, η έκφραση του οποίου καταστέλλεται με τη χρήση ενός συστήματος υποκινητή-καταστολέα. Όταν αυτά τα άτομα, συζευχθούν με αγρίου τύπου έντομα, δίνουν απογόνους ετερόζυγους ως προς το θνησιγόνο γονίδιο οι οποίοι πεθαίνουν, συνήθως στο στάδιο της προνύμφης ή της νύμφης, μειώνοντας έτσι τον πληθυσμό του εντόμου στην περιοχή (Εικόνα 8). Η θνησιμότητα φαίνεται να φτάνει τα ποσοστά του 95-97%.. Το σύστημα βασίζεται στα ρυθμιστικά στοιχεία του Tn10 οπερονίου ανθεκτικότητας στην τετρακυκλίνη του βακτηρίου *Escherichia coli*, όπου η μεταγραφή γονιδίων που συμβάλουν στην ανθεκτικότητα στην τετρακυκλίνη ρυθμίζεται αρνητικά από τον καταστολέα της τετρακυκλίνης (*tetR*). Παρουσία του αντιβιοτικού ή παραγώγων του (συνηθέστερα δοξυκυκλίνης), ο καταστολέας δεν προσδένεται στην ρυθμιστική περιοχή του, εντός του υποκινητή και έτσι επιτρέπεται η μεταγραφή του οπερονίου. Προκειμένου το σύστημα να μεταφερθεί στους ευκαρυώτες, ο καταστολέας είναι συζευγμένος με την καρβοξυτελική περιοχή της πρωτεΐνης VP16 του ιού HSV, στην οποία οφείλεται η μεταγραφή ορισμένων γονιδίων, παράγοντας έτσι υβριδικές πρωτεΐνες που προάγουν τη μεταγραφή γονιδίων οι υποκινητές των οποίων περιέχουν περιοχές ελέγχου του οπερονίου (*tetO*). Τα γονίδια είναι πρακτικά σιγασμένα παρουσία μικρών συγκεντρώσεων του αντιβιοτικού καθώς το σύμπλεγμα δε μπορεί να προσδεθεί στις *tetO* αλληλουχίες και να τις ενεργοποιήσει [32, 33].

Με τη μέθοδο αυτή βρίσκονται υπό έλεγχο πολλές παράμετροι οι οποίες αφορούν τη θνησιμότητα των εντόμων. Οι κυριότερες είναι το φύλο και το στάδιο στο οποίο επέρχεται ο θάνατος. Μια εκδοχή της μεθόδου, οι οποία έχει μελετηθεί στο είδος *Ceratitis capitata* [49], είναι η fsRIDL. Σε αυτήν πραγματοποιείται μαζική απελευθέρωση αρσενικών ατόμων, τα οποία φέρουν ένα ειδικό προς τα θηλυκά θνησιγόνο διαγονίδιο [34-37]. Η σύζευξη των διαγονιδιακών αρσενικών με τα αγρίου τύπου θηλυκά έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή μη βιώσιμων θηλυκών απογόνων και με αυτόν τον τρόπο μειώνεται η αναπαραγωγική ικανότητα του αγρίου τύπου πληθυσμού. Φυσικά οι αρσενικοί απόγονοι επιβιώνουν, όμως οι μισοί θηλυκοί απόγονοι αυτών είναι μη βιώσιμοι. Με αυτόν τον τρόπο η μέθοδος έχει αποτελέσματα σε παραπάνω από μια γενιές [38, 39]. Εάν η σύζευξη αρσενικών επαναληφθεί αρκετές φορές, μπορεί να υπάρξει εξαφάνιση του πληθυσμού.

Επίσης, ανάλογα με το είδος του εντόμου που καταπολεμάται, αλλάζει και το επιθυμητό στάδιο της ζωής του στο οποίο επέρχεται η θνησιμότητα. Το βασικό κριτήριο είναι ότι τα έντομα πρέπει να πεθαίνουν πριν από το στάδιο στο οποίο προκαλούν ζημιά. Για παράδειγμα, στο είδος *Aedes aegypti*, το στάδιο αυτό είναι οποιοδήποτε πριν την ενηλικίωση αλλά όχι απαραίτητα κατά την εμβρυογένεση. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι στο συγκεκριμένο είδος τα αυγά του πληθυσμού εναποτίθενται όλα στο ίδιο μέρος και έτσι οι προνύμφες ανταγωνίζονται μεταξύ τους για τροφή. Αν λοιπόν ο θάνατος επέρχεται στο στάδιο της νύμφης τότε ο ανταγωνισμός μεταξύ των προνυμφών μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα τη θανάτωση περισσότερων εντόμων καθώς η έλλειψη προνυμφών δίνει πλεονέκτημα σε περισσότερες φυσιολογικές προνύμφες να ενηλικιωθούν αφού δεν υπάρχει σημαντικός ανταγωνισμός για την εύρεση τροφής [6]. Σε άλλα είδη όπως τα *Bactrocera oleae* και *Ceratitis capitata* [49] όπου κάθε αυγό εναποτίθεται σε ένα καρπό είναι



Εικόνα 8: Τυπικό σύστημα R.I.D.L.: εντοπισμός σταθερού στελέχους γενετικά τροποποιημένου εντόμου, μαζική παραγωγή εντόμων, διαχωρισμός φύλου και απελευθέρωση στη φύση

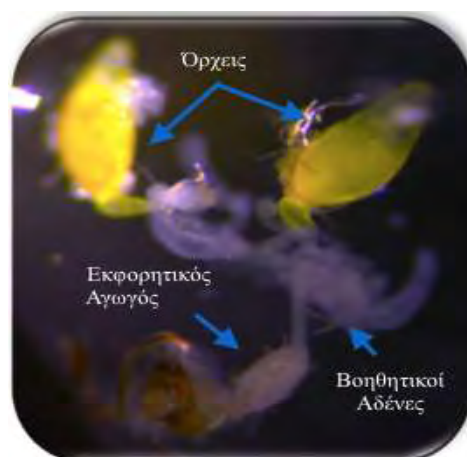
προτιμότερο να πεθαίνουν κατά την εμβρυογένεση, ώστε να μην χρησιμοποιούν και καταστρέφουν τους καρπούς ως προνύμφες ή νύμφες.

Ενώ η S.I.T. είναι μια μέθοδος μείωσης του πληθυσμού (population reduction) η RIDL χαρακτηρίζεται ως μέθοδος αντικατάστασης του πληθυσμού (population replacement) αγρίου τύπου με διαγονιδιακά έντομα που φέρουν ένα επιθυμητό χαρακτηριστικό. Στη συγκεκριμένη περίπτωση το θνησιγόνο γονίδιο [40]. Όπως και στην S.I.T., η επιτυχία της τεχνικής εν τέλει εξαρτάται από την ανταγωνιστικότητα και τη βιωσιμότητα των διαγονιδιακών εντόμων σε σχέση με τα αγρίου τύπου. Στην RIDL δεν παρατηρείται η σημαντική κατάπτωση του πληθυσμού η οποία αναφέρθηκε προηγουμένως. Κατά τη χρήση της μεθόδου, όπως πραγματοποιήθηκε στο είδος *Ceratitis capitata* [6], έχουν παρατηρηθεί και μειονεκτήματα όπως μικρή μείωση της βιωσιμότητας των ατόμων, τα οποία όμως πιθανόν να μπορούν να αντιμετωπισθούν με βελτίωση των πρωτοκόλλων παραγωγής και διαχείρισης των εργαστηριακών πληθυσμών. Επίσης είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η θέση στην οποία εισάγεται το γονίδιο μπορεί να αποδειχθεί πολύ σημαντική καθώς είναι πιθανόν να μπορεί να επηρεάσει χαρακτηριστικά του εντόμου όπως την διάρκεια ζωής του ή την ικανότητά του να πετάξει. Για να αντιμετωπισθεί αυτό το πρόβλημα υπάρχει η πρόταση της δημιουργίας πολλών διαγονιδιακών σειρών, ώστε εν τέλει να γίνεται αξιοποίηση εκείνης ή εκείνων που φέρουν τα καλύτερα χαρακτηριστικά [6]. Επιπλέον, όσον αφορά την S.I.T., μελέτες δείχνουν ότι τα ποσοστά επανασύζευξης των θηλυκών με ακτινοβολημένα αρσενικά σε σχέση με μη είναι σημαντικά μεγαλύτερα [50]. Αυτό το φαινόμενο δεν παρατηρείται στην RIDL. Η “υγεία” του σπέρματος μπορεί να είναι κύριας σημασίας για την επιτυχία της οποιασδήποτε μεθόδου ανάλογα με το είδος του εντόμου. Υπάρχουν θηλυκά τα οποία πραγματοποιούν μόνο μια σύζευξη αν την θεωρήσουν επιτυχή. Συνήθως αυτό εξαρτάται από πρωτεΐνες των σπερματικών υγρών, όπως θα αναφερθεί στην συνέχεια, και σε αυτά δεν υπάρχει πρόβλημα αν λαμβάνεται σπέρμα ή όχι. Σε περίπτωση, όμως, που το θηλυκό πραγματοποιεί πολλαπλές συζεύξεις, τότε υπάρχει ανταγωνισμός σπέρματος εντός του θηλυκού. Έτσι, αν το αρσενικό έχει καταστεί στειρό λόγω της ακτινοβολίας, και πιθανότατα το σπέρμα του είναι εξασθενημένο, το πιθανότερο είναι πως δε θα υπάρξει σημαντική διαφορά στον αριθμό των απογόνων του θηλυκού. Αν όμως χρησιμοποιηθεί η RIDL το σπέρμα θα είναι υγιές και ο θάνατος των απογόνων θα επέλθει κατά την φάση της εμβρυογένεσης, προκαλώντας σημαντική διαφορά [41].

Πριν από λίγα χρόνια, δημιουργήθηκε το πρώτο διαγονιδιακό έντομο του είδους *Bactrocera oleae* με τη μέθοδο R.I.D.L. Σε αυτό προστέθηκε μια κατασκευή η οποία έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία στη *Ceratitis capitata* και προκαλεί θνησιμότητα των θηλυκών. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων ήταν ιδιαίτερα ενθαρρυντικά καθώς παρατηρήθηκε υψηλή θνησιμότητα των θηλυκών απογόνων κατά τα πρώτα στάδια της νύμφης απουσία του καταστολέα. Επιπλέον τα διαγονιδιακά αρσενικά έδειξαν να είναι ανταγωνιστικά με τα αρσενικά αγρίου τύπου σε βαθμό πολύ υψηλότερο από αυτόν που είχε παρατηρηθεί με τη μέθοδο S.I.T. και να πραγματοποιούν σύζευξη την ίδια χρονική περίοδο. Επίσης, τα θηλυκά που πραγματοποίησαν σύζευξη με τα διαγονιδιακά αρσενικά παρουσίασαν μειωμένη επανασύζευξη, το οποίο αποτελεί ένα πολύ σημαντικό χαρακτηριστικό για την επιτυχία της μεθόδου στη φύση, καθώς συνήθως σε περίπτωση επανασύζευξης προτιμάται ένα αρσενικό αγρίου τύπου το οποίο και δίνει υγιείς απογόνους μειώνοντας την επιτυχία της μεθόδου. Τέλος, έγιναν πειράματα καταστολής πληθυσμού δάκου αγρίου τύπου σε θερμοκήπια με μεγάλη επιτυχία, καθώς ο πληθυσμός εξαλειφθηκε σε διάστημα 12 εβδομάδων από την απελευθέρωση των διαγονιδιακών δάκων [5]. Το 2013, αυτός ο διαγονιδιακός δάκος επιχειρήθηκε από την αγγλική εταιρία βιοτεχνολογίας Oxitec να απελευθερωθεί στην κύρια ελαιοπαραγωγική περιοχή της Καταλονίας. Η πρόταση εν τέλει αποσύρθηκε από την εταιρία, μάλλον, λόγω των πολλαπλών εμποδίων και απαιτήσεων προστασίας, που έθεσε η ισπανική κυβέρνηση (ή και επειδή η εταιρία δε μπορούσε να δώσει σαφείς απαντήσεις στις ερωτήσεις για τις πιθανές επιπτώσεις της απελευθέρωσης των εντόμων “στους ανθρώπους και το περιβάλλον”) [107]. Τον Αύγουστο του 2015 η εταιρία επανέλαβε το αίτημα της το οποίο απορρίφθηκε [108].

3. Αναπαραγωγικό σύστημα των αρσενικών εντόμων

Το αναπαραγωγικό σύστημα βρίσκεται στην κοιλία των εντόμων και τα περισσότερα από τα μέρη του έχουν αμφίπλευρη συμμετρία. Στα αρσενικά οι όρχις είναι τοποθετημένοι στο σώμα, στο άνω και πρόσθιο μέρος της κοιλίας. Καθένας αποτελείται από τους τυφλούς σπερματοφόρους σωλήνες και κάθε σωλήνας περιέχει γεννητικά κύτταρα σε όλα τα στάδια ανάπτυξης, από σπερματογόνια έως και τέλεια σπερματοζωάρια [56]. Οι όρχις, έχουν κατεύθυνση προς τα κάτω και πίσω και ενώνονται κάτω από τον πεπτικό σωλήνα με τον εκφορητικό αγωγό ενώ στο κάτω μέρος αυτού είναι προσαρτημένοι οι βοηθητικοί αδένες [52]. Το σχήμα των βοηθητικών αδένων μπορεί να διαφέρει ανάμεσα στα είδη και αποτελείται από δυο είδη αδένων, εκτοδερμικούς και μεσοδερμικούς [51] (Εικόνα 9).



Εικόνα 9: Αναπαραγωγικό σύστημα αρσενικού απόμου *Bactrocera oleae*

Στο δάκο όπως και σε άλλα είδη του γένους *Bactrocera*, π.χ. *B. cucurbitae* [129], οι σύζευξις ξεκινούν να πραγματοποιούνται αργά το απόγευμα ή το σούρουπο, γεγονός που υποδεικνύει ότι υπάρχει ένας ημερήσιος ρυθμός στη σεξουαλική δραστηριότητα του εντόμου [126]. Η ακολουθία των γεγονότων που οδηγούν στην σύζευξη μπορεί να χωριστεί σε τρεις φάσεις: αρχικά, μια φάση αναζήτησης συντρόφου, κατά την οποία τα οπτικά και οσφρητικά ερεθίσματα παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο και η οποία λήγει με το αρσενικό να κάθεται κοντά στο θηλυκό. Στην επόμενη φάση, τα δυο άτομα βρίσκονται πολύ κοντά και η επιλογή του θηλυκού για το αν θα πραγματοποιηθεί η σύζευξη επηρεάζεται από την ποιότητα των δονήσεων που παράγουν τα φτερά του αρσενικού. Στην τελική φάση, το αρσενικό επιχειρεί να πραγματοποιήσει τη σύζευξη [125] (Εικόνα 10). Όσον αφορά την ίδια τη σύζευξη πρέπει να σημειωθεί ότι γενικότερα για την οικογένεια *Tephritidae* αποτελεί μια μηχανικά απαιτητική διαδικασία καθώς ο κόλπος είναι ένας λεπτός και μακρύς σωλήνας σε σχήμα S σχεδιασμένος έτσι ώστε να επιτρέπει στο θηλυκό να επεκτείνει τον αποθήκη του για την απόθεση των αυγών. Το αρσενικό διεισδυτικό όργανο στην άκρη του είναι ιδιαίτερα ευλύγιστο και λεπτό και πρέπει να διεισδύσει βαθιά μέσα στο θηλυκό ώστε να εναποθέσει το σπέρμα κοντά στην σπερματοθήκη [53].

Τα αρσενικά μεταφέρουν στα θηλυκά ένα μείγμα σπέρματος και εκκρινικών υγρών που παράγονται από τους βοηθητικούς αδένες. Οι δύο σπερματικοί θύλακες στους οποίους βρίσκεται αποθηκευμένο το σπέρμα ενώνονται στον εκφορητικό αγωγό κοντά στους βοηθητικούς αδένες στο πίσω μέρος του αγωγού [66]. Το μείγμα μεταφέρεται μέσω του εκφορητικού αγωγού στον γεννητικό πόρο, κοντά στην βάση του μορίου και συσπάσεις των βοηθητικών αδένων παρέχουν την απαραίτητη πίεση για τη μεταφορά του σπέρματος [66]. Στο γένος *Aedes*, η μεταφορά του μείγματος στο θηλυκό διαρκεί λίγα δευτερόλεπτα [67], καθώς η διάρκεια της σύζευξης είναι μικρότερη του ενός λεπτού [59, 68, 124]. Στην περίπτωση αυτή, ο κόλπος του θηλυκού επανέρχεται στην κατάσταση στην οποία βρισκόταν και πριν την σύζευξη μέσα σε 30 δευτερόλεπτα από το τέλος της και το σπέρμα αρχίζει να συγκεντρώνεται μπροστά από την προεξοχή της σπερματοθήκης [66]. Σε άλλα είδη όπως το *Bactrocera cucurbitae* όπου η σύζευξη διαρκεί τουλάχιστον



Εικόνα 10: Αρσενικό και θηλυκό άτομο *Bactrocera oleae* κατά τη διαδικασία της σύζευξης

10 ώρες, δεν παρατηρείται μεταφορά σπέρματος στο θηλυκό κατά τη πρώτη μισή ώρα της σύζευξης, όμως φαίνεται να έχει πρακτικά ολοκληρωθεί μετά τις 4 ώρες [123, 129]. Η αφθονία των εκκρίσεων των βοηθητικών αδένων προσφέρει ένα υγρό μέσο για την ευκολότερη κίνηση του σπέρματος και τη μεταφορά του στην σπερματοθήκη [56].

Η σπερματογένεση ξεκινάει όταν το έντομο βρίσκεται ακόμα στο προνυμφικό στάδιο και συνεχίζεται σε όλη τη διάρκεια της ενήλικης ζωής του μέχρι την εξάντληση των αποθεμάτων του σε σπερματογόνια [76, 56, 69]. Τα σπερματοζωάρια ωριμάζουν στους όρχεις και κατόπιν αποθηκεύονται στα σπερματικά θυλάκια κατά την σεξουαλική ωρίμανση [70, 61]. Οι δύο βοηθητικοί αδένες συσσωρεύουν εκκρίσεις [71] κατά τη διάρκεια των πρώτων ημερών μετά την εκκόλαψη [72, 73, 74]. Η παραγωγή του σπέρματος, φαίνεται να συσχετίζεται με την ηλικία, το σωματικό μέγεθος [75], και σε κάποιο βαθμό και με τη θερμοκρασία [76]. Τα αρσενικά του είδους *Bactrocera oleae* είναι πολυγαμικά και μπορούν να πραγματοποιήσουν συζεύξεις καθημερινά εάν υπάρχουν στο περιβάλλον τους δεκτικά θηλυκά [58]. Σε άλλα γένη, όπως το *Aede*, στα οποία υπάρχει επίσης πολυγαμική συμπεριφορά, παρατηρείται ότι τα αρσενικά επιχειρούν όσο το δυνατόν περισσότερες συζεύξεις μπορούν, ακόμα και αν δεν έχουν τη δυνατότητα πλέον να μεταφέρουν σπέρμα [59]. Σε αυτές τις περιπτώσεις, μετά από επαναλαμβανόμενες επιτυχείς συζεύξεις τα αποθέματα σπερματοζωαρίων και εκκριτικών υγρών (των βοηθητικών αδένων) πρακτικά εξαντλούνται, στο είδος *A. aegypti* μετά την 6^η σύζευξη/γονιμοποίηση και επανέρχονται στα αρχικά τους επίπεδα μετά από τρεις μέρες αποχής [70, 77]. Η προαναφερθείσα μείωση πραγματοποιείται με χαμηλότερους ρυθμούς στα μεγαλύτερου μεγέθους αρσενικά του είδους [78]. Η πολυγαμική συμπεριφορά των αρσενικών κουνουπιών φαίνεται να ευνοείται από την αφθονία που διαθέτουν σε σπέρμα, το μικρό χρόνο σύζευξης και την πιθανότητα να συναντήσουν πολλά θηλυκά σε συγκεκριμένες περιοχές (τροφής, ξεκούρασης, απόθεσης αυγών) [79].

Η επιτυχής σύζευξη έχει ως αποτέλεσμα τη μονογαμική συμπεριφορά των θηλυκών, το οποίο επιτυγχάνεται με τη μεταφορά αρκετής ποσότητας σπέρματος για τη γονιμοποίηση όλων των αυγών τα οποία αποτίθενται από το θηλυκό καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής του [80] και μέσω των εκκρίσεων των βοηθητικών αδένων που μπορούν και δρουν, σαν ένα βραχυπρόθεσμο φυσικό φραγμό σε κάποια είδη όπως *A. aegypti* και *D. melanogaster* [81, 82, 83, 68, 130], και μακροπρόθεσμο χημικό φραγμό σε περαιτέρω συζεύξεις [84]. Οι εκκρίσεις περιέχουν ένα κοκκώδες υλικό που σταδιακά συσσωρεύεται και στερεοποιείται μέσα στο αναπαραγωγικό σύστημα του θηλυκού περίπου 40 λεπτά μετά το τέλος της σύζευξης [82, 83, 68]. Αυτό το υλικό διασπάται 24-48 ώρες μετά τη σύζευξη αλλά η δράση του παραμένει [68]. Μέχρι στιγμής στο είδος *Bactrocera oleae* δεν έχει παρατηρηθεί ο σχηματισμός αυτού του φυσικού φραγμού. Έχει εντοπιστεί ότι υπεύθυνη για την επαγωγή της μονογαμίας στο γένος *Aedes* είναι η φερομόνη *matrone* [85] η οποία δρα απευθείας στο νευρικό σύστημα [86]. Στα κουνούπια θεωρείται ότι η μεταφορά των εκκρίσεων των βοηθητικών αδένων είναι κατάλοιπο των "γαμήλιων δώρων" τα οποία εξασφαλίζουν τη μονογαμία των θηλυκών ενώ είναι πλέον περιττά ως προς τη συμβολή τους στην αποθήκευση ενέργειας και την εύρεση τροφής [87].

Μετά τη σύζευξη, το σπέρμα μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την άμεση γονιμοποίηση των ωαρίων ή να αποθηκευτεί στη σπερματοθήκη. Τα εκκριτικά υγρά από τους βοηθητικούς αδένες αποτελούνται από ένα μείγμα πρωτεϊνών, ανόργανων ουσιών, υδατανθράκων και λιπιδίων [54, 55]. Σε πολλά είδη εντόμων, όπως *D. melanogaster*, *C. tarsalis* και *A. aegypti* [88, 89, 90, 91, 92], προκαλούν αλλαγές στη φυσιολογία και τη συμπεριφορά του θηλυκού, με σκοπό την γονιμοποίηση του θηλυκού από το συγκεκριμένο αρσενικό και την παραγωγή όσο το δυνατόν περισσότερων απογόνων του. Στις αλλαγές αυτές περιλαμβάνονται η αύξηση της ωογένεσης και της απόθεσης αυγών και η αύξηση στην κατανάλωση τροφής [93,94]. Τα εκκριτικά υγρά επίσης συμβάλλουν στην αποθήκευση του σπέρματος στο θηλυκό, κάποιες από τις πρωτεΐνες που περιέχουν διαθέτουν αντιβακτηριακές ιδιότητες [131, 132], ενώ στη *Drosophila melanogaster* έχει βρεθεί και μια πρωτεΐνη, η Acp70A, η οποία επάγει την παραγωγή αντιμικροβιακών πεπτιδίων από τα θηλυκά μετά τη σύζευξη [133]. Σε άλλα είδη εντόμων είναι γνωστό ότι αρκετές από τις πρωτεΐνες των εκκριτικών υγρών ρυθμίζουν σημαντικές λειτουργίες του αναπαραγωγικού συστήματος των θηλυκών όπως, π.χ.

ενεργοποιούν ή επιταχύνουν την ανάπτυξη των ωαρίων, τη βιτελογέννεση, την ωορρηξία και την απόθεση αυγών [54, 95]. Και στην οικογένεια των *Tephritidae* όπου ανήκει ο δάκος, φαίνεται ότι τα εκκριτικά υγρά των βοηθητικών αδένων πιθανότατα παίζουν τον καθοριστικό ρόλο στην επιτυχία του αρσενικού να αναπαραχθεί και για αυτό το λόγο τα γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες των εκκριτικών υγρών, είναι επιρρεπή σε συχνές μεταλλάξεις ως αποτέλεσμα του σεξουαλικού ανταγωνισμού [96].

Τα γονίδια που μεταγράφονται στο αναπαραγωγικό σύστημα του αρσενικού της *Drosophila melanogaster* έχουν χαρακτηριστεί σε μεγάλο βαθμό. Έμφαση έχει δοθεί στα γονίδια που μεταγράφονται στους βοηθητικούς αδένες καθώς σε αυτόν τον ιστό παρατηρείται σε πολύ μεγάλο βαθμό πρωτεϊνοσύνθεση. Οι πληροφορίες που υπάρχουν μέσω αυτών των μελετών δε μπορούν να βοηθήσουν σημαντικά στην αντίστοιχη έρευνα που πραγματοποιείται σε άλλα είδη καθώς έχει παρατηρηθεί ότι από είδος σε είδος, αν και διατηρούνται οι λειτουργικές τάξεις των πρωτεϊνών που παράγονται, ο βαθμός της έκφρασής τους αλλάζει σημαντικά [97]. Επιπλέον, ανάμεσα στα είδη του γένους *Drosophila* φαίνεται να υπάρχουν μεγάλες διαφορές στις αλληλουχίες των γονιδίων του αναπαραγωγικού συστήματος, ειδικά των αρσενικών ατόμων [55]. Ακόμα και σε γειτονικά είδη μπορεί να είναι δύσκολο να βρεθούν κοινές πρωτεΐνες. Κάτι αντίστοιχο έχει παρατηρηθεί και σε άλλα είδη όπως στη Μεσογειακή μύγα, όπου σε τρανσκριπτομική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε, πάνω από το 1/3 των γονιδίων που εντοπίστηκαν δεν εμφάνιζε σημαντική ομοιότητα με γνωστά γονίδια και μπορεί να αποτελούν καινούργιες ή/και γρήγορα εξελισσόμενες αλληλουχίες [55].

4. Τρανσκριπτομική ανάλυση

Η τρανσκριπτομική ανάλυση αποτελεί τη μελέτη του μεταγραφώματος, δηλαδή όλων των μορίων RNA που παράγονται από το γονιδίωμα σε κάθε στιγμή. Το σημαντικό πλεονέκτημα της τρανσκριπτομικής ανάλυσης είναι ότι παρέχει πληροφορίες για τη μεταγραφή του RNA αλλά και για τις μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις που υφίσταται, οι οποίες είναι χρήσιμες για την μελέτη της βιολογικής λειτουργίας σε επίπεδο κυττάρου, ιστού αλλά και οργανισμού [145].

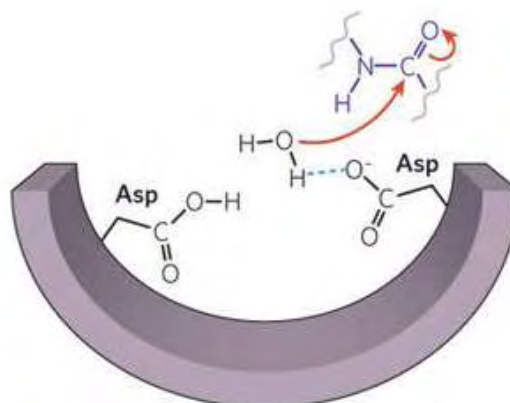
Για τη μελέτη ολόκληρου του τρανσκριπτόματος έχουν αναπτυχθεί νέες τεχνικές που επιτρέπουν την ταυτόχρονη ανάλυση χιλιάδων γονιδίων. Σε αυτές τις τεχνικές συγκαταλέγονται οι μικροσυστοιχίες, οι ετικέτες εκφραζόμενων αλληλουχιών (Expressed Sequence Tags, ESTs), η MPSS (Massively Parallel Signature Sequencing), η σειριακή ανάλυση γονιδιακής έκφρασης (Serial Analysis of Gene Expression, SAGE) και η αλληλούχηση του RNA (RNA-seq) [146].

Το μεγάλο πλεονέκτημα της τρανσκριπτομικής ανάλυσης μέσω RNA-seq, σε σχέση με άλλες μεθόδους (κυρίως microarrays), είναι η ικανότητά της να εντοπίζει μετάγραφα χωρίς να είναι απαραίτητη η αντιστοίχιση με προϋπάρχουσες γονιδιωματικές αλληλουχίες. Λόγω αυτού η RNA-seq προτιμάται για τη μελέτη οργανισμών μη-μοντέλων οι οποίοι διαθέτουν γονιδιωματικές αλληλουχίες οι οποίες δεν έχουν χαρακτηριστεί ακόμα. Επίσης η RNA-seq φαίνεται να είναι πολύ ακριβής στην ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων, όπως έχει φανεί μέσω της χρήσης ποσοτικής PCR, ειδικά όσον αφορά μετάγραφα χαμηλής έκφρασης. Τέλος, η μέθοδος αυτή μπορεί να απεικονίσει τη διαφορετική δυναμική του τρανσκριπτόματος ανάμεσα σε διαφορετικούς ιστούς ή καταστάσεις, χωρίς να χρειάζεται εξειδικευμένη ομαλοποίηση των δεδομένων, γεγονός που την κάνει πιο εύκολη στη χρήση [141].

Σε προηγούμενα πειράματα του εργαστηρίου πραγματοποιήθηκε τρανσκριπτομική ανάλυση των ιστών των βοηθητικών αδένων και του εκφορητικού αγωγού αρσενικών ατόμων *Bactrocera oleae* 7^{ης} ημέρας πριν πραγματοποιήσουν σύζευξη και 12 ώρες μετά. Έτσι δημιουργήθηκε μια λίστα γονιδίων τα οποία εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά (p -value ≤ 0.05) ανάμεσα στις δύο φάσεις. Μεταξύ αυτών βρίσκεται και μια λυσοσωμική πρωτεάση του ασπαρτικού, η οποία αποτελεί αντικείμενο αυτής της εργασίας.

5. Πρωτεάσες

Οι πρωτεάσες αποτελούν την πιο μεγάλη και ποικίλη οικογένεια ενζύμων. Ανήκουν στην κατηγορία των υδρολασών και ο ρόλος τους είναι να υδρολύουν πεπτιδικούς δεσμούς. Μπορούν να κατηγοριοποιηθούν ως πρωτεάσες ασπαρτικού, κυστεΐνης, γλουταμικού, σερίνης ή θρεονίνης με βάση τα αμινοξέα τα οποία βρίσκονται παρόντα στο καταλυτικό κέντρο, ή ως μεταλλοπρωτεάσες εάν ένα μεταλλικό ιόν είναι απαραίτητο για την κατάλυση [134]. Παράγονται φυσιολογικά από όλους τους οργανισμούς και με την ιδιότητα τους να διασπούν πεπτιδικούς δεσμούς μπορούν να μεταβάλλουν τις βιολογικές ιδιότητες των πεπτιδικών αλυσίδων. Έτσι, εμπλέκονται σε



πολλές διαδικασίες, όπως η παραγωγή θρεπτικών συστατικών για την κυτταρική ανάπτυξη και πολλαπλασιασμό [135], η αποδόμηση των πρωτεϊνών [136], η απόπτωση (μέσω της ενεργοποίησης των κασπασών [137]) αλλά και σαν ρυθμιστικά στοιχεία διαφόρων φυσιολογικών διαδικασιών, είτε μέσω υποδοχέων (PARs, Notch [60]) είτε μέσω προτεόλυσης προ-ορμονών [57]. Οι πρωτεάσες μπορούν να συμμετέχουν σε τόσες διαφορετικές διαδικασίες καθώς παρουσιάζουν υψηλή εξειδίκευση για το υπόστρωμα τους καθώς αναγνωρίζουν την περιοχή των πεπτιδίων όπου θα πραγματοποιηθεί η υδρόλυση μαζί με γειτονικές αλληλουχίες του τμήματος αυτού. Η προτεολυτική δραστηριότητα καταφέρνει να περιορίζεται στα επιθυμητά υποστρώματα χωρίς τη καταστροφή λειτουργικών ή απαραίτητων πρωτεϊνών μέσα και έξω από τον συγκεκριμένο ιστό. Οι οργανισμοί έχουν αναπτύξει ένα μεγάλο εύρος μηχανισμών προκειμένου να ελέγχουν την προτεολυτική δραστηριότητα. Αυτή η ρύθμιση μπορεί να πάρει μέρος σε οποιοδήποτε επίπεδο, από τη γονιδιακή έκφραση, π.χ. με την ύπαρξή τους σε οπερόνια στους προκαρυώτες, μέχρι τα επίπεδα της μεταγραφής και της μετάφρασης και της μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις και τις αλληλεπιδράσεις με αναστολείς πρωτεασών και άλλες πρωτεΐνες [62].

Ένα σημαντικό ποσοστό των πρωτεϊνών που παράγονται από τους βοηθητικούς αδένες, έχει αποδειχθεί ότι είναι πρωτεάσες ή ρυθμιστές πρωτεασών [98]. Η πρωτεόλυση φαίνεται να είναι ένας βασικός μηχανισμός ελέγχου και ρύθμισης γεγονότων στο αναπαραγωγικό σύστημα των εντόμων. Οι πρωτεάσες των σπερματικών υγρών μπορούν να επηρεάσουν πολλές παραμέτρους της αναπαραγωγής των αρσενικών, όπως ενεργοποιώντας αδρανή μόρια. Η ενζυμική αντίδραση ανάμεσα σε μια πρωτεάση και τον αναστολέα της χαρακτηρίζεται από τον σχηματισμό ενός μη αναστρέψιμου “συμπλόκου” [99]. Στη *D. melanogaster* πιστεύεται ότι η πρωτεόλυση ρυθμίζει τη μετα-συζευκτική συμπεριφορά του θηλυκού με την επεξεργασία ή ενεργοποίηση πεπτιδίων και ενζύμων τα οποία προέρχονται από το αρσενικό [103, 138, 65, 64, 63]. Η δράση αναστολέων πρωτεασών αρκετών Acps της *Drosophila* [100] και η ομολογία με άλλες πρωτεάσες συνηγορούν [101, 102] στην άποψη ότι ο ρόλος ορισμένων Acps είναι να ενεργοποιούν άλλα Acps [103, 104, 105]. Επίσης έχουν βρεθεί ρυθμιστές της πρωτεόλυσης, όπως ο αναστολέας της τρυψίνης Acpr62F, ο οποίος συμβάλει στη προστασία του σπέρματος από την αποικοδόμηση εντός του θηλυκού ατόμου [106]. Κατά την αποθήκευση του σπέρματος στα κατάλληλα γυναικεία όργανα η πρωτεόλυση επιφανειακών πρωτεϊνών του, μπορεί να μηδενίσει την ικανότητα του να προσδεθεί ή και να ενεργοποιηθεί/κινηθεί [55].

ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η μελέτη του γονιδίου της λυσοσωμικής πρωτεΐσης του ασπαρτικού και της συμμετοχής του στη διαδικασία της αναπαραγωγής του δάκου της ελιάς. Χρησιμοποιώντας διαθέσιμες μεταγραφόμενες αλληλουχίες που προέκυψαν με σύγκριση RNAseq από το αρσενικό γεννητικό σύστημα του δάκου (βοηθητικοί αδένες και εκφορητικός αγωγός) πριν και δώδεκα ώρες μετά τη σύζευξη, σχεδιάστηκαν ομόλογοι εκκινητές και καθορίστηκαν τα επίπεδα έκφρασής του με ποσοτική Real-time PCR. Επιπλέον πραγματοποιήθηκε παροδική αποσιώπηση του γονιδίου και μελέτη των επιπέδων έκφρασης για τον καθορισμό του ρόλου του στην αναπαραγωγική διαδικασία του εντόμου.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Για την παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε εργαστηριακός πληθυσμός του είδους *Bactrocera oleae*. Οι συνθήκες του εντομοτροφίου, ήταν σταθερές με περιβαλλοντική θερμοκρασία στους 25 °C και την υγρασία στο 58%.

Κατά τη διάρκεια του πειράματος πραγματοποιούνταν διαχωρισμός των αρσενικών και θηλυκών εντόμων την πρώτη μέρα της μεταμόρφωσης τους από νύμφες σε ενήλικα άτομα και διατηρούνταν σε διαφορετικά κλουβιά. Αυτή η μέρα ήταν η μέρα μηδέν (0) του πειράματος. Την έβδομη μέρα όπου τα έντομα ήταν ώριμα σεξουαλικά, τα αρσενικά και θηλυκά άτομα τοποθετούνταν σε ένα κλουβί ώστε να συζευχθούν. Κατόπιν, μετά από διάστημα 12 ωρών από το τέλος της σύζευξης, πραγματοποιούνταν απομόνωση του βοηθητικού αδένου και του εκφορητικού αγωγού των αρσενικών. Οι ίδιοι ιστοί είχαν απομονωθεί και από σεξουαλικά ανώριμα αρσενικά όλων των ημερών (ημέρες 1-6) και μη συζευγμένα άτομα (ημέρα 7), προκειμένου να διερευνηθεί η έκφραση του υπό μελέτη γονιδίου κατά την σεξουαλική ωρίμανση.

1. Απομόνωση RNA (RNA extraction)

Σε αυτή τη διαδικασία γίνεται απομόνωση ολικού RNA από τον απομονωμένο ιστό. Η απομόνωση πραγματοποιείται με χρήση του αντιδραστηρίου TRIsure (Bioline) σύμφωνα με το πρωτόκολλο που προτείνεται στο εγχειρίδιο του κατασκευαστή.

Υλικά	C τελικό
Απομονωμένος ιστός με TRIsure	150 μl
TRIsure	150 μl
BCP	40 μl
ισοπροπανόλη	1/2X όγκου του (TRIsure)
γλυκογόνο	0,5 μl
75% παγωμένη αιθανόλη	600 μl
ultra pure water	20 μl

Μεθοδολογία

Ο απομονωμένος ιστός βρίσκεται σε erpendorf με 150 μl trisure και έχει διατηρηθεί στους -80°C.

1. Τοποθέτηση των δειγμάτων στον πάγο για να ξεπαγώσουν
2. Ομογενοποίηση των δειγμάτων με αποστειρωμένο pestle.
3. Πλύση των pestle με 150 μl trisure στο erpendorf για την ανάκτηση υπολειμμάτων του ιστού στο pestle. Κατόπιν vortex και quick spin.
4. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.
5. Ελαφρύ vortex και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.
6. Φυγοκέντρηση στους 4°C, 12.000rpm για 10 λεπτά, για την απομάκρυνση όλων των κυτταρικών υπολειμμάτων και κατόπιν μεταφορά του υπερκειμένου σε νέο tube (1,5 ml).
7. Πρόσθεση 40 μl BCP και ανάδευση για 15 δευτερόλεπτα.
8. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 3 λεπτά.
9. Φυγοκέντρηση στους 4°C, 12.000g για 15 λεπτά.
10. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.
11. Μεταφορά του υπερκειμένου σε νέο tube (1,5 ml).
12. Προσθήκη 1/2X όγκου (του trisure) παγωμένης ισοπροπανόλης και 0,5 μl γλυκογόνο
13. Vortex και επώαση σε πάγο για 45 λεπτά.
14. Φυγοκέντρηση στους 4°C, 12.000g για 45 λεπτά.
15. Αφαίρεση υπερκειμένου και πλύση με 200 μl 75% παγωμένη αιθανόλη.
16. Φυγοκέντρηση στους 4°C, 12.000g για 5 λεπτά.
17. Επανάληψη των βημάτων 15 και 16 ακόμη δυο φορές.
18. Απομάκρυνση της αιθανόλης και στέγνωμα για 10 λεπτά.
19. Αναδιάλυση του ιζήματος αφού στεγνώσει σε 20 μl ultra pure water θερμομασμένο στους 50°C.

2. Επεξεργασία με DNase (DNase Treatment)

Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται προκειμένου να απομακρυνθούν από το διάλυμα οι DNάσες, ένζυμα τα οποία καταστρέφουν το ελεύθερο DNA, διαδικασία απαραίτητη για τη μη μόλυνση του δείγματος στα επόμενα βήματα καθώς η παρουσία μορίων γονιδιωματικού DNA μπορεί να οδηγήσει σε λανθασμένα αποτελέσματα.

Οι DNάσες ανήκουν στην κατηγορία των νουκλεάσων. Καταλύουν την αντίδραση υδρόλυσης ανάμεσα στις φωσφορικές ομάδες των αλυσίδων του μορίου DNA με αποτέλεσμα την κοπή σε αυτό το σημείο της αλυσίδας.

Μεθοδολογία

1. Quick-spin στο απομονωμένο από ιστούς δείγμα RNA.
2. Προσθήκη σε σωληνάκι PCR του νερού, του ρυθμιστικού διαλύματος, του RNA και του DNase inhibitor.
3. Επώαση στους 37 °C για 30 λεπτά και κατόπιν προσθήκη του inactivation buffer.
4. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά
5. Φυγοκέντρηση για 2 λεπτά στα 11.000 g.
6. Συλλογή του υπερκειμένου.

Το τελικό δείγμα μπορεί να υποστεί κατευθείαν επεξεργασία για σύνθεση cDNA ή να διατηρηθεί στους -80 °C

Υλικά	C τελικό
RNA	20 μl
Turbo DNase buffer	2,5 μl
DNase inhibitor	0,5 μl
H ₂ O	2 μl
Τελικός όγκος	25 μl

3. Σύνθεση cDNA (cDNA Treatment)

Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται μέσω του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφή, το οποίο συνθέτει μια συμπληρωματική αλυσίδα DNA για το RNA μονόκλωνο μόριο. Η διαδικασία πραγματοποιείται για την μετέπειτα ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης αλλά και για την προστασία του δείγματος καθώς το RNA ως μονόκλωνο μόριο είναι αρκετά ασταθές.

Μεθοδολογία

1. Προσθήκη σε eppendorf 20 μ l RNA και 1 μ l Random primers
2. Επώαση των δειγμάτων στους 70 °C για 10 λεπτά
3. Επώαση των δειγμάτων σε πάγο για 5 λεπτά
4. Προσθήκη του νερού, των δεοξυριβονουκλεοτιδίων, του ρυθμιστικού διαλύματος, του αναστολέα και της αντίστροφης μεταγραφάσης.
5. Επώαση στους 45 °C για 45 λεπτά και στους 70 °C για 10 λεπτά.

Υλικά	C τελικό
RNA	20 μ
Random primers	1 μ l
M.MULV Buffer 1X	3 μ l
dNTPs (10mM each)	1 μ l
RNase inhibitor	1 μ l
M.MULV	1 μ l
H ₂ O	3 μ l

4. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζη

Η ηλεκτροφόρηση αποτελεί μέθοδο διαχωρισμού και ανάλυσης μορίων (DNA, RNA και πρωτεϊνών) σύμφωνα με το μέγεθος και το φορτίο τους. Στην πηκτική εφαρμόζεται ηλεκτρικό πεδίο και τα μόρια κινούνται σε αυτή σύμφωνα το φορτίο τους. Τα μικρότερα μόρια κινούνται περισσότερο καθώς διαπερνούν εύκολα τους πόρους της πηκτικής. Μετά τη λήξη εφαρμογής του ηλεκτρικού πεδίου τα μόρια σταματούν την κίνηση τους και συσσωρεύονται σε μεγάλες συγκεντρώσεις σε ευδιάκριτες ζώνες.

Μεθοδολογία

Για την παραγωγή πηκτικής 1% περιεκτικότητας σε αγαρόζη 40ml

1. Προσθήκη σε κωνική φιάλη 40ml TBE 0,5 X και 0,4 gr αγαρόζη
2. Θέρμανση του διαλύματος σε φούρνο μικροκυμάτων, με ανάδευση ανά τακτά χρονικά διαστήματα έως ότου διαλυθεί πλήρως η αγαρόζη.
3. Ψύξη της κωνικής φιάλης σε τρεχούμενο νερό
4. Προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου και ανάδευση
5. Μεταφορά του πηκτώματος σε καλούπι και δημιουργία “πηγαδιών” στο πήκτωμα
6. Αναμονή μέχρι την στερεοποίηση του πηκτώματος

Για να πραγματοποιηθεί η ηλεκτροφόρηση:

1. Τοποθέτηση του πηκτώματος στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και προσθήκη TBE 0,5 X σε αυτή για την κάλυψη της επιφάνειας του πηκτώματος
2. Φόρτωση δειγμάτων στα “πηγαδάκια” και του μάρτυρα μοριακού βάρους 1kb/1000bp σε συγκέντρωση 0,1mg/μl.

5. Απομόνωση μορίων DNA από πηκτή αγαρόζης (gel DNA recovery)

Η ανάκτηση από πηκτή είναι μία τεχνική που χρησιμοποιείται για την απομόνωση ενός επιθυμητού τμήματος DNA από μια πηκτή αγαρόζης μετά από ηλεκτροφόρηση.

Η ανάκτηση περιλαμβάνει τα εξής βήματα: προσδιορισμός των επιθυμητών τμημάτων, απομόνωση των αντίστοιχων ζωνών, απομόνωση του DNA από αυτά τα κομμάτια και απομάκρυνση των συνοδευτικών αλάτων και προσμίξεων.

Μεθοδολογία

Με έκθεση της πηκτής αγαρόζης σε UV ακτινοβολία εντοπίζονται οι ζώνες DNA που θα απομονωθούν και με ένα κοπίδι κόβονται οι επιθυμητές ζώνες (η έκθεση του πηκτώματος πρέπει να είναι η ελάχιστη δυνατή προκειμένου να αποτραπεί πιθανή μεταλλαξιγένεση του DNA)

1. Τοποθέτηση του τμήματος της πηκτής που απομονώθηκε σε erpendorf 1,5ml τα οποία προηγουμένως έχουν ζυγιστεί
2. Υπολογισμός καθαρού βάρους πηκτής και προσθήκη ίσου όγκου Buffer GB.
3. Γρήγορη φυγοκέντρηση ώστε το gel να παραμείνει στον πάτο του σωλήνα και τοποθέτηση του σε υδατόλουρο στους 55°C μέχρις ότου διαλυτοποιηθεί το gel
4. Μεταφορά του περιεχομένου των erpendorf στα ειδικά column tubes και φυγοκέντρηση στα 10000g για 1 λεπτό
5. Απομάκρυνση του εκλούσματος
6. Προσθήκη 750ml Wash Buffer και φυγοκέντρηση στα 10.000g για ένα λεπτό
7. Απομάκρυνση του εκλούσματος
8. Φυγοκέντρηση στα 10000g για 1 λεπτό ώστε να εξατμιστεί τυχόν εναπομένουσα αιθανόλη
9. Μεταφορά του επάνω μέρους του column tube σε νέο erpendorf
10. Προσθήκη 30μl Elution Buffer και αναμονή για δύο λεπτά
11. Φυγοκέντρηση στα 10.000g για ένα λεπτό για διαλυση του DNA.

6. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η PCR βασίζεται σε θερμικούς κύκλους, οι οποίοι περιλαμβάνουν μία σειρά επαναλαμβανόμενων εναλλαγών θερμοκρασίας. Αρχικά με αύξηση της θερμοκρασίας επιτυγχάνεται η αποδιάταξη του δίκλωνου DNA. Στη συνέχεια με μείωση της θερμοκρασίας ο κάθε κλώνος χρησιμοποιείται ως εκμαγείο για την DNA πολυμεράση, η οποία πολλαπλασιάζει το DNA στόχο. Αυτό επιτυγχάνεται με τη χρήση εκκινητών (primers), συμπληρωματικών προς την αλληλουχία DNA. Με τους επαναλαμβανόμενους κύκλους, η αλληλουχία στόχος πολλαπλασιάζεται με εκθετικό ρυθμό.

Μεθοδολογία

Όλα τα αντιδραστήρια τοποθετούνται σε PCR tubes, τα οποία κατόπιν τοποθετούνται σε θερμοκυκλοποιητή όπου προσδιορίζονται οι συνθήκες της αντίδρασης

Αντιδραστήρια

Υλικά	C τελικό
DNA	1 μ l
Buffer (1X)	2 μ l
Εκκινητής F	0,7 μ l
Εκκινητής R	0,7 μ l
Taq πολυμεράση	0,2 μ l
dNTPs (0,8 mM)	0,4 μ l
H ₂ O	15 μ l

7. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real Time PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-Time PCR, RT-PCR) βασίζεται στις αρχές της μεθόδου PCR. Χρησιμοποιείται για την ενίσχυση και ταυτόχρονα την ποσοτικοποίηση μίας ή περισσότερων ειδικών αλληλουχιών σε ένα δείγμα DNA. Η Real-Time PCR χρησιμεύει στον ακριβή προσδιορισμό της ποσότητας DNA που βρίσκεται αρχικά σε ένα δείγμα, καθώς και στη σύγκριση των ποσοτικών τιμών της ίδιας αλληλουχίας μεταξύ διαφορετικών δειγμάτων. Η πιο κοινή μέθοδος για την ανίχνευση των προϊόντων με ποσοτική PCR βασίζεται στη χρήση μη ειδικών φθορίζουσων χρωστικών, όπως το SYBR Green, που παρεμβάλλονται σε οποιοδήποτε δίκλωνο DNA που συντίθεται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης, παράγοντας φθορισμό. Προκειμένου να εξασφαλιστεί η ακρίβεια όσον αφορά στην ποσοτικοποίηση, είναι απαραίτητο ένα σταθερώς εκφραζόμενο γονίδιο (house keeping gene, hkg). Τα γονίδια αυτά χρησιμοποιούνται ευρέως ως εσωτερικοί μάρτυρες (controls) για την κανονικοποίηση της έκφρασης του γονιδίου στόχου σε μεθόδους.

Αντιδραστήρια

- cDNA
- Εκκινητές (Forward, Reverse)
- iTaq Universal SYBR Green Supermix (Mix διάλυμα, το οποίο περιέχει hot start iTaq DNA Polymerase, dNTPs, MgCl₂, SYBR Green)
- H₂O

Μεθοδολογία

Αρχικά πραγματοποιείται υπολογισμός των ποσοτήτων που θα χρειαστούν σε τελικό όγκο αντίδρασης 15μl με 5μl cDNA σε κάθε δείγμα. Τα αντιδραστήρια τοποθετούνται σε ειδικά PCR tube strips και εν συνεχεία στον θερμοκυκλοποιητή. Σε αυτό το σημείο αξίζει να σημειωθεί πως για κάθε δείγμα, εκτός από την ενίσχυση με το εκάστοτε ζεύγος εκκινητή, πραγματοποιείται και μία αντίδραση με τους εκκινητές των γονιδίων αναφοράς. Ως γονίδια αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν τα γονίδια gpl 19 και 14:3:3.

Συνθήκες Real-Time PCR:

50°C για 2 λεπτά

95°C για 3 λεπτά

Για 50 κύκλους: 95°C για 10 δευτερόλεπτα

55°C για 20 δευτερόλεπτα

72°C για 30 δευτερόλεπτα

8. Δημιουργία δίκλωνου RNA (dsRNA)

Υλικά	C τελικό
Προϊόν PCR	7 μ l
H ₂ O	9 μ l
rATP	4 μ l
rGTP	4 μ l
rCTP	4 μ l
rUTP	4 μ l
Reaction Buffer (10X)	4 μ l
TURBO DNase	4 μ l

Μεθοδολογία

1. Ξεπαγώνουμε τα αντιδραστήρια, προσέχοντας τα διαλύματα των ριβουκλεοτιδίων να είναι τοποθετημένα στον πάγο και το 10X Reaction Buffer να είναι στον πάγο σε θερμοκρασία δωματίου.
2. Προσθήκη του νερού, κατόπιν των ριβονουκλεοτιδίων και τέλος του Buffer σε tube σε θερμοκρασία δωματίου, έτσι ώστε να μην καθιζάνει το DNA.
3. Καλή ανάμειξη με πιπέτα.
4. Επώαση στους 37°C για 16 ώρες.
5. Προσθήκη TURBO DNase και επώαση στους 37°C για 15 λεπτά.
6. Προσθήκη 115 μ l Nuclease-free Water και 15 μ l διαλύματος οξικού αμμωνίου και καλή ανάμειξη.
7. Προσθήκη ίσης ποσότητας φαινόλης/χλωροφορμίου και μεταφορά της υδατικής φάσης σε καθαρό tube.
8. Προσθήκη ενός όγκου (1X) ισοπροπανόλης, για να καθιζάνει το RNA και καλή ανάμειξη.
9. Φυγοκέντρηση στους 4°C για 45 λεπτά.

10. Προσεκτική μεταφορά του υπερκείμενου.
11. Προσθήκη καθαρής αιθανόλης 70% και φυγοκέντρηση στους 4°C για 5 λεπτά.
12. Προσεκτική μεταφορά του υπερκείμενου.
13. Αναδιάλυση του RNA σε 25μl H₂O.
14. Ηλεκτροφόρηση μικρής ποσότητας του RNA για ποσοτικοποίηση.

9. Παροδική αποσιώπηση γονιδίων (RNA silencing)

Γονιδιακή σίγηση ή αποσιώπηση είναι ένας γενικός όρος που περιγράφει επιγενετικές διαδικασίες της γονιδιακής ρύθμισης. Είναι μια μετα-μεταγραφική διαδικασία και πυροδοτείται από την εισαγωγή του δίκλωνου RNA (dsRNA), το οποίο οδηγεί σε αποσιώπηση γονιδίου-στόχου (gene of interest).

Το RNAi μονοπάτι στα κύτταρα ξεκινάει από το ένζυμο DICER, η οποία ως RNase κόβει τα dsRNAs σε μικρότερα των 21–25 νουκλεοτιδίων, που ονομάζονται siRNAs. Αυτά ενσωματώνονται σε ένα πρωτεϊνικό σύμπλοκο με το όνομα RISC. Κατόπιν η RISC κατευθύνεται σε εκείνα τα mRNA τα οποία είναι συμπληρωματικά με τα siRNAs και τα κόβει, με αποτέλεσμα την αποσιώπηση των εκάστοτε γονιδίων (Εικόνα). Η πρωτεΐνη Argonaute είναι το κύριο συστατικό της RISC και μεσολαβεί στην αναγνώριση του στόχου και την κοπή αυτού.

Η αποσιώπηση των γονιδίων στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε με έγχυση του dsRNA σε ενήλικα έντομα με τη χρήση του μηχανήματος Nanoject II.

Μεθοδολογία

1. Σύνδεση του μηχανήματος και καθαρισμός του σύμφωνα με τις οδηγίες του μηχανήματος
2. Επιλογή γυάλινης βελόνας quartz και κοπή της κατάλληλα έτσι ώστε να χρησιμοποιηθεί για την έγχυση
3. Γέμισμα της βελόνας με mineral oil (το οποίο βρίσκεται σε ένεση) προσεκτικά ώστε να μην δημιουργηθούν φυσαλίδες μέχρι να γεμίσει η βελόνα και να στάξει.
4. Τοποθέτηση της βελόνας στο μηχανήμα σύμφωνα με τις οδηγίες του μηχανήματος
5. Γέμισμα της βελόνας με το dsRNA
6. Ένεση των εντόμων με το dsRNA είτε ανάμεσα στα φτερά είτε κάτω από το ένα φτερό. Τα έντομα έχουν προηγουμένως αναισθητοποιηθεί με τοποθέτηση τους στους -20°C για 5 λεπτά και παραμένουν αναισθητα κατά την διάρκεια των ενέσεων καθώς τοποθετούνται σε τριβλύο με πάγο

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. Μελέτη έκφρασης λυσοσωμικής πρωτεάσης του ασπαρτικού

Σε δεδομένα RNAseq του εργαστηρίου μας που προήλθαν από σύγκριση σε αναπαραγωγικό ιστό σεξουαλικά ώριμων αρσενικών εντόμων κατά την έβδομη (7) ημέρα πριν το αρσενικό πραγματοποιήσει σύζευξη και δώδεκα (12) ώρες μετά από αυτή, βρέθηκε ότι η έκφραση του γονιδίου το οποίο παράγει μια λυσοσωμική πρωτεάση του ασπαρτικού παρουσιάζει στατιστικώς σημαντική διαφορά. Η διαφορά αυτή ίσως να υποδηλώνει σχέση του προϊόντος του γονιδίου με τη διαδικασία της σύζευξης ή με κάποια μετα-συζευκτική δράση ή συμπεριφορά του θηλυκού. Η υπόθεση ήταν ότι αν ένα γονίδιο παράγει μια πρωτεΐνη των αρσενικών βοηθητικών αδένων τότε θα πρέπει να εκφράζεται πριν τη σύζευξη ώστε η πρωτεΐνη να είναι παρούσα κατά τη διάρκειά της σύζευξης, προκειμένου να επιτελέσει τη λειτουργία της είτε στο σώμα του αρσενικού εντόμου είτε να μεταφερθεί στο θηλυκό έντομο. Για το σκοπό αυτό απομονώθηκαν βοηθητικοί αδένες από το αρσενικό αναπαραγωγικό σύστημα και συγκεκριμένα από την πρώτη μέρα, ημέρα 0, η ημέρα που εμφανίζονται τα ενήλικα έντομα, μέχρι την ημέρα 7, όπου τα έντομα είναι σεξουαλικά ώριμα, και είναι η ημέρα που πραγματοποιείται η σύζευξη στα πειράματά μας.

Μετά την απομόνωση πραγματοποιήθηκε αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real time- PCR) ώστε να εντοπιστούν τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου κάθε μέρα ξεχωριστά. Για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκαν ως γονίδια αναφοράς το rpl19 και το γονίδιο 14:3:3, γονίδια με σταθερή έκφραση στους ιστούς αυτούς.

Για να ελεγχτεί αν η Real-Time PCR έχει την μέγιστη αποτελεσματικότητα μελετώνται τα εξής χαρακτηριστικά της:

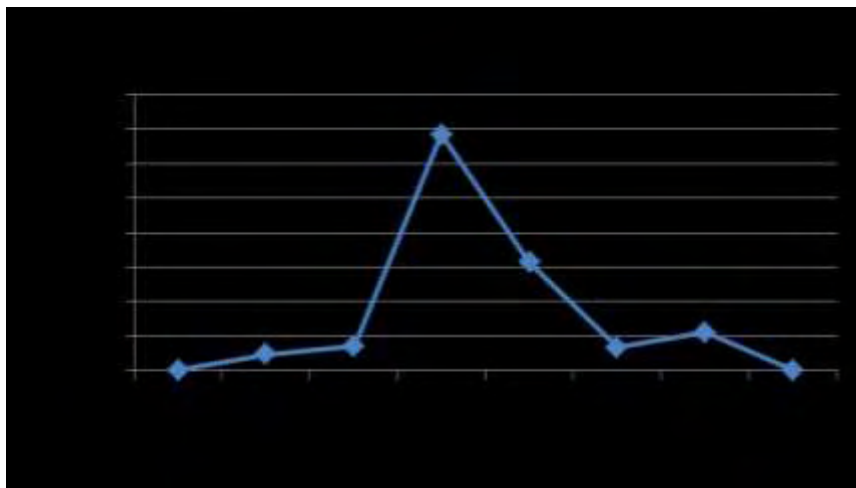
- Γραμμική πρότυπη καμπύλη ($R^2 > 0.98$)
- Υψηλή τιμή efficiency (90 - 105%)
- Συνέπεια στις επαναληπτικές αντιδράσεις

Η τιμή efficiency, E, υπολογίζεται από τον τύπο: $E = 10 - 1/\text{slope}$

Ενώ η τιμή efficiency ως ποσοστό υπολογίζεται από τον τύπο: $\% \text{ Efficiency} = (E - 1) \times 100\%$

Efficiency εκκινητή *lysosomal aspartic protease*: $E = 104,2\%$, $R^2 = 0,98$

Από το προφίλ έκφρασης του γονιδίου για τις ημέρες αυτές προέκυψε το γράφημα 1 όπου παρατηρείται ότι μέχρι και τη δεύτερη (2) μέρα της ζωής του ενηλίκου ατόμου η έκφραση του γονιδίου πραγματοποιείται με πολύ αργούς ρυθμούς, ενώ την τρίτη (3) μέρα αυξάνεται ραγδαία και αποκτά το μέγιστο της έκφρασής της. Η έκφραση μειώνεται σταδιακά και επιστρέφει στα επίπεδα πριν την αύξηση την πέμπτη (5) ημέρα ενώ υπάρχει μια μικρή έκφραση ξανά την έκτη (6) ημέρα η οποία σταματά την 7η ημέρα.

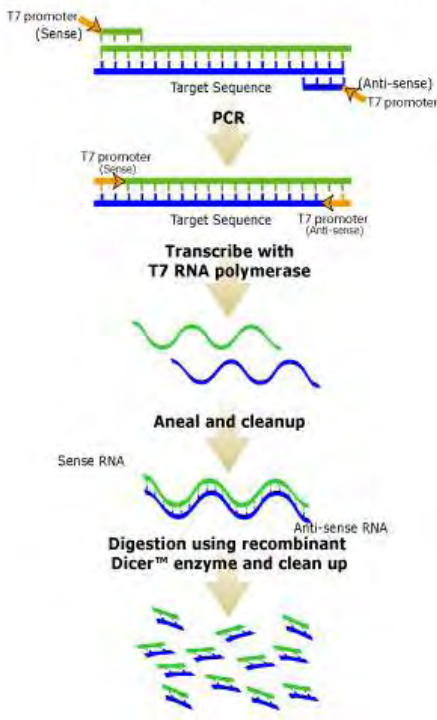


Γράφημα 1: Προφίλ έκφρασης του γονιδίου λυσοσωμικής ασπαρτικής πρωτεάσης αρσενικών εντόμων μετά από Real-Time PCR σε βοηθητικούς αδένες και εκφορητικούς αγωγούς σε χρονικές στιγμές. Ως γονίδια αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν *rpl19* και *14:3:3*.

Το προφίλ έκφρασης συμφωνεί με την υπόθεση, για αυτό αποφασίστηκε το γονίδιο να μελετηθεί περαιτέρω. Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκε παροδική αποσιώπησή του. Αν η μέθοδος πραγματοποιηθεί με επιτυχία, τότε η προσωρινή αποσιώπηση του γονιδίου της λυσοσωμικής πρωτεάσης του ασπαρτικού μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση κάποιου διαφορετικού του φυσιολογικού φαινοτύπου.

2. Παροδική σίγηση γονιδίου λυσοσωμικής ασπαρτικής πρωτεάσης

How Dicer siRNA Generation Kit Works

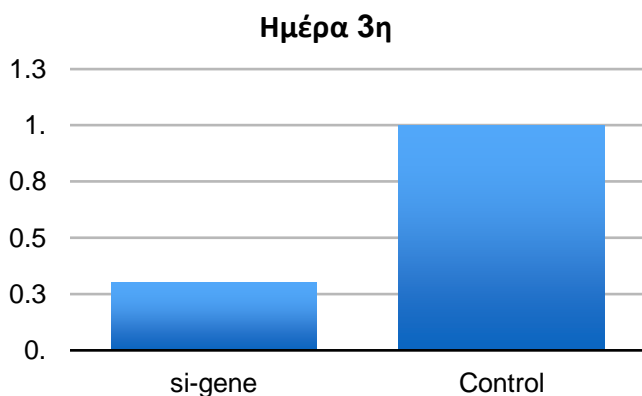


Για τη δημιουργία δίκλωνων τμημάτων RNA (dsRNA) χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα το προϊόν ενίσχυσης cDNA το οποίο προέκυψε μετά από αντίστροφη μεταγραφή του RNA βοηθητικών αδένων και εκφορητικού αγωγού αρσενικών εντόμων 7^{ης} ημέρας. Για την ενίσχυση του επιθυμητού τμήματος σχεδιάστηκαν εκκινητές βάσει του προγράμματος E-RNAi, οι οποίοι φέρουν στο 5' άκρο τους την αλληλουχία του T7 υποκινητή, ώστε σε επόμενο στάδιο να είναι σε θέση η T7 Polymerase να ξεκινήσει τη διαδικασία μεταγραφής. Τα προϊόντα της PCR ηλεκτροφορήθηκαν με σκοπό την εκτίμηση της συγκέντρωσής τους και την εξακρίβωση ότι είναι μοναδικά, χωρίς παραπροϊόντα.

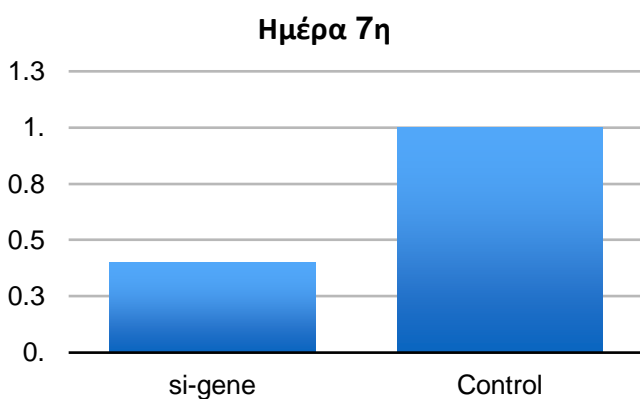
Για να ελεγχθεί ο λειτουργικός ρόλος του υπό μελέτη γονιδίου ακολούθησε παροδική αποσιώπηση του σε αρσενικά έντομα. Για το σκοπό αυτό, δημιουργήθηκαν δίκλινα τμήματα RNA (dsRNA) του γονιδίου της λυσοσωμικής ασπαρτικής πρωτεάσης, τα οποία εγχύθηκαν απευθείας στην αιμολέμφο των εντόμων την ίδια ημέρα όπου εμφανίστηκαν τα ενήλικα άτομα (Ημέρα 0). Παράλληλα, σε ίδιο αριθμό εντόμων εγχύθηκε και δίκλινο τμήμα RNA του γονιδίου GFP (dsGFP), το οποίο λειτουργεί ως δείγμα ελέγχου (control). Το γονίδιο GFP

χρησιμοποιήθηκε καθώς είναι ένα γονίδιο που παρουσιάζει μηδέν ομολογία με το γονιδίωμα του εντόμου, οπότε οποιαδήποτε μεταβολή που μπορεί να παρατηρηθεί στο έντομο μετά την έγχυση θα οφείλεται στην πραγμάτωση του πειράματος και όχι στην αποσιώπηση. Για τη διερεύνηση της επιτυχίας της διαδικασίας της αποσιώπησης του γονιδίου μετά την έγχυση του dsRNA απομονώθηκαν ιστοί βοηθητικών αδένων την 3^η ημέρα κατά την οποία εντοπίστηκε η μεγαλύτερη έκφραση του γονιδίου και την 7^η ημέρα, κατά την οποία πραγματοποιούνται τα πειράματα σύζευξης, ώστε να είναι γνωστό το επίπεδο της έκφρασης του γονιδίου και να υπάρχει η δυνατότητα καλύτερης ερμηνείας των μελλοντικών φαινοτυπικών αποτελεσμάτων. Τα επίπεδα έκφρασης μελετήθηκαν με Real-Time PCR χρησιμοποιώντας ως hkg το γονίδιο Rpl19 και 14:3:3, για την κανονικοποίηση των τιμών.

Στα παρακάτω γραφήματα παρουσιάζεται η αποσιώπηση του γονιδίου στα έντομα που πραγματοποιήθηκε έγχυση του ds-lysosomal aspartic protease σε σχέση με τα έντομα στα οποία πραγματοποιήθηκε έγχυση ds-GFP. Παρατηρούμε ότι την 3^η μέρα η έκφραση του γονιδίου έχει μειωθεί κατά 70%. Την 7^η ημέρα η έκφραση του γονιδίου συνεχίζει να βρίσκεται υπό σίγηση αν και σε ελαφρά μικρότερο ποσοστό του 60%. Συνεπώς, θεωρούμε ότι επιτεύχθηκε αποσιώπηση του γονιδίου σε ένα ικανοποιητικό βαθμό.



Γράφημα 2: Επίπεδα έκφρασης του γονιδίου σε αρσενικά έντομα *B. oleae* την 3^η ημέρα.

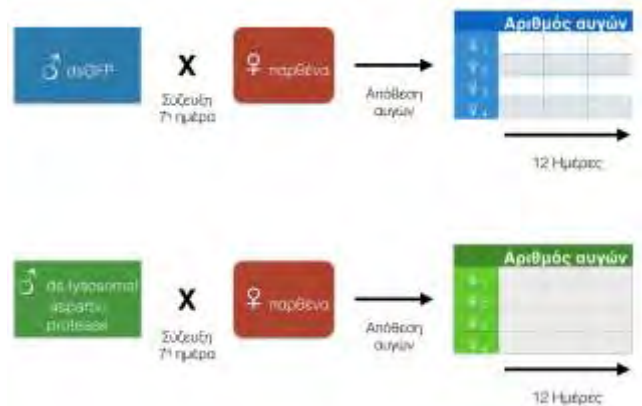


Γράφημα 3: Επίπεδα έκφρασης του γονιδίου σε αρσενικά έντομα *B. oleae* την 7^η ημέρα.

3. Μελέτη αποτελεσμάτων της αποσιώπησης στα συζευγμένα θηλυκά έντομα *B. oleae*

Για να εξακριβωθεί αν το ποσοστό αποσιώπησης είναι ικανό να παρεμποδίσει την απόθεση των αυγών ακολούθησε σύζευξη των αρσενικών ατόμων και των δύο ομάδων με παρθένα θηλυκά την ημέρα 7.

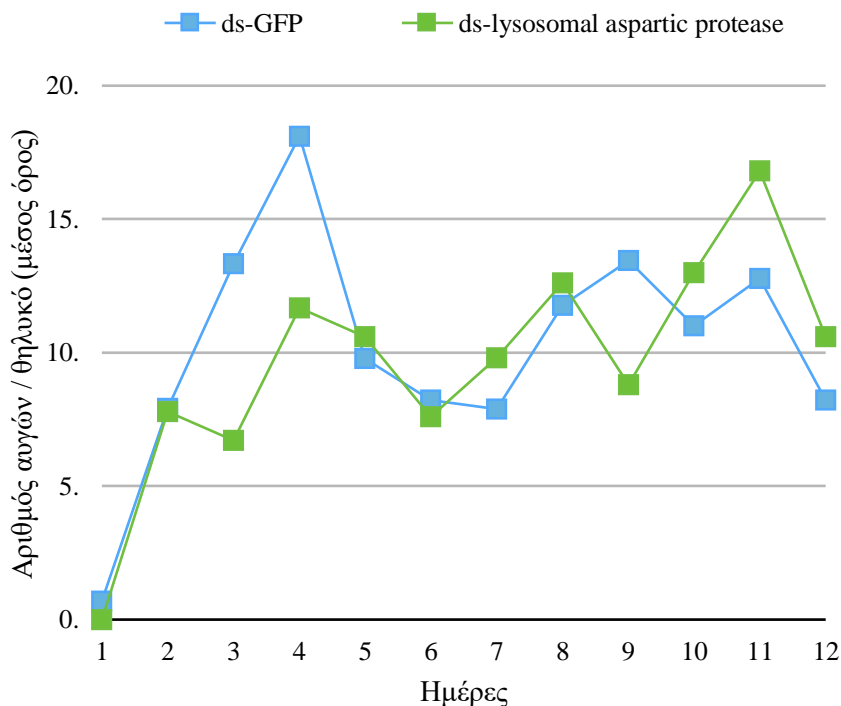
Οι συνθήκες στις οποίες πραγματοποιήθηκε η σύζευξη ήταν πανομοιότυπες. Τα έντομα των δυο φύλων βρίσκονταν σε διαφορετικά κλουβιά μέχρι την 7^η μέρα ωρίμανσης του εντόμου. Η σύζευξη πραγματοποιήθηκε τις απογευματινές ώρες αναμιγνύοντας τα δυο



Εικόνα 13: Σχηματική απεικόνιση της πειραματικής διαδικασίας

φύλα σε ένα μεγάλο κλουβί. Η επιθυμητή αναλογία των εντόμων ήταν ένα αρσενικό:

δυο θηλυκά ώστε να πραγματοποιηθεί χωρίς δυσκολία η επιλογή θηλυκού για σύζευξη. Όταν τα έντομα πραγματοποιούσαν σύζευξη απομονώνονταν από τον υπόλοιπο πληθυσμό για να μην αναμιχθούν με τα μη συζευγμένα. Επιτυχημένη σύζευξη θεωρήθηκε η σύζευξη που είχε διάρκεια μεγαλύτερη της μίας ώρας. Στη φύση ο δάκος της ελιάς πραγματοποιεί σύζευξη για περισσότερο από τρεις ώρες. Εντούτοις, σε εργαστηριακές συνθήκες η διάρκεια σύζευξης του δάκου της ελιάς είναι μικρότερη. Αυτό αποτελεί ένα παράδειγμα προσαρμογής πληθυσμού σε εργαστηριακές συνθήκες. Μετά την επιτυχή σύζευξη πραγματοποιήθηκε απομόνωση του κάθε θηλυκού και καταγραφή της απόθεσης αυγών για τις επόμενες 12 ημέρες. Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε παρουσιάζεται σχηματικά στην εικόνα 13. Στο γράφημα 4 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των καταγραφών.



Γράφημα 4: Μέσος όρος του αριθμού των αυγών που απέθεσε ένα θηλυκό ανά ημέρα

Ο μέσος όρος της απόθεσης αυγών και ο συνολικός αριθμός αυγών που κατά γράφηκαν παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες. Παρατηρούμε ότι τις ημέρες 3 και 4 της καταγραφής υπάρχει διαφορά στον μέσο όρο των αυγών που αποθέτουν τα θηλυκά των δύο ομάδων. Στη συνέχεια, η διαφορά εξομαλύνεται και ο αριθμός των αυγών που αποτίθενται καθημερινά είναι παρόμοιος.

	Αριθμός αυγών											
	Day 1		Day 2		Day 3		Day 4		Day 5		Day 6	
ds GFP	0.7		7.9		13.3		18.1		9.7		8.2	
ds protease		0		7.8		6.7		11.7		10.6		7.6
Total	0.7	0	8.6	7.8	21.9	14.5	40	26.2	49.7	36.8	57.9	44.4

	Αριθμός αυγών											
	Day 7		Day 8		Day 9		Day 10		Day 11		Day 12	
ds GFP	7.8		11.7		13.4		11		12.8		8.2	
ds protease		9.8		12.6		8.8		13		16.8		10.6
Total	65.7	54.2	77.4	66.8	90.8	75.6	101.8	88.6	114.6	105.4	122.8	116

Πίνακας 1: Μέσος όρος του αριθμού των αυγών που απέθεσε ένα θηλυκό ανά ημέρα και άθροισμα όλων των ημερών

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο δάκος της ελιάς *Bactrocera oleae* είναι ένα παρασιτικό έντομο το οποίο κάθε χρόνο προκαλεί σοβαρές ζημιές στις ελαιοκαλλιέργειες. Η αντιμετώπιση του ακόμη και σήμερα, πραγματοποιείται με κλασικούς τρόπους, όπως η χρήση εντομοκτόνων και παγίδων, οι οποίοι έχουν αποδεδειγμένα επιβλαβείς συνέπειες, για το περιβάλλον αλλά και για τους ανωτέρους οργανισμούς των οικοσυστημάτων. Αυτό οδήγησε στην ανάγκη ανάπτυξης εναλλακτικών και φιλικών προς το περιβάλλον μεθόδων καταπολέμησης του εντόμου οι οποίες θα παρέχουν την απαραίτητη εξειδίκευση προς τον οργανισμό-στόχο. Μετά τη σύζευξη το θηλυκό έντομο *B. oleae* δημιουργεί νύγματα στους ανώριμους ελαιόκαρπους προκειμένου να αποθέσει σε αυτούς τα αυγά του. Τα νύγματα αυτά αποτελούν πηγή μόλυνσης του ελαιόκαρπου από μύκητες ενώ η προνύμφη η οποία προκύπτει χρησιμοποιεί το καρπό ως θρεπτικό μέσο καθιστώντας τον μη εμπορεύσιμο. Όλα τα παραπάνω προϋποθέτουν την επιτυχή σύζευξη του θηλυκού με το αρσενικό έντομο. Κατά συνέπεια, τυχόν παρεμπόδιση της διαδικασίας της αναπαραγωγής μπορεί να συμβάλλει καθοριστικά στην ανάπτυξη των νέων μεθόδων καταπολέμησης.

Σύμφωνα με τα όσα είναι γνωστά για το αναπαραγωγικό σύστημα των εντόμων, ένα όργανο το οποίο είναι πολύ πιθανόν να παράγει μόρια-στόχους σημαντικά για την δημιουργία νέων μεθόδων καταπολέμησης του είδους, είναι οι βοηθητικοί αδένες των αρσενικών. Από τους ιστούς αυτούς παράγεται μια μεγάλη ποικιλία πρωτεϊνών οι οποίες μαζί με υδατάνθρακες, ανόργανες ουσίες και λιπίδια αποτελούν τις εκκρίσεις οι οποίες συνοδεύουν το σπέρμα από το αρσενικό στο θηλυκό έντομο κατά τη διάρκεια μιας επιτυχημένης σύζευξης. Από μελέτες σε άλλα είδη εντόμων, όπως η *Drosophila melanogaster* είναι γνωστό ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στις αλλαγές της συμπεριφοράς και της φυσιολογίας, οι οποίες παρατηρούνται στα θηλυκά μετά τη σύζευξη [97]. Η εμφάνιση ενός επιθυμητού φαινοτύπου των θηλυκών ο οποίος οφείλεται στη μεταφορά μιας πρωτεΐνης μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη νέων εναλλακτικών μεθόδων καταπολέμησης του δάκου μειώνοντας τα επίπεδα του πληθυσμού του. Επιθυμητά χαρακτηριστικά αυτού του φαινοτύπου μπορούν να αφορούν τον χρόνο σύζευξης, την απόθεση αυγών, την επιτυχία της σύζευξης, τον αριθμό των προνυμφών και των ενηλίκων που παράγονται, τον επιτυχή σχηματισμό ενηλίκων εντόμων και την αναλογία αρσενικών προς θηλυκών απογόνων.

Στόχος αυτής της διπλωματικής εργασίας είναι η μελέτη του γονιδίου της λυσοσωμικής πρωτεάσης του ασπαρτικού το οποίο φέρεται να εκφράζεται στους βοηθητικούς αδένες και η διερεύνηση της συμμετοχής του στην σύζευξη. Οι πρωτεάσες αποτελούν κατηγορία πρωτεϊνών που έχουν διατηρηθεί στα αναπαραγωγικά όργανα πολλών ειδών και τάξεων όπως τα είδη *Ae. aegypti* και *D. melanogaster* [97]. Αυτό μπορεί να οφείλεται στη συμμετοχή τους στη ρύθμιση πολλών εξωκυτταρικών διαδικασιών.

Αρχικά, μελετήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου της λυσοσωμικής πρωτεάσης του ασπαρτικού με ποσοτική Real-Time PCR σε συγκεκριμένες χρονικές στιγμές από την ημέρα μηδέν (ημέρα εκκόλαψης του ενήλικου) έως και την ημέρα επτά όπου και επέρχεται η σεξουαλική ωρίμανση [117], ώστε να παρατηρηθεί αν το επίπεδο έκφρασης του γονιδίου μπορεί να συσχετιστεί με την ωρίμανση του ενήλικου. Παρατηρήθηκε ότι η έκφραση του γονιδίου αυτού είναι ελάχιστη τις δύο πρώτες μέρες της ζωής του ενήλικου αρσενικού. Την 3^η μέρα όμως, η έκφραση αυξάνεται σημαντικά και σημειώνει το μέγιστο ποσοστό της. Στη συνέχεια, επιστρέφει σε χαμηλά επίπεδα την 5^η μέρα. Η απότομη αύξηση της έκφρασης πιθανότατα οφείλεται στο γεγονός ότι το έντομο συσσωρεύει πρωτεΐνες, μια εκ των οποίων και το προϊόν του γονιδίου, κατά τις πρώτες μέρες της ενήλικης ζωής του κατά τις οποίες πραγματοποιείται και η σεξουαλική ωρίμανση

Για να διασαφηνιστεί ο ρόλος και η σημασία του προϊόντος του γονιδίου στην αναπαραγωγική διαδικασία πραγματοποιήθηκε ανάλυση παροδικής αποσιώπησης του

γονιδίου. Για το σκοπό αυτό έγινε έγχυση δίκλωνου RNA (dsRNA), την ημέρα μηδέν χρησιμοποιώντας ως γονίδιο ελέγχου το GFP. Έπειτα απομονώθηκαν ιστοί (βοηθητικοί αδένες) την 3^η και 7^η μέρα της ανάπτυξης των εντόμων, ώστε να ελεγχθεί αν πραγματοποιήθηκε αποσιώπηση. Παρατηρήθηκε επιτυχία της μεθόδου σε ποσοστό 70% την 3^η (τρίτη) μέρα ενώ παρέμεινε σε υψηλά επίπεδα (60%) και την 7^η μέρα.

Στη συνέχεια, προκειμένου να παρατηρηθεί αν το γονίδιο με ποσοστό αποσιώπησης 60% είναι ικανό να παρεμποδίσει την αναπαραγωγική διαδικασία επιτράπηκε στα αρσενικά να πραγματοποιήσουν σύζευξη με παρθένα θηλυκά έντομα. Κατόπιν, τα θηλυκά έντομα απομονώθηκαν και πραγματοποιήθηκε καθημερινή καταγραφή του αριθμού των αυγών που απέθεσαν κατά τη διάρκεια των επόμενων 12 ημερών. Κατά τις δύο πρώτες μέρες της καταμέτρησης δεν καταγράφηκε σημαντική διαφορά στην απόθεση των αυγών των δύο ομάδων. Εντούτοις, την 3^η και 4^η μέρα ο ρυθμός απόθεσης αυγών των θηλυκών εντόμων που είχαν συζευχθεί με αρσενικά με μερική αποσιώπηση του γονιδίου της λυσοσωμικής ασπαρτικής πρωτεάσης ήταν αυξημένος σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (Πίνακας 1 και Γράφημα 4). Η διαφορά ανάμεσα στις δύο ομάδες στη συνέχεια εξισορροπείται. Η μείωση αυτή των πρώτων ημερών μπορεί να είναι ένδειξη της συμμετοχής του προϊόντος του γονιδίου σε μια μετα-συζευκτική δραστηριότητα του θηλυκού.

Οι πρωτεάσες φαίνεται να έχουν ρόλο στη ρύθμιση διαφόρων μετα-συζευκτικών επιδράσεων, π.χ. ενεργοποίηση της προ-ορμόνης οβουλίνης που οδηγεί στην αύξηση της ωορρηξίας των θηλυκών [105]. Μέχρι στιγμής η μόνη λυσοσωμική πρωτεάση ασπαρτικού που έχει βρεθεί σε αναπαραγωγικό ιστό εντόμων φαίνεται να αποσυνθέτει τα οργανίδια που χρησιμοποιούνται στην έκκριση της βιτελλογενίνης η οποία περιβάλλει το ωάριο, σχηματίζοντας μια δίοδο ώστε το σπέρμα να εισχωρήσει στο ωάριο [118]. Υπό αυτή την οπτική, ως μια πρώτη εξήγηση των αποτελεσμάτων μας θα μπορούσαμε να προτείνουμε ότι λόγω της μειωμένης ποσότητας της πρωτεάσης η οποία μεταφέρθηκε στα θηλυκά η αποσύνθεση της βιτελλογενίνης πραγματοποιήθηκε σε χαμηλότερα επίπεδα και συνεπώς δεν γονιμοποιήθηκε ο φυσιολογικός αριθμός ωαρίων. Ένα δεύτερο σενάριο μπορεί να βασίζεται στο γεγονός ότι πρωτεάσες φαίνεται να εμπλέκονται και σε μια άλλη πτυχή της μετα-συζευκτικής συμπεριφοράς των θηλυκών. Στη *D. melanogaster* η αύξηση στην απόθεση αυγών πραγματοποιείται σε δυο φάσεις και οι δύο απαραίτητες για τη μέγιστη γονιμότητα των θηλυκών. Μια βραχυπρόθεσμη η οποία πραγματοποιείται το πρώτο 24ώρο μετά τη σύζευξη και μια μακροπρόθεσμη η οποία ακολουθεί και απαιτεί την παρουσία ορισμένων πρωτεϊνών ανάμεσα σε αυτές και πρωτεάσες [139]. Είναι πιθανό στο δάκο της ελιάς η βραχυπρόθεσμη φάση να διαρκεί δύο μέρες (όταν δεν παρατηρείται διαφορά ανάμεσα στην ομάδα αποσιώπησης και ελέγχου, Γράφημα 4) και ο ρόλος της υπό μελέτη πρωτεάσης να βρίσκεται στην έναρξη της μακροπρόθεσμης φάσης (ημέρες 3 και 4, Γράφημα 4). Η πιθανή μείωση της ποσότητας της πρωτεάσης που μεταφέρθηκε στα θηλυκά είναι πιθανό να προκάλεσε την καθυστέρηση της εμφάνισης της μακροπρόθεσμης φάσης, με αποτέλεσμα αργότερα ο ρυθμός ωοαπόθεσης να εξισορροπείται.

Προκειμένου να αξιολογηθεί η σημασία των αποτελεσμάτων χρειάζεται περαιτέρω μελέτη του γονιδίου αυτού, από τη στιγμή που υπάρχει ένδειξη για συμμετοχή της πρωτεΐνης στην σύζευξη. Θα πρέπει να επαναληφθεί το πείραμα τουλάχιστον δυο φορές ακόμη με καταγραφή τόσο της απόθεσης αυγών αλλά και του αριθμού των προνυμφών και των ενηλίκων που παράγονται. Επίσης σημαντικό είναι να μελετηθεί και η αναλογία αρσενικών και θηλυκών ενήλικων εντόμων που θα εμφανιστούν. Αυτό θα βοηθήσει στον ακριβή καθορισμό του μονοπατιού που συμμετέχει η πρωτεάση.

Επίσης σημαντικός παράγοντας είναι να αυξηθεί το ποσοστό αποσιώπησης του γονιδίου για την εμφάνιση ενός ξεκάθਾਰου φαινότυπου. Αυτό θα μπορούσε να επιτευχθεί είτε με μια επαναληπτική έγχυση ds-RNA την 6^η ή την 7^η μέρα (μέρα που πραγματοποιείται η σύζευξη) είτε με την ταυτόχρονη προσθήκη περισσότερων dsRNAs σχεδιασμένων σε διαφορετικά μέρη του γονιδίου της πρωτεάσης. Κατά τη διάρκεια του πειράματος που

πραγματοποιήθηκε, είναι πιθανόν η παρουσία του υπόλοιπου ποσοστού της πρωτεΐνης, που αγγίζει το 40%, να είναι αρκετή ώστε να μην παρουσιαστεί ένας μεγαλύτερου βαθμού φαινότυπος. Λαμβάνοντας αυτό υπόψη ακόμη και η μικρή μεταβολή της απόθεσης αυγών μεταξύ των δύο ομάδων αποσώπησης που παρατηρήθηκε μπορεί να είναι μια σημαντική ένδειξη για συμμετοχή της πρωτεάσης στη σύζευξη.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Tzanakakis, M.EM., (2006). Insects and mites feeding on olive. *Brill Academic Publishers*, Boston, MA.
2. Fletcher BS, Pappas S, Kapatos E (1978) Changes in ovaries of olive flies (*Dacus oleae* (Gmelin)) during summer, and their relationship to temperature, humidity and fruit availability, *Ecol. Entomol.*3, 99–107
3. Τζανακάκης, Μ. και Κατσόγιαννος Β., (2003). Έντομα Καρποφορών Δέντρων και Αμπέλου. *Αγρότοπος Α.Ε., Θεσσαλονίκη*, σελ.360
4. Dyck VA, Hendrichs J, Robinson AS: Sterile Insect Technique: Principles and practice in area-wide integrated pest management Dordrecht, Netherlands: Springer; 2005
5. Ant T, Koukidou M, Rempoulakis P, et al. Control of the olive fruit fly using genetics-enhanced sterile insect technique. *BMC Biology*. 2012;10:51. doi:10.1186/1741-7007-10-51.
6. Phuc HK, Andreasen MH, Burton RS, et al. Late-acting dominant lethal genetic systems and mosquito control. *BMC Biology*. 2007;5:11. doi:10.1186/1741-7007-5-11.
7. Knipling, E. F. 1955. Possibilities of insect control or eradication through the use of sexually sterile males. *J. Econ. Entomol.* 48: 459-469.
8. Mastrangelo, T., A. G. Parker, A. Jessup, R. Pereira, D. Orozco-Davila, A. Islam, T. Dammalage, and J.M.M. Walder. 2010. A new generation of X ray irradiators for insect sterilization. *J. Econ. Entomol.* 103: 85Ð94.
9. LaChance, L. E. 1967. The induction of dominant lethal mutations in insects by ionizing radiation and chemicals Ñas related to the sterile-male technique of insect control, pp. 617- 650. In J. W. Wright, and R. Pal [eds.], *Genetics of insect vectors of disease*. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.
10. Tazima, Y. 1978. Radiation mutagenesis of the silkworm, pp. 213Ð266. In Y. Tazima [ed.], *The silkworm - an important laboratory tool*. Kodansha Ltd., Tokyo, Japan.
11. LaChance, L. E., and C. K. Graham. 1984. Insect radiosensitivity: dose curves and dose-fractionation studies of dominant lethal mutations in the mature sperm of 4 insect species. *Mutat. Res.* 127: 49-59.
12. Andreasen, M.H., Curtis, C.F., 2005 Optimal life stage for radiation sterilization of *Anopheles* males and their fitness for release. *Med. Vet. Entomol.* 19, 238-244
13. Helinski MEH, Knols BG: The influence of late-stage pupal irradiation and increased irradiated: un-irradiated male ratio of mating competitiveness of the malaria mosquito *Anopheles arabiensis* Patton. *Bull Entomol Res* 2009, 99:317 – 322
14. Yamada H, Vreysen MJ, Gilles JR, Munhenga G, Damiens DD: The effects of genetic manipulation, dieldrin treatment and irradiation on the mating competitiveness of male *Anopheles arabiensis* in field cages. *Malar J* 2014, 13:318
15. Grosch DS (1961) Entomological aspects of radiation related to genetics and physiology. *Annu Rev Entomol* 6: 81-106
16. LaBrecque GC, Keller JC (1965) Advances in insect population control by the sterile-male technique. Vienna, Austria: International Atomic Energy Agency (IAEA). 79 p.
17. Economopoulos AP (1972) Sexual competitiveness of gamma-ray sterilized males of *Dacus oleae*. Mating frequency of artificially reared and wild females. *Environ Entomol* 1: 490–497.
18. Helinski MEH, Knols BGJ (2008) Mating competitiveness of male *Anopheles arabiensis* mosquitoes irradiated with a semi- or fully-sterilizing dose in small and large laboratory cages. *J Med Entomol* 45: 698–705
19. Oliva CF, Jacquet M, Gilles J, Lemperiere G, Maquart P-O, et al. (2012) The Sterile Insect Technique for Controlling Populations of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) on Reunion Island: Mating Vigour of Sterilized Males. *PLoS ONE* 7(11): e49414. doi:10.1371/journal.pone.0049414

20. Proverbs MD (1969) Induced sterilization and control of insects. *Annu RevEntomol* 14: 81–102.
21. Ndo C., Yamada H., Damiens D.D., N’do S., Seballos G., Gilles J.R.L.: X-ray sterilization of *An. arabiensis* genetic sexing strain ‘ANO IPCL1’ at pupal and adult stages. *Acta Tropica* 131 (2014) 124-128
22. Maïga et al. Mating competitiveness of sterile male *Anopheles coluzzi* in large cages. *Malaria Journal* 2014,13:460
23. Benedict MQ, Knols BGJ, Bossin HC, Howell PI, Mialhe E, et al. (2009) Colonization and mass rearing: learning from others. *Malaria J* 8: S4
24. Clarke, G.M., McKenzie, L.J., 1992. Fluctuating asymmetry as a quality control indicator for insect mass rearing processes. *J. Econ. Entomol.* 85, 2045–2050
25. Madakacherry O., Lees R.S., Gilles J.R.L.: *Aedes albopictus* (Skuse) males in laboratory and semi-field cages: Release ratios and mating competitiveness. *Acta Tropica* (2014) S124-S129
26. Whitten M (1969) Automated sexing of pupae and its usefulness in control by sterile insects, *J Econ Entomol* 62, 272-273
27. Rossler, Y., 1979. Automated sexing of *Ceratitis capitata* (Dip: Tephritidae): the development of strains with inherited sexlimited pupal color dimorphism. *Entomophaga* 24: 411–416.
28. Robinson, A.S. & C. van Heemert, 1981. Genetic sexing in *Drosophila melanogaster* using the alcohol dehydrogenase locus. *Theoret. Appl. Genet.* 72: 453–457
29. Baker, R.H., R.K. Sakai & U.T. Saifuddin, 1978. Genetic sexing technique for a mosquito sterile male release. *Nature* 274: 253–255.
30. Oliva, C.F., M.Q. Benedict, S.M. Soliban, G. Lemperiere, F. Balestrino, and J. Gilles. 2012. Comparisons of life-history characteristics of a genetic sexing strain with laboratory strains of *Anopheles arabiensis* (Diptera: Culicidae) from Northern Sudan. *J. Med. Entomol.* 49: 1045-1051
31. Varanda, E.A., and D.C. Tavares. 1998. Radioprotection: Mechanism and radioprotective agents including honeybee venom. *Venom. Anim. Toxins.* 4: 5-21.
32. Hillen, W. & Wissmann, A. (1989) in *Protein-Nucleic Acid Interaction, Topics in Molecular and Structural Biology*, eds. Saenger, W. & Heinemann, U. (Macmillan, London), Vol. 10, pp. 143-162.
33. Triezenberg, S. J., Kingsbury, R. C. & McKnight, S. L. (1988) *Genes Dev.* 2, 718-729.
34. Fu GL, Condon KC, Epton MJ, Gong P, Jin L, Condon GC, Morrison NI, Dafa’alla TH, Alphey L. 2007. Female-specific insect lethality engineered using alternative splicing. *Nat. Biotechnol.* 25, 353–357
35. Fu GL, et al. 2010. Female-specific flightless phenotype for mosquito control. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 107, 4550–4554
36. Valdez de MRW, Nimmo D, Betz J, Gong HF, James AA, Alphey L, Black WC. 2011. Genetic elimination of dengue vector mosquitoes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 108, 4772–4775
37. Heinrich JC, Scott MJ. 2000. A repressible female-specific lethal genetic system for making transgenic insect strains suitable for a sterile-release program. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 97, 8229–8232
38. Thomas D, Donnelly C, Wood R, Alphey L. Insect population control using a dominant, repressible, lethal genetic system. *Science* 2000;287:2474-6
39. Schliekelman P, Gould F. Pest control by the release of insects carrying a female-killing allele on multiple loci. *J Econ Entomol* 2000;93:1566-79.
40. Massonnet-Bruneel, Blandine et al. “Fitness of Transgenic Mosquito *Aedes Aegypti* Males Carrying a Dominant Lethal Genetic System.” Ed. Kristin Michel. *PLoS ONE* 8.5 (2013): e62711. PMC. Web. 19 Oct. 2015.
41. Alphey L. Re-engineering the sterile insect technique. *Insect Biochem Mol Biol.* 2002 Oct;32(10):1243-7.

42. Mazomenos, B.E., Pantazi-Mazomenou, A. and Stefanou, D., (2002). Attract and kill of the olive fruit fly *Bactrocera oleae* in Greece as a part of an integrated control system, IOBC wars Bulletin Vol.25
43. Ζιώγας, Ν.Β., (1996). Ο Δάκος της ελιάς. Σελ.25-26, 44-45, 48-52, 89-97
44. Montiel-Bueno A, Jones O (2002) Alternative methods for controlling the olive fly, *Bactrocera oleae*, involving semiochemicals. Use of pheromones and other semiochemicals in integrated production. Int Org Biol Integr Control-West Palearctic Reg Sect (IOBW/WPRS) Bull 25:147-156
45. Denholm I, Rowland MW. 1992. Tactics for managing pesticide resistance in arthropods: theory and practice. Annual Review of Entomology 37:91–112.
46. Zhang D, Lees RS, Xi Z, Gilles JRL, Bourtzis K. Combining the Sterile Insect Technique with Wolbachia-Based Approaches: II- A Safer Approach to *Aedes albopictus* Population Suppression Programmes, Designed to Minimize the Consequences of Inadvertent Female Release. Favia G, ed. PLoS ONE. 2015;10(8):e0135194. doi:10.1371/journal.pone.0135194.
47. Economopoulos AP, Avtzis N, Zervas G, Tsitsipis J, Haniotakis G, Tsiropoulos G, Manoukas A (1977). Experiments on control of olive fly, *Dacus oleae* (Gmelin), by combined effect of insecticides and releases of gamma-ray sterilized insects. J Applied Entomol 83:201-215.
48. Economopoulos AP: The olive fruit fly, *Bactrocera (Dacus) oleae* (Gmelin) (Diptera: Tephritidae): its importance and control; previous SIT research and pilot testing. International Atomic Energy Agency, Vienna, Austria; 2002
49. Leftwich, Philip T. et al. “Genetic Elimination of Field-Cage Populations of Mediterranean Fruit Flies.” Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences 281.1792 (2014): 20141372. PMC.
50. Kraaijeveld, Ken, and Tracey Chapman. “Effects of Male Sterility on Female Remating in the Mediterranean Fruitfly, *Ceratitis capitata*.” Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences 271.Suppl 4 (2004): S209–S211. Print.
51. Daniela Marchini & Giovanna Del Bene (2006) Comparative fine structural analysis of the male reproductive accessory glands in *Bactrocera oleae* and *Ceratitis capitata* (Diptera, Tephritidae), Italian Journal of Zoology, 73:01, 15-25, DOI: 10.1080/11250000500502319
52. Klowden MJ (2005), Physiological Systems in insects Second Edition Elsevier
53. Briceño RD, Orozco D, Luis Quintero J, Hanson P, del Refugio Hernández M. Copulatory behaviour and the process of intromission in *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae). Rev Biol Trop. 2011 Mar;59(1):291-7.
54. Gillott C. Male accessory gland secretions: modulators of female reproductive physiology and behavior. Annu Rev Entomol. 2003;48:163–84
55. Scolari, Francesca et al. “Transcriptional Profiles of Mating-Responsive Genes from Testes and Male Accessory Glands of the Mediterranean Fruit Fly, *Ceratitis capitata*.” Ed. Subba Reddy Palli. PLoS ONE 7.10 (2012): e46812. PMC.
56. Barr, A.R., 1974. Symposium on reproduction of arthropods of medical and veterinary importance. V. Reproduction in Diptera of medical importance with special reference to mosquitoes. J. Med. Entomol. 11, 35–40.
57. Zhou A., Webb G., Zhu X., Steiner D. F. (1999) Proteolytic processing in the secretory pathway. J. Biol. Chem. 274:20745–20748.
58. Zervas GA (1982) Reproductive physiology of *Dacus oleae* (Gmel.) (Diptera: Trypetidae). Comparison of a wild and artificially reared flies. Geoponica282,10–14
59. Roth, L.M., 1948. A study of mosquito behavior. An experimental laboratory study of the sexual behavior of *Aedes aegypti* (Linnaeus). Am. Midl. Nat. 40, 265–352.
60. K. Oikonomopoulou, K.K. Hansen, M. Saifeddine, N. Vergnolle, I. Tea, E.P. Diamandis, et al. Proteinase-mediated cell signalling: Targeting proteinase-activated receptors (PARs) by kallikreins and more. Biol Chem, 387 (2006), pp. 677–685 <http://dx.doi.org/10.1515/BC.2006.086>

61. Foster, W.A., Lea, A.O., 1975a. Sexual behavior maturation in male *Aedes triseriatus* (Diptera: Culicidae): a re-examination. *J. Med. Entomol.* 12, 459–463.
62. Benedykt Władysław, Katarzyna Pustelny. Regulation of bacterial protease activity. *Cellular & Molecular Biology Letters*. June 2008, Volume 13, Issue 2, pp 212-229
63. Pilpel N, Nezer I, Applebaum SW, Heifetz Y. Mating-increases trypsin in female *Drosophila* hemolymph. *Insect Biochem Mol Biol.* 2008;38:320–330.
64. Ravi Ram K, Sirot LK, Wolfner MF. Predicted seminal astacin-like protease is required for processing of reproductive proteins in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006;103:18674–18679
65. Peng J, Chen S, Busser S, Liu H, Honegger T, Kubli E. Gradual release of sperm bound sex-peptide controls female postmating behavior in *Drosophila*. *Curr Biol.* 2005;15:207–213.
66. Spielman, A., 1964. The mechanics of copulation in *Aedes aegypti*. *Biol. Bull.* 127, 324–344.
67. Lum, P.T.M., 1961a. The reproductive system of some Florida mosquitoes. I. The male reproductive tract. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 54, 397–401
68. Oliva, C.F., Damiens, D., Vreysen, M.J.B., Lempérière, G., Gilles, J., 2013. Reproductive strategies of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) and implications for the sterile insect technique. *PLoS ONE*, 8, e78884.
69. Clements, A.N., 2000. *The Biology of Mosquitoes. Development, Nutrition and Reproduction*, vol. 1. CABI Publishing, New York, NY.
70. Jones, J.C., 1967. Spermatocysts in *Aedes aegypti* (Linnaeus). *Biol. Bull.* 132, 23–33.
71. Jones, J.C., Wheeler, R.E., 1965a. Studies on spermathecal filling in *Aedes aegypti* (Linnaeus). I. Description. *Biol. Bull.* 129, 134–150.
72. Hodapp, C.J., Jones, J.C., 1961. The anatomy of the adult male reproduction system of *Aedes aegypti* (Linnaeus) (Diptera, Culicidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 54, 832–844.
73. Lum, P.T.M., 1961b. The reproductive system of some Florida mosquitoes. II. The male accessory glands and their role. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 54, 430–433.
74. Foster, W.A., Lea, A.O., 1975b. Renewable fecundity of male *Aedes aegypti* following replenishment of seminal vesicles and accessory glands. *J. Insect Physiol.* 21, 1085–1090.
75. Ponlawat, A., Harrington, L.C., 2007. Age and body size influence male sperm capacity of the dengue vector *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* 44, 422–426.
76. Ponlawat, A., Harrington, L.C., 2007. Age and body size influence male sperm capacity of the dengue vector *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* 44, 422–426.
77. Dapples, C.C., Foster, W.A., Lea, A.O., 1974. Ultrastructure of the accessory gland of the male mosquito, *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). *Int. J. Insect Morphol. Embryol.* 3, 279–291.
78. Helinski, M.E.H., Harrington, L.C., 2011. Male mating history and body size influence female fecundity and longevity of the dengue vector *Aedes aegypti*. *J. Med. Entomol.* 48, 202–211
79. Thornhill, R., Alcock, J., 2001. *The Evolution of Insect Mating Systems*. iUniverse.com, Inc., Lincoln, USA.
80. Jones, J.C., 1968. The sexual life of a mosquito. *Sci. Am.* 218, 108–115.
81. George, J.A., 1967. Effect of mating sequence on egg-hatch from female *Aedes aegypti* (L.) mated with irradiated and normal males. *Mosq. News* 27, 82–86.
82. Spielman, A., Leahy, M.G., Skaff, V., 1967. Seminal loss in repeatedly mated female *Aedes aegypti*. *Biol. Bull.* 132, 404–412
83. Spielman, A., Leahy, M.G., Skaff, V., 1969. Failure of effective insemination of young female *Aedes aegypti* mosquitoes. *J. Insect Physiol.* 15, 1471–1479.
84. Helinski, M.E.H., Deewatthanawong, P., Sirot, L.K., Wolfner, M.F., Harrington, L.C., 2012. Duration and dose-dependency of female sexual receptivity responses to seminal fluid proteins in *Aedes albopictus* and *Ae. aegypti* mosquitoes. *J. Insect Physiol.* 58, 1307–1313.

85. Fuchs, M.S., Craig, G.B., Hiss, E.A., 1968. The biochemical basis of female monogamy in mosquitoes. I. Extraction of the active principle from *Aedes aegypti*. *Life Sci.* 7, 835–839.
86. Gwadz, R.W., 1972. Neuro-hormonal regulation of sexual receptivity in female *Aedes aegypti*. *J. Insect Physiol.* 18, 259–266.
87. Yuval, B., 2006. Mating systems of blood-feeding flies. *Annu. Rev. Entomol.* 51, 413–440.
88. Young ADM, Downe AER. Male accessory gland substances and the control of sexual receptivity in female *Culex tarsalis*. *Physiol Entomol.* 1987;12:233–9.
89. Leahy MG, Craig GB. Accessory gland substance as a stimulant for oviposition in *Aedes aegypti* and *A. albopictus*. *Mosq News.* 1965;25:448–52
90. Fuchs MS, Hiss EA. The partial purification and separation of the protein components of matrone from *Aedes aegypti*. *J Insect Physiol.* 1970;16:931–9.
91. Fuchs MS, Craig GB Jr, Hiss EA. The biochemical basis of female monogamy in mosquitoes. I. Extraction of the active principle from *Aedes aegypti*. *Life Sci.* 1968;7:835–9
92. Fuchs MS, Craig GB Jr, Despommier DD. The protein nature of the substance inducing female monogamy in *Aedes aegypti*. *J Insect Physiol.* 1969;15:701–9.
93. Chapman T, Davies SJ. Functions and analysis of the seminal fluid proteins of male *Drosophila melanogaster* fruit flies. *Peptides.* 2004;25:1477–90.
94. Ram KR, Wolfner MF. Seminal influences: *Drosophila* Acps and the molecular interplay between males and females during reproduction. *Integr Comp Biol.* 2007;47:427–45
95. Wolfner M. “S.P.E.R.M.” seminal proteins are essential reproductive modulators: the view from *Drosophila*. *Soc Reprod Fertil.* 2007;Suppl 65:183–199
96. Ravi Ram K, Wolfner MF (2007) Sustained post-mating response in *Drosophila melanogaster* requires multiple seminal fluid proteins. *PLoS Genet* 3: e238
97. Baldini F, Gabrieli P, Rogers DW, Catteruccia F. Function and composition of male accessory gland secretions in *Anopheles gambiae*: a comparison with other insect vectors of infectious diseases. *Pathogens and Global Health.* 2012;106(2):82-93. doi:10.1179/2047773212Y.0000000016.
98. Gurupriya VS, Roy SC, Dhama K, Gopinath D, Rekha V, Aswathi PB, John KJ, Gopalakrishnan A (2014): Proteases and Proteases Inhibitors of Semen – A Review. *Adv. Anim. Vet. Sci.* 2 (8): 447-456
99. Laskowski M, Kato I (1980) Protein inhibitors of proteinases. *Annu Rev Biochem* 49: 593–626
100. Lung O, Tram U, Finnerty CM, Eipper-Mains MA, Kalb JM, et al. (2002) The *Drosophila melanogaster* seminal fluid protein Acp62F is a protease inhibitor that is toxic upon ectopic expression. *Genetics* 160: 211–224
101. Swanson WJ, Clark AG, Waldrip-Dail HM, Wolfner MF, Aquadro CF (2001) Evolutionary EST analysis identifies rapidly evolving male reproductive proteins in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 7375–7379
102. Mueller JL, Ripoll DR, Aquadro CF, Wolfner MF (2004) Comparative structural modeling and inference of conserved protein classes in *Drosophila* seminal fluid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 13542–13547
103. Park M, Wolfner MF (1995) Male and female cooperate in the prohormone-like processing of a *Drosophila melanogaster* seminal fluid protein. *Dev Biol* 171: 694–702
104. Monsma SA, Harada HA, Wolfner MF (1990) Synthesis of two *Drosophila* male accessory gland proteins and their fate after transfer to the female during mating. *Dev Biol* 142: 465–475
105. Heifetz Y, Vandenberg LN, Cohn HI, Wolfner MF (2005) Two cleavage products of the *Drosophila* accessory gland protein ovulin can independently induce ovulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 743–748
106. Mueller JL, Linklater JR, Ravi Ram K, Chapman T, Wolfner MF (2008) Targeted gene deletion and phenotypic analysis of the *Drosophila melanogaster* seminal fluid protease inhibitor Acp62F. *Genetics* 178: 1605–1614

107. Spain Considers Trial Release of Genetically-Modified Olive Flies By JULIE BUTLER on August 27, 2013 oliveoiltimes.com
108. Media release, UK company withdraws its application for release of genetically engineered flies in Spain. 7 August 2015, <http://www.testbiotech.org/>
109. Sokoloff, A. 1974. The Biology of Tribolium, vol.II. Clarendon, Oxford.
110. Lewis, S.M. & Iannini, J. 1995. Fitness consequences of differences in male mating behaviour in relation to female reproductive status in our beetles. *Anim. Behav.* 50:1157-1160.
111. Barclay, H.J., 2005. Mathematical models for the use of sterile insects. In: Dyck, V.A., Hendrichs, J., Robinson, A.S. (Eds.), *Sterile Insect Technique. Principles and Practice in Area-wide Integrated Pest Management*. Springer Netherlands, Dordrecht, The Netherlands, pp. 147–174.
112. Whitten, M., Mahon, R., 2005. Misconceptions and constraints. In: Dyck, V.A., Hendrichs, J., Robinson, A.S. (Eds.), *Sterile Insect Technique. Principles and Practice in Area-wide Integrated Pest Management*. Springer Netherlands, Dordrecht, The Netherlands, pp. 601–626.
113. Knippling, E.F., 1964. The Potential Role of the Sterility Method for Insect Population Control with Special Reference to Combining this Method with Conventional Methods. Agricultural Research Service (USDA), Washington, DC.
114. Whitten, M.J., 1971. Selection for polygamy and the sterile-insect technique. *J. Econ. Entomol.* 64, 1310–1311.
115. Perez-Staples, D., Shelly, T.E., Yuval, B., 2013. Female mating failure and the failure of mating in sterile insect programs. *Entomol. Exp. Appl.* 146, 66–78.
116. Steiner, L.F., Harris, E.J., Mitchell, W.C., Fujimoto, M.S., Christenson, L.D., 1965. Melon fly eradication by overflooding with sterile flies. *J. Econ. Entomol.* 58, 519–522
117. Benelli G, Bonsignori G, Stefanini C, Raspi A, Canale A. The production of female sex pheromone in *Bactrocera oleae* (Rossi) young males does not influence their mating chances. *Entomological Science*
118. Cho, W.-L., Raikhel, A.S. (1992): Cloning of cDNA for mosquito lysosomal aspartic protease: Sequence analysis of an insect lysosomal enzyme similar to cathepsins D and E *Journal of Biological Chemistry* Vol. 267 (30) 21823-21829
119. Iannotta N., Noce M.E., Perri L., Scalercio S., Vizzarri V., 2006. Susceptibility of olive cultivars to *Camarosporium dalmaticum* (Thum) infections. Olivebioteq, Marzara del Vallo, Marsalla, Italy
120. Stavradi, H., (1970). *Entomophaga*. 15: 225-231
121. Neuenschwander, P., Bieler, F., Delucchi, V. and Michelakis, S., (1983). Natural enemies of preimaginal stages of *Dacus oleae* Gmel. (Dipt., Tephritidae) in Western Crete. I. Bionomics and phenologies, *Boll. Lab. Ent. Agr.*, "F. Silvestri".40:3-32
122. Economopoulos, A.P. (1979). Attraction of *Dacus oleae* (Gmelin) (Diptera, Tephritidae) to odor and color traps. *Z. ang. Ent.* 88: 90-97
123. Yamagishi M, Tsubaki Y. Copulation duration and sperm transfer in the melon fly, *Dacus cucurbitae* Coquillett (Diptera: Tephritidae) *Applied Entomology and Zoology*. 1990;25:517–519
124. Jones, J.C., 1974. Sexual activities during single and multiple cohabitations in *Aedes aegypti* mosquitoes. *Physiol. Entomol.* 48, 185–191.
125. Benelli G, Canale A, Bonsignori G, Ragni G, Stefanini C, Raspi A (2012) Male wing vibration in the mating behavior of the olive fruit fly *Bactrocera oleae* (Rossi) (Diptera: Tephritidae). *J Ins Behav* 25:590–603
126. Mazomenos BE (1989) *Dacus oleae*. In: Helle W Word Crop Pests (ed) Vol 3A: Fruit Flies: their biology, natural enemies and control. p 169
127. Cavalloro R, Delrio G (1970) Rilievi sul comportamento sessuale di *Dacus oleae* (Gmelin) (Diptera, Tephritidae) in laboratorio. *Redia* LII:201–230
128. Zouros E, Krimbas CB (1970) Frequency of male bigamy in natural population of the olive fruit fly *Dacus oleae* as found by using enzyme polymorphism. *Entomol Exp Appl* 13:1–9

129. Dhillon MK, Singh R, Naresh JS, Sharma HC. The melon fruit fly, *Bactrocera cucurbitae*: A review of its biology and management. *Journal of Insect Science*. 2005;5:40.
130. Lung O, Wolfner MF. Identification and characterization of the major *Drosophila melanogaster* mating plug protein. *Insect Biochem Molec Biol*. 2001;31:543–551.
131. Samakovlis, C., Kylsten, P., Kimbrell, D., Engstrom, A., Hultmark, A., 1991. The andropin gene and its product, a male-specific anti-bacterial peptide in *Drosophila melanogaster*. *EMBO J* 10, 163–169
132. Lung, O., Wolfner, M.F., 2001a. *Drosophila* males transfer antibacterial proteins from their accessory gland and ejaculatory duct to their mates. *J. Ins. Physiol.* 47, 617–622
133. Peng, J., Zipperlen, P., Kubli, E., 2005. *Drosophila* sex peptide stimulates female innate immune system after mating via the Toll and Imd pathways. *Current Biology* 15, 1690–1694
134. A. Sumantha, C. Larroche, A. Pandey, Microbiology and industrial biotechnology of food-grade proteases: a perspective, *Food Technol Biotechnol*, 44 (2006), pp. 211–220
135. J.S. Lin, S.K. Lee, Y. Chen, W.D. Lin, C.H. Kao, Purification and characterization of a novel extracellular tripeptidyl peptidase from *Rhizopus oligosporus*, *J Agric Food Chem*, 59 (2011), pp. 11330–11337 <http://dx.doi.org/10.1021/jf201879e>
136. A. Ciechanover, Proteolysis: From the lysosome to ubiquitin and the proteasome, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6 (2005), pp. 79–87 <http://dx.doi.org/10.1038/nrm1552>
137. Wolf B. B., Green D. R. (1999) Suicidal tendencies: apoptotic cell death by caspase family proteinases. *J. Biol. Chem.* 274:20049–20052.
138. Monsma SA, Harada HA, Wolfner MF. Synthesis of two *Drosophila* male accessory gland proteins and their fate after transfer to the female during mating. *Dev Biol*. 1990;142:465–475.
139. LaFlamme, Brooke A., K. Ravi Ram, and Mariana F. Wolfner. “The *Drosophila* Melanogaster Seminal Fluid Protease ‘Seminase’ Regulates Proteolytic and Post-Mating Reproductive Processes.” Ed. Michael W. Nachman. *PLoS Genetics* 8.1 (2012): e1002435. PMC.
140. Wolf, J. B. W. (2013), Principles of transcriptome analysis and gene expression quantification: an RNA-seq tutorial. *Molecular Ecology Resources*, 13: 559–572. doi: 10.1111/1755-0998.12109
141. Wang, Zhong, Mark Gerstein, and Michael Snyder. “RNA-Seq: A Revolutionary Tool for Transcriptomics.” *Nature reviews. Genetics* 10.1 (2009): 57–63. PMC.
142. Wilhelm BT, et al. Dynamic repertoire of a eukaryotic transcriptome surveyed at single-nucleotide resolution. *Nature*. 2008;453:1239–1243
143. Cloonan N, et al. Stem cell transcriptome profiling via massive-scale mRNA sequencing. *Nature Methods*. 2008;5:613–619.
144. Mortazavi A, Williams BA, McCue K, Schaeffer L, Wold B. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nature Methods*. 2008;5:621–628.
145. Tsapakis E. M., Basu A, Aitchison K.J., 2004: Transcriptomics and proteomics: advancing the understanding of psychiatric pharmacogenomics. *Clinical Neuropsychiatry* 1, 2, 117-124
146. Διδακτορική διατριβή, Τρανσκριπτομική και πρωτεομική ανάλυση του σημαντικότερου παρασίτου της ελιάς, του εντόμου *Bactrocera oleae*, με έμφαση στα συστήματα φυλοδιαχωρισμού και ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα, Σαγρή Ευθυμία, Λάρισα 2015

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Αλληλουχίες

- Η αλληλουχία του μεταγράφου του γονιδίου *lysosomal aspartic protease* είναι:

ACCCGGACAGTTGTATTTTCATCAATAGGTGCCATACGACATTGATAACAAAGTAAAACAA
AATGTTCAAGTTTCTCGCATTTCTGACCATTTGCGTTGCCTTGGCCTCGGCCAATTTGGT
GCGCGTGCCCATCTACAAGAACCCCAATTACCGCAGAACCCGTAATTCTGTGAATACTGA
GACCGCCTACTTGCGCGGCAAATACAATGTGGCCACAGCACGCAGCGCCAGCGAGCAATT
AGATAATGAAGTGAATATGTCTTACTATGGCATAATCACCATCGGTACACCTCCACAGGA
GTTCTTGGTGCTCTTCGATTCCGGCTCATCTAACTTGTGGGTGCCATCATCCGACTGTCC
CAGCAGCAACGAAGCTTGCCAACCTTACAACCAATACGATTCGAGCGCTTCTAGCACCTA
TGTTGCCAACGATGAATTTTTCTCTATTGCATACGGTACTGGCAGTTTGTCTGGTTTCTT
GTCGCAGGATACCGTTAATGTAGCTGGACTCAATATTCAGAACCAAGTTTTCGCTCAAGC
TATGCTAGAACCAGGCACTCAGTTCGTTAACGCCAACTTCGATGGTATTTTGGGTATGGC
CTTCCAATCGATTGCCGTTGACAATGTAGTCCCACCGTTC **TACAACATCTGGAGTCAGGG**
TTTGATCGACAATGATGTGTTCTCCTTCTATTTGGCTCGTGATGGCAGCTCCAACCAGGG
TGGTCAAATGATTTTGGGTGGTTCCGATTCCAGCCTCTACCAAGGTG **GTCTAACCTATGT**
GCCCATCTCTGAGCCTGGTTATTGGCAATTCAGTTTGGGTGGCGCTACCATGGGTGGACA
GATCTTGTGCGGTTTCGGTTGCCAAGCCATCGCTGATACTGGCACCTCACTCATTGTTGC
CCATACAATGCCTACAACACATATATGAACATCGTTGACCCCGATGGTGCTTGGT
TGACTGCTCATTTGGTAAACAGCTTGCCTGATATGGAGTTCATCATTGGCGGTAATACCTT
CCTTGTGCCTGCTTCCCAATACATCCTTAACGACTTCGGTGAGTGCTCACCTGCCGTCAG
CTACATGGTACTGACTTCTGGATCTTGGGTGACATCTTCATTGGAATGTAATAACCGA
ATTGATATGGGCAACAGCCGCATCGGTTTCGCTCCAGTCGTTAACTTAATAATCTTGC
TTTTGAATAAAAATATAAAGAAGTACTTAAAGTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

- Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στη Real-Time PCR είναι:

	Sequence (5' -> 3')	Length	T _m	GC%	Self complementarity
Forward primer	TACAACATCTGGAGTCAGG	19	60.11	47.37	3.00
Reverse primer	ATGGGCACATAGGTTAGAC	19	60.93	47.37	6.00
Product length	146				

- Η αλληλουχία του προϊόντος ενίσχυσης που χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα για τη δημιουργία των δίκλωνων τμημάτων (dsRNA) είναι:

GCGCGTGCCCATCTACAAGAACCCCAATTACCGCAGAACCCGTAATTCTGTGAATACTGA
 GACCGCCTACTTGC GCGGCAAATACAATGTGGCCACAGCACGCAGCGCCAGCGAGCAATT
 AGATAATGAACTGAATATGTCTTACTATGGCATAATCACCATCGGTACACCTCCACAGGA
 GTTCTTGGTGCTCTTCGATTCCGGCTCATCTAACTTGTGGGTGCCATCATCCGACTGTCC
 CAGCAGCAACGAAGCTTGCCAACTTCACAACCAATACGATTCGAGCGCTTCTAGCACCTA
 TGTGCCAACGATGAATTTTTCTCTATTGCATACGGTACTGGCAGTTTGTCTGGTTTCTT
 GTCGCAGGATACCGTTAATGTAGCTGGACTCAATATTCAGAACCAAGTTTTCGCTCAAGC
 TATGCTAGAACCAGGCACTCAGTTCGTT

- Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία των δίκλωνων τμημάτων RNA για το εκάστοτε γονίδιο με τη βοήθεια του E-RNAi είναι:

	Sequence (5' -> 3')	Length	T _m	GC%
Forward primer	taatacgactcactatagggAGTTTCTCGCATTCTGACC A	21	59.867	42.857
Reverse primer	taatacgactcactatagggAAATACCATCGAAGTTGGC G	20	59.960	45.000

Design 1: c43382_g1_iilen=1255path=[3113:0-10772492:1078-11122613:1113-11252626:1126-11544264:1155-1254]_1

dsRNA information

Primer forward		Amplicon sequence	
Sequence	taatacgactcactatagggAGTTTCTCGCATTCTGACC	AGTTTCTCGCATTCTGACCATTTCGCTTGGCCTTGGCCAAATTTG	
Length [nt]	21	GTGGCGGTGCCCCTCTACRAGAACCCCAATTACCGCAGAACCCGTAATTG	
Tm[°C]	59.867	TGTGAATACTGAGACCGCCTACTTGC GCGGCAAATACAATGTGGCCACG	
GC[%]	42.857	CACGCAGCGCCAGCGAGCAATTAGATAATGAACGAAATATGTCTTACTAT	
Primer reverse		GGCATAATCACCATCGGTACACCTCCACAGGAGTTTGTGGTCTCTTGG	
Sequence	taatacgactcactatagggAAATACCATCGAAGTTGGC	TTCCGGCTCATCTAACTTGTGGGTGCCATCATCCGACTGTCCAGCAGCA	
Length [nt]	20	ACGAAGCTTGC CCACTTCACAAACCAATACGATTCGAGCGCTTCTAGCAC	
Tm[°C]	59.960	TATGTTGCCAACGATGAATTTTTCTCTATTGCATACCGTACTGGCAGTTT	
GC[%]	45.000	GTCTGGTTTCTTGTGCGCAGGATACCGTTAATGTAGCTGGACTCAATATTC	
Primer pair penalty	1.1729	AGAACCAAGTTTTGCGTCAAGCTATGCTAGAACCCAGGCACTCAGTTGCTT	
		AACGCCAACTTCGATGGTATTT	
		Amplicon length [nt]	522

Target information

Intended target gene	NA
Intended target transcripts (hits)	NA (NA)
Other targeted gene(s)	NA
Other targeted transcripts (hits)	NA

Reagent quality

siRNAs [19 nt]	On-target	Off-target	No-target	Efficient siRNAs	Avg efficiency score	LowComplexRegions	CAN
504	0	0	504	487	52.70	0	0