



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΤΟΥ
ΣΥΖΕΥΚΤΙΚΟΥ ΠΕΠΤΙΔΙΟΥ ΣΤΟΝ ΔΑΚΟ ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ
FUNCTIONAL ANALYSIS OF SEX PEPTIDE
RECEPTOR IN *BACTROCERA OLEAE*

ΓΑΛΑΤΙΔΟΥ ΣΤΥΛΙΑΝΗ

ΛΑΡΙΣΑ, 2017

M^DN_YT^D

V^LY₀Y

R^LL_APS

ASP

E^ME

M^EL_A

D^PR_QM

VR^GF^H

L^PTNE_s

Q^LEIP

D^YGNE_s

LDYPN

Y_Q

Q^MV

GGP^C

R^MEDNN

I^SY^W

N^LT

C^DS^P_L

E^YA^MP

L^YG^YC

M^PF^L_L

I^IT^IM^S

N^S_LI

V^LV^LS^K

K^SM_A

T^PT^NF^V

I_M

Τριμελής Επιτροπή

Μαθιόπουλος Κωνσταντίνος: Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας

Δημήτριος Μόσιαλος: Επίκουρος Καθηγητής Βιοτεχνολογίας Μικροβίων

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

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας & Γονιδιωματικής του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, το διάστημα Δεκέμβριος 2015-Δεκέμβριος 2016 υπό την επίβλεψη του κ. Κ. Μαθιόπουλου, καθηγητή Μοριακής Βιολογίας και της υποψήφιας διδάκτορα Μ.Γρηγορίου.

Η αναπαραγωγή αποτελεί θεμελιώδες χαρακτηριστικό της ζωής και ως εκ τούτου δεν αποτελεί έκπληξη το γεγονός ότι η εξέλιξη έχει δημιουργήσει μια τεράστια ποικιλία μηχανισμών για την εξασφάλιση των απογόνων στους διάφορους οργανισμούς. Τα έντομα, η πολυπληθέστερη και πιο πολυποίκιλη ομοταξία των αρθροπόδων αλλά και ολόκληρου του ζωικού βασιλείου, αποτελούν εκπληκτικά ιδιοφυείς οργανισμούς όσον αφορά τον έλεγχο της αναπαραγωγικής τους συμπεριφοράς. Κατά τη σύζευξη σπέρμα από το αρσενικό έντομο μεταφέρεται στο αναπαραγωγικό σύστημα του θηλυκού. Η διαδικασία υλοποιείται μέσω του εκσπερματικού αγωγού συνοδευόμενου από εκκριτικά υγρά που παράγονται από τους βοηθητικούς αδένες. Μετά τη σύζευξη τα θηλυκά έντομα πραγματοποιούν μια σειρά από ενέργειες όπως έναρξη της ωαπόθεσης και μείωση της σεξουαλικής δεκτικότητας. Το σύνολο αυτών των ενεργειών ονομάζονται μετασυζευκτική δραστηριότητα (Post-mating Responses) και επάγονται από ουσίες του σπερματικού υγρού, τις πρωτεΐνες των αρσενικών βοηθητικών αδένων (ACPs). Ο υποδοχέας του συζευκτικού πεπτιδίου (SPR) στον δάκο είναι το μόριο στο οποίο προσδένεται το συζευκτικό πεπτίδιο (SP), ένα πεπτίδιο που ανήκει στην ομάδα ACPs. Το δυαδικό αυτό σύστημα, του υποδοχέα και του πεπτιδίου, είναι ουσιαστικά ο μοριακός διακόπτης για την έναρξη των διεργασιών που έπονται της σύζευξης και καθιστούν επιτυχημένη την αναπαραγωγική διαδικασία. Ο σημαντικός ρόλος της σύνδεσης αυτής καθιστούν τα μόρια αυτά ιδανικό στόχο για την ανάπτυξη εναλλακτικών μεθόδων ελέγχου του εντόμου.

Σκοπός της πτυχιακής εργασίας ήταν η αναστολή της αναπαραγωγής του δάκου της ελιάς μέσω σίγησης του γονιδίου SPR. Αρχικά κλωνοποιήθηκε μέρος του γονιδίου του συζευκτικού πεπτιδίου στον ειδικό φορέα L4440 και στα ειδικά βακτηριακά στελέχη HT115. Μέσω Real Time PCR καθορίστηκαν τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου SPR σε ιστούς από κεφάλια αρσενικών και θηλυκών και αναπαραγωγικού συστήματος θηλυκού. Έπειτα τα μετασηματισμένα βακτήρια χορηγήθηκαν σε θηλυκά έντομα μέσω της τροφής από την πρώτη μέρα ζωής τους ως ενήλικα έντομα μέχρι και δώδεκα μέρες μετά τη σύζευξη με αρσενικά έντομα. Επίσης έγινε παρακολούθηση της ωαπόθεσης και του χρόνου ζωής των εντόμων. Παρατηρήθηκε μεγάλο ποσοστό σίγησης του γονιδίου και στατιστικά σημαντική μείωση της παραγωγής αυγών. Επίσης διαπιστώθηκε ότι ο υποδοχέας SPR επηρεάζει την βιωσιμότητα των εντόμων. Συμπερασματικά, ο υποδοχέας του συζευκτικού πεπτιδίου φαίνεται ότι επηρεάζει την αναπαραγωγική ικανότητα στον οργανισμό *Bactrocera oleae* και έτσι θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως γονίδιο στόχος στα πλαίσια νέων μεθόδων αντιμετώπισης.

Abstract

The reproduction is the main principle of life and this is the reason that the evolution has created a big variation of mechanisms, with which organisms are able to make offsprings. Insects, the most populous and most diverse bivalvia of arthropods and whole animal kingdom, are amazingly ingenious organisms regarding the control of their reproductive behavior. During the mating, the sperm is transferred from the male to the female insect. This process is completed through the ejaculatory duct with seminal fluid proteins that produced in accessory glands. After mating female insects have a series of operation such as oviposition and decrease in sexual receptivity. This set of actions called Post-mating Responses and induced by the seminal fluid proteins, such as proteins of male accessory glands (ACPs). The SEX PEPTIDE RECEPTOR of *Bactrocera oleae* is the molecule in which binding the sex peptide, a ACPs peptide. These molecules, the peptide and the receptor, are a molecular switch for post mating behavior. The important role of this link makes these molecules ideal target for the schedule of alternative methods of pest control.

The aim of this study was the inhibition of the reproduction in *Bactrocera oleae* through the SPR gene silencing. First of all, it was cloned a part of the SPR gene to specific plasmid L4440 and special bacterial strains HT115. Secondly, it was determined the expression levels of SPR in tissues of male and female heads and female reproductive system through Real Time PCR. Eventually the bacteria were administered to female insects through feeding from the first day of their adult life until to twelfth day (after the mating with male in seventh day). Also was watching the oviposition and insect life time. It was observed a large percentage of silencing gene and statistically significant reduction in egg production. We determined that the receptor SPR affect the viability of the insect. In conclusion, the SEX PEPTIDE RECEPTOR affects the reproduction in *Bactrocera oleae* and so it could be used as a target gene in respect of new methods of treatment.

Ευχαριστίες,

Τον Νοέμβριο του 2015 βρέθηκα για πρώτη φορά στο εργαστήριο μοριακής βιολογίας ξεκινώντας με απίστευτο ενθουσιασμό την πτυχιακή μου εργασία. Από την αρχή των πειραμάτων φάνηκε ότι η τύχη δεν ήταν με το μέρος μας καθώς οι αναποδιές ερχόταν η μία μετά την άλλη. Μετά από ένα χρόνο ακριβώς, βρισκόμουν στο ίδιο σημείο προσπαθώντας αυτή την φορά να κλείσω τον κύκλο της εργασίας μου. Παρά τις συνεχείς αποτυχίες ο ενθουσιασμός είχε παραμείνει μέσα μου. Με αυτόν και την τεράστια υπομονή συνέχισα την προσπάθεια μου και τελικά κατάφερα τον στόχο μου. Φυσικά χωρίς την βοήθεια της Μαριλένας τίποτα από αυτά δεν θα είχε γίνει. Για το λόγο αυτό θα ήθελα να εκφράσω ένα μεγάλο ευχαριστώ πρώτα από όλους στην Μαριλένα Γρηγορίου, η οποία στάθηκε δίπλα μου σαν επιβλέπωντας, σαν καθοδηγήτρια σαν δασκάλα και σαν φίλη. Νιώθω πολύ τυχερή που ξεκίνησα την ερευνητική μου πορεία δίπλα της και μου πρόσφερε απλόχερα τις γνώσεις της. Θαύμασα από την πρώτη στιγμή τον τρόπο που σκέφτεται, την αισιοδοξία της, την οργάνωση της, γενικά τον τρόπο που κινείται μέσα στο εργαστήριο. Η Μαριλένα είναι παράδειγμα γνήσιου επιστήμονα και ελπίζω να αφομοιώσω κάτι και εγώ δουλεύοντας δίπλα της. Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους ερευνητές του εργαστηρίου και κυρίως την Γιώτα και την Έφη με τις οποίες περάσαμε πολύ όμορφες στιγμές στο εργαστήριο. Ακόμα ένα τεράστιο ευχαριστώ στην τριμελή μου επιτροπή. Στην κ. Κωνσταντίνα Τσουμάνη, που εκτός των άλλων θα την χαρακτήριζα πολυμήχανη αφού ότι πρόβλημα και να παρουσιαζόταν στο εργαστήριο πάντα θα έβρισκε μία λύση. Στον κ. Δημήτριο Μόσιαλο που είναι πάντα κοντά στους φοιτητές και προσωπικά με έχει βοηθήσει πάρα πολύ. Το μεγαλύτερο όμως ευχαριστώ οφείλω στο κ. Κωνσταντίνο Ματθιόπουλο έναν υπόδειγμα καθηγητή, σπουδαίο ερευνητή, μα πάνω από όλα άνθρωπο, που από την πρώτη στιγμή με εμπιστεύτηκε και με δέχτηκε στο εργαστήριο. Σε ένα εργαστήριο που σχεδόν όλοι οι φοιτητές της σχολής μας επιθυμούν να δουλέψουν, έπρεπε να το τονίσω αυτό. Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τους δικούς μου ανθρώπους, γονείς και φίλους, οι οποίοι με στήριξαν και συνεχίζουν να με στηρίζουν, παρότι νομίζουν ότι το μόνο που κάνω είναι να ταΐζω κάτι δάκους.

Η εμπειρία μου στο εργαστήριο μοριακής βιολογίας και γονιδιωματικής ήταν ότι καλύτερο μπορούσε να μου συμβεί ως προπτυχιακή φοιτήτρια. Όποια και αν είναι η πορεία μου στο μέλλον, πάντα θα νιώθω αυτό το εργαστήριο και αυτήν ομάδα ως το ερευνητικό μου σπίτι. Κλείνοντας θα ήθελα να πω ότι ακόμα και αν γινόταν να γυρίσει ο χρόνος πίσω δεν θα άλλαζα τίποτα, καμία αποτυχημένη προσπάθεια και καμία δυσκολία γιατί μέσα από αυτές έμαθα, απέκτησα εμπειρία και πλέον νιώθω βιοχημικός!

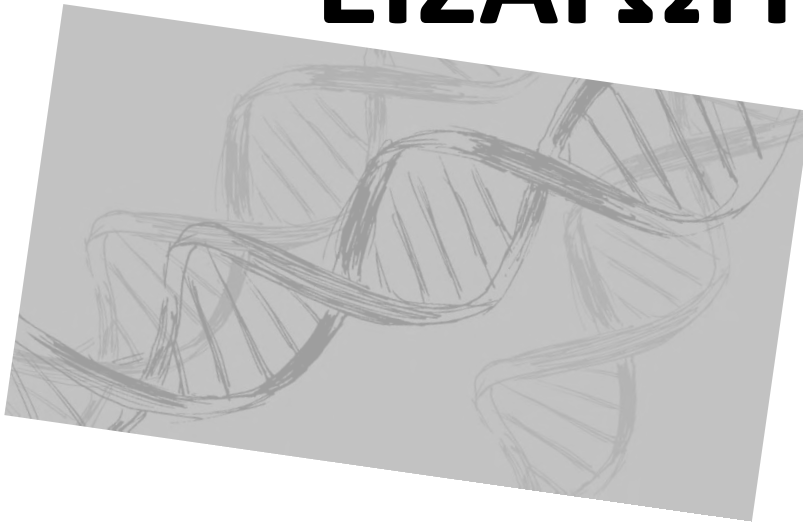
Πίνακας περιεχομένων

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	10
1.1 Ο Δάκος της ελιάς.....	10
1.1.1 Ο βιολογικός κύκλος του εντόμου και η προκαλούμενη ζημιά στον καρπό της ελιάς	10
1.1.2 Καταπολέμηση	11
1.2 ΝΕΥΡΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΕΝΤΟΜΩΝ	15
1.3 ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΕΝΤΟΜΩΝ.....	16
1.3.1 Θηλυκό αναπαραγωγικό σύστημα.....	16
1.3.2 Μετασυζευκτική δραστηριότητα (Post-mating Responses)	17
1.3.3 Πρωτείνες Σπερματικού Υγρού (SFPs).....	17
1.4 ΤΟ ΣΥΖΕΥΚΤΙΚΟ ΠΕΠΤΙΔΙΟ (SP) ΚΑΙ Ο ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ ΤΟΥ (SPR).....	19
1.4.1 Σύνθεση και δομή του συζευκτικού πεπτιδίου.....	19
1.4.2 Το καρβοξυτελικό και αμινοτελικό άκρο του SP.....	20
1.4.3 Ο υποδοχέας του συζευκτικού πεπτιδίου	20
1.4.4 Τοποθέτηση του υποδοχέα SPR.....	21
1.4.5 Το SP δρα στο Νευρικό σύστημα προκειμένου να προκαλέσει μετασυζευκτική δραστηριότητα.	21
1.4.6 Μετασυζευκτική δραστηριότητα του SP.....	23
1.4.7 Το SP και ο SPR στα διάφορα είδη οργανισμών	27
1.5 Μηχανισμός αποσιώπησης γονιδίων– RNAi παρεμβολή	28
1.5.1 Το έντερο ως σημείο παραλαβής dsRNA	28
1.5.2 Η απόκριση των κυττάρων στο dsRNA.....	28
2 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ	31
3 ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ	33
3.1.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	33
3.1.2 Ηλεκτροφόρηση Νουκλεϊκών Οξέων σε πήκτωμα (gel) αγαρόζης.....	34
3.1.3 Ανάκτηση μορίων DNA από πήκτωμα αγαρόζης (gelextraction)	35
3.1.4 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με αλκαλική λύση (Minipreps)	36
3.1.5 Πέψη πλασμιδιακού DNA με ένζυμο περιορισμού	37
3.1.6 Αντίδραση σύνδεσης μορίων DNA σε πλασμιδιακό φορέα (ligation)	38
3.1.7 Παρασκευή δεκτικών κυττάρων για Θερμικό Σοκ με χρήση CaCl ₂ και Θερμικό Σοκ.....	39
3.1.8 ColonyPCR.....	41

3.1.9	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου(Real-TimePCR) .	41
3.1.10	Απομόνωση ολικού RNA από ιστό	44
3.1.11	Κατεργασία με DNAση του απομονωμένου RNA	45
3.1.12	Σύνθεση cDNA με αντίστροφη μεταγραφή από ολικό RNA ιστού	46
3.1.13	Πρωτόκολλο έκφρασης δίκλωνου rna (ds-SPR)	47
3.1.14	Καθαρισμός με Φαινόλη- Χλωροφόρμιο	47
3.1.15	Χρώση Βακτηρίων	48
3.1.16	Διαδικασία παραγωγής τροφής feeding	48
3.1.17	Το βακτηριακό στέλεχος <i>HT115</i> και το Πλασμίδιο <i>L4440</i>	50
3.1.18	Βιοπληροφορική και στατιστική ανάλυση	52
4	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	54
4.1	Κατασκευή βακτηρίων σίγησης	54
4.1.1	Εντοπισμός νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του γονιδίου του υποδοχέα του συζευκτικού πεπτιδίου.....	54
4.1.2	Σχεδιασμός εκκινητών.....	54
4.1.3	Κλωνοποίηση του SPR σε κατάλληλο πλασμιδιακό φορέα.....	55
4.1.4	Δοκιμασία παραγωγής δίκλωνων RNA SPR (ds-SPR).....	56
4.1.5	Επιβεβαίωση κατάποσης των βακτηρίων από τα έντομα.....	57
4.2	Πρότυπο έκφρασης του υποδοχέα του συζευκτικού βακτηρίου.....	57
4.2.1	Έκφραση του SPR σε κεφάλια αρσενικών εντόμων <i>Bactrocera oleae</i>	58
4.2.2	Έκφραση του SPR σε κεφάλια θηλυκών εντόμων <i>Bactrocera oleae</i>	58
4.2.3	Έκφραση του SPR στο θηλυκό αναπαραγωγικό σύστημα του <i>Bactrocera oleae</i> .	59
4.3	Διαδικασία feeding και αποτελέσματα σίγησης.....	59
4.3.1	Σίγηση του γονιδίου του υποδοχέα του συζευκτικού πεπτιδίου SPR στο αναπαραγωγικό σύστημα και στα κεφάλια των θηλυκών <i>Bactrocera oleae</i>	60
4.3.2	Παρατήρηση Φαινοτύπου.....	61
5	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	64
6	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	68

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

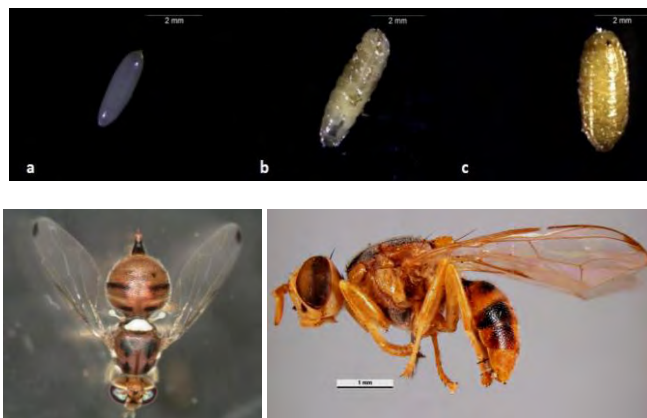


1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΟΔάκος της ελιάς

Ο δάκος της ελιάς ή *Bactrocera oleae*(Rossi) αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα παράσιτα της ελιάς. Ανήκει στην τάξη των εντόμων Diptera και στην οικογένεια Tephritidae. Στην Ελλάδα το έντομο αυτό ήταν γνωστό από την αρχαιότητα. Ο Θεόφραστος (371-286 π.Χ) αναφέρει στο βιβλίο του <<Περί φυτών αιτιών>> : <<τας δε ελάας, εάν μεν υπό το δέρμα γένωνται (οι σκώληκες) διαφθείρουσιν εξεσθίουσι γαρ. Εάν δ' εν τω έσω τον πυρήνα διαφάγωσι (οι σκώληκες του πυρηνοτρήτη) ωφελούσι>> (Ζιώγας, 1996). Όπως φαίνεται δεν είχε διακρίνει την διαφορά των δύο σκουληκιών δηλαδή του δάκου και του πυρηνοτρήτη και θεωρούσε το δεύτερο είδος σκουληκιού ότι είναι ωφέλιμο. Ο Π. Γεννάνδιος στο δημοσίευμα του << Ασθένειαι της ελαιάς>> στο περιοδικό που εξέδιδε << Ελληνική Γεωργία>>(1896) είναι ο πρώτος που αναφέρει πολύτιμες, για εκείνη την εποχή, πληροφορίες για τον δάκο (Γιαμβριάς, 1998)

Ο δάκος είναι ένα ολομετάβολο έντομο με κύκλο ζωής που περιλαμβάνει τέσσερα διακριτά μορφολογικά στάδια: i) το αυγό, το οποίο έχει στενόμακρο σχήμα και λευκό χρώμα και τοποθετείται μέσα στο μεσοκάρπιο του φυτού ξενιστή (εικόνα 1.1.a) ii) την προνύμφη η οποία είναι υπόλευκη ή ανοιχτοκίτρινη μήκους 7-8mm (εικόνα 1.1.b) iii) την νύμφη με ελλειψοειδής, ανοιχτοκαστανό χρώμα (1.1.c) και iv) την τελική μορφή του ενήλικου εντόμου. Το ενήλικο έντομο έχει μήκος περίπου 5mm και γενικό χρωματισμό ανοιχτοκαστανό ως σκοτινοκαστανό. Οι πτέρυγες του είναι διαφανείς, ιριδίζουσες, με ένα σκοτεινό στίγμα στην άκρη ενώ ο ωοθέτης των θηλυκών εντόμων είναι ευδιάκριτος (εικόνα 1.1.d, 1.1.e)(Τζανακάκης & Κατσόγιαννος, 2003).



Εικόνα1.1:Τα στάδια ζωής του εντόμου *Bactrocera oleae*.

α)Αυγόβ) Προνύμφη γ) Νύμφηδ) θηλυκό ενήλικο έντομο ε) αρσενικό ενήλικο έντομο

1.1.1 Ο βιολογικός κύκλος του εντόμου και η προκαλούμενη ζημιά στον καρπό της ελιάς

Ο κύκλος ζωής του εντόμου διαρκεί περίπου έναν μήνα και έχει 3-4 γενιές ανά έτος. Ανάλογα με την περιοχή που βρίσκεται, διαχειμάζει ως ενήλικο σε προφυλαγμένες θέσεις ή ως νύμφη(rupa) στο έδαφος. Σε περιοχές με ήπιο χειμώνα, όταν υπάρχει στα δέντρα κατάλληλος καρπός είναι δυνατόν να συνυπάρχουν στον ελαιώνα όλα τα στάδια του

εντόμου, σπάνια όμως το αυγό. Όταν ο καρπός πλησιάζει το τελικό του μέγεθος και γίνει τόσο μαλακός ώστε να μπορεί να τρυπηθεί από τον ωothήτη του θηλυκού, αρχίζει η ωοτοκία (το φαινόμενο αυτό παρατηρείται συνήθως τον Ιούλιο). Το θηλυκό αφού ανοίξει με τονωothήτη του την οπή ωοτοκίας, εισάγει στο μεσοκάρπιο ένα αυγό (Τζανακάκης & Κατσόγιαννος, 2003). Η οπή ωοτοκίας του δάκου, κοινώς το "νύγμα" βοηθάει την εγκατάσταση του μύκητα *Camarosporium dalaticum* Berl. And Volg., γνωστού και ως *Sphaeropsis* ή *Macrophoma dalmaatica* που προκαλεί την "ξεροβούλα" στις άγουρες και την "σαποβούλα" στις ώριμες ελιές (εικόνα 1.1.1A).



Εικόνα 1.1.1A: α) Συμπτώματα ξεροβούλας, β) νύμφη μέσα στον ελαιόκαρπο

Η προκαλούμενη ζημιά στον καρπό της ελιάς έχει ως αποτέλεσμα την ποσοτική και ποιοτική υποβάθμιση της ελαιοπαραγωγής καθιστώντας έτσι τον δάκο τον σοβαρότερο εχθρό της ελιάς στις παραμεσόγειες χώρες. Η υποβάθμιση αυτή επηρεάζει και την οικονομία της χώρας μας, αφού η ελαιοκαλλιέργεια αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους και δυναμικότερους κλάδους της αγροτικής οικονομίας της Ελλάδας (FAOSTAT) (εικόνα 1.1.1B)

Θέση Χώρα	Παραγωγή (σε τόνους)	Καλλιεργήσιμη περιοχή (σε Εκτάρια)	Απόδοση (q/εκτάριο)
— Συνολική παγκόσμια παραγωγή	19.845.300	9.634.576	20.598
01  Ισπανία	7.820.060	2.330.400	29.781
02  Ιταλία	3.182.204	1.144.420	27.806
03  Ελλάδα	2.000.000	850.000	23.529
04  Τουρκία	1.750.000	798.493	21.916
05  Μαρόκο	1.415.902	597.513	22.839

Εικόνα 1.1.1.B: Κύριες χώρες παραγωγής ελιάς, έτος 2011

1.1.2 Καταπολέμηση

Η καταπολέμηση του δάκου της ελιάς μέχρι σήμερα επιτυγχάνεται κυρίως με χημική στρατηγική και χωρίζεται σε δύο κατηγορίες: την "προληπτική" και την "θεραπευτική". Μεταξύ των εντομοκτόνων που χρησιμοποιούνται στην χημική μέθοδο είναι τα οργανοφωσφορικά (dimethoate, fenthion, formothion, malathion, phosphamidon), τα περισσότερα από τα οποία εισχωρούν στον ελαιόκαρπο και σκοτώνουν τις προνύμφες. Αξίζει να σημειωθεί ότι ορισμένα εντομοκτόνα μπορεί να είναι φυτοτοξικά για ορισμένες ποικιλίες ελιάς, σε ψεκασμούς πλήρους κάλυψης. Ωστόσο τα τελευταία χρόνια, η ανακάλυψη και η εργαστηριακή σύνθεση των φερομονών συνείσφερε αποτελεσματικά

στην αναβάθμιση των τεχνικών ελέγχου και καταπολέμησης του εντόμου, μέσω της δημιουργίας ειδικών κατασκευών που ονομάζονται παγίδες. Οι παγίδες περιέχουν φερομόνες και άλλες προσελκυστικές οσμές ως δολώματα με σκοπό τον μαζικό εγκλωβισμό των εντόμων (masstrapping) ή τον έλεγχο των επιπέδων του πληθυσμού των εντόμων (monitor) (Broumas&Haniotakis, 1987)

Οι πιο διαδεδομένοι τύποι παγίδων:

McPhail trap: Αποτελεί τον πιο ευρέως χρησιμοποιημένο τύπου παγίδας και η κατασκευή του περιλαμβάνει ένα δοχείο με δύο πλαστικά μέρη, το ένα εκ των οποίων είναι κίτρινο, χρώμα που έλκει το δάκο. Τα αρσενικά έντομα προσελκύονται από φερομόνες που υπάρχουν στο εσωτερικό της παγίδας και καθώς εγκλωβίζονται στο εσωτερικό τους, πέφτουν στον πυθμένα του δοχείου όπου βρίσκεται σε υγρή μορφή κάποιο εντομοκτόνο μαζί με γευστικά δολώματα, όπως διττανθρακικό και φωσφορικό αμμώνιο. Οι παγίδες αυτές μπορεί να περιέχουν και άλλα δολώματα για την παγίδευση και των δύο φύλων, όπως τις γευστικές οσμές της ζύμης *Torula* ή του φυτικού εκχυλίσματος NuLure (εικόνα 1.1.2.1.a).

Yellow sticky panel: Είναι παγίδες κίτρινου χρώματος στις επιφάνειες των οποίων κολλάνε τα έντομα. Περιέχουν σεξουαλική φερομόνη των δάκων για την προσέλκυση των αρσενικών ατόμων και διττανθρακικό αμμώνιο ως γευστική προσελκυστική ουσία και για τα δύο φύλα (εικόνα 1.1.2.1.b).

OLIPE trap: Αποτελεί το πιο απλό τύπο παγίδας, περιλαμβάνει ένα απλό πλαστικό μπουκάλι με νερό και μια ποσότητα από τη ζύμη *torula*, η οποία προσελκύει το δάκο (και άλλα έντομα) ως πηγή τροφής. Τα έντομα εισέρχονται από μικρές οπές του μπουκαλιού, ανεξαρτήτως φύλου, και παγιδεύονται στο εσωτερικό του (εικόνα 1.1.2.1.c).

Attract and kill device: Αποτελείται από χαρτόνια, εμποτισμένα με πυρεθροειδή εντομοκτόνα. Ανά τέσσερα χαρτόνια υπάρχει ένα το οποίο φέρει φερομόνες (εικόνα 1.1.2.1.d).



Εικόνα 1.1.2.1: Τύποι παγίδων

a) McPhail trap b) Yellow sticky panel c) OLIPE trap d) Attract and kill device

Οι μέθοδοι αυτοί χρησιμοποιούνται ευρέως μέχρι και σήμερα παρότι δεν θα έπρεπε καθώς εγκυμονούν πολλούς κινδύνους. Συγκεκριμένα η μαζική χρήση των συμβατικών χημικών εντομοκτόνων (οργανοφωσφορικά και πυρεθροειδή) έχει επιπτώσεις στον άνθρωπο και το περιβάλλον ενώ ταυτόχρονα η αλόγιστη χρήση τους οδηγεί στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας του πληθυσμού του εντόμου. Επίσης στην περίπτωση της μαζικής παγίδευση και εξόντωσης (lureandkill) εντόμων, υποβόσκουν προβλήματα κυρίως οικολογικά. Πιο αναλυτικά, η μαζική παγίδευση και εξόντωση του δάκου δεν είναι ειδοειδική αλλά στοχεύει γενικά σε έντομα. Το αποτέλεσμα της μειωμένης αυτής εξειδίκευσης είναι η εξόντωση κοινωφελών εντόμων (π.χ. μέλισσες) ή εντόμων-παρασιτοειδών που δρουν ως φυσικοί εχθροί του δάκου (π.χ. *Eurymusurozonus*) στο μικροπεριβάλλον της ελιάς.

Το σύνολο των κινδύνων αυτών επέβαλε την ανάγκη βελτίωσης των υπάρχουσών μεθόδων ή την αντικατάστασή τους με νέες τεχνικές φιλικότερες προς το περιβάλλον. Στα πλαίσια της αντικατάστασης αυτής, σχεδιάστηκαν δύο μέθοδοι: η μέθοδος στείρων εντόμων Sterile Insect Technique, SIT) και η μέθοδος απελευθέρωσης εντόμων που φέρουν επικρατές θνησιγόνο γονίδιο (RIDL). Οι δύο αυτές εναλλακτικές τεχνικές στηρίζονται σε εξειδικευμένα χαρακτηριστικά του εντόμου στόχου και ξεπερνούν τους κινδύνους που αναφέρθηκαν προηγουμένως.

1.1.2.1 Μέθοδος στείρων εντόμων (Sterile Insect Technique, SIT)

Η ιδέα για την μέθοδο στείρων εντόμων (Sterile Insect Technique, SIT) ξεκίνησε την δεκαετία του 1930 και εφαρμόστηκε για πρώτη φορά το 1955 (Knipling et al, 1955). Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην στείρωση μεγάλου αριθμού αρσενικών εντόμων σε εργαστηριακές συνθήκες και στην απελευθέρωσή τους στις προσβεβλημένες περιοχές αποσκοπώντας στην σύζευξη των εντόμων αυτών με θηλυκά έντομα αγρίου-τύπου και την επακόλουθη μείωση του φυσικού πληθυσμού. Η συγκεκριμένη μέθοδος χαρακτηρίζεται ως περιβαλλοντικά φιλική. Η πρώτη τεχνική στείρωσης που εφαρμόστηκε ήταν μέσω ακτινοβολίας. Ουσιαστικά πραγματοποιείται στείρωση αρσενικών εντόμων με χρήση ακτινοβολίας γ και μετά ακολουθεί η απελευθέρωσή τους στον αγρό ώστε να συζευχθούν με τα θηλυκά έντομα. Ωστόσο κατά την εφαρμογή της τεχνικής αυτής στο φυσικό περιβάλλον αποδείχτηκε πως οι εργαστηριακοί αρσενικοί πληθυσμοί είχαν σημαντικό μειονέκτημα ως προς την προσέλκυση των θηλυκών σε σχέση με τα αγρίου τύπου αρσενικά έντομα (Atkinson & Michel, 2002). Επιπλέον ακόμα ένα πρόβλημα της μεθόδου είναι ο φυλοδιαχωρισμός των εκτρεφόμενων εντόμων (Leftwich et al., 2015), καθώς αυτά δεν εμφανίζουν μορφολογικά χαρακτηριστικά στα πρώτα αναπτυξιακά στάδια που να επιτρέπουν τον διαχωρισμό τους.



Εικόνα 1.1.2.2: Sterile Insect Technique

1.1.2.2 Απελευθέρωση εντόμων που φέρουν επικρατές θνησιγόνο γονίδιο (RIDL)

Η αρχή της μεθόδου απελευθέρωσης εντόμων που φέρουν επικρατές θνησιγόνο γονίδιο (RIDL) στηρίζεται στην εισαγωγή ενός επικρατούς θνησιγόνου γονιδίου στα έντομα, το οποίο συνήθως ελέγχεται από ένα θηλεο-ειδικό υποκινητή και έτσι εκφράζεται μόνο στα θηλυκά έντομα (Thomas et al, 2000). Τα διαγονιδιακά αυτά έντομα, αρχικά, αναπτύσσονται και πολλαπλασιάζονται υπό εργαστηριακές συνθήκες καθώς το θνησιγόνο γονίδιο ελέγχεται από την παρουσία τετρακυκλίνης στην τροφή. Έτσι παρουσιάζονται αντιβιοτικού τόσο τα αρσενικά όσο και θηλυκά έντομα επιβιώνουν κανονικά. Αντίθετα κατά την απελευθέρωση των εντόμων στο περιβάλλον το θνησιγόνο γονίδιο (λόγω απουσίας τετρακυκλίνης στη διατροφή τους) εκφράζεται κανονικά προκαλώντας το θάνατο των θηλυκών εντόμων.



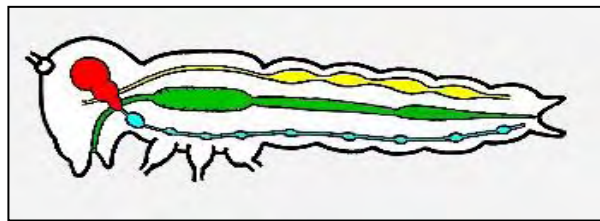
Εικόνα 1.1.2.3 Μέθοδος RIDL

Οι δύο αυτές καινοτόμες μέθοδοι καταπολέμησης εντόμων (SIT, RIDL) αποτέλεσαν το πρώτο βήμα για την εφαρμογή μιας φιλικότερης προς το περιβάλλον και τον άνθρωπο στρατηγικής αντιμετώπισης. Την παρούσα χρονική στιγμή η έρευνα αποσκοπεί είτε στην βελτίωση των μεθόδων SIT και RIDL είτε στην ανάπτυξη νέων τεχνικών που θα βασίζονται σε αυτές. Για την πραγματοποίηση αυτού του σκοπού κρίνεται αναγκαία η απόκτηση όλο και περισσότερης γνώσης για τα βιολογικά συστήματα και τα μόρια που συμμετέχουν σε αυτά. Για παράδειγμα εάν σκεφτεί κανείς ότι η γονιμότητα ενός εντόμου και κατ' επέκταση η απόκτηση απογόνων εξαρτάται από το αναπαραγωγικό σύστημα, αυτόματα αυτό καθίσταται ελκυστικός στόχος για την ανάπτυξη εναλλακτικών παρεμβατικών μεθόδων ελέγχου. Η μελέτη του ίδιου του συστήματος καθώς και η μελέτη των παραγόντων που εμπλέκονται σε αυτό (πχ γονίδια, πρωτεΐνες) θα προσφέρει τη γνώση πάνω στην οποία θα βασιστεί και θα σχεδιαστεί μια καινοτόμα και νέας γενιάς τεχνική καταπολέμησης.

1.2 ΝΕΥΡΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΕΝΤΟΜΩΝ

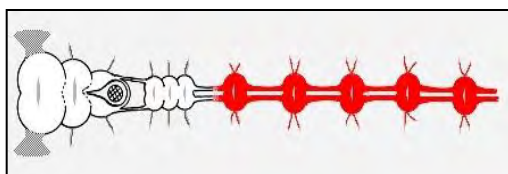
Το νευρικό σύστημα των εντόμων είναι ένα δίκτυο από εξειδικευμένα κύτταρα (νευρώνες) που χρησιμεύουν ως <<δρόμοι>> για την μετάδοση πληροφοριών μέσα στο σώμα. Αυτά τα κύτταρα παράγουν ηλεκτρικά ερεθίσματα που ταξιδεύουν σαν κύματα εκπόλωσης κατά μήκος της μεμβράνης του κυττάρου. Κάθε νευρώνας αποτελείται από ένα σώμα νευρικών κυττάρων (πυρήνας) και από συνεχείς ίνες (δενδρίτες, άξονες) που είναι υπεύθυνες για την διάδοση του δυναμικού δράσης. Η μετάδοση του σήματος πραγματοποιείται πάντα προς μία κατεύθυνση –κινούμενη προς το σώμα των νευρικών κυττάρων κατά μήκος ενός δενδρίτη ή μακριά από το σώμα των νευρικών κυττάρων κατά μήκος ενός άξονα (Strausfeld, 1976).

Όπως τα περισσότερα αρθρόποδα, έτσι και τα έντομα έχουν ένα σχετικά απλό κεντρικό νευρικό σύστημα που περιλαμβάνει έναν εγκέφαλο (brain) τοποθετημένο ραχιαία (εικόνα 1.2A), ο οποίος συνδέεται με ένα κεντρικό νευρώνα που βρίσκεται στην κοιλιακή πλευρά του εντόμου (Ventralnervencord, VNC)(εικόνα1.2B). Ο κεντρικός νευρώνας αποτελείται από ζεύγη γαγγλίων και διαπερνά τον θώρακα και την κοιλιά (Niven et al., 2008).

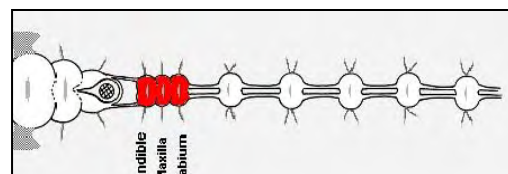


Εικόνα1.2A: εγκέφαλος εντόμων, αναπαρίσταται με κόκκινο

Στην κοιλιακή πλευρά και τοποθετημένο κάτω από τον εγκέφαλο και τον οισοφάγο βρίσκεται είναι ένα άλλο συγκρότημα γαγγλίων (subesophageal ganglion) (εικόνα 1.2Γ). Το συγκρότημα αυτό νευρώνει κυρίως την γνάθο και όργανα όπως ο υποφάρυγγας, οι σιελογόνοι αδένες και οι μύς του αυχένα. Στον θώρακα, τρία ζευγάρια θωρακικών γαγγλίων είναι υπεύθυνα για τον έλεγχο των κινητικών νευρώνων των ποδιών και των φτερών. Στα γάγγλια αυτά επίσης, είναι συνδεδεμένοι οι μύς του θώρακα και οι αισθητήριοι υποδοχείς (Strausfeld, 1976).



Εικόνα 1.2B: κεντρικός νευρώνας (VNC) εντόμων, αναπαρίσταται με κόκκινο



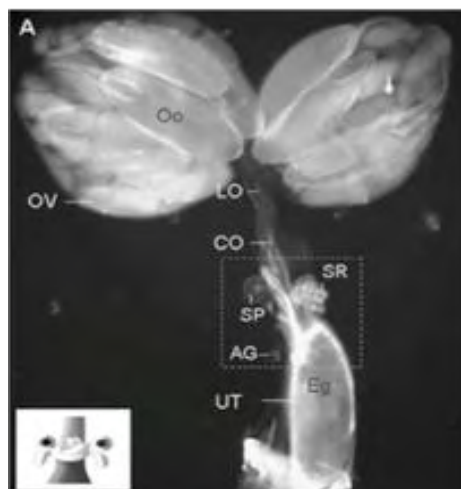
Εικόνα 1.2Γ:subesophageal γάγγλιο εντόμων, αναπαρίσταται με κόκκινο

1.3 ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΕΝΤΟΜΩΝ

Τα όργανα του αναπαραγωγικού συστήματος στα έντομα είναι παρόμοια σε δομή και λειτουργία με εκείνα των σπονδυλωτών. Οι γαμέτες είναι απλοειδής και μονοκύτταροι, με τα αυγά να είναι συνήθως πολύ μεγαλύτερα σε όγκο από ότι το σπέρμα. Το αρσενικό αναπαραγωγικό σύστημα είναι υπεύθυνο για την παραγωγή, την αποθήκευση και την μεταφορά του σπέρματος στα θηλυκά. Στις λειτουργίες του θηλυκού συστήματος συγκαταλέγονται η παραγωγή αυγών, η υποδοχή και αποθήκευση του σπέρματος όπως επίσης ο συντονισμός των γεγονότων που θα οδηγήσουν τελικά στην γονιμοποίηση και την ωοτοκία (Resh&Carde, 2009).

1.3.1 Θηλυκό αναπαραγωγικό σύστημα

Το θηλυκό αναπαραγωγικό σύστημα περιλαμβάνει ένα ζεύγος ωοθηκών (ovaries), κάθε μια από τις οποίες κατέχει επιμέρους περιοχές στις οποίες παράγονται τα αυγά (ovarioles). Κοντά στις περιοχές αυτές βρίσκονται γεννητικά κύτταρα, τα ωογόνια (oogonia) από τα οποία θα προκύψουν, μέσω μίτωσης και αύξησης μεγέθους, τα ωοκύτταρα (oocytes). Από κάθε ωοκύτταρο δημιουργούνται με την διαδικασία της μείωσης ένα αυγό (egg) και τρία πολικά σωμάτια (polarbodies). Τα ώριμα αυγά εγκαταλείπουν την ωοθήκη και μέσω του ωαγωγού (oviduct) καταλήγουν στην μήτρα (uterus). Επιπλέον το θηλυκό αναπαραγωγικό σύστημα είναι εξοπλισμένο με δύο σπερματοθήκες (spermatheca) στις οποίες αποθηκεύεται το σπέρμα. Οι αδένες της σπερματοθήκης (spermathecalglands) παράγουν θρεπτικά συστατικά, ώστε το σπέρμα να κρατηθεί ζωντανό στην σπερματοθήκη, όπου εκεί μπορεί να επιβιώσει για εβδομάδες, μήνες ή ακόμη και χρόνια. Όταν το αυγό εισέρχεται στην μήτρα περνά δια μέσου της σπερματοθήκης και διεγείρει την απελευθέρωση των σπερματοζωαρίων πάνω στην επιφάνεια του αυγού. Τα σπερματοζωάρια εισέρχονται στο αυγό μέσω ενός μικρού ανοίγματος στην επιφάνεια του αυγού, και γονιμοποιούνται ωάριο. Στην συνέχεια ακολουθεί ωοτοκία. Τέλος το θηλυκό αναπαραγωγικό σύστημα είναι εξοπλισμένο με βοηθητικούς αδένες (accessoryglands), οι οποίοι παράγουν απαραίτητες ουσίες όπως πρωτεΐνες που περιβάλλουν το αυγό (Raabe M., 1987).



Εικόνα 1.3.1:Θηλυκό αναπαραγωγικό σύστημα της *D. melanogaster*.Απεικονίζονται: OV=ωοθήκες, CO= κεντρικός ωαγωγός, SP= σπερματοθήκη, AG= βοηθητικοί αδένες, UT= μήτρα.

1.3.2 Μετασυζευκτική δραστηριότητα (Post-mating Responses)

Η αναπαραγωγή αποτελεί θεμελιώδες χαρακτηριστικό της ζωής και ως εκ τούτου, δεν αποτελεί έκπληξη, το γεγονός ότι η εξέλιξη έχει δημιουργήσει μια τεράστια ποικιλία μηχανισμών για την εξασφάλιση των απογόνων στους διάφορους οργανισμούς. Τα έντομα, η πολυπληθέστερη και πιο πολυποίκιλη ομοταξία των αρθροπόδων αλλά και ολόκληρου του ζωικού βασιλείου, αποτελούν εκπληκτικά ιδιοφυείς οργανισμούς όσον αφορά τον έλεγχο της αναπαραγωγικής τους συμπεριφοράς. Τα περισσότερα θηλυκά έντομα ρυθμίζουν με μεγάλη προσοχή τον αριθμό των αυγών που γεννούν όπως και πολλές άλλες παραμέτρους του ζευγαρώματος (Kubli, 2003). Για παράδειγμα ένα παρθένο θηλυκό έντομο μπορεί να γεννήσει λίγα μόνο αυγά και είναι σεξουαλικά δεκτικό ως προς τα αρσενικά για σύζευξη, σε αντίθεση με ένα θηλυκό το οποίο έχει ζευγαρώσει και αυξάνει σημαντικά το ποσοστό ωοτοκίας του ενώ παράλληλα μειώνεται η σεξουαλική του δεκτικότητα (Wolfner, 2002). Εκτός της αυξημένης ωοτοκίας και της μειωμένης δεκτικότητας έχουν παρατηρηθεί και άλλες αλλαγές μετά το ζευγάρωμα στη συμπεριφορά και τη φυσιολογία των θηλυκών εντόμων συμπεριλαμβανομένων της διατροφικής αλλαγής (αύξηση κατανάλωσης τροφής), της αύξησης της αντιμικροβιακής δραστηριότητας, της ρύθμισης παραμέτρων που σχετίζονται με την αποθήκευση του σπέρματος και της μείωσης του χρόνου ζωής. Το σύνολο των παραπάνω ενεργειών είθισται να αναφέρονται ως μετασυζευκτική δραστηριότητα (Post-mating Responses) και συνήθως επάγεται από ουσίες του σπερματικού υγρού (Swanson & Vacquier, 2002; Chapman & Davies, 2004; Poiani, 2006; Wong & Wolfner, 2006; Ravi Ram & Wolfner, 2007).

1.3.3 Πρωτεΐνες Σπερματικού Υγρού (SFPs)

Το σπερματικό υγρό περιέχει πέραν του σπέρματος, μια πληθώρα πρωτεϊνών που ονομάζονται πρωτεΐνες του σπερματικού υγρού (SFPs). Τα μόρια αυτά συντίθενται και εκκρίνονται είτε από τους βοηθητικούς αδένες των αρσενικών εντόμων (ACPs) είτε από άλλα όργανα του αρσενικού αναπαραγωγικού συστήματος όπως τα σπερματικά κυστίδια, τον αγωγό εκσπερμάτωσης και τους όρχεις. Μετά τη σύνθεση και την έκκρισή τους στο αρσενικό αναπαραγωγικό σύστημα μεταφέρονται στο θηλυκό δια μέσου του σπερματικού υγρού κατά την σύζευξη. Ο ρόλος των πρωτεϊνών αυτών είναι να επάγουν τη μετασυζευκτική δραστηριότητα στο θηλυκό έντομο με τελικό σκοπό μία επιτυχημένη σύζευξη και γονιμοποίηση.

Μέχρι σήμερα, στον οργανισμό-μοντέλο *Drosophila melanogaster* έχει προσδιοριστεί ένας μεγάλος αριθμός πρωτεϊνών του σπερματικού υγρού, εκ των οποίων περίπου 112 ανήκουν στην κατηγορία των ACPs (Ravi Ram & Wolfner, 2007) και πολλές από αυτές εμφανίζουν δομική ομολογία με κατηγορίες πρωτεϊνών που βρίσκονται στο σπερματικό υγρό άλλων εντόμων, ακόμα και θηλαστικών (Mueller et al., 2004). Οι πρωτεΐνες του σπερματικού υγρού συμπεριλαμβάνουν πολλές κατηγορίες πρωτεϊνών όπως: πρωτεάσες / αναστολείς πρωτεασών, λεκτίνες, προ-ορμόνες, πεπτίδια και προστατευτικές πρωτεΐνες όπως αντιοξειδωτικά. Επίσης αξίζει να τονιστεί ότι στο σπερματικό υγρό περιλαμβάνονται και μη πρωτεϊνικά μόρια όπως προσταγλαδίνες και στεροειδείς ορμόνες, ωστόσο η έρευνα για τις συνέπειες της μεταφοράς του σπερματικού υγρού έχει επικεντρωθεί στα πρωτεϊνικά μόρια.

Τα τελευταία χρόνια έχει παρατηρηθεί μια έκρηξη στην ταυτοποίηση και στην λειτουργική ανάλυση των πρωτεϊνών του σπερματικού υγρού στα έντομα, λόγω των νέων τεχνολογιών

πρωτεομικής και RNAi παρεμβολής. Ο καθορισμός της φύσης και της λειτουργίας των πρωτεϊνών του σπερματικού υγρού των εντόμων έχει τεράστιο ενδιαφέρον διότι, πέρα από το γεγονός ότι βοηθάει στην κατανόηση της δράσης τους και της αναπαραγωγής των εντόμων, οι πρωτεΐνες αυτές παρέχουν στόχους για τον έλεγχο φορέων πολλών νοσημάτων και γεωργικών παρασίτων. Στον πίνακα 1 αναγράφονται κάποιες από τις γνωστότερες πρωτεΐνες του σπερματικού υγρού και εν συντομία ο ρόλος τους (Ravi Ram et al., 2005).

Πίνακας 1

Πρωτεΐνες σπερματικού υγρού (SFPs)	Λειτουργικός ρόλος
Συζευκτικό πεπτίδιο (SexPeptide, SP)	Πεπτίδιο με ρόλο στην ωοαπόθεση, τη διάρκεια ζωής, τη μεταγραφή γονιδίων που κωδικοποιούν αντιμικροβιακά πεπτίδια και τον ρυθμό έκδυσης.
Οβιουλίνη (ovulin, Acp26Aa)	Προέρχεται από μια προορμόνη που διεγείρει την ωορρηξία στα θηλυκά έντομα από την πρώτη ημέρα μετά το ζευγάρωμα.
Acp36DE	Γλυκοπρωτεΐνη με ρόλο στην αποθήκευση του σπέρματος.
Acp29AB	Λεκτίνη η οποία παίζει ρόλο στον ανταγωνισμό του σπέρματος.

1.4 ΤΟ ΣΥΖΕΥΚΤΙΚΟ ΠΕΠΤΙΔΙΟ (SP) ΚΑΙ Ο ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ ΤΟΥ (SPR)

Το 1988 ο Chen και οι συνεργάτες του, εντόπισαν για πρώτη φορά ένα πεπτίδιο 36αμινοξέων σε εκχύλισμα που προερχόταν από τους βοηθητικούς αδένες αρσενικού εντόμου *D. Melanogaster* (Chen et al., 1988). Στην συνέχεια διαπιστώθηκε ότι ύστερα από έγχυση του πεπτιδίου σε παρθένα θηλυκά έντομα, αυτά παρουσίαζαν μετασυζευκτική δραστηριότητα (Aigaki et al., 1991; Schmidt et al., 1993). Λόγω της παρουσίας του στα αρσενικά έντομα και της εμπλοκής του στην αναπαραγωγή ονομάστηκε συζευκτικό πεπτίδιο (SexPeptide, SP). Το συζευκτικό πεπτίδιο συντίθεται στους βοηθητικούς αδένες των αρσενικών εντόμων και μεταφέρεται στα θηλυκά μετά το ζευγάρωμα (Chen et al., 1988; Styger, 1992) προκαλώντας μετασυζευκτική δραστηριότητα (κυρίως αύξηση της ωοτοκίας και μείωση της σεξουαλικής δεκτικότητας των θηλυκών). Αξίζει να σημειωθεί ότι οι βοηθητικοί αδένες εντόμων ηλικίας 7 ημερών περιέχουν περίπου 3,1 pmole SP από το οποίο το ένα τρίτο έως και το ήμισυ αυτού μεταφέρεται κατά τη διάρκεια του ζευγαρώματος στο θηλυκό έντομο (Kubli, 1992).

1.4.1 Σύνθεση και δομή του συζευκτικού πεπτιδίου

Τα όργανα σύνθεσης του συζευκτικού πεπτιδίου είναι οι βοηθητικοί αδένες των αρσενικών εντόμων. Αρχικά τα κύρια εκκριτικά κύτταρα των αδένων συνθέτουν και εκκρίνουν ένα πρόδρομο πεπτίδιο 55-αμινοξέων, το οποίο στην συνέχεια διασπάται στο αμινοτελικό του άκρο απελευθερώνοντας έτσι ένα κομμάτι 19 αμινοξέων. Το ώριμο πλέον πεπτίδιο είναι μια μακριά πολυπεπτιδική αλυσίδα 36 αμινοξέων και αποτελεί το συζευκτικό πεπτίδιο (Kubli, 2003). Το ώριμο SP αποτελείται από ένα κυκλικό καρβοξυτελικό άκρο (σχηματισμός δισουλφιδικών γεφυρών μεταξύ των αμινοξέων στις θέσεις 24 και 36) και ένα γραμμικό αμινοτελικό άκρο (εικόνα 1.4.1). Στο κυκλικό τμήμα του πεπτιδίου, τα δέκα από τα δώδεκα αμινοξέα που αποτελείται είναι όμοια. Το καρβοξυτελικό άκρο του ώριμου πεπτιδίου περιέχει αμινοξέα που κωδικοποιούνται από το δεύτερο εξόνιο του γονιδίου ενώ τα αμινοξέα του αμινοτελικού άκρου κωδικοποιούνται από το πρώτο εξόνιο (Kubli, 2003). Επιπλέον το πεπτίδιο υφίστανται μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις καθώς επιπρόσθετες λειτουργικές ομάδες προστίθεται μετά τη μετάφραση του (εικόνα 1.4.1). Το ώριμο SP περιέχει πέντε υδροξυπρολίνες και, πιθανώς, μια υδροξυλευκίνηωστόσο οι τροποποιήσεις αυτές δεν είναι απαραίτητες για την πρόκληση μετασυζευκτικής δραστηριότητας (Schmidt et al., 1993). Η βιολογική λειτουργία των τροποποιήσεων των αμινοξέων δεν είναι γνωστή.



Εικόνα 1.4.1: Η αλληλουχία των αμινοξέων του πεπτιδίου στην *Drosophilamelanogaster*. Το πρόδρομο μόριο αποτελείται από 19 επιπλέον αμινοξέα στο αμινοτελικό άκρο σε σχέση με το ώριμο SP (σκούρα αμινοξέα, bold). Τα ανοικτό τρίγωνο δείχνει την θέση εισαγωγής ιντρονίου στην γονιδιωματική αλληλουχία και τα αστέρια συμβολίζουν τις υδροξυπρολίνες .

1.4.2 Το καρβοξυτελικό και αμινοτελικό άκρο του SP

Το καρβοξυτελικό τμήμα του SP έχει δειχθεί ότι είναι απαραίτητο για την πρόκληση της μετασυζευκτικής δραστηριότητας στο θηλυκό έντομο μετά το ζευγάρωμα (Schmidt et al., 1993). Σε πειράματα που πραγματοποιήθηκαν με σκοπό την εξακρίβωση της λειτουργίας αυτής της περιοχής διαπιστώθηκε ότι όλα τα θραύσματα πεπτιδίων που στερούνται το καρβοξυτελικό άκρο, ή έχουν κατεστραμμένη την γέφυρα δισουλφιδίου, είναι ανενεργά (Schmidt et al., 1993). Το αμινοτελικό τμήμα του πεπτιδίου είναι επίσης πολύ σημαντικό καθώς αποτελεί την περιοχή με την οποία το SP προσδένεται πάνω στην ουρά των σπερματοζωαρίων και μεταφέρεται στα θηλυκά έντομα (Pengetal., 2005).



Εικόνα 1.4.2: Δομή του συζευκτικού πεπτιδίου της *D. melanogaster* σε διάλυμα.

1.4.3 Ο υποδοχέας του συζευκτικού πεπτιδίου

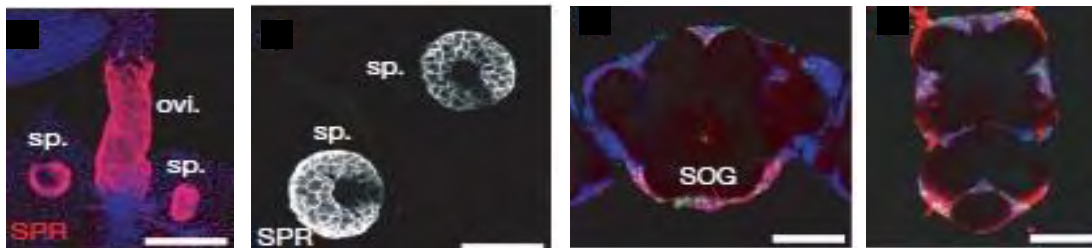
Το συζευκτικό πεπτιδίδιο αφού εισχωρήσει στο θηλυκό αναπαραγωγικό σύστημα στοχεύει σε έναν υποδοχέα τον SPR (sexpeptidereceptor), ο οποίος αποτελεί τον διακόπτη για την έναρξη της μετασυζευκτικής δραστηριότητας. Ο SPR ανήκει στην οικογένεια των GPCRs υποδοχέων, συγκεκριμένα στην κλάση A και είναι συζευγμένος με μια Gα_i ή Gα_o ετεροτριμερή πρωτεΐνη μέσω της οποίας ρυθμίζει το επίπεδο συγκέντρωσης του cAMP. Το cAMP αποτελεί το δεύτερο αγγελιοφόρο μήνυμα που θα μεταδώσει το σήμα επάγοντας έναν καταρράκτη βιοχημικών αντιδράσεων (Yarici et al., 2008).

```
MDNYTDVLYQYRLAPSASPEMEMELADPRQMVRGFHLPNTNESQLEIPDY
GNESLDYPNYQQMVGGPCRMEEDNNISYWNLTCDSPLEYAMPLYGYCMP
FLLIITISNSLIVLVLSKKSMA TPTNFVLMGMAICDMLTVIFPAPGLWYMYT
FGNHYKPLHPVSMCLAYSIFNEIMPAMCHTISVWLTALAVQRYYVCHAP
MARTWCTMPRVRRCTAYIALLAFLHQLPRFFDRTYMPLVIEWNGSPTEVC
HLETSMWVHDYIGVDLYTSYFLRVLFVHLLPCIIIVTLNILLFAAMRQAQ
ERRKLLFRENKKECKKLRETNC TTLMLIVVSVFLLAEIPIAVVTAMHIVSSL
IIEFLDYGLANICIMLTNFFLVFSYPINFGIYCGMSRQFRETFKEIFLGRIMAK
KDSSTKYSIVNGARTCTNTNETVL
```

Εικόνα 1.4.3: Αμινοξική αλληλουχία του SPR της *D. melanogaster*

1.4.4 Τοποθέτηση του υποδοχέα SPR

Ο SPR είναι ένας υποδοχέας που εντοπίζεται τόσο στο νευρικό όσο και στο αναπαραγωγικό σύστημα. Συγκεκριμένα είναι παρών στα θηλυκά αναπαραγωγικά όργανα: στη σπερματοθήκη και στη σάλπιγγα (εικόνα 1.4.4.b), ενώ δεν έχει εντοπιστεί στο αρσενικό αναπαραγωγικό σύστημα. Παράλληλα στο νευρικό σύστημα εντοπίζεται στα εξής σημεία: στις κοιλιακές περιοχές του γαστροοισοφαγικού γαγγλίου (SOG) (εικόνα 1.4.4.c) και σε πολλούς νευρώνες του εγκεφάλου και του κεντρικού νευρικού συστήματος (εικόνα 1.4.4.d). Εντύπωση προκαλεί το γεγονός ότι ο υποδοχέας εμφανίζει αυτήν την κατανομή στο νευρικό σύστημα και των δύο φύλων. Ωστόσο η μετασυζευκτική δραστηριότητα που προκαλεί η σύνδεση του SP με τον υποδοχέα του αποδίδεται αποκλειστικά στη λειτουργία του SPR στο νευρικό σύστημα (Yarici et al., 2008).



Εικόνα 1.4.4: Ο υποδοχέας SPR εντοπίζεται στα γυναικεία αναπαραγωγικά όργανα και το νευρικό σύστημα της *Drosophila melanogaster*: a) τα θηλυκά αναπαραγωγικά όργανα χρωματίστηκαν με αντί-SPR, διακρίνεται η σάλπιγγα και η σπερματοθήκη, b) μεγέθυνση των σπερματοθηκών, c) υπο-οισοφαγικό γάγγλιο (d) ventral nerve cord.

1.4.5 Το SP δρα στο νευρικό σύστημα προκειμένου να προκαλέσει μετασυζευκτική δραστηριότητα.

Προτού ξεκινήσει η ανάλυση των νευρικών μονοπατιών που πυροδοτεί η σύνδεση του SP με τον υποδοχέα του SPR είναι σημαντικό να διασαφηνιστεί πώς το συζευκτικό πεπτίδιο ρυθμίζει τα νευρικά κυκλώματα που ελέγχουν τη γυναικεία μετασυζευκτική δραστηριότητα.

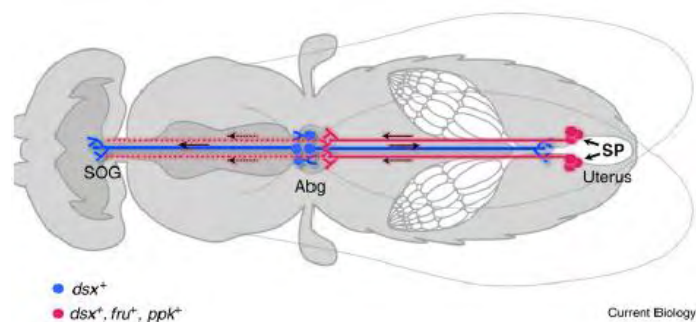
Η επικρατούσα άποψη είναι ότι το SP μεταφέρεται κατά μήκος του επιθηλίου του γεννητικού συστήματος, εισέρχεται στην αιμολέμφο και στην συνέχεια δρα άμεσα στους στόχους του στο κεντρικό νευρικό σύστημα (Kubli, 2003). Σε συμφωνία με την άποψη αυτή είναι το γεγονός ότι το SP όπως και πολλές άλλες πρωτεΐνες του σπερματικού υγρού (Lung & Wolfner, 1999; Monsma et al., 1990 & Ravi Ram et al., 2005), μπορεί να ανιχνευθούν στην αιμολέμφο των ζευγαρωμένων αλλά όχι των παρθένων θηλυκών (Pilpe et al., 2008). Ωστόσο, μια άλλη πιθανότητα είναι ότι το σήμα του SP μεταφέρεται στο κεντρικό νευρικό σύστημα με απευθείας νευρική οδό από το αναπαραγωγικό σύστημα (Hasemeyer et al., 2009). Μια παρόμοια νευρική διαδρομή έχει προταθεί και για ορισμένα είδη των σκώρων (Foster, 1993; Giebulowicz et al., 1990; Jurenka et al., 1993).

1.4.5.1 Στόχοι του SP στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα.

Η πρόκληση μετασυζευκτικής δραστηριότητας, όπως έχει ήδη αναφερθεί, αποδίδεται αποκλειστικά στη λειτουργία του υποδοχέα SPR στο νευρικό σύστημα (Yarici et al., 2008) και

συγκεκριμένα σε ένα σύνολο εσωτερικών αισθητήριων νευρώνων (SPSNs) που νευρώνουν κάθε πλευρά της μήτρας (Hasemeyeretal., 2009; Rezavaletal., 2012; Yangetal., 2009).

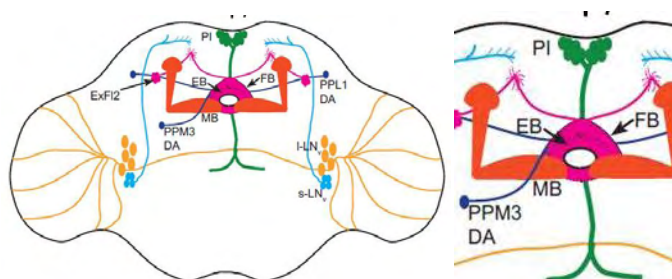
Σε πειράματα που έγιναν διαπιστώθηκε ότι η σίγηση της συναπτικής διαβίβασης των SPSNs μιμείται την δράση του SP (Hasemeyeretal., 2009; Rezavaletal., 2012; Yangetal., 2009) με αποτέλεσμα τα παρθένα θηλυκά έντομα να συμπεριφέρονται σαν να έχουν ζευγαρώσει (αυξημένη ωτοκία, μειωμένη σεξουαλική δεκτικότητα). Αυτό οδήγησε στην υπόθεση ότι ίσως το SP προκαλεί μείωση της μετάδοσης νευρικών σημάτων από τους SPSNs προς τους στόχους τους. Το 2014 βρέθηκε ότι ο κεντρικός στόχος των αισθητήριων αυτών νευρώνων (SPSNs) είναι οι νευρώνες SAG του κοιλιακού γαγγλίου (Fengetal., 2014). Συγκεκριμένα αποδείχθηκε ότι οι νευρώνες SAG του κοιλιακού γαγγλίου αποτελούν τους μετασυναπτικούς νευρώνες των SPSNs και ότι η δραστηριότητά τους καταστέλλεται από το ζευγάρι και το SP, όπως επίσης και ότι η αναστολή αυτή είναι κρίσιμη για την πρόκληση μετασυζευκτικής δραστηριότητας (Feng et al., 2014).



Εικόνα 1.4.5.1A: Τα νευρωνικά μονοπάτια που εμπλέκονται στην λειτουργία του συζευκτικού πεπτιδίου. Πρωταρχικός στόχος του SP είναι οι νευρώνες DSX + / FRU + / PPK + (SPSNs) που νευρώνουν το γεννητικό σύστημα (κόκκινες κουκκίδες). Οι άξονές τους προβάλλουν σε δύο περιοχές- στόχους στο κεντρικό νευρικό σύστημα, στο κοιλιακό γάγγλιο (Abg) και στο υπο-εισοφαγικό γάγγλιο (SOG). Επιπλέον έχουν εντοπίσει νευρώνες που καταλήγουν στον εγκέφαλο και νευρώνες που ξεκινούν από τον εγκέφαλο και νευρώνουν το γεννητικό σύστημα (μπλε νευρώνες) (Rezaval et al. 2012). Οι πρωταρχικές θέσεις δράσης του SP είναι οι αισθητήριες νευρικές απολήξεις στον αυλό του γεννητικού συστήματος (κόκκινες κουκκίδες).

Εντός του εγκεφάλου, ο κύριος στόχος των νευρών SAG είναι μια περιοχή που ονομάζεται “pars intercerebralis” (εικόνα 1.4.5.1). Η περιοχή αυτή αποτελεί ένα ενδοκρινικό κέντρο και περιλαμβάνει τουλάχιστον δύο κατηγορίες κυττάρων που έχουν συσχετιστεί με την ρύθμιση της θηλυκής σεξουαλικής δεκτικότητας. Η πρώτη είναι τα κύτταρα που παράγουν το μικρό πεπτίδιο SIFamide (Terhzaz et al., 2007) και η δεύτερη τα κύτταρα που παράγουν πεπτίδια παρόμοια με αυτά της ινσουλίνης (insulin-like peptides) (Wigby et al., 2011; Sakai et al., 2014). Επιπλέον το συγκεκριμένο ενδοκρινικό κέντρο περιλαμβάνει διάφορους πεπτιδενεργικούς κυτταρικούς τύπους που ρυθμίζουν ποικίλες συμπεριφορές που σχετίζονται με το SP όπως ο ύπνος, η σίτιση και η γονιμότητα (Bouletreau-Merle, 1976; Foltenyi et al., 2007; Sheldon et al., 2011; Terhzaz et al., 2007; Wigby et al., 2011). Τα στοιχεία αυτά οδήγησαν στην άποψη ότι οι SAG νευρώνες ίσως ρυθμίζουν διάφορους τύπους κυττάρων στην περιοχή pars intercerebralis, προκαλώντας έτσι τις φυσιολογικές και συμπεριφορικές αλλαγές που παρατηρούνται κατόπιν του ζευγαρώματος. Τέλος αξίζει να σημειωθεί ότι η περιοχή pars intercerebralis στον εγκέφαλο των εντόμων είναι λειτουργικά

και αναπτυξιακά ομόλογη του υποθαλάμου στα σπονδυλωτά (de Velasco et al., 2007; Siga, 2003), ο οποίος ελέγχει την γονιμότητα και την σεξουαλική δεκτικότητα σε απόκριση των στεροειδών της ωοθήκης (οιστρογόνα, προγεστερόνη).



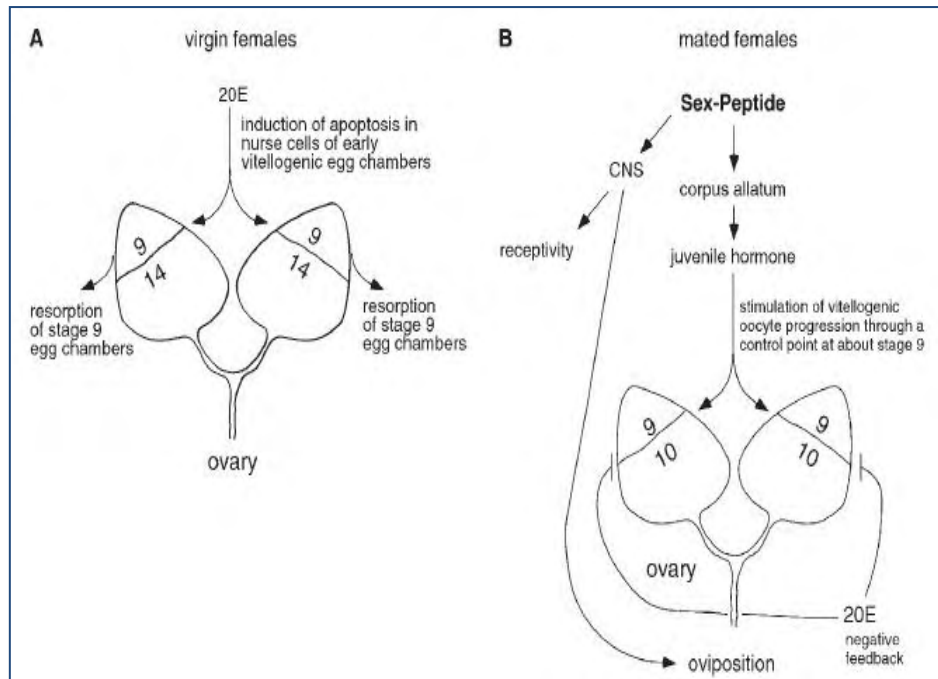
Εικόνα1.4.5.1B:Ηπεριοχήparsintercerebralis(PI)στην *D. melanogaster*.

1.4.6 Μετασυζευκτική δραστηριότητα του SP

Μετά το ζευγάρωμα, το θηλυκό έντομο *D. melanogaster* γεννά περίπου 300 αυγά σε 1 εβδομάδα, ανάλογα με το απόθεμα και την κατάσταση εκτροφής (Kubli, 1996; Herndon & Wolfner, 1995). Ωστόσο, οι ωοθήκες των θηλυκών περιέχουν μόνο 80-100 ωοκύτταρα τελικού σταδίου 14, συνεπώς μετά το ζευγάρωμα, είναι απαραίτητη η διεγερση της ωογένεσης ώστε να διατηρηθεί η ωοτοκία για μία εβδομάδα. Η αύξηση της ωοτοκίας και της παραγωγής αυγών έχει ονομαστεί «φυσιολογική δραστηριότητα» του SP (physiological response) καθώς το συγκεκριμένο πεπτιδίο είναι αυτό που επάγει την έναρξη της διαδικασίας. Ο ρόλος του πεπτιδίου συσχετίστηκε με την νεανική ορμόνη (JH) και με την 20-υδροξυκεκδυζόνη (20E) καθώς και με την σύνθεση και παραλαβή των πρωτεϊνών του αυγού (YPs). Η JH, είναι μια ορμόνη που συμμετέχει κατά βάση στην ωρίμανση των ωοκυττάρων και ρυθμίζει κυρίως το όγδοο και ένατο στάδιο της ανάπτυξης ενώ η 20E ελέγχει την έκδυση και μεταμόρφωση των αρθροπόδων. Οι δύο ορμόνες έχουν ανταγωνιστική δράση.

1.4.6.1 Μοντέλο δράσης του SPστην παραγωγή ωοκυττάρων

Στα ώριμα θηλυκά έντομα που δεν έχουν ζευγαρώσει τα ωοκύτταρα που βρίσκονται στο στάδιο ανάπτυξης είναι άφθονα, έτσι δεν υπάρχει ανάγκη ωρίμανσης νέων ωοκυττάρων. Κατά συνέπεια τα ωοκύτταρα που βρίσκονται σε μικρότερο αναπτυξιακό στάδιο οδηγούνται σε απόπτωση λόγω υψηλών συγκεντρώσεων της ορμόνης 20E και χαμηλών συγκεντρώσεων της νεανικής ορμόνης στην αιμοδέμφο, με αποτέλεσμα την αποτροπή παραγωγής νέων αυγών. Παράλληλα η σύνθεση πρωτεϊνών του αυγού στον λιπώδη ιστό του σώματος είναι συνεχής και συσσωρεύονται στην αιμοδέμφο των σεξουαλικά ώριμων και παρθένων θηλυκών εντόμων. Κατά το ζευγάρωμα, το SP μεταφέρεται στο θηλυκό έντομο και διεγείρει τη σύνθεση JH, η οποία διεγείρει την ανάπτυξη των ωαρίων από το σημείο ελέγχου και αναστέλλει με αυτόν τον τρόπο την δράση της 20E, η οποία πλέον βρίσκεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις στα ζευγαρωμένα θηλυκά έντομα. Το αποτέλεσμα όλων των παραπάνω αντιδράσεων είναι η παραγωγή ώριμων ωοκυττάρων. Ωστόσο το SP έχει επιπλέον στόχους εκτός από την JH, δεδομένου ότι η συγκεκριμένη ορμόνη ούτε διεγείρει την ωοτοκία ούτε μειώνει τη δεκτικότητα (εικόνα 1.4.6.1).



Εικόνα 1.4.6.1: Μοντέλο για τον έλεγχο της ωρίμανσης των ωαρίων, σε παρθένα θηλυκά έντομα (A) και σε έντομα μετά την είσοδο του sr κατά το ζευγάρωμα (B). (A) Όταν η ωοθήκη είναι γεμάτη με ώριμα ωάρια (σταδίου 14) κατά τη διάρκεια της σεξουαλικής ωρίμανσης, τα νέα αναπτυσσόμενα ωοκύτταρα οδηγούνται σε απόπτωση από την 20E πριν την ταχεία φάση ανάπτυξης. Στα παρθένα θηλυκά έντομα η συγκέντρωση της 20E είναι υψηλή στην αιμολέμφο και χαμηλή στην ωοθήκη. (B) Μετά το ζευγάρωμα, το SP διεγείρει τη σύνθεση JH και τα επίπεδα συγκέντρωσης της 20E στην αιμολέμφο χαμηλώνουν. Η JH διεγείρει την ανάπτυξη των ωοκυττάρων και τα προστατεύει από την αποπτωτική δράση της 20E. Η 20E μπορεί να λειτουργήσει και ως ένα αρνητικό σήμα ανάδραση. Υπό δυσμενείς συνθήκες (πχ. έλλειψη τροφής) τα επίπεδα συγκέντρωσης της 20E στην αιμολέμφο αυξάνονται παρά την παρουσία της JH, επιβραδύνοντας την ανάπτυξη του σταδίου 10 στα ωοκύτταρα.

1.4.6.2 Το συζευκτικό πεπτιδίο υπεύθυνο για το κόστος αναπαραγωγής στα θηλυκά έντομα.

Στη *Drosophila*, όπως και στα περισσότερα έντομα, υπάρχει μία διαμάχη ανάμεσα στα θηλυκά και αρσενικά άτομα για την συχνότητα του ζευγαρώματος (Bateman, 1948). Τα αρσενικά επωφελούνται από την μεγάλη συχνότητα ζευγαρώματος κάτι το οποίο δεν ισχύει για τα θηλυκά. Πιο συγκεκριμένα τα αρσενικά αποκτούν καλύτερη φυσική κατάσταση (αυξημένη αναπαραγωγική ικανότητα) από κάθε επιπλέον ζευγάρωμα ενώ στα θηλυκά η αυξημένη συχνότητα ζευγαρώματος οδηγεί στην μείωση της καλής φυσικής κατάστασης, δηλαδή στην μείωση της μακροζωίας και της αναπαραγωγικής ικανότητας (Flower & Partidge, 1989). Οι επιπτώσεις αυτές στην φυσική κατάσταση του θηλυκού εντόμου ονομάζονται «κόστος της αναπαραγωγής». Το κόστος αυτό είναι αποτέλεσμα της δράσης των πρωτεϊνών των βοηθητικών αδένων των αρσενικών εντόμων, ACPs (Charpman et al., 1995). Σε πειράματα στα οποία αγρίου τύπου θηλυκά έντομα ζευγάρωσαν με αρσενικά με μειωμένη έκφραση του συζευκτικού πεπτιδίου διαπιστώθηκε ότι αυτά είχαν μεγαλύτερο χρόνο ζωής και αυξημένη σεξουαλική δεκτικότητα για δεύτερο ζευγάρωμα από ότι τα control θηλυκά που ζευγάρωσαν με αγρίου τύπου αρσενικά (Wigby & Charpman, 2005). Τα

αποτελέσματα αυτά καθιστούν το SP, αν όχι πλήρως σίγουρα σε πολύ μεγάλο βαθμό, υπεύθυνο στοιχείο για το κόστος της αναπαραγωγής στα θηλυκά έντομα (Wigby & Chapman, 2005).

1.4.6.3 Η αποθήκευση και η απελευθέρωση του σπέρματος, δύο διαδικασίες που επάγονται από το SP

Το σπέρμα και οι πρωτεΐνες των βοηθητικών αδένων, όπως αναλύθηκε και προηγουμένως, επηρεάζουν την παραγωγή των αυγών και την σεξουαλική δεκτικότητα των θηλυκών. Ωστόσο αυτή η μετασυζευκτική δραστηριότητα στα θηλυκά λαμβάνει χώρα σε δύο διακριτές χρονικές φάσεις: η πρώτη φάση ολοκληρώνεται τις πρώτες ώρες μετά το ζευγάρωμα και ονομάζεται βραχυπρόθεσμη απάντηση (STR), στην φάση αυτή η αυξημένη παραγωγή αυγών και η μειωμένη σεξουαλική δεκτικότητα εξαρτώνται από τις πρωτεΐνες του σπέρματος SFPs (Kalb et al., 1993; Xue & Noll, 2000; Bretman et al., 2010). Η δεύτερη φάση επέρχεται πέρα των πρώτων ωρών και αφορά τη διατήρηση της μετασυζευκτικής δραστηριότητας. Η δεύτερη φάση ονομάζεται μακροπρόθεσμη απάντηση (LTR) και απαιτεί εκτός από τις SFPs και την αποθήκευση του σπέρματος (Kalbetal., 1993; Chapman et al., 2003; Liu & Kubli 2003; Peng et al. 2005).

Το συζευκτικό πεπτίδιο διαδραματίζει κεντρικό ρόλο εκτός από την STR και στην LTR διότι ρυθμίζει την αποθήκευση και την απελευθέρωση του σπέρματος καθώς βρίσκεται προσδεμένο στην ουρά των σπερματοζωαρίων. Πιο συγκεκριμένα, μετά την αποθήκευση του σπέρματος στη σπερματοθήκη του θηλυκού αναπαραγωγικού συστήματος, το δεσμευμένο SP απομακρύνεται σταδιακά από το σπέρμα (Peng et al., 2005) και συνδέεται σε υποδοχείς SPR που βρίσκονται κατά κύριο ρόλο στους νευρώνες και στα κύτταρα της σπερματοθήκης (Avila et al., 2015). Με την πρόσδεση του SP στους υποδοχείς διαμεσολαβείται η απελευθέρωση του σπέρματος και η επίτευξη της LTR (Peng et al., 2005). Μελέτες έχουν δείξει ότι θηλυκά έντομα που δεν έλαβαν το SP κατά τη διάρκεια του ζευγαρώματος απέτυχαν να απελευθερώσουν το σπέρμα αποτελεσματικά (Avila et al., 2010). Ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο το πεπτίδιο επάγει τις ενέργειες αυτές δεν είναι γνωστός, ωστόσο έχει βρεθεί ότι το SP σε συνδυασμό με άλλες πρωτεΐνες ACPs ρυθμίζουν την σύσπαση των μυών του θηλυκού αναπαραγωγικού συστήματος, επάγοντας μορφολογικές αλλαγές στην μήτρα με σκοπό την μετακίνηση του σπέρματος προς τα όργανα αποθήκευσης. Κυκλικοί μύες που περιβάλλουν τη μήτρα, καθώς επίσης και διαμήκεις μύες κατά μήκος αυτής συμμετέχουν στο μηχανισμό σύσπασης (Adams & Wolfner, 2007).

1.4.6.4 Το ανοσοποιητικό σύστημα και ο ρόλος του SP

Το ανοσοποιητικό σύστημα των εντόμων βασίζεται κυρίως σε χυμικούς παράγοντες, όπως αντιμικροβιακά πεπτίδια (AMP) τα οποία καταστρέφουν άμεσα τους παθογόνους μικροοργανισμούς ή σε κυτταρικές διεργασίες που περιλαμβάνουν φαγοκυττάρωση και ενθυλάκωση από αιμοκύτταρα. Στην *Drosophila*, η οδός TOLL που ενεργοποιείται από μύκητες και gram-θετικά βακτήρια όπως και η οδός IMD που ενεργοποιείται από gram-αρνητικά βακτήρια οδηγούν στη σύνθεση τουλάχιστον 20 αντιμικροβιακών πεπτιδίων (Attacins, Diptericins, Drosocins, Metchnikowin Mtk, κ.α.) (De Gregorio et al., 2002). Ωστόσο έχει βρεθεί ότι τα γονίδια που κωδικοποιούν AMP πεπτίδια ενεργοποιούνται και από άλλους παράγοντες όπως η γήρανση, οι κικκάδιοι ρυθμοί και το ζευγάρωμα (Carton et al.,

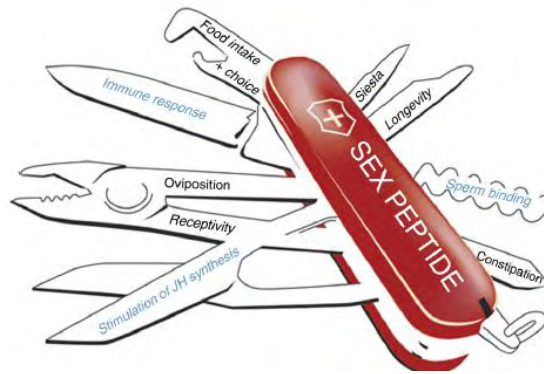
1992; McDonald et al., 2001; McGraw et al., 2004; Lawniczak & Begun, 2004; Zerofsky et al., 2005).

Όσον αφορά το ζευγάρωμα, τα γονίδια AMP παρουσιάζουν διαφοροποιημένη έκφραση σε θηλυκά που έχουν ζευγαρώσει σε σχέση με θηλυκά που δεν έχουν ζευγαρώσει. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η έκφραση των γονιδίων Mtk που διεγείρονται τις πρώτες 6 ώρες μετά το ζευγάρωμα. Ο βασικός παράγοντας που προκαλεί τη μεταγραφή των Mtk όπως επίσης και την μεταγραφή πολλών άλλων γονιδίων AMP είναι το SP. Αυτό επάγει την έκφραση των συγκεκριμένων γονιδίων μέσω των μονοπατιών Toll και IMD όμως δεν είναι γνωστό εάν ενεργοποιεί τα μονοπάτια από τα αρχικά στάδια αλληλεπιδρώντας με τους υποδοχείς αναγνώρισης PRRs όπως συμβαίνει με τους παθογόνους μικροοργανισμούς ή εμπλέκεται σε κάποιο ενδιάμεσο σημείο του <<καταρράκτη>> μεταγωγής σήματος (Peng et al., 2005).

Ωστόσο σε αυτό το σημείο ίσως έχει μεγαλύτερη σημασία να γίνει αντιληπτή η βιολογική έννοια της ενεργοποίησης του ανοσοποιητικού συστήματος κατά την διάρκεια του ζευγαρώματος παρά να καθοριστούν τα ακριβή μονοπάτια που εμπλέκονται. Το ζευγάρωμα στα έντομα μπορεί να βλάψει σωματικώς τα θηλυκά ή μπορεί να τα εκθέσει σε παθογόνους παράγοντες που μεταφέρονται από το αρσενικό (Abbot & Dill, 2001). Το γεγονός ότι το σήμα ενεργοποίησης (SP) βρίσκεται συζευγμένο στο σπέρμα και μεταφέρεται με την συνουσία στο θηλυκό αποτελεί έναν εξαιρετικά έξυπνο μηχανισμό, ο οποίος επιτρέπει στο θηλυκό έντομο να ανταποκριθεί προληπτικά σε πιθανές νοσογόνες απειλές προερχόμενες από το ζευγάρωμα.

1.4.6.5 Τοσυζευκτικό πεπτίδιο επάγει την αναστολή του ύπνου και την κινητική δραστηριότητα.

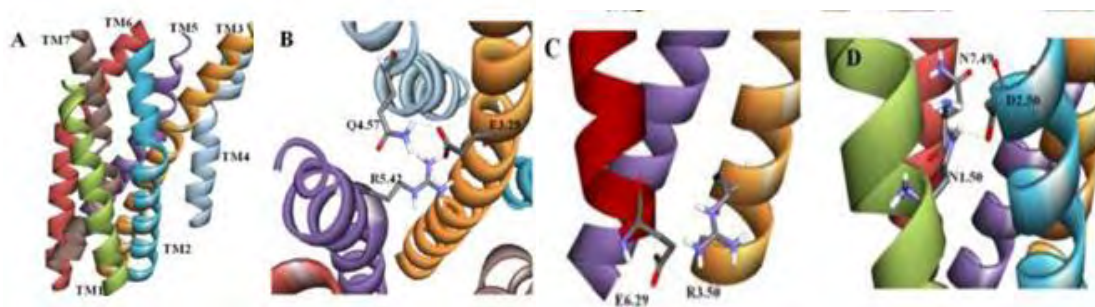
Η αδράνεια ή η κατάσταση υπνηλίας, είναι ένα κοινό και σημαντικό χαρακτηριστικό της καθημερινής ζωής των ζώων τόσο των ασπόνδυλων όσο και των σπονδυλωτών. Η αρχιτεκτονική του ύπνου ανάμεσα στα δυο φύλα διαφέρει. Χαρακτηριστικό είναι το παράδειγμα της *D. melanogaster* όπου τα θηλυκά κοιμούνται πολύ λιγότερο από τα αρσενικά κατά τη διάρκεια της ημέρας, ειδικά μετά το ζευγάρωμα, καθώς απαιτείται εντονότερη δραστηριότητα στην αναζήτηση τροφής από το θηλυκό προκειμένου να καλυφθούν οι θρεπτικές ανάγκες που απαιτεί η αυξημένη παραγωγή αυγών (Carvalho et al. 2006). Το SP είναι ο μοριακός διακόπτης που προάγει αυτή την εγρήγορση στα θηλυκά έντομα *D. melanogaster* και ουσιαστικά αυξάνει τον χρόνο για αναζήτηση τροφής (Isaac et al., 2010). Επιπλέον το στρες που προκύπτει από την SP-εξαρτώμενη στέρηση ύπνου αποτελεί σημαντική συμβολή στην μείωση της διάρκειας ζωής που παρατηρείται στα θηλυκά μετά το ζευγάρωμα (Wigby & Chapman, 2005).



Εικόνα 1.4: Οι κύριες λειτουργίες του SP στα ζευγαρωμένα θηλυκά έντομα. Το SP επάγει την ωορρηξία, την σύνθεση της νεανικής ορμόνης (JH) και την ανοσολογική απόκριση ενώ μειώνει την σεξουαλική δεκτικότητα και την διάρκεια ζωής των ζευγαρωμένων θηλυκών εντόμων. Ακόμα συμμετέχει στην ενισχυμένη πρόσληψη τροφής, την επιλογή τροφίμων και την αναστολή του ύπνου. Προσδένεται στο σπέρμα, ως εκ τούτου, παρατείνει την μετασυζευκτική δραστηριότητα για περίπου μια εβδομάδα (LTR). Οι λειτουργίες με μαύρο χρώμα είναι αυτές που ρυθμίζονται μέσω των νευρικών κυκλωμάτων ενώ με μπλε αναγράφονται οι λειτουργίες που κατά πάσα πιθανότητα είναι αποτέλεσμα της εισόδου του SP στην αιμολέμφο ή διαμεσολαβούνται μέσω άλλων πρωτεϊνών

1.4.7 Το SP και ο SPR στα διάφορα είδη οργανισμών

Ο SPR έχει ανιχνευτεί σε πολλά είδη, όπως στο *Aedesegypti*, στο *Bombyxmori* και στο *Aplysia californica*. Ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός ότι τα περισσότερα από αυτά τα είδη έχουν τα δικά τους γονίδια που κωδικοποιούν πεπτίδια SP, τα οποία αλληλεπιδρούν μόνο με τους υποδοχείς του δικού τους και όχι άλλων ειδών, παρά τη μεγάλη ομοιότητα των υποδοχέων (Yaricietal., 2008). Για παράδειγμα, το SP της *Drosophila* ενεργοποιεί μόνο τον υποδοχέα DmSPR και όχι των κουνουπιών *Aedes*SPR, παρότι η αλληλουχία της διαμεμβρανικής περιοχής (TM) μεταξύ των δύο ειδών είναι 68% ίδια. Τα στοιχεία αυτά ενισχύουν την ήδη υπάρχουσα άποψη περί μοναδικότητας SP κάθε είδους και καθιστούν ακόμα δυσκολότερο τον εντοπισμό της αλληλουχίας του πεπτιδίου στους διάφορους οργανισμούς.



Εικόνα 1.4.7:Συνολική δομή (α) και σημαντικέςπεριοχές δέσμησης (b-d) στην δομή του DmSPR

1.5 Μηχανισμός αποσιώπησης γονιδίων– RNAi παρεμβολή

Έχουν περάσει αρκετά χρόνια από την αρχική ανακάλυψη του μηχανισμού παρεμβολής RNA (RNAi) στο νηματώδη *Caenorhabditis elegans* (Fire et al., 1998) και πλέον είναι ξεκάθαρο ότι η γονιδιακή σίγηση που προκαλεί το δίκλωνο RNA (ds-RNA) είναι ένας μηχανισμός που απαντάται σε πολλούς ευκαρυώτες. Από την αρχή της ανακάλυψής της, η τεχνική χαρακτηρίστηκε ως εξαιρετικά ελπιδοφόρα για πολλούς τομείς της έρευνας και συνεχίζει να αποτελεί μέχρι και σήμερα ένα πολύτιμο εργαλείο λειτουργικής γονιδιωματικής σε πολλούς οργανισμούς συμπεριλαμβανομένων και των εντόμων. Επιπλέον η τεχνική παρουσιάζει τεράστιες προοπτικές στον κλάδο της βιοτεχνολογίας λόγω της υψηλής εξειδίκευσης της και ως εκ τούτου θα μπορούσε να βρει εφαρμογή στον ειδικό έλεγχο παρασίτων στην γεωργία (Borovsky, 2005; Gordon & Waterhouse, 2007; Price & Gatehouse, 2008). Αξίζει να σημειωθεί ότι η οικονομική σημασία του ελέγχου των παρασίτων είναι τεράστια, γεγονός που αποδεικνύεται και από τους αριθμούς που δαπανώνται ετησίως για τα εντομοκτόνα: 3000 εκατομμύρια δολάρια δαπανηθήκαν για την προστασία των πέντε σημαντικότερων γεωργικών καλλιεργειών το 2007 (McDougall, 2008).

Μέχρι στιγμής, η προτιμώμενη μέθοδος χορήγησης δίκλωνου RNA (ds-RNA) στα έντομα είναι η μικροέγχυση μικρών ποσοτήτων ds-RNA (συντιθέμενων *in vitro*) στην αιμολέμφο του εντόμου. Ωστόσο η μέθοδος αυτή δεν φαίνεται να είναι λειτουργική για τον μαζικό έλεγχο των παρασιτικών εντόμων, ο οποίος για να καταστεί αποτελεσματικός θα πρέπει ο ίδιος οργανισμός να είναι σε θέση να προσλαμβάνει αυτόνομα το ds-RNA για παράδειγμα μέσω της τροφής (feeding) (Huvenne & Smagghe, 2010).

1.5.1 Το έντερο ως σημείο παραλαβής dsRNA

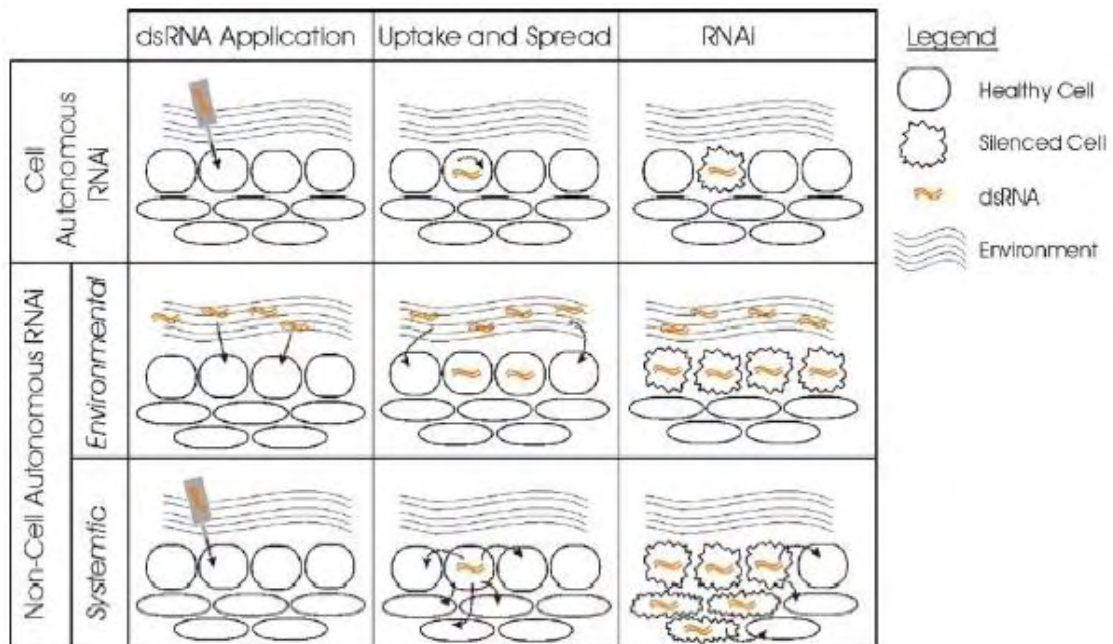
Το έντερο του έντομο αποτελείται από ένα στρώμα κυλινδρικών κυττάρων με μικρολάχνες, ενδοκρινικά και βλαστικά κύτταρα. Το όργανο αυτό είναι σχεδιασμένο έτσι ώστε να μπορεί να απορροφήσει τα θρεπτικά συστατικά από τον αυλό του εντέρου μέσω μιας μεγάλης περιοχής απορρόφησης που δημιουργείται από τις μικρολάχνες και περιλαμβάνει πολλά κανάλια και μηχανισμούς ενδοκυττάρωσης (Lehane & Billingsley, 1996; Hakim et al., 2010). Τα χαρακτηριστικά αυτά καθιστούν τον ιστό ιδανικό υποψήφιο για την πρόσληψη ds-RNA.

1.5.2 Η απόκριση των κυττάρων στο dsRNA

Το εναρκτήριο βήμα του μηχανισμού σίγησης είναι η είσοδος του δίκλωνου RNA στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων. Υπάρχουν δύο πιθανοί τρόποι με τους οποίους προσλαμβάνεται το dsRNA: είτε μέσω διαμεμβρανικών πρωτεϊνών είτε μέσω ενδοκυττάρωσης. Αφότου εισέλθουν στο κυτταρόπλασμα, υποβάλλονται σε επεξεργασία από την Dicer, η οποία έχει δράση RNAάσης και τα τεμαχίζει σε μικρά κομμάτια περίπου 20 βάσεων που ονομάζονται παρεμβαλλόμενο RNA (siRNA). Στην συνέχεια με την βοήθεια μιας πρωτεΐνης αργοναύτη (argonaute) ενσωματώνονται στο σύμπλοκο σίγησης RISC. Το σύμπλοκο αυτό με την σειρά του, στοχεύει και αποικοδομεί ειδικά mRNAs με βάση την αλληλουχία siRNA.

Υπάρχουν δύο μηχανισμοί με τους οποίους γίνεται η σίγηση: η κυτταρικά αυτόνομη RNAi σίγηση (cell-autonomous RNAi) και η κυτταρικά μη αυτόνομη σίγηση (noncell- autonomous

RNAi). Ουσιαστικά ο διαχωρισμός αφορά τον τρόπο με τον οποίο διανέμεται το ds-RNA στα κύτταρα. Στην περίπτωση της κυτταρικά αυτόνομης RNAi σίγησης, η διαδικασία σίγησης περιορίζεται στα κύτταρα στα οποία εισάγεται το ds-RNA. Στην περίπτωση της κυτταρικά μη αυτόνομης RNAi σίγησης, η επίδραση της παρεμβολής λαμβάνει χώρα σε ιστούς και κύτταρα διαφορετικά από την τοποθεσία εφαρμογής ή παραγωγής του dsRNA. Υπάρχουν δύο διαφορετικά είδη κυτταρικά μη αυτόνομης RNAi σίγησης: η περιβαλλοντική και η συστηματική RNAi σίγηση. Η περιβαλλοντική RNAi σίγηση περιγράφει όλες τις διαδικασίες με τις οποίες το κύτταρο προσλαμβάνει το ds-RNA από το περιβάλλον(Whangbo & Hunter, 2008). Ως εκ τούτου, η διαδικασία αυτή μπορεί επίσης να παρατηρηθεί και σε μονοκύτταρους οργανισμούς ενώ η συστηματική RNAi σίγηση μπορεί να πραγματοποιηθεί μόνο σε πολυκύτταρους οργανισμούς, επειδή περιλαμβάνει τις διεργασίες με τις οποίες ένα σήμα σίγησης μεταφέρεται από το ένα κύτταρο στο άλλο ή από ένα τύπο ιστού στο άλλο(Roessel & Brand, 2004;Grishok , 2005;Jose&Hunter, 2007). Σε πολυκύτταρους οργανισμούς η περιβαλλοντική RNAi σίγηση μπορεί να ακολουθείται από συστηματική σίγηση (εικόνα 1.5.2).



Εικόνα1.5.2: Σχηματική επισκόπηση των διαφόρων μηχανισμών RNAi σίγησης. Η πρώτη γραμμή παρουσιάζει την κυτταρικά αυτόνομη σίγηση: το dsRNA ενός γονιδίου που είναι απαραίτητο για τη βιωσιμότητα του κυττάρου εγχέεται σε ένα κύτταρο και το αποτέλεσμα της σίγησης περιορίζεται στο συγκεκριμένο κύτταρο. Στην περίπτωση περιβαλλοντικής RNAi σίγησης, το ds-RNA προσλαμβάνεται από τα κύτταρα μέσω του περιβάλλοντος του και η επίδραση σίγησης παρατηρείται σε όλα τα κύτταρα τα οποία προσέλαβαν το ds-RNA. Τέλος η συστηματική RNAi σίγηση περιγράφει όλες τις διαδικασίες με τις οποίες το σήμα της σίγησης μεταφέρεται και προκαλεί αποσιώπηση, από το κύτταρο που το προσέλαβε σε άλλα κύτταρα και ιστούς.

Για την αποτελεσματική εφαρμογή του μηχανισμού RNAi μέσω τροφής στα έντομα, θα πρέπει να εφαρμοστεί κυτταρικά μη αυτόνομη RNAi σίγηση. Το έντομο θα πρέπει να προσλάβει το dsRNA ενός γονιδίου στόχου μέσω της τροφής του και στην συνέχεια, αυτό να προχωρήσει από τον αυλό του εντέρου εντός των κυττάρων του εντέρου ώσπου να οδηγήσει στην αποσιώπηση του γονιδίου στόχου. Εάν το γονίδιο στόχος εκφράζεται σε

έναν ιστό εκτός του εντέρου, το σήμα σίγησης θα πρέπει να μεταδοθεί μέσω των κυττάρων και των ιστών (συστημική RNAi σίγηση). Αρκετές ερευνητικές ομάδες έχουν ασχοληθεί με την RNAi σίγηση σε έντομα μέσω της τροφής (πίνακας 2). Οι παράγοντες που επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό την επίδραση της αποσιώπησης και ως εκ τούτου την αποτελεσματικότητα του RNAi ως τεχνική για τον έλεγχο εντόμων συνοψίζονται στα παρακάτω 5 κύρια σημεία (Huvenne & Smaghe, 2009):

1. Η συγκέντρωση του ds-RNA: Για κάθε γονιδίου στόχο και οργανισμό υπάρχει μία βέλτιστη συγκέντρωση dsRNA ώστε να προκληθεί η βέλτιστη σίγηση. Δεν είναι απαραίτητο η μεγαλύτερη συγκέντρωση να επιφέρει και τα βέλτιστα αποτελέσματα.
2. Η νουκλεοτιδική αλληλουχία: Η αλληλουχία που χρησιμοποιείται πρέπει είναι ειδική διότι διαφορετικά μπορεί να επιδράσει εκτός στόχου στον οργανισμό-στόχο, αλλά και σε άλλα έντομα.
3. Μήκος του θραύσματος ds-RNA: Είναι ένας παράγοντας που επηρεάζει την πρόσληψη και την επιτυχία της σίγησης σε οργανισμούς και κυτταρικές σειρές. Στα περισσότερα πειράματα σίγησης μέσω τροφής (RNAi- feeding) οι αλληλουχίες κυμαίνονται μεταξύ 300 και 520 bp.
4. Η διατήρηση του αποτελέσματος της σίγησης: Η επίδραση του ds-RNA έναντι της πρωτεΐνης-στόχου συσχετίζεται με τον ρυθμό σύνθεσης και αποικοδόμησης της πρωτεΐνης.
5. Στάδιο ζωής του οργανισμού στόχου: Τα μεγαλύτερα στάδια της ζωής είναι συνήθως ευκολότερα στον χειρισμό ωστόσο τα νεότερα στάδια παρουσιάζουν συχνά μεγαλύτερο ποσοστό αποσιώπησης.

Πίνακας 2

οργανισμός	Γονίδιο στόχος	Ιστός	Ποσότητα dsRNA	Μήκος (bp)	mRNA σίγηση	Βιβλιογραφία
Lepidoptera: <i>Epiphyas postvittana</i>	Larval gut carboxylase	Gut	1μg	370	<50%	Turner et al. (2006)
Isoptera <i>Reticulitermes flavipes</i>	Cellulose enzyme	Saliva glands	13mg	500	60%	Zhou et al. (2008)
Hemiptera <i>Acyrtosiphon pisum</i>	Water specific aquaporin	Gut	1mg	–	50%	Shakesby et al. (2009)
Diptera <i>Glossina morsitans</i>	Midgut protein TsetseEP	Midgut	10mg	315	30–55%	Walshe et al. (2009)

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι να διαπιστωθεί ο πιθανός ρόλος του υποδοχέα του συζευκτικού πεπτιδίου στο αναπαραγωγικό σύστημα του *Bactrocera oleae*. Στο πλαίσιο αυτό, πραγματοποιήθηκε σίγηση του γονιδίου του υποδοχέα του συζευκτικού πεπτιδίου μέσω της τροφής σε θηλυκά έντομα *Bactrocera oleae*. Αν ο υποδοχέας αυτό συμμετέχει σε σημαντικό μονοπάτι της αναπαραγωγής τότε η σίγηση του θα οδηγήσει στην μείωση του ποσού της πρωτεΐνης στο νευρικό και αναπαραγωγικό σύστημα των εντόμων με αποτέλεσμα την μείωση της αναπαραγωγικής τους ικανότητας και κατ'επέκταση την μείωση των απογόνων. Σε περίπτωση που η πάραπάνω υπόθεση επιβεβαιωθεί τότε ο υποδοχέας θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την ανάπτυξη νέων μεθόδων ελέγχου του πληθυσμού του εντόμου.



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η PCR εμφανίστηκε το 1986 (Mullis *et al.*, 1986) και από τότε αποτελεί την πιο διαδεδομένη τεχνική στη μοριακή βιολογία. Η Αρχή της μεθόδου βασίζεται στον ενζυμικό πολλαπλασιασμό συγκεκριμένων αλληλουχιών DNA και την δημιουργία έτσι πολλών αντιγράφων της αρχικής αλληλουχίας. Η διαδικασία αυτή επιτυγχάνεται μέσω επαναλαμβανόμενων κύκλων με εναλλαγές στη θερμοκρασία. Σε κάθε κύκλο ο νεοσυντιθέμενος κλώνος λειτουργεί ως εκμαγείο για τη σύνθεση νέων, πολλαπλασιάζοντας εκθετικά την αλληλουχία στόχο (Bartlett and Stirling, 2003).

Κάθε κύκλος της PCR αποτελείται από τρία βασικά στάδια:

1.Αποδιάταξη: Στο στάδιο αυτό η θερμοκρασία κυμαίνεται στους 94-95°C με σκοπό την αποδιάταξη του δίκλωνου DNA στις δύο μονόκλωνες αλυσίδες του.

2.Υβριδοποίηση: Στο στάδιο πραγματοποιείται η υβριδοποίηση των ολιγονουκλεοτιδίων, που ονομάζονται εκκινητές (primers), πάνω στις μονόκλωνες αποδιατεταγμένες αλυσίδες. Η θερμοκρασία υβριδοποίησης (T_a) εξαρτάται από την θερμοκρασία τήξης των εκκινητών (T_m), οι δύο αυτές παράμετροι υπολογίζονται σύμφωνα με τους παρακάτω τύπους:

$$T_m = 4 * (\text{αριθμός βάσεων } G+C) + (\text{αριθμός βάσεων } A+T)$$

$$T_a = T_m - 5 \text{ (Thein \& Wallace, 1986)}$$

3.Επιμήκυνση: Στο στάδιο αυτό το ένζυμο Taq με δράση πολυμεράσης, αναγνωρίζει τους εκκινητές και επιμηκώνει την επιθυμητή νουκλεοτιδική αλληλουχία. Η θερμοκρασία στην οποία δρά το ένζυμο και γίνεται η επιμήκυνση είναι 72-74°C.

Αξίζει να σημειωθεί ότι ο αριθμός των επαναλαμβανόμενων κύκλων επιλέγεται με βάση το μέγεθος του επιθυμητού προϊόντος και συνήθως δεν ξεπερνά τους 30 κύκλους, διότι η μέθοδος αρχίζει να εμφανίζει λάθη. Ο αριθμός των τελικών αντιγράφων της αλληλουχίας υπολογίζεται ως 2^n αντίγραφα του κάθε αρχικού μορίου DNA, όπου n οι επαναλαμβανόμενοι κύκλοι της PCR (Sambrook and Russel, 2001).

Υλικά:

- ✓ DNA
- ✓ Εκκινητές (Forward και Reverse)
- ✓ dNTPs
- ✓ DNA Taq πολυμεράση (High –Fidelity DNA Polymerase, FINNZYMES, Phusion)
- ✓ Ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμου (Buffer)

Μέθοδος:

Για την πραγματοποίηση μιας τυπικής αντίδρασης PCR τελικού όγκου 20μl προστίθενται στα ειδικά PCR σωληνάκια:

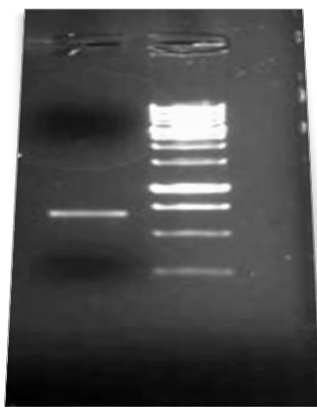
Υλικά	Caρχικό	Cτελικό	Ποσότητα
DNA	-	10-40ng	2μl
Buffer	5X	1X	5μl
dNTPs	40mM	1.2mM	0.75μl
εκκινητής F	10pmol/μl	0.3μM	0,75μl
εκκινητής R	10pmol/μl	0.3μM	0,75μl
Τααπολυμεράση	2U/μl	0.024U/μl	0,3μl
ddH ₂ O	-	-	15.45 μl
Τελικός όγκος			25μl

Αντίδραση PCR

3.1.2 Ηλεκτροφόρηση Νουκλεϊκών Οξέων σε πήκτωμα (gel) αγαρόζης

Αρχή της μεθόδου

Η ηλεκτροφόρηση, είναι η ηλεκτροχημική μέθοδος διαχωρισμού ηλεκτρικά φορτισμένων σωματιδίων (συνήθως νουκλεϊνικής ή πρωτεϊνικής φύσεως) από ένα μίγμα, ενώ παράλληλα χρησιμοποιείται για την απομόνωση και την ταυτοποίηση τους. Κατά την ηλεκτροφόρηση διοχετεύεται ηλεκτρικό ρεύμα μέσω ηλεκτροδίων σε ένα μέσο (πηκτή) που πάνω του έχει ενσωματωθεί σε ένα σημείο το προς ανάλυση δείγμα. Το αποτέλεσμα είναι ότι τα φορτισμένα σωματίδια κινούνται προς τα ηλεκτρόδια με ταχύτητες διαφορετικές, ανάλογα με το φορτίο τους και αντιστρόφως ανάλογα με το μέγεθος τους (Fisher & Dingman, 1971; Aaij & Borst, 1972).



Εικόνα 3.1.2: Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1%.

Έτσι τα πιο φορτισμένα και μικρότερα μόρια απομακρύνονται περισσότερο από το αρχικό σημείο σε σχέση με τα μεγαλύτερα και λιγότερο φορτισμένα με αποτέλεσμα να επέρχεται διαχωρισμός παρόμοιος με την χρωματογραφία. Η οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων της ηλεκτροφόρησης πραγματοποιείται με την εισαγωγή μιας φθορίζουσας χρωστικής, (βρωμιόχοαιθίδιο). Η χρωστική αυτή έχει την δυνατότητα να παρεμβάλλεται εντός της διπλής έλικας του DNA και στην συνέχεια μπορεί να ανιχνευτεί υπό την επίδραση υπεριώδους φωτός. Τέλος για τον υπολογισμό του μεγέθους των δειγμάτων, στην πηκτή ενσωματώνεται και ένας μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους (ladder). Ο μάρτυρας είναι ένα μίγμα νουκλεοτιδίων, τα οποία έχουν διακριτά μοριακά μεγέθη και μετακινούνται παράλληλα με το DNA του δείγματος στο ηλεκτρικό πεδίο. Ουσιαστικά για τον προσδιορισμό του μεγέθους του υπό μελέτη DNA γίνεται σύγκριση μεταξύ της απόστασης που έχει

διανύσει αυτό και του μάρτυρα (Helling et al., 1974).

Υλικά:

- ✓ Ρυθμιστικό διάλυμα TBE 5X
(1L: 54g Tris-base, 20mL EDTA 0,5M (pH:8), 27,5g Boric acid)
- ✓ Αγαρόζη
- ✓ Ladder
- ✓ Διάλυμα φόρτωσης (Loading buffer) 10X
(0,25% μπλε της βρωμοφαινόλης, 0,25% κυανού της ξυλόλης, 15% φικκόλη σε νερό)
- ✓ Βρωμιούχοαιθίδιο

Μέθοδος:

Η παρακάτω περιγραφή αφορά την παρασκευή 100mL πηκτώματος αγαρόζης 1%.

1. Προσθήκη 1g αγαρόζης σε κωνική φιάλη.
2. Προσθήκη 100ml TBE 0,5X στην ίδια φιάλη.
3. Υπολογισμός γραμμαρίων της κωνικής φιάλης που περιέχει τα υλικά.
4. Θέρμανση της κωνικής φιάλης, με ανάδευση ανά τακτά διαστήματα, έως ότου διαλυθεί πλήρως η αγαρόζη.
5. Υπολογισμός ξανά των γραμμαρίων της φιάλης και στην περίπτωση που έχουν ελαττωθεί προσθήκη απιονισμένου νερού για να αποκτήσει την αρχική ποσότητα.
6. Προσθήκη 4ml βρωμιούχου αιθιδίου και ανακίνηση.
7. Εισαγωγή του διαλύματος αγαρόζης στις ειδικές μήτρες και τοποθέτηση χτενών για τη δημιουργία μικρών πηγαδιών, εντός του πηκτώματος.
8. Αναμονή μέχρι να στερεοποιηθεί πλήρως ώστε να αφαιρεθούν τα χτενάκια.

Για την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων:

9. Τοποθέτηση του πηκτώματος στη συσκευή ηλεκτροφόρησης .
10. Προσθήκη διαλύματος TBE 0,5X στη συσκευή ηλεκτροφόρησης ώστε να καλυφθούν πλήρως τα πηγαδάκια της ηλεκτροφόρησης.
11. Προσθήκη διαλύματος φόρτωσης στα, προς ηλεκτροφόρηση, δείγματα.
12. Εισαγωγή των δειγμάτων καθώς και του Ladder στα διαφορετικά πηγαδάκια του πηκτώματος.

Η παρακολούθηση της ηλεκτροφόρησης μπορεί να γίνει είτε δια γυμνού οφθαλμού, παρατηρώντας τα δύο συστατικά του διαλύματος φόρτωσης (μπλε βρωμοφαινόλης ~300bp, κυανούνξυλόλης ~4000bp), είτε δια της υπεριώδους ακτινοβολίας.

3.1.3 Ανάκτηση μορίων DNA από πήκτωμα αγαρόζης (gelextraction)

Η ανάκτηση μορίων DNA είναι τεχνική της μοριακής βιολογίας που χρησιμοποιείται για την απομόνωση και τον καθαρισμό μιας νουκλεοτιδικής αλληλουχίας η οποία έχει διαχωριστεί από τις υπόλοιπες ενός δείγματος σε πήκτωμα αγαρόζης. Η διαδικασία λαμβάνει χώρα μετά την ηλεκτροφόρηση και το κομμάτι του πηκτώματος που περιέχει την επιθυμητή αλληλουχία κόβεται με νυστέρι και υφίσταται επεξεργασία προκειμένου να απομονωθεί πλήρως το DNA που εμπεριέχεται σε αυτό. Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε είναι το GF-1 GELDNARECOVERYKIT της εταιρείας VIVANTIS για gelextraction

Υλικά:

- ✓ GB Buffer
- ✓ Wash Buffer
- ✓ ddH₂O (Elution Buffer)

Μέθοδος:

1. Τοποθέτηση του κομμένου κομματιού πηκτώματος με την επιθυμητή ζώνη DNA σε σωληνάκι τύπου erpendorf 1,5mL και ζύγιση του.
2. Προσθήκη του GBBuffer στο erpendorf (σε αναλογία 100μL για κάθε 0,1g).
3. Ανάδευση και επώαση σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 50°C, έως ότου διαλυτοποιηθεί.
4. Μεταφορά του διαλύματος σε στήλη (spin column) η οποία είναι τοποθετημένη μέσα σε σωλήνα συλλογής.
5. Φυγοκέντρηση του σε συνθήκες 10.000 g για 1 min. Το έκλουσμα αποχύνεται από το σωλήνα συλλογής.
6. Προσθήκη 650 μL Wash Buffer και φυγοκέντρηση στις 10.000 g στροφές για 1min. Το έκλουσμα αποχύνεται από το σωλήνα συλλογής.
7. Επανάληψη φυγοκέντρησης σε συνθήκες 10.000 g για 1min, για να εξατμιστεί η αιθανόλη. Αφαίρεση της στήλης και τοποθέτηση της σε καινούργιο σωλήνα.
8. Προσθήκη ddH₂O (συνήθως 30μl) και επώαση για 2 min σε T °C δωματίου.
9. Φυγοκέντρηση 10.000 g στροφές για 1min και αφαίρεση της στήλης.

3.1.4 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με αλκαλική λύση (Minipreps)

Ο σκοπός της παρούσας τεχνικής είναι η απομόνωση, από το διάλυμα της υγρής βακτηριακής καλλιέργειας κυττάρων XL1-Blue, του πλασμιδιακού DNA (pL4440). Η επεξεργασία περιλαμβάνει τη λύση των βακτηριακών κυττάρων, την καταστροφή διαφόρων αποικοδομητικών ενζύμων που απελευθερώνονται από τη λύση των κυττάρων και το διαχωρισμό του πλασμιδιακού DNA, από το χρωμοσωμικό DNA και τις πρωτεΐνες (Sambrook et al., 1989).

Υλικά:

- GET (solution I): 50mM glucose, 25mM TrisCl (Ph=8), 10mM EDTA (Ph=8)
- Alkali (solution II): 0,2N NaOH, 1% SDS
- CH₃COOK (solution III): 5M potassium acetate, glacial acetic acid, H₂O

Μέθοδος:

1. Ήπια ανάδευση της καλλιέργειας
2. Εισαγωγή 1,5 ml καλλιέργειας σε σωλήνα τύπου erpendorf
3. Φυγοκέντρηση για 3min σε 3.000 rpm στροφές και έπειτα αφόδευση του υπερκείμενου. Για να σταθεροποιηθεί το ίζημα στην βάση του σωλήνα γίνεται μία μικρής διάρκειας φυγοκέντρηση σε μέγιστη ταχύτητα.
4. Εισαγωγή 100μl παγωμένου ρυθμιστικού διαλύματος GET (solution I) στο erpendorf. Ανάδευση μέχρι να διαλυθεί το ίζημα. Επώαση για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου.
5. Τοποθέτηση του erpendorf στον πάγο και εισαγωγή 200 μl διαλύματος Alkali (solution II). Ήπια ανακίνηση του σωλήνα και επώαση στον πάγο για 7-8 min.

6. Εισαγωγή 150 μl παγωμένου διαλύματος CH₃COOK(solutionIII) ενώ το eppendorf είναι στον πάγο. Ανακίνηση καλά του περιεχομένου και επώαση στον πάγο για 7-8 min.
7. Φυγοκέντρηση για 9 min σε μέγιστη ταχύτητα και μεταφορά του υπερκειμένου σε καινούργιο σωληνάκι.
8. Εισαγωγή ισοπροπανόλης 100%. Η ποσότητα της οποίας είναι ίση με την ποσότητα του υπερκειμένου που συλλέχθηκε. Ανακίνηση και επώαση για 15 min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.
9. Φυγοκέντρηση για 10 min σε μέγιστη ταχύτητα. Αφόδευση του υπερκειμένου και προσθήκη αιθανόλης 70% στο ίζημα. Η ποσότητα της αιθανόλης που προστίθεται είναι η μισή της ισοπροπανόλης. Επώαση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 15 min.
10. Φυγοκέντρηση για 5 min σε μέγιστη ταχύτητα. Αφόδευση του υπερκειμένου και επώαση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ώσπου να στεγνώσει το ίζημα.
11. Προσθήκη 50μl H₂O στον σωλήνα ώστε να αναδιαλυθεί το ίζημα.

3.1.5 Πέψη πλασμιδιακούDNA με ένζυμο περιορισμού

Στην πορεία της εξέλιξης εμφανίστηκε ένα ενζυμικό σύστημα, που στοχεύει στον περιορισμό της ανάπτυξης και επιβίωσης φάγωνDNA, οι οποίοι μολύνουν τα βακτήρια. Τα ένζυμα περιορισμού, αναγνωρίζουν και διασπούνδρολυτικά συγκεκριμένες αλληλουχίες, ταυτόχρονα και στους δύο κλώνους ενός μορίου του DNA. Καθένα αναγνωρίζει ακολουθίες 4-8 νουκλεοτιδίων που έχουν ένα άξονα συμμετρίας και «κόβουν» το DNA μέσα σε αυτές τις ακολουθίες. Οι θέσεις αυτές καλούνται «θέσειςπεριορισμού». Τα διαφορετικά είδη των βακτηρίων έχουν διαφορετικά ένζυμα περιορισμού. Οι ακολουθίες που αναγνωρίζονται συνήθως παλινδρομούν. Δηλαδή οι αλληλουχίες στους δυο κλώνους DNA είναι ίδιες στο σημείο αναγνώρισης όταν διαβάζονται στην κατεύθυνση 5'→3' στον κάθε κλώνο. Ανάλογα με τον τρόπο πέψης, τα ένζυμα περιορισμού δημιουργούν τμήματα DNA με συμπληρωματικά(κολλώδη) ή τυφλά(λεία) άκρα(Hartletal., 2001). Το πρώτο ένζυμο που ανακαλύφθηκε ήταν στην *E.coli* και πήρε το όνομα *EcoRI*. Μέχρι σήμερα έχουν ανακαλυφθεί περισσότερα από 500 συστήματα περιορισμού. Τα ένζυμα αυτά είναι πολύτιμα εργαλεία στην κλωνοποίηση του DNA και στην υβριδοποίηση των νουκλεϊνικών οξέων και αποτελούν τη βάση της ανάπτυξης του κλάδου της Γενετικής Μηχανικής. Στην παρούσα μεθοδολογία η πέψη του πλασμιδίου πραγματοποιήθηκε με το ένζυμο *SmaI*. Το συγκεκριμένο ένζυμο κόβει στις εξής θέσεις:



Υλικά:

- ✓ ΠλασμιδιακόDNA
- ✓ Bufferγια το ένζυμο *smaI*
- ✓ Ενζυμο *SmaI* (Bio-Lab)
- ✓ ddH₂O

Μέθοδος:

Σε ένα σωλήνα τύπου Eppendorf προστίθενται οι ποσότητες που φαίνονται στον πίνακα και ο σωλήνας επωάζεται για 1h σε 25°C και έπειτα 20min στους 65°C.

Υλικά	C _{αρχικό}	C _{τελικό}	Ποσότητα
DNA	84ng/μl	33.6ng/μl	20μl
Buffer	10X	1X	5μl
SmaI	20u/ml	0.08u/ml	0.2μl
ddH ₂ O			24.8μl
Τελικός όγκος			50μl

Αντίδραση πέψης

3.1.6 Αντίδραση σύνδεσης μορίων DNA σε πλασμιδιακό φορέα (ligation)

Η αντίδραση σύνδεσης μορίων DNA σε πλασμιδιακό φορέα αποσκοπεί στην κατασκευή ενός ανασυνδυασμένου πλασμιδίου, με την ενσωμάτωση ενός ενθέματος στην νουκλεοτιδική του αλληλουχία. Το πλασμίδιο πρέπει να βρίσκεται σε γραμμική μορφή ώστε να συνδεθεί με το ένθεμα στο ένα του άκρο με την βοήθεια της DNA λιγάση και στη συνέχεια να κυκλοποιηθεί με σύνδεση και των άλλων δύο άκρων. Η σύνδεση πραγματοποιείται με το σχηματισμό τεσσάρων φωσφοδιεστερικών δεσμών μεταξύ των 5' φωσφορικών καταλοίπων και των 3' υδροξυλομάδων. Ένα πλασμίδιο στη γραμμική του μορφή μπορεί να έχει είτε συμπληρωματικά, είτε τυφλά άκρα. Ανάλογα με αυτό διαφοροποιείται και η προσέγγιση για την εισαγωγή του ενθέματος (Sgararella & Khorana, 1972; Sgararella & Ehrlich, 1978). Στην παρούσα εργασία τα άκρα του πλασμιδίου είναι τυφλά και έτσι χρησιμοποιείται ένθεμα που έχει και αυτό τυφλά άκρα.

Υλικά:

- ✓ Προϊόν ενίσχυσης PCR
- ✓ Πλασμιδιακός Φορέας
- ✓ Buffer
- ✓ PEG
- ✓ Λιγάση T4 (Thermo Fisher Scientific)
- ✓ H₂O

Μέθοδος:

Σε ένα σωληνάκι τύπου eppendorf προσθέτουμε τις παρακάτω ποσότητες και επώαση για 1h στους 16°C και στην συνέχεια 1h στους 22°C.

Υλικά	Σαρχικό	Στελικό	Ποσότητα
Ένθεμα- DNA	70 ng/μl	8.75 ng/μl	2.7μl
Πλασμιδιακός Φορέας	20ng/μl	5ng/μl	5 μl
Buffer	10X	1X	2 μl
PEG50% w/v			2 μl
T4 λιγάση	5weiss u/μl	0.25weiss u/μl	1μl
H2O			7.3μl
Τελικόςόγκος			20 μl

Αντίδραση ligation

Για τον υπολογισμό της ποσότητας του ενθέματος χρησιμοποιήθηκε ο παρακάτω τύπος:

$$ng = \frac{\text{συγκέντρωσηπλασμιδίου} \times \text{μέγεθοςενθέματος}}{\text{μέγεθοςπλασμιδίου}} \times \frac{8}{1}$$

3.1.7 Παρασκευή δεκτικών κυττάρων για Θερμικό Σοκ με χρήση CaCl₂ και Θερμικό Σοκ.

Το θερμικό σοκ αποτελεί μια τεχνική που στόχο έχει την εισαγωγή DNA (συνήθως πλασμιδιακό) σε βακτηριακά κύτταρα. Μετά την εναλλαγή θερμοκρασιών η μεμβράνη των βακτηρίων γίνεται παροδικά διαπερατή, το πλασμίδιο εισέρχεται στο βακτήριο και επιτυγχάνεται ο μετασχηματισμός. Ωστόσο για να επιτευχθεί το θερμικό σοκ των κυττάρων και να συμβεί ο μετασχηματισμός τα κύτταρα πρέπει πρώτα να επεξεργαστούν ώστε να γίνουν δεκτικά στην παραλαβή του πλασμιδίου.

➤ Παρασκευή δεκτικών κυττάρων για Θερμικό Σοκ

Υλικά:

- ✓ Βακτηριακό στέλεχος HT115 (DH3)
- ✓ LB- BROTH(υγρό θρεπτικό μέσο):

Για την παρασκευή 25ml θρεπτικού μέσου χρησιμοποιούνται 0,625g σκόνης LB- BROTH και 25ml νερού. Στην συνέχεια αποστειρώνεται το διάλυμα και εφόσον κρυώσει προστίθενται 25μl αμπικιλίνη (100mg/ml) και 62.5 μl τετρακυκλίνη (5mg/ml).

- ✓ CaCl₂ 50mM
- ✓ γλυκερόλη 10%

Μέθοδος:

1. Καλλιέργεια του βακτηριακού στελέχους HT115 σε θρεπτικό μέσο LB. Στη καλλιέργεια προστίθενται αντιβιοτικά (τετρακυκλίνη, αμπικιλίνη). Η καλλιέργεια επωάζεται ολονύκτια σε θερμοκρασία 37°C και 210 rpm.
2. Ανάπτυξη βακτηριακών κυττάρων μέχρι το OD₅₉₅ = 0.4.

3. Φυγοκέντρηση του θρεπτικού μέσου ώστε τα κύτταρα να καθιζάνουν, σε συνθήκες 3.000rpm και $T = 4^{\circ}\text{C}$.
4. Αναδιάλυση του ιζήματος σε 0,5X του αρχικού όγκου αποστειρωμένου CaCl_2 συγκέντρωσης 50mM). Η αναδιάλυση γίνεται με την βοήθεια πιπέτας και όχι με Vortex.
5. Επώαση στον πάγο για 30min.
6. Φυγοκέντρηση σε συνθήκες 3.000rpm και $T = 4^{\circ}\text{C}$.
7. Αναδιάλυση του ιζήματος σε 0,1X του αρχικού όγκου αποστειρωμένου CaCl_2 συγκέντρωσης 50mM) και προσθήκη 287μl γλυκερόλης 10%. Τα κύτταρα φυλάγονται σε θερμοκρασία 4°C για άμεση χρήση εντός τριών ημερών.
8. Για μακροπρόθεσμη διατήρηση, τα κύτταρα φυλάγονται σε θερμοκρασία -80°C .

➤ Κλωνοποίηση μέσω θερμικού σοκ (HeatShock)

Υλικά:

- ✓ Βακτηριακά κύτταρα (HT115 στέλεχος)
- ✓ Πλασμίδιο με ένθεμα
- ✓ Θρεπτικό μέσο SOC: το θρεπτικό μέσο SOC περιέχει τα συστατικά του παρακάτω πίνακα:

Υλικά	Σ _{τελικό}	Ποσότητα
Bacto- tryptone (trypton water)	0.02gr/ml	1gr
Bacto- Yeast extract	0.005gr/ml	0.25gr
NaCl	0.0005gr/ml	0.025gr
KCl (pH: 7,0-7,2)	2.5mM	0.5ml
H ₂ O		Συμπληρώνει τον όγκο
Τελικός όγκος 50 μl		

Συστατικά διαλύματος SOC

Ακολουθεί αποστείρωση του παραπάνω διαλύματος και στην συνέχεια προσθήκη 0.25gr MgCl_2 (2M) και 1ml glucose (1M). Για την διατήρηση του φυλάγεται σε θερμοκρασία -20°C .

- ✓ Πιάτα καλλιέργειας:

Για την παρασκευή ενός πιάτου χρησιμοποιούνται τα εξής υλικά: 30ml διάλυμα LB- agar (1,6gr LB-agar και 30ml H_2O). Αποστείρωση του διαλύματος και στην συνέχεια προσθήκη αντιβιοτικών (30μl αμπικιλίνη 75μg/ml, 75μl τετρακυκλίνη 12,5μg/ml)

Μέθοδος:

1. Σε ένα σωληνάκι τύπου erpendorf το οποίο περιέχει 100μl κυττάρων που επεξεργάστηκαν και αποθηκεύτηκαν σε γλυκερόλη όπως αναλύεται παραπάνω, προστίθεται 1μl πλασμιδιακού DNA
2. Επώαση στον πάγο για 30min

3. Μεταφορά σε υδατόλουτρο στους 42°C για 2 min και στην συνέχεια μεταφορά του erpendorf στον πάγκο.
4. Προσθήκη 1ml θρεπτικού μέσου SOC και επώαση σε συνθήκες T= 37°C, 180 rpm, για 1h
5. Φυγοκέντρηση σε 4000rpm για 2min ώστε να καθιζάνουν τα κύτταρα
6. Αναδιάλυση του ιζήματος σε 200μl θρεπτικού μέσου SOC
7. Μεταφορά των αναδιαλυμένων σε θρεπτικό μέσο κυττάρων, σε πιάτα καλλιέργειας.
8. Επώαση των πιάτων στους 37°C για περίπου 16h.

3.1.8 ColonyPCR

Η ColonyPCR, είναι μία τεχνική που χρησιμοποιείται για την επιλογή των μετασηματισμένων βακτηριακών αποικιών. Η ColonyPCR δεν διαφέρει από την κλασική PCR, η μόνη διαφορά έγκειται στο γεγονός ότι ως εκμαγείο DNA χρησιμοποιείται η προς μελέτη βακτηριακή αποικία.

Σχεδιασμός της αντίδραση για κάθε αποικία που εξετάστηκε.

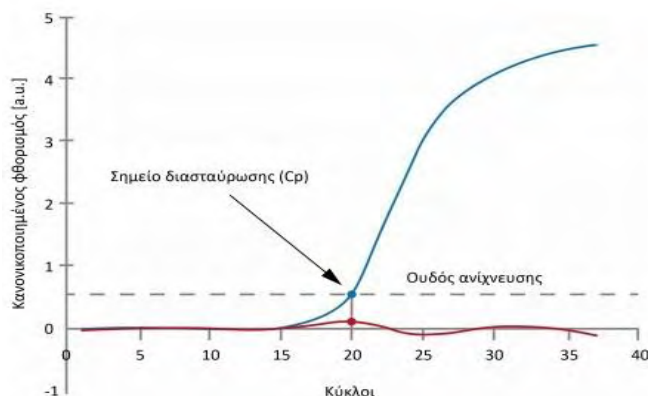
Υλικά	Carχικό	CTελικό	Ποσότητα
DNA (βακτηριακή αποικία σε ddH ₂ O)			16μl
Buffer	10X	1X	2μL
dNTPs	40mM	0.8mM	0,4μL
εκκινητήςF	10pmol/μl	0.35μM	0,7μL
εκκινητήςR	10pmol/μl	0.35μM	0,7μL
Taq πολυμεράση	5units/μl	0.05unit/μl	0,2μL
Τελικός όγκος			20μL

Αντίδραση ColonyPCR

3.1.9 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου(Real-TimePCR)

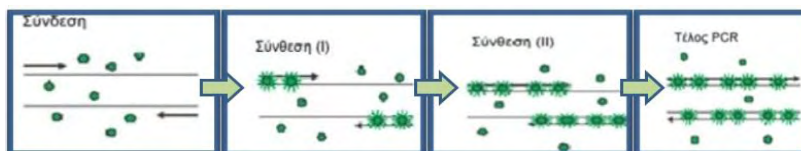
Η Real Time- PCR είναι μια τεχνική που εμφανίστηκε το 1993 και έχει εξελιχθεί ραγδαία μέχρι σήμερα, όπου πλέον αποτελεί μια γρήγορη, ευαίσθητη και αξιόπιστη μέθοδο ποσοτικοποίησης μορίων DNA και cDNA(Watson et al., 2004).Εκτελείται σε εξειδικευμένα μηχανήματα (θερμικοί κυκλοποιητές πραγματικού χρόνου), εξοπλισμένα με ένα πολύπλοκο σύστημα κατόπτρων και φίλτρων που «διαβάζουν» τον φθορισμό που εκπέμπεται από διάφορες φθορίζουσες χρωστικές, καθώς αυτές ενσωματώνονται στα προϊόντα της PCR. Η αρχή της Real Time- PCR είναι ίδια με αυτήν της κλασικής PCR, περιέχει δηλαδή τα ίδια 3 στάδια όμως η βασική διαφορά των δύο τεχνικών είναι η φάση της αντίδρασης στην οποία συλλέγονται τα δεδομένα και εξάγονται τα αποτελέσματα (εικόνα3.1.9Α). Στην κλασική PCR όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, πρέπει πρώτα να ολοκληρωθούν όλοι οι κύκλοι της αντίδρασης (25-35) και η αντίδραση να φτάσει στη φάση κορεσμού (κατώφλι). Στη συνέχεια τα δείγματα υφίστανται περαιτέρω χειρισμό, όπως για παράδειγμα ηλεκτροφόρηση σε γέληγαράζης, και αξιολογείται το αποτέλεσμα της PCR. Αντίθετα, στην RealTime- PCR τα δεδομένα συλλέγονται όταν η αντίδραση είναι ακόμη στη φάση της εκθετικής αύξησης. Η

σημαντικότερη παράμετρος για την ποσοτικοποίηση είναι η τιμή C_p , που αντιστοιχεί στον κύκλο κατά τον οποίο ο φθορισμός των προϊόντων της PCR ξεπερνά το βασικό επίπεδο (baseline)(Ponchel et al., 2003).



Εικόνα 3.1.9A:Γραφική παράσταση της καμπύλης της αντίδρασης της ποσοτικής PCR. Η οριζόντια γραμμή δείχνει το κατώφλι (threshold) στο οποίο ο φθορισμός των προϊόντων της PCR αρχίζει να ξεχωρίζει από το βασικό επίπεδο (baseline). Ο κύκλος στον οποίο συμβαίνει αυτό αποδίδεται με την τιμή C_t , που αντιστοιχεί στον κύκλο κατά τον οποίο ο φθορισμός ξεπερνά το κατώφλι ανίχνευσης. Το σημείο αυτό είναι αλλιώς γνωστό ως σημείο διασταύρωσης, C_p (Crossing Point). Η τιμή C_p είναι απαραίτητη για την ποσοτικοποίηση του δείγματος. Δείγματα με πολλά αντίγραφα του γονιδίου στόχου έχουν μικρότερο C_p από δείγματα με λιγότερα αντίγραφα του γονιδίου στόχου.

Ο φθορισμός οφείλεται σε μια χρωστική, που ονομάζεται SYBRGreen. Η SYBRGreen ενσωματώνεται στα δίκλινα μόρια που συντίθενται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης στο διάλυμα παράγοντας φθορισμό, η ένταση του οποίου είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του παραγόμενου προϊόντος (εικόνα 3.1.9B). Μειονέκτημα κατά τη χρήση της χρωστικής αυτής ως σύστημα ανίχνευσης είναι πως μπορεί να ενσωματώνεται σε οποιοδήποτε δίκλινο μόριο, εκτός του μορίου-στόχου, συμπεριλαμβάνοντας και διμερή των εκκινητών ή ενισχυμένα μη-ειδικά προϊόντα της αντίδρασης και να οδηγεί τελικά σε αύξηση του συνολικού φθορισμού.



Εικόνα 3.1.9B:SYBRGreenΧρωστική

Για την αξιόπιστη σύγκριση των επιπέδων mRNA σε διαφορετικά δείγματα απαραίτητη είναι και η διαδικασία κανονικοποίησης των τιμών έκφρασής τους. Της αντιστάθμισης δηλαδή πειραματικών σφαλμάτων, που μπορεί να οφείλονται είτε στο χειρισμό των δειγμάτων (όπως η εισαγωγή διαφορετικών τελικών ποσοτήτων γενετικού υλικού από το κάθε δείγμα στην αντίδραση), είτε στις διαφορετικές αποδόσεις των αντιδράσεων αντίστροφης μεταγραφής αλλά και της ίδιας της PCR. Για την κανονικοποίηση των τιμών η πιο συνήθης μέθοδος είναι η παράλληλη ενίσχυση ενός γονιδίου σταθερής έκφρασης

(house keeping gene, *hkg*) σε όλους τους ιστούς, που θα λειτουργήσει ως εσωτερικός μάρτυρας και θα αποτελέσει ουσιαστικά το γονίδιο αναφοράς. Τελικά η κανονικοποιημένη ποσότητα της αλληλουχίας στόχου προσδιορίζεται ως προς την έκφραση του γονιδίου αναφοράς (σχετική έκφραση). Η σχετική ποσοτικοποίηση πραγματοποιείται με τη μέθοδο σύγκρισης των Ct ($\Delta\Delta Ct$) (Livak *et al*, 2001).

Στην παρούσα διαδικασία η ανάλυση όλων των δεδομένων της RealTimePCR έγινε με χρήση του προγράμματος CFX Manager Software (Bio-RadCFX96).

Τέλος να σημειωθεί ότι το μέγεθος του προϊόντος της αντίδρασης της Real Time PCR πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 80-120bp για να εξασφαλιστεί η ειδικότητα και η υψηλή απόδοση της ενίσχυσης. Η ειδικότητα της ενίσχυσης μπορεί να διαπιστωθεί μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης μέσω της καμπύλης αποδιάταξης (melting curve analysis). Με την ανάλυση αυτή προσδιορίζεται η θερμοκρασία τήξης (T_m) των προϊόντων της αντίδρασης. Έτσι διαπιστώνεται τελικά ο τυχόν σχηματισμός διμερών των εκκινητών ή μη ειδικών προϊόντων, που όντας μικρότερα σε μέγεθος παρουσιάζουν χαμηλότερη θερμοκρασία τήξης.

Παρακάτω φαίνονται τα στάδια μιας τυπικής Real-TimePCR:

Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος	Κύκλος
Αρχική αποδιάταξη	95°C	4min	1
Αποδιάταξη	95°C	20sec	39
Υβριδισμός	T_a	30sec	
Απαλοιφή θορύβου	95°C-55°C	ανά 5sec μειώνεται η T κατά 0,5°C	1

ΣτάδιαRealTimePCR

Υλικά:

- ✓ cDNA
- ✓ Εκκινητές (Forward και Reverse)
- ✓ Master mix (SYBER Select Master Mix ,bio Systems)

Μέθοδος

Για την πραγματοποίηση μιας Real-timePCR προστίθενται στα ειδικά PCR σωληνάκια τα παρακάτω συστατικά με τελικό όγκο 15 μ L. Τα συστατικά της αντίδρασης dNTPs, Ταρπολυμεράση, ρυθμιστικό διάλυμα πολυμεράσης, $MgCl_2$ και SYBRGreen εμπεριέχονται στο Supermix.

- ✓ Για το κάθε δείγμα cDNA πραγματοποιείται ξεχωριστή αντίδραση ενίσχυσης με το εκάστοτε ζεύγος εκκινητών ανά γονίδιο (SPRprimers), καθώς και με τους εκκινητές του *hkg*, που στην παρούσα διαδικασία πρόκειται για το ριβοσωμικό γονίδιο *Rpl19*.

Υλικά	Σαρχικό	Στελικό	Ποσότητα
cDNA	-	10-40ng	5μl
Master Mix	2X	1X	7.5μL
εκκινητήςF	10pmol/μL	0.33 pmol/μL	0.5μl
εκκινητήςR	10pmol/μL	0.33 pmol/μL	0.5μl
ddH ₂ O	-	-	1.6μl
Τελικός όγκος			15μL

Αντίδραση Real- TimePCR

3.1.10 Απομόνωση ολικού RNA από ιστό

Η απομόνωση του ολικού RNA από ιστούς έγινε με σκοπό την χρησιμοποίηση του ως εκμαγείο για την δημιουργία cDNA. Για την απομόνωση εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο TRI-Reagent Protocol and DNA extraction της εταιρίας Molecular ResearchC, INC.

Υλικά:

- TRI (TRI REAGENT)
- BCP (1- BROMO- 3- Chloropropane,99% Cl(CH₂)₃Br, Alfa Aesar)
- Γλυκογόνο
- Αιθανόλη 75%
- ddH₂O

Μέθοδος:

1. Ομογενοποίηση

Στο στάδιο της ομογενοποίησης ο ιστός που βρίσκεται σε σωληνάκι που περιέχει 50μl TRI, διαλυτοποιείται με την βοήθεια των pasteles και στην συνέχεια προστίθεται επιπλέον TRI (ο τελικός όγκος στο σωληνάκι ισούται με 200μl). Στο τέλος γίνεται πολύ καλή ανακίνηση του διαλύματος με την βοήθεια του Vortex.

2. Φάση διαχωρισμού

- Επώαση του διαλύματος σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 5min
- Φυγοκέντρηση σε συνθήκες: 12.000g, 4°C, για 10min
- Μεταφορά υπερκείμενου σε καινούργιο σωληνάκι
- Προσθήκη 0,1ml ή 0,2mlBCP για κάθε 1mlTRI (στην παρούσα διαδικασία προστέθηκαν 20μlBCP)
- Έντονη Ανακίνηση για 15sec
- Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 2-15min
- Φυγοκέντρηση σε συνθήκες:12.000g, 4°C, για 15min

3. Προετοιμασία RNA

- Μεταφορά υπερκείμενου σε καινούργιο σωληνάκι
- Προσθήκη 10μlισοπροπανόλης 0,5X και 0.5μl γλυκογόνο
- Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5=10min
- Φυγοκέντρηση σε συνθήκες 12.000g, 4°C, για 8 min

4. Έκπλυση RNA

- Αφαίρεση υπερκείμενου και προσθήκη αιθανόλης 75% (1 mol για κάθε 1ml TRI, 200μl)
- Φυγοκέντρηση σε συνθήκες 12.000g, 4°C, για 5min

5. Διαλυτοποίηση RNA

- Αφαίρεση της αιθανόλης και στέγνωμα του ιζήματος στους σωλήνες για 3-5 min
- Προσθήκη 8μl ddH₂O θερμοκρασίας 55°C και αναδιάλυση του ιζήματος.

3.1.11 Κατεργασία με DNase του απομονωμένου RNA

Το πρωτόκολλο "Turbo DNase Treatment and Removal Reagents" της εταιρίας Ambion RNA by life technologies εφαρμόζεται με σκοπό την αποφυγή μόλυνσης του RNA που απομονώθηκε με προσμίξεις DNA. Το απομονωμένο RNA επρόκειτο να μετατραπεί σε cDNA μέσω ενός ενζύμου, της αντίστροφης μεταγραφάσης, και στη συνέχεια να χρησιμοποιηθεί ως εκμαγείο για αντιδράσεις PCR πραγματικού χρόνου. Κατά συνέπεια, η ύπαρξη γενωμικού DNA θα μόλυνε το δείγμα και θα αλλοίωνε τα αποτελέσματα της RT-PCR. Για να αποφευχθεί αυτό, τα RNA δείγματα υφίστανται κατεργασία με DNase, ένα ένζυμο που αποικοδομεί επιλεκτικά DNA.

Υλικά:

- Απομονωμένο RNA
- Ενζυμο DNase (Turbo DNase-free, Ambion RNA by life technologies)
- Ρυθμιστικό διάλυμα (buffer)
- Ρυθμιστικό διάλυμα απενεργοποίησης (inactivation buffer)
- ddH₂O

Μέθοδος:

Υλικά	Σαρχικό	Στελικό	Ποσότητα
RNA			8μl
DNase	2Units/μl	0.1Units/μl	0.5μl
Buffer	10x	1x	1 μl
ddH ₂ O			0.5 μl
Τελικός όγκος			10μl

Αντίδραση για κατεργασία με DNase

Μετά την προσθήκη των παραπάνω υλικών, τα δείγματα επωάζονται στους 37°C για 30 λεπτά και στην συνέχεια προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα απενεργοποίησης του ενζύμου όπου και πάλι ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά. Έπειτα τα δείγματα φυγοκεντρώνονται σε 11.000 g στροφές για 2 λεπτά και τέλος μεταφέρεται η επάνω φάση σε καινούργιο σωλήνα.

3.1.12 Σύνθεση cDNA με αντίστροφη μεταγραφή από ολικό RNA ιστού

Η αντίστροφη μεταγραφή είναι μια διαδικασία μετατροπής του RNA σε δίκλωνο μόριο μέσω της σύνθεσης μιας συμπληρωματικής cDNA αλυσίδας. Η μετατροπή αυτή αποσκοπεί στην καλύτερη προστασία του μορίου, καθώς ως μονόκλωνο το RNA είναι περισσότερο ασταθές και συνεπώς ευαίσθητο σε ένζυμα αποικοδόμησης. Επιπλέον για τη δυνατότητα ενίσχυσής του μέσω PCR ή RT-PCR, όπως σε περίπτωση ανάλυσης της γονιδιακής έκφρασης, το μόριο πρέπει να βρίσκεται σε δίκλωνη μορφή (Verma, 1975 ; Gerard and Grandgenett, 1975 ; Roth, Tanese and Goff, 1985 ; Sambrook, Fritsch and Maniatis, 1989).

Υλικά:

- Ολικό RNA του επιθυμητού ιστού
- Τυχαίοι εκκινητές
- dNTPs
- Ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση (Invitrogen by life technologies)
- DTT
- Ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμου (5X)
- Αναστολέας ριβονουκλεασών
- ddH₂O

Μέθοδος:

Υλικά	Σαρχικό	Στελικό	Ποσότητα
Ολικό RNA			(50- 250 ng)
Τυχαίοι Εκκινητές	100μM	8.33μM	1μl
DNTPs	10mM	0.2mM	0.25μl
ddH ₂ O		-	Συμπληρώνει τον όγκο
Τελικός όγκος			12 μl

Αντίδραση σύνθεσης cDNA

Μετά την προσθήκη των παραπάνω υλικών ακολουθεί επώαση στους 65°C για 5 λεπτά και στην συνέχεια προστίθενται τα εξής υλικά:

Υλικά	Σαρχικό	Στελικό	Ποσότητα
buffer	5X	1X	4μl
DTT	0.1M	0.01M	2μl
Αναστολέας ριβονουκλεασών	40 Units/μl	2 Units/μl	1μl
Τελικός όγκος			20 μl

Αντίδραση σύνθεσης cDNA

Στην συνέχεια ακολουθεί επώαση στους 37°C για 2 λεπτά και προσθήκη 1μl αντίστροφης μεταγραφάσης (200Units/μl), ανάδευση και ξανά επώαση στις συνθήκες: 25°C για 10 λεπτά, 37°C για 50 λεπτά και 7°C για 15 λεπτά.

3.1.13 Πρωτόκολλο έκφρασης δίκλωνου rna (ds-SPR)

(Li et al., 2015)

Υλικά:

- Θρεπτικό μέσο YDiferrent
- IPTG
- EDTA
- Φαινόλη
- Χλωροφόρμιο
- Ισοπροπανόλη
- TE BUFFER
- H₂O

Μέθοδος:

1. Ολονύχτια Καλλιέργεια βακτηρίων HT115, σε συνθήκες 37°C και 210 rpm
2. Μεταφορά καλλιέργειας σε θρεπτικό μέσο YDiferrent (100ml)
3. Επώαση καλλιέργειας στο θρεπτικό μέσο μέχρι OD₆₀₀=0,5, σε συνθήκες 250rpm και 37°C
4. Τα 50ml από τα 100ml μεταφέρονται σε καινούργια κωνική και προστίθεται 20ml IPTG 1M. Τα υπόλοιπα 50ml μένουν χωρίς IPTG ως control
5. Επώαση στους 37°C για 4h
6. Φυγοκέντρηση σε συνθήκες 5.000g για 10min
7. Αφαίρεση θρεπτικού μέσου
8. Αναδιάλυση σε immoniumyietule/ 10ml EDTA (500μl)
9. Προσθήκη 250ml phenol και 250ml chloroform
10. Επώαση στους 65°C για 30min (στο υδατόλουτρο) και φυγοκέντρηση στις 12.000g για 15min
11. Απομόνωση πάνω φάσης και προσθήκη ίσου όγκου ισοπροπανόλης (100%)
12. Επώαση ολονύχτια στους -90°C.

(όλα εις διπλούν, μία για το IPTG και μία για το control)

13. Φυγοκέντρηση για 30min σε 1200g
14. Αναδιάλυση του ιζήματος σε 500ml H₂O

Από τα 500μl τα 100μl αφήνονται ως έχουν, τα 100μl επεξεργάζονται με DNase, τα 100μl επεξεργάζονται με RNase και τα τελευταία 100μl επεξεργάζονται τόσο με DNase όσο και με RNase.

Τελική αναδιάλυση σε TE BUFFER

3.1.14 Καθαρισμός με Φαινόλη- Χλωροφόρμιο

(Sambrook et al., 1989)

Υλικά:

- Φαινόλη, χλωροφόρμιο
- Ισοπροπανόλη

- Αιθανόλη 70%
- TE Buffer

Μέθοδος:

Για τελικό όγκο 300μl.

1. Προσθήκη 150μl φαινόλης και 150μl χλωροφόρμιο
2. Ανακίνηση και φυγοκέντρηση (5min, fullspeed)
3. Απομόνωση υδατικής φάσης και την μεταφέρω σε νέο erpendorf και προσθήκη 300μl χλωροφόρμιο
4. Ανακίνηση και φυγοκέντρηση (3min, fullspeed)
5. Μεταφορά της επάνω φάσης σε καθαρό erpendorf και προσθήκη 300μl χλωροφόρμιο
6. Ανακίνηση, φυγοκέντρηση όπως πριν
7. Μεταφορά υδατικής φάσης σε καινούργιο erpendorf
8. Προσθήκη ισοπροανόλης (ίση με τον όγκο)
9. Ήπια ανάδευση και επώαση για 15min στους -20°C
10. Φυγοκέντρηση 15°min σε μέγιστη ταχύτητα
11. Απομάκρυνση υπερκειμένου και προσθήκη αιθανόλης 70% (μισό όγκο)
12. Ανακίνηση και φυγοκέντρηση 5 min σε μέγιστη ταχύτητα
13. Απομάκρυνση υπερκειμένου και επώαση μέχρι να στεγνώσει το ίζημα
14. Προσθήκη 50μl/100ml TE Buffer

3.1.15 Χρώση Βακτηρίων

Υλικά:

- Βακτηριακή Καλλιέργεια
- Χρωστική Coomaie Brilliant Blue R 1%

Μέθοδος:

Προσθήκη στην καλλιέργεια κατά την επώαση της 0,1% χρωστικής

3.1.16 Διαδικασία παραγωγής τροφής feeding

(Timmons et al., 2001)

Υλικά:

- Θρεπτικό υλικό LBBROTH
- θρεπτικό υλικό 2XYT

2ΧΥΤ (1000ml)	
Bacto-trypton	16gr
Bacto yeast	10gr
NACL	5gr

Προστίθενται τα συστατικά του πίνακα και 1000 ml H₂O. Ρύθμιση PH=7 με NaOH και αποστείρωση. Προσθήκη αντιβιοτικών, τετρακυκλίνη 12.5μg/mL και αμπικιλίνη 75μg/mL.

- H₂O
- Τροφή ενηλίκων εντόμων *Bactrocera oleae*

Συστατικά τροφής	
Ζάχαρη- Αχνη	8gr
Υδρολυμένη μαγιά	2gr
Αποξηραμένος κρόκος αυγού	0,6gr

Μέθοδος:

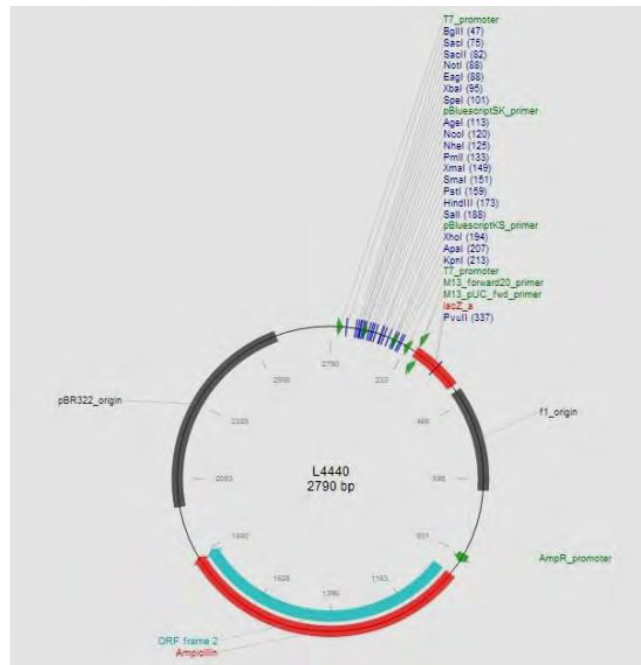
1. Ολονύχτια καλλιέργεια βακτηριακού στελέχους HT115 με το ανασυνδεδεμένο πλασμίδιο L4440 σε θρεπτικό υλικό LBBROTH (2ml)
2. Μεταφορά της καλλιέργειας σε θρεπτικό υλικό 2ΧΥΤ (100ml) και επώαση μέχρι OD₆₀₀=5 σε θερμοκρασία 37°C και 250 rpm
3. Προσθήκη IPTG (40mM) και επώαση για 4 h σε θερμοκρασία 37°C και 220 rpm
4. Φυγοκέντρηση σε συνθήκες T=4°C, 5,000 rcf για 10 min
5. Αναδιάλυση βακτηριακού ιζήματος σε 200μlH₂O
6. Προσθήκη 200μl του παραπάνω διαλύματος σε 2g τροφής

Η παρούσα διαδικασία επαναλαμβάνονταν κάθε δεύτερη μέρα και η αλλαγή τροφής στα κλουβιά των εντόμων ανανεωνόταν μια φορά το 24ώρο.

3.1.17 Το βακτηριακό στέλεχος *HT115* και το Πλασμίδιο *L4440*

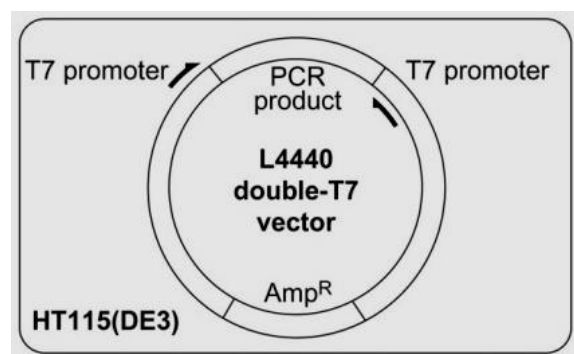
(Wang & Barr, 2005)

L4440:



Εικόνα 3.1.16A: Πλασμιδιακός φορέας *L4440*

Ο συγκεκριμένος πλασμιδιακός φορέας έχει την ικανότητα να επάγει την RNAί σίγηση. Αυτό το επιτυγχάνει διότι περιέχει δύο υποκινητές T7 RNA πολυμεράσης στα άκρα του πολυσυνδέτη (η T7 πολυμεράση είναι μια ιϊκή πολυμεράση η οποία εκφράζεται από υποκινητές με συγκεκριμένη αλληλουχία), αυτοί επιτρέπουν τη μεταγραφή των δύο κλώνων του RNA που βρίσκονται μεταξύ των υποκινητών.



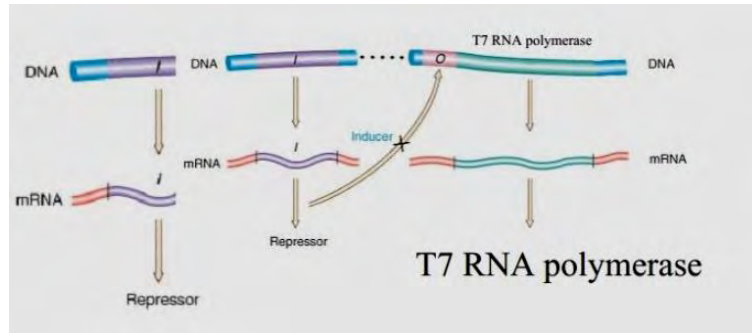
Εικόνα 3.1.16B: Πλασμιδιακό φορέας *L4440* και οι T7 υποκινητές που διαθέτει

HT115 (DE3):

Γονότυπος: *E. coli* [F⁻, mcrA, mcrB, IN(rrnD-rrnE)1, mrc14::Tn10(DE3 lysogen:lavUV5 promoter -T7 polymerase)].

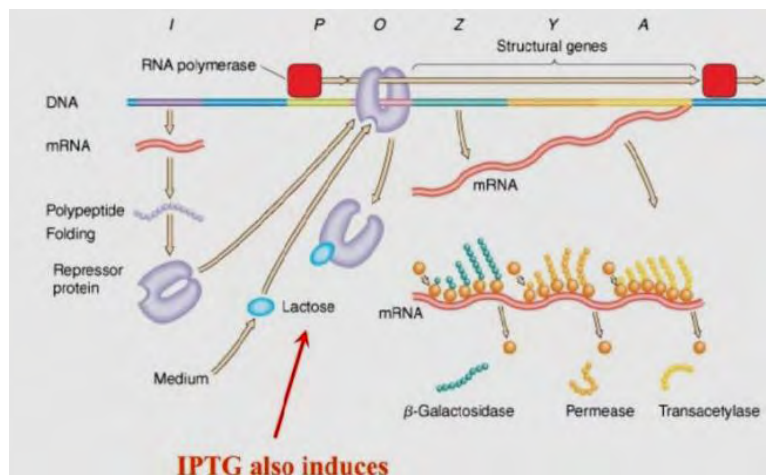
Άλλα ονόματα: PDB1

Το στέλεχος *E. coli* HT115 (DE3) έχει έναν τροποποιημένο υποκινητή *lac* υπεύθυνο για έλεγχο της μεταγραφής της T7 RNA πολυμεράσης.



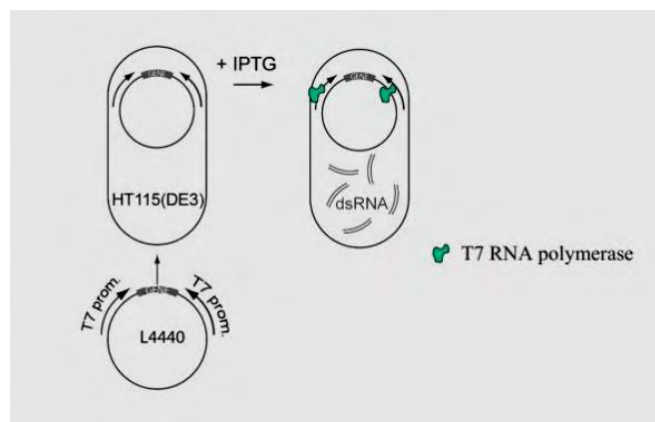
Εικόνα 3.1.16Γ: Υποκινητής *lac*

Ο υποκινητής *lac* μπλοκάρεται από έναν καταστολέα και επάγεται από λακτόζη ή IPTG, τα οποία προσδένονται στον καταστολέα αποτρέποντας την δέσμευση του στον υποκινητή *lac*.



Εικόνα 3.1.16Δ: Οπερόνιο Λακτόζης

Μόλις προστεθεί IPTG, αρχίζει να μεταγράφεται το γονίδιο της T7 RNA πολυμεράσης και εκφράζεται έτσι το ένζυμο στο κύτταρο.



Εικόνα 3.1.16.Ε: Παραγωγή δίκλωνου RNA μετά την επαγωγή από IPTG

3.1.18 Βιοπληροφορική και στατιστική ανάλυση

3.1.18.1 Αλγόριθμος Blast (Basic Local Alignment Search Tool)

Ευρετικός αλγόριθμος για την ανίχνευση ομόλογων ακολουθιών. Ο χρήστης εισάγει την υπό ερώτηση αλληλουχία (νουκλεοτιδική ή αμινοξική) και ο αλγόριθμος ανιχνεύει ομόλογες αλληλουχίες με αυτήν στην βάση δεδομένων. Ανάλογα με τον τύπο της αλληλουχίας υπάρχουν διάφορες υποκατηγορίες Blast. Οι τέσσερις βασικές είναι:

- Blastn (σύγκριση νουκλεοτιδικής με νουκλεοτιδική αλληλουχίας)
- Blastx (σύγκριση νουκλεοτιδικής αλληλουχίας μεταφρασμένη σε όλα τα αναγνωστικά πλαίσια με πρωτεϊνική αλληλουχία)
- Blastp (σύγκριση πρωτεϊνικής με πρωτεϊνική αλληλουχία)
- tBlastn (σύγκριση πρωτεϊνικής αλληλουχίας με νουκλεοτιδική αλληλουχία μεταφρασμένη σε όλα τα αναγνωστικά πλαίσια)

3.1.18.2 Omiga

Το Omiga είναι πρόγραμμα ανάλυσης νουκλεοτιδικών και πρωτεϊνικών αλληλουχιών. Επιτρέπει την δημιουργία, την ανάλυση και την επεξεργασία αλληλουχιών καθώς και τον προσδιορισμό θέσεων περιορισμού, μοτίβων, αναγνωστικών πλαισίων και άλλων χαρακτηριστικών. Επιπλέον παρέχει την δυνατότητα στοίχισης και σύγκρισης αλληλουχιών με τη χρήση του αλγόριθμου BLAST και τις διαθέσιμες βάσεις δεδομένων.

3.1.18.3 Microsoft Excel

Το Microsoft Excel είναι υπολογιστικό φύλλο μέσω του οποίου οργανώθηκαν τα αριθμητικά δεδομένα του πειράματος και απεικονίστηκαν με την μορφή γραφημάτων.

3.1.18.4 CFX Manager Software (Bio-Rad CFX96)

Το λογισμικό CFX Manager χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των αποτελεσμάτων της ποσοτικής RealTime PCR.

3.1.18.5 GraphPad Prism

Το GraphPad Prism είναι ένα πρόγραμμα στατιστικής που προσφέρει τη δυνατότητα επεξεργασίας επιστημονικών και πειραματικών αποτελεσμάτων με τη χρήση διάφορων στατιστικών τεστ. Δύο από τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα τεστ είναι το paired και το unpaired t-test, τα οποία συγκρίνουν τους μέσου όρους τιμών από δύο ομάδες. Στο πρώτο τεστ οι τιμές αυτές αφορούν τον ίδιο πληθυσμό και είναι αντιστοιχισμένες μεταξύ τους αφού λαμβάνονται σε δύο διαφορετικές χρονικές στιγμές. Στο δεύτερο, οι τιμές αφορούν δύο διαφορετικούς πληθυσμούς και δεν είναι αντιστοιχισμένες μεταξύ τους.

Η ανάλυση και η παρουσίαση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από αυτήν την πειραματική διαδικασία έγινε με unpaired t-test μέσω του προγράμματος αυτού.

Τέλος κλείνοντας το κεφάλαιο υλικών και μεθόδων πρέπει να σημειωθεί ότι για την απομόνωση του αναπαραγωγικού συστήματος και την φωτογράφιση των εικόνων: 1.1abc, 1.3.1, 1.3.2 και 4.1.8, χρησιμοποιήθηκε στερεοσκόπιο Leica Mz10F, συνδεδεμένο με κάμερα Leica DFC295.



ΚΕΦΑΛΑΙΟ4

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Κατασκευή βακτηρίων σίγησης

4.1.1 Βιοπληροφορικός εντοπισμός και απομόνωση νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του γονιδίου του υποδοχέα του συζευκτικού πεπτιδίου.

Το εναρκτήριο βήμα της όλης διαδικασίας ήταν ο εντοπισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του υποδοχέα του συζευκτικού πεπτιδίου (SPR) στον οργανισμό *Bactrocera oleae*. Με βάση την αλληλουχία του ομόλογου γονιδίου SPR της *Drosophila melanogaster*, διαθέσιμες νουκλεοτιδικές αλληλουχίες του εργαστηρίου και βιοπληροφορική ανάλυση εντοπίστηκε ένα μεγάλο μέρος της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του γονιδίου SPR του δάκου (BoSPR) (Εικόνα 4.1.1).

```
GTACATCTACGTGTGCACGCTCCCATGGCACGTACATGGTGCACCATGCCACGGGTGACGACGATCAACAATCTACATCGCCATCGCCGCTTT  
CTTGATCAGCTGACCCGGTTTTTCGATCGCACCTACTTCCCGATCACAATCGAGTGGAACGGCCAGCAAACTGAGGTGTGCCATGTGGAAA  
CCTCCGCATGGGTATTCAATTACATCGGGGAAGACCTCTACTTTCCATATACTTTCTATTTTCGAGTAGTGTGGTGCATGTGGTACCGTGCAT  
CTTACTCGTCACGCTGAATGTGCTGCTCTGGCAAGCAATGGAAGAAGCTAAGGAACGACGCAAAAGCGCTTCCCGGATAATAAGAAAGTA  
GAGAGCCGCAAGGTGCGCGACAGCAATTGCACCACATACATGTTGATTACGGTCTGCTCGGTCTTTTAGCTGTTGAGATACCCATAGCCGT  
GGTGACGGTACTGCACATCTTCTCCTCGTTAATGGGCGAATTTCTAAATTATCGCATGGCCAATATATCCATTATGTTACGAACTCTTTCTT  
GTAGTCAGTTATCCGATCAACTTCGGCATTACTGCGGCATGTCGCGCCAATTTTCGTGAAACCTTCAAGCATATATTTTCGAACGTTTTCTCA  
CTAAAAAGGATGCTTCATCGAAATATTCCATTGTCAATGGACCACGCACCTGCACCAGCACTAATGAGACTGTGCTCTAG
```

Εικόνα 4.1.1: Μέρος της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του SPR στον *Bactrocera oleae*, 728bp

Σύμφωνα με τον αλγόριθμο BLAST και το πρόγραμμα OMIGA διαπιστώθηκε ότι το κομμάτι του γονιδίου BoSPR αντιστοιχεί στο εξόνιο 8-9 του DmSPR και η αμινοξική αλληλουχία στο *Bactrocera oleae* είναι 75% όμοια με την αντίστοιχη της *Drosophila*. Επιπλέον βασιζόμενοι στον αλγόριθμο UniProt διαπιστώθηκε ότι η συγκεκριμένη νουκλεοτιδική αλληλουχία κωδικοποιεί τις διαμεμβρανικές περιοχές 4,5,6,7 μαζί με τις ενδιάμεσές τους περιοχές στην πρωτεΐνη.

4.1.2 Σχεδιασμός εκκινήτων.

Πάνω στην νουκλεοτιδική αλληλουχία σχεδιάστηκαν κατάλληλοι εκκινήτες τόσο για απλή PCR όσο και για PCR πραγματικού χρόνου (REAL TIME PCR) (Εικόνα 4.1.2).

```
GTACATCTACGTGTGCACGCTCCCATGGCACGTACATGGTGCACCATGCCACGGGTGACGACGATCAACAATCTACATCGCCATCGCCGCTTT  
CTTGATCAGCTGACCCGGTTTTTCGATCGCACCTACTTCCCGATCACAATCGAGTGGAACGGCCAGCAAACTGAGGTGTGCCATGTGGAAA  
CCTCCGCATGGGTATTCAATTACATCGGGGAAGACCTCTACTTTCCATATACTTTCTATTTTCGAGTAGTGTGGTGCATGTGGTACCGTGCAT  
CTTACTCGTCACGCTGAATGTGCTGCTCTGGCAAGCAATGGAAGAAGCTAAGGAACGACGCAAAAGCGCTTCCCGGATAATAAGAAAGTA  
GAGAGCCGCAAGGTGCGCGACAGCAATTGCACCACATACATGTTGATTACGGTCTGCTCGGTCTTTTAGCTGTTGAGATACCCATAGCCGT  
GGTGACGGTACTGCACATCTTCTCCTCGTTAATGGGCGAATTTCTAAATTATCGCATGGCCAATATATCCATTATGTTACGAACTCTTTCTT  
GTAGTCAGTTATCCGATCAACTTCGGCATTACTGCGGCATGTCGCGCCAATTTTCGTGAAACCTTCAAGCATATATTTTCGAACGTTTTCTCA  
CTAAAAAGGATGCTTCATCGAAATATTCCATTGTCAATGGACCACGCACCTGCACCAGCACTAATGAGACTGTGCTCTAG
```

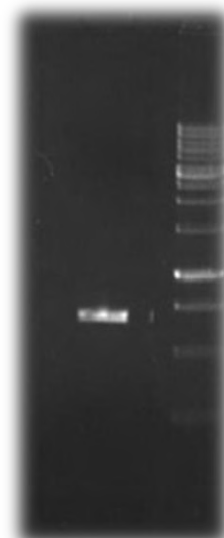
Εικόνα 4.1.2: Σχεδιασμός εκκινήτων, με κίτρινο απεικονίζονται οι εκκινήτες που σχεδιάστηκαν για PCR πραγματικού χρόνου και με γαλάζιο οι εκκινήτες που σχεδιάστηκαν για απλή PCR.

4.1.3 Κλωνοποίηση του SPR σε κατάλληλο πλασμιδιακό φορέα.

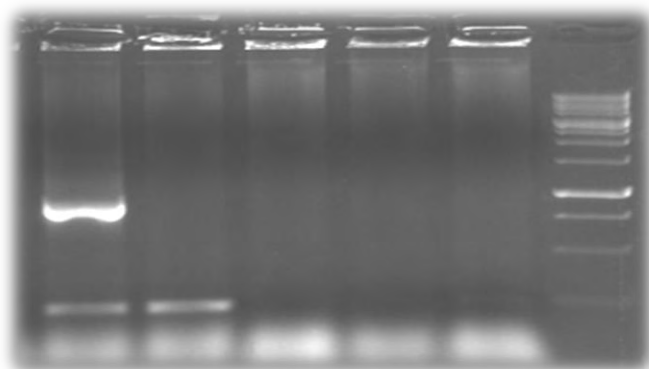
Στην συνέχεια σχεδιάστηκε αντίδραση απλής PCR με σκοπό την ενίσχυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του υποδοχέα SPR (BoSPR). Το αναμενόμενο μέγεθος της αλληλουχίας ήταν 666bp, το οποίο επιβεβαιώθηκε με την ηλεκτροφόρηση του προϊόντος της PCR σε πήκτωμα αγαρόζης 1% (Εικόνα 4.1.3.1). Ακολούθησε απομόνωση του κομματιού από το πήκτωμα και κλωνοποίησή του σε κατάλληλο φορέα.

Η διαδικασία της κλωνοποίησης περιλάμβανε αρχικά την απομόνωση του πλασμιδίου *L4440* από βακτηριακά κύτταρα *XL1-BLUE*. Στην πέψη του *L4440* με ένζυμα περιορισμού ώστε να αποκτήσει γραμμική μορφή και σύνδεση του με το ένθεμα SPR.

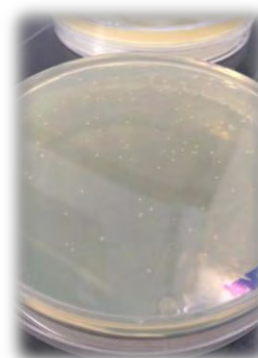
Το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο εισήχθη σε βακτηριακά κύτταρα (εικόνα 4.1.3.2) και μέσω ColonyPCR εντοπίστηκε βακτηριακή αποικία η οποία περιείχε το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο. (Εικόνα 4.1.3.3).



Εικόνα 4.1.3.1 Προϊόν PCR, 666bp

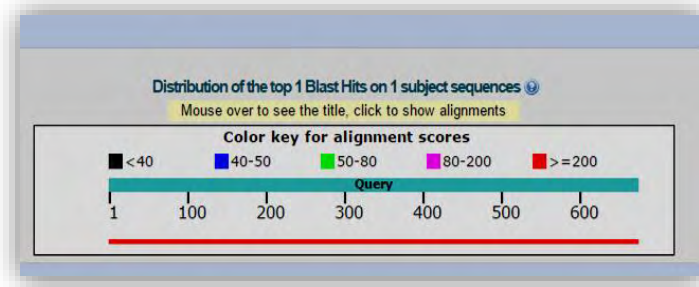


Εικόνα 4.1.3.3 : Ηλεκτροφόρηση του προϊόντος της colonyPCR χρησιμοποιώντας T7primers. Η έντονη ζώνη που φαίνεται είναι 850bp, και είναι ο BoSPR μαζί με τις βάσεις του πολυσυνδέτη.



Εικόνα 4.1.3.2: Βακτηριακές αποικίες

Για την ολοκλήρωση του πρώτου μέρους της πειραματικής διαδικασίας το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο αλληλουχήθηκε ώστε να επιβεβαιωθεί ότι το ένθεμα που περιέχει είναι πράγματι η νουκλεοτιδική αλληλουχία του SPR, με 100% ομολογία σε γονιδίωμα του δάκου και 75-80% στο ομόλογο γονίδιο της *Drosophila melanogaster* (Εικόνα 4.1.3.4).



Select: All None Selected:0

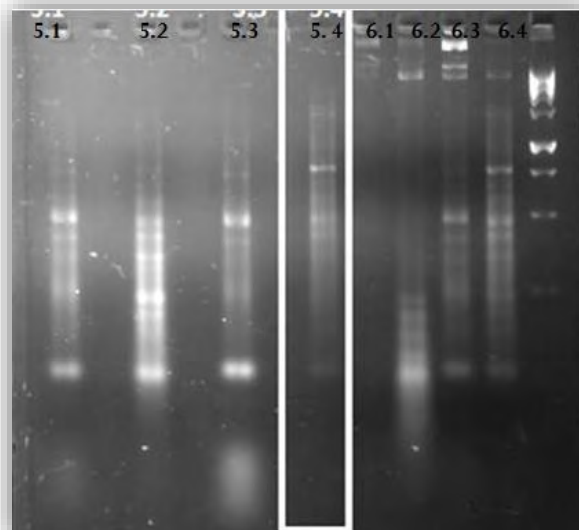
Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	PREDICTED: Bactrocera oleae sex peptide receptor (LOC106624880), partial mRNA	1242	1242	100%	0.0	100%	XM_014244661.1
<input type="checkbox"/>	Drosophila melanogaster isolate X010 sex peptide receptor (SPR) gene, exon 6 and partial cds	152	152	49%	5e-35	75%	HQ381320.1
<input type="checkbox"/>	Drosophila melanogaster chromosome X	148	148	31%	6e-34	80%	AE014298.5
<input type="checkbox"/>	Drosophila melanogaster Sex peptide receptor (SPR), transcript variant B, mRNA	148	148	31%	6e-34	80%	NM_001297964.1

Εικόνα 4.1.3.4:Ομολογία της κλωνοποιημένης περιοχής μέσω του προγράμματος Blastn: 100% με περιοχή του γονιδιώματος του δάκου της ελιάς και 80% με ομόλογη αλληλουχία της *D. melanogaster*

4.1.4 Δοκιμασία παραγωγής δίκλωνων RNASPR (ds-SPR).

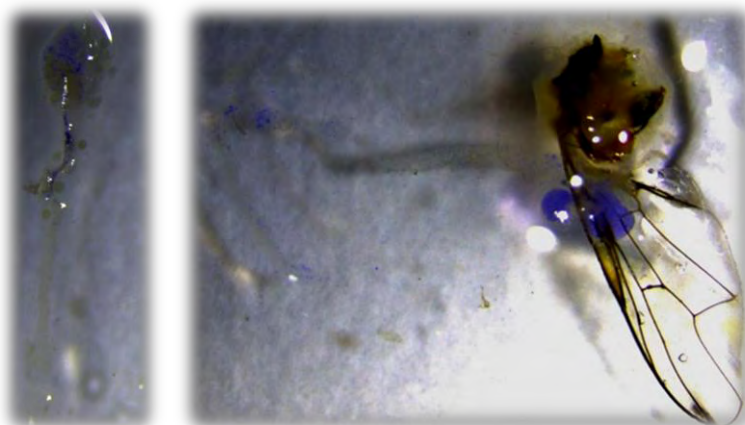
Για να επιβεβαιωθεί ότι τα βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιούνται είναι ικανά για παραγωγή ds-RNAπραγματοποιήθηκε η διαδικασία της επαγωγής ds-RNA(όπως περιγράφηκε στα Υλικά-Μέθοδοι)(Εικόνα 4.1.4).



Εικόνα4.1.4:5.1 DNase + RNase (2μl)-IPTG, 5.2 DNase +RNase(2μl)+IPTG, 5.3 DNase + RNase (0.2μl)- IPTG, 5.4 DNase + RNase (0.2μl)+IPTG, 6.1 RNase (2μl)-IPTG, 6.2 RNase (2μl)+IPTG, 6.3 RNase (0.2μl)-IPTG, RNase (0.2μl)+IPTG

4.1.5 Επιβεβαίωση κατάποσης των βακτηρίων από τα έντομα.

Για την εξακρίβωση της κατάποσης των βακτηρίων από τα ενήλικα έντομα, έγινε χρώση των βακτηρίων με μπλε χρωστική και παρακολούθηση της κοιλιακής χώρας των εντόμων. Όπως παρουσιάζεται στην εικόνα 4.1.8 τα έντομα είχαν μπλε κοιλιακή χώρα επιβεβαιώνοντας την παρουσία βακτηρίων στο πεπτικό τους σωλήνα. (Εικόνα 4.1.5).



Εικόνα 4.1.5: Η ύπαρξη χρωστικής στην κοιλιακή χώρα των δάκνων που τράφηκαν με τροφή που περιέχει βαμμένα βακτήρια

4.2 Πρότυπο έκφρασης του υποδοχέα του συζευκτικού βακτηρίου.

Το επόμενο κομμάτι του πειράματος αφορούσε την ανάλυση της έκφρασης του υποδοχέα SPR. Αρχικά συλλέχθηκαν ιστοί ενήλικων εντόμων, αρσενικών και θηλυκών, μηδέν έως επτά ημερών. Συγκεκριμένα για κάθε ημέρα πάρθηκαν δύο βιολογικά και κάθε δείγμα περιλάμβανε 10 ιστούς. Για παράδειγμα την ημέρα 0:

ΗΜΕΡΑ	ΙΣΤΟΣ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΙΣΤΩΝ
0	Κεφάλια Αρσενικών Δάκνων	20 (10/βιολογικό δείγμα)
	Κεφάλια Θηλυκών Δάκνων	
	Βοηθητικοί Αδένες Θηλυκών Δάκνων	

Στην συνέχεια έγινε απομόνωση του RNA από τα βιολογικά δείγματα, δημιουργία cDNA, και τέλος PCRπραγματικού χρόνου (Real Time PCR). Τα αποτελέσματα της Real Time PCR φαίνονται παρακάτω.

4.2.1 Έκφραση του SPR σε κεφάλια αρσενικών εντόμων *Bactrocera oleae*



Διάγραμμα 1

Παρατηρούμε ότι ο υποδοχέας εκφράζεται στα κεφάλια αρσενικών δάκων και συγκεκριμένα την ημέρα 6 παρουσιάζει μέγιστη έκφραση. Η μπάρα σφάλματος δείχνει την διακύμανση ανάμεσα στα δύο βιολογικά δείγματα. Για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο σταθερής έκφρασης rpl19.

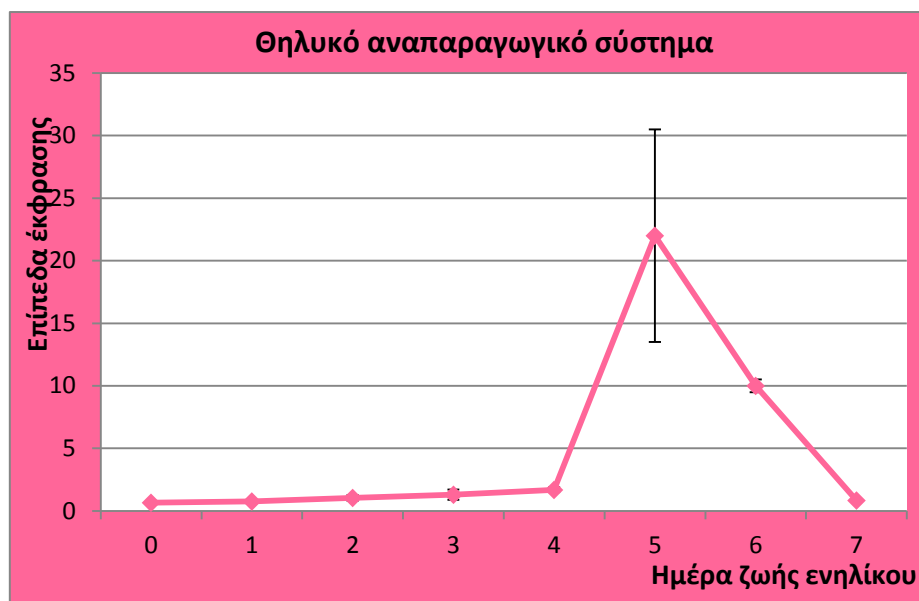
4.2.2 Έκφραση του SPR σε κεφάλια θηλυκών εντόμων *Bactrocera oleae*



Διάγραμμα 2

Το πρότυπο έκφρασης του υποδοχέα στα κεφάλια θηλυκών δάκων εμφανίζει διαφορετική μορφή από αυτό των αρσενικών. Ωστόσο και πάλι την ημέρα 6 έχουμε μέγιστη έκφραση. Η μπάρα σφάλματος δείχνει την διακύμανση ανάμεσα στα δύο βιολογικά δείγματα. Για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο σταθερής έκφρασης rpl19.

4.2.3 Έκφραση του SPR στο θηλυκό αναπαραγωγικό σύστημα του *Bactrocera oleae*



Διάγραμμα 3

Παρατηρούμε ότι η έκφραση του SPR στο αναπαραγωγικό σύστημα του δάκου αυξάνεται σταδιακά και παρουσιάζει μέγιστο την ημέρα 5. Η μπάρα σφάλματος δείχνει την διακύμανση ανάμεσα στα δύο βιολογικά δείγματα. Για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο σταθερής έκφρασης GAPDH.

- ❖ Τα πρότυπα έκφρασης του SPR βοήθησαν στον σχεδιασμό της διαδικασίας του feeding.

4.3 Διαδικασία feeding και αποτελέσματα σίγησης

Με βάση τα πρότυπα έκφρασης του SPR τόσο στα κεφάλια όσο και στο αναπαραγωγικό σύστημα και σύμφωνα με βιβλιογραφική ανασκόπηση (Avila et al., 2015; Zheng et al., 2015; Li et al., 2011) η πειραματική διαδικασία για την κατάποση ds-RNA στα έντομα είχε τις εξής παραμέτρους:

- Παρθένα θηλυκά έντομα και όχι αρσενικά θα τρέφονταν με ds-SPR προερχόμενο από τα βακτήρια. Η τροφή θα εναλλάσσονταν καθημερινά με φρέσκια ώστε να επέλθει το μέγιστο ποσοστό της σίγησης (Li et al., 2015).
- Τα έντομα θα τρέφονταν με ds-RNA από την πρώτη μέρα ενήλικου εντόμου (ημέρα 0) μέχρι την ημέρα θανάτου τους.
- Με βάση το πρότυπο έκφρασης του γονιδίου θα γινόταν λήψη δειγμάτων την ημέρα 5 για την εξακρίβωση του ποσοστού σίγησης.
- Ως ημέρα σύζευξης ορίστηκε η ημέρα 7 όπου τα έντομα είναι σεξουαλικά ώριμα.
- Μετά τη σύζευξη, τα θηλυκά έντομα θα απομονώνονταν σε κλουβί με κώνο ώστε να καταμετρηθεί η ωοαπόθεση τους.
- Η πειραματική διαδικασία θα επαναλαμβανόταν και σε έντομα control τα οποία θα τρέφονταν με ds-GFP

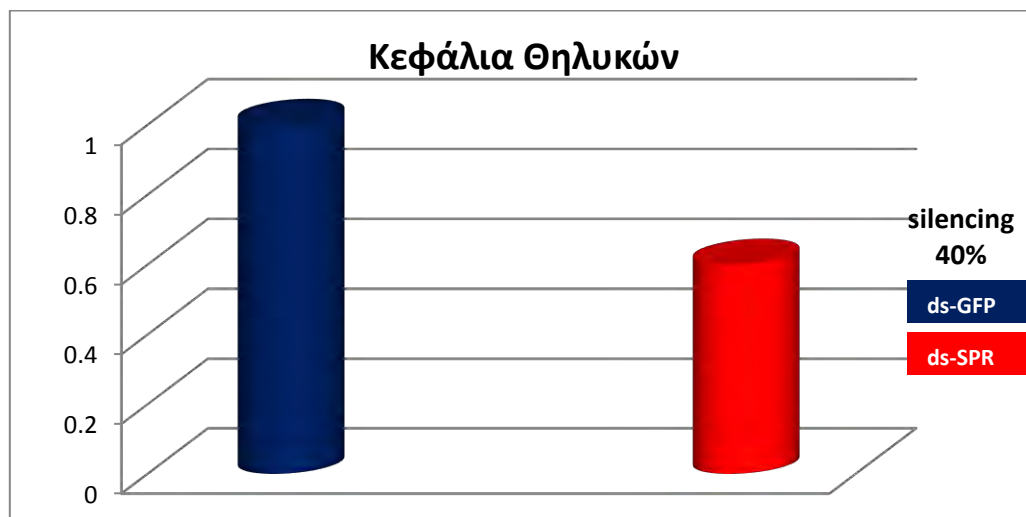
4.3.1 Σίγηση του γονιδίου του υποδοχέα του συζευκτικού πεπτιδίου SPR στο αναπαραγωγικό σύστημα και στα κεφάλια των θηλυκών *Bactrocera oleae*

Για να υπολογιστεί το ποσοστό σίγησης του γονιδίου πραγματοποιήθηκε αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-Time PCR) σε δείγματα 5^{ης} μέρας από την ομάδα που τρεφόταν με ds-SPR (γονιδίου-στόχου) και ds-GFP (γονίδιο ελέγχου).



Διάγραμμα 4

Στο διάγραμμα 4 αναπαρίστανται τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου SPR σε θηλυκά έντομα *B.oleae* την 5^η ημέρα. Παρατηρούμε ένα ποσοστό σίγησης της τάξης του 90% στο αναπαραγωγικό σύστημα των εντόμων που τρέφονταν με ds-SPR.

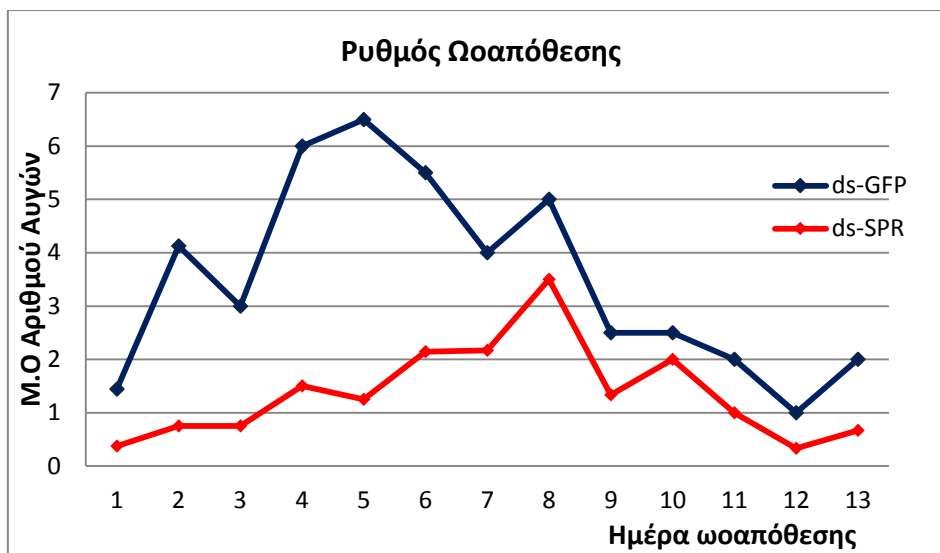


Διάγραμμα 5

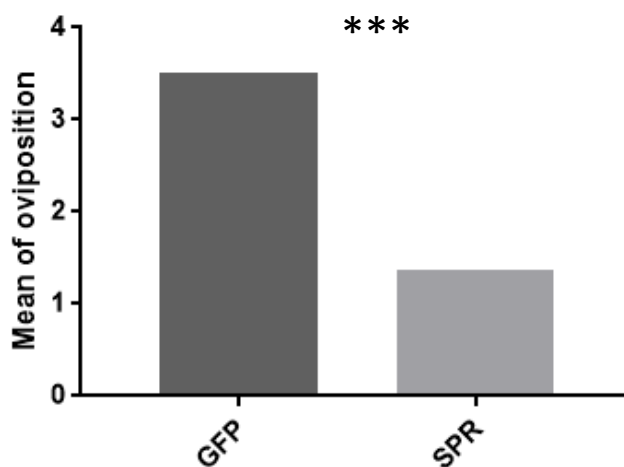
Στο διάγραμμα 5 αναπαρίστανται τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου SPR σε θηλυκά έντομα *B.oleae* την 5^η ημέρα. Παρατηρούμε ένα ποσοστό σίγησης της τάξης του 40% στα κεφάλια των εντόμων που τρέφονταν με ds-SPR.

4.3.2 Παρατήρηση Φαινοτύπου.

Μετά την επιβεβαίωση της σίγησης του γονιδίου SPR ακολούθησε παρατήρηση του φαινοτύπου. Για τον σκοπό αυτό θηλυκά παρθένα έντομα που τρέφονταν με τροφή ds-SPR, ζευγάρωσαν με παρθένα αρσενικά έντομα την ημέρα 7 και στην συνέχεια απομονώθηκαν σε κλουβί. Κάθε μέρα γινόταν καταμέτρηση των αυγών και των πεθαμένων εντόμων.

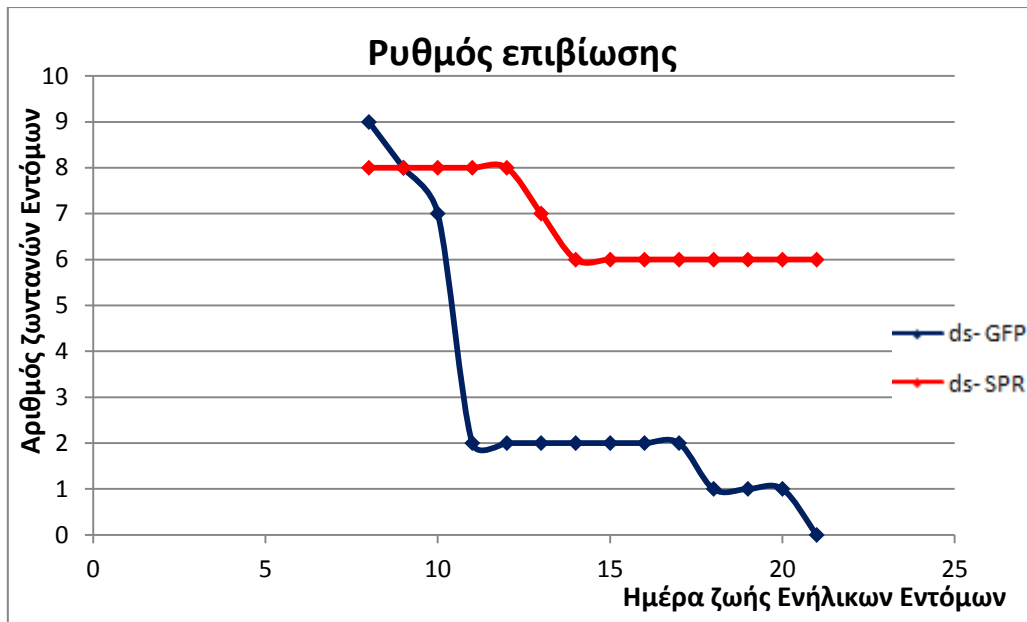


Διάγραμμα 6A



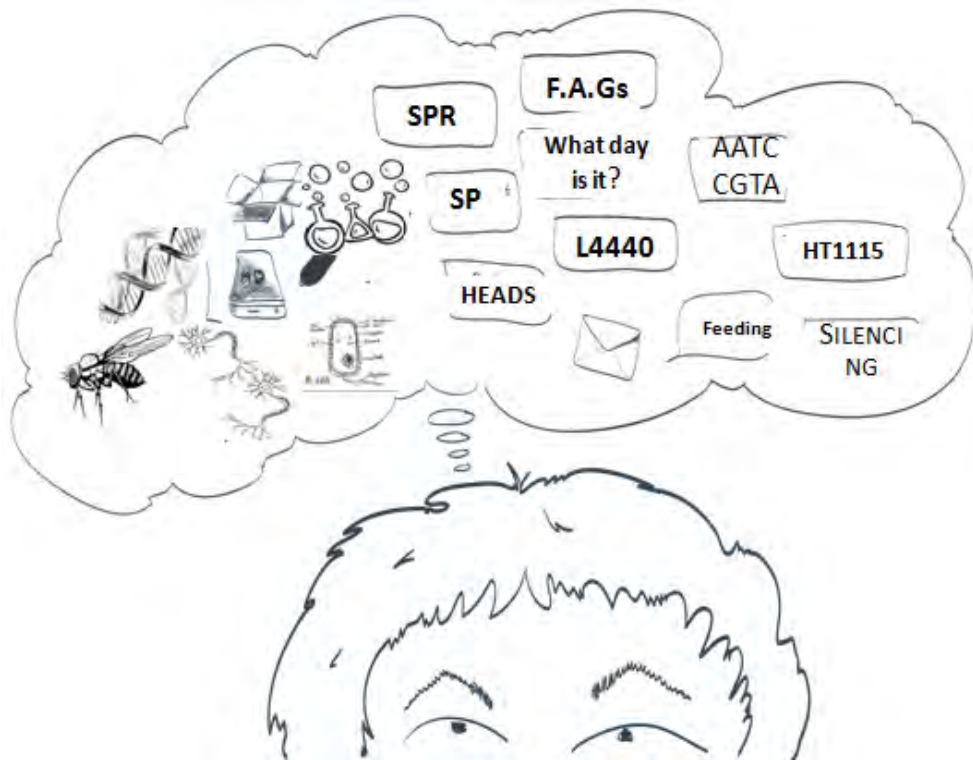
Διάγραμμα 6B

Στο διάγραμμα 6A φαίνεται ότι τα έντομα που τρέφονταν με ds-SPR γεννούσαν στατιστικά σημαντικά μικρότερο αριθμό αυγών σε σχέση με τα control έντομα. Στο διάγραμμα 6B απεικονίζεται ο μέσος όρος των αυγών καθημερινά στα έντομα που τρέφονταν με ds-SPR και ds-GFP. Το * χρησιμοποιείται ως ένδειξη στατιστικής σημαντικότητας για $p < 0,05$.



Διάγραμμα 7

Στο διάγραμμα φαίνεται ότι τα έντομα που τρέφονταν με ds-SPR είχαν μεγαλύτερη διάρκεια ζωής από ότι τα control.



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο δάκος της ελιάς ή *Bactrocera oleae* είναι το σημαντικότερο παράσιτο της ελιάς. Η ζημιά που προκαλεί στην ελιά είναι τόσο ποιοτική όσο και ποσοτική. Η αντιμετώπισή του, ακόμη και σήμερα, πραγματοποιείται με κλασσικούς τρόπους όπως η χρήση εντομοκτόνων και παγίδων. Οι επιβλαβείς συνέπειες που έχουν αυτοί οι τρόποι αντιμετώπισης για το περιβάλλον αλλά και για τον άνθρωπο οδήγησαν στο σχεδιασμό νέων, εξειδικευμένων και περιβαλλοντικά φιλικών μεθόδων καταπολέμησης του δάκου.

Το πρώτο βήμα για το σχεδιασμό εξειδικευμένων μεθόδων καταπολέμησης είναι ο εντοπισμός γονιδίων-κλειδιών που ρυθμίζουν σημαντικές διεργασίες του εντόμου απαραίτητες για την επιβίωση και αναπαραγωγή του. Οι νέες μέθοδοι αντιμετώπισης στοχεύουν σε τέτοια γονίδια με σκοπό την μείωση της αναπαραγωγικής ικανότητας του εντόμου και κατ' επέκταση τον έλεγχο του πληθυσμού. Ένα πεπτίδιο που είναι γνωστό για το ρόλο του στην αναπαραγωγική διαδικασία είναι το συζευκτικό πεπτίδιο (SP). Το SP παράγεται στους βοηθητικούς αδένες του αρσενικού αναπαραγωγικού συστήματος και μεταφέρεται μέσω του σπέρματος στα θηλυκά έντομα. Εντός του θηλυκού αναπαραγωγικού συστήματος συνδέεται σε ένα GPCR υποδοχέα γνωστό ως υποδοχέα του συζευκτικού πεπτιδίου και ενεργοποιεί ένα καταρράκτη μοριακών μονοπατιών με τελικό αποτέλεσμα τη μετα-συζευκτική δραστηριότητα του θηλυκού εντόμου (Yarici et al., 2008). Το δυαδικό αυτό σύστημα, του υποδοχέα και του πεπτιδίου, είναι ουσιαστικά ο μοριακός διακόπτης για την έναρξη των διεργασιών που έπονται της σύζευξης και καθιστούν επιτυχημένη την αναπαραγωγική διαδικασία.

Για τους παραπάνω λόγους, το γονίδιο του SPR επιλέχθηκε ως γονίδιο στόχος στην παρούσα πτυχιακή εργασία. Πιο συγκεκριμένα, ο σκοπός της εργασίας ήταν η αναστολή της αναπαραγωγής του δάκου της ελιάς μέσω σίγησης του γονιδίου SPR. Ως μέθοδος σίγησης επιλέχθηκε η πρόσληψη δίκλωνων RNA μέσω τροφής (feeding), διότι έδινε τη δυνατότητα συνεχούς καταστολής του γονιδίου στόχου. Η συνεχής καταστολή ήταν απαραίτητη στην περίπτωση του SPR καθώς το SP το οποίο είναι αποθηκευμένο μαζί με το σπέρμα στην σπερματοθήκη, απελευθερώνεται σταδιακά και στη συνέχεια συνδέεται στον υποδοχέα (Peng et al., 2005). Έτσι η συνεχής σίγηση του γονιδίου του υποδοχέα εξασφαλίζει ότι το συζευκτικό πεπτίδιο δεν θα προσδεθεί σε αυτόν.

Κατά την πειραματική διαδικασία, αρχικά εντοπίστηκε ένα τμήμα της αλληλουχίας του SPR στον δάκο της ελιάς μέσω της ομολογίας του υποδοχέα με γνωστή αλληλουχία της *D. melanogaster*. Σχεδιάστηκαν εκκινητές για την συγκεκριμένη αλληλουχία και μέσω PCR πραγματοποιήθηκε ενίσχυσή της. Το κομμάτι που ενισχύθηκε κλωνοποιήθηκε στον πλασμιδιακό φορέα L4440 και στάλθηκε για αλληλούχηση. Η περιοχή που αλληλουχήθηκε παρουσίασε 100% ομολογία σε περιοχή γονιδιώματος του δάκου που προβλέπεται ότι αντιστοιχεί στον υποδοχέα και 75-80% στο ομόλογο γονίδιο της *Drosophila melanogaster*. Ο φορέας L4440 επιλέχθηκε διότι έχει την ικανότητα να επάγει την RNAi σίγηση. Αυτό το επιτυγχάνει διότι περιέχει δύο υποκινητές T7 RNA πολυμεράσης στα άκρα του πολυσυνδέτη οι οποίοι επιτρέπουν τη μεταγραφή της περιοχής που βρίσκεται μεταξύ των υποκινητών. Στην συνέχεια ο ανασυνδιασμένος φορέας εισήχθη σε βακτηριακά κύτταρα του στέλεχος *E. coli* HT115 (DE3). Το στέλεχος αυτό είναι κατάλληλο για την παραγωγή δίκλωνου RNA μετά την επαγωγή από IPTG όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι.

Παράλληλα με την κλωνοποίηση του γονιδίου σχεδιάστηκαν και εκκινητές για τη δημιουργία του προτύπου έκφρασης του υποδοχέα. Για το σκοπό αυτό συλλέχθηκαν αναπαραγωγικοί ιστοί θηλυκών εντόμων και ιστοί κεφαλών από αρσενικά και θηλυκά έντομα, από την ημέρα που εκκολάπτεται το ενήλικο έντομο (ημέρα μηδέν), έως την ημέρα που θεωρείται σεξουαλικά ώριμο (ημέρα επτά).

Στο διάγραμμα 1 παρουσιάζεται το πρότυπο έκφρασης του υποδοχέα στα κεφάλια αρσενικών εντόμων. Η μέγιστη έκφραση παρουσιάζεται την ημέρα 6. Μέχρι πρόσφατα, ο ρόλος του υποδοχέα στα αρσενικά κεφάλια δεν έχει συνδυαστεί με κάποια βιολογική λειτουργία. Ωστόσο το 2010 βρέθηκε ότι ο υποδοχέας αυτός στη *D. melanogaster* έχει κι άλλους προσδέτες, τα πεπτιδία MIPs (Myoinhibitory Peptides) (Kimetal., 2010; Poels et al., 2010). Στο δεύτερο διάγραμμα, στο οποίο απεικονίζεται το πρότυπο έκφρασης του υποδοχέα στα κεφάλια θηλυκών δάκων παρουσιάζεται μια κορυφή έκφρασης την ημέρα 3 και μέγιστη έκφραση την ημέρα 6. Η διακύμανση που απεικονίζει η μπάρα σφάλματος τις ημέρες αυτές αντιπροσωπεύει δύο βιολογικά δείγματα. Για την εξακρίβωση του επιπέδου έκφρασης είναι απαραίτητο να ληφθεί και τρίτο βιολογικό δείγμα.

Παρατηρώντας τα δύο αυτά πρότυπα έκφρασης, διαπιστώνει κανείς ότι και στις δύο περιπτώσεις η έκφραση αυξάνεται παράλληλα με τη σεξουαλική ωρίμανση. Το γεγονός αυτό κάνει ελκυστική την υπόθεση ότι ίσως ο υποδοχέας του συζευκτικού πεπτιδίου στα κεφάλια των αρσενικών και θηλυκών εντόμων να ενεργοποιεί μεταγωγικά μονοπάτια που οδηγούν στην σεξουαλική ωρίμανση του εντόμου και στην προετοιμασία του για σύζευξη.

Η παρουσία του υποδοχέα στο κεφάλι των εντόμων αλλά και στα διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια μελετήθηκε στη *Drosophila melanogaster*. Ωστόσο το προφίλ της έκφρασης του υποδοχέα σε σχέση με την σεξουαλική ωριμότητα του εντόμου δεν έχει προς το παρόν συσχετιστεί (βιβλιογραφία). Όσον αφορά το πρότυπο έκφρασης του υποδοχέα στα θηλυκά κεφάλια του δάκου (διάγραμμα 2) αυτό παρουσιάζει μία αύξηση την ημέρα 3. Η αύξηση αυτή συνάδει με το γεγονός ότι τα έντομα που μελετήθηκαν είναι του εργαστηριακού πληθυσμού. Λόγω των διαφορετικών συνθηκών που υπάρχουν στο εργαστήριο από τη φύση, τα έντομα ωριμάζουν σεξουαλικά πολύ πιο γρήγορα από τα έντομα στο περιβάλλον. Ίσως δηλαδή η έκφραση του SPR την ημέρα 3 να υποδηλώνει την σεξουαλική ωρίμανση των θηλυκών του εργαστηρίου νωρίτερα.

Στο τρίτο διάγραμμα αναπαριστάται το πρότυπο έκφρασης του υποδοχέα στο αναπαραγωγικό σύστημα των θηλυκών εντόμων. Σύμφωνα με το πρότυπο, υπάρχει μέγιστη έκφραση την ημέρα 5. Με αυτό τον τρόπο τα μετάγραφα μεταφράζονται προς πρωτεΐνη, η οποία είναι παρούσα στο αναπαραγωγικό σύστημα την ημέρα 7 όπου πραγματοποιείται η σύζευξη. Έτσι κατά τη σύζευξη ο υποδοχέας είναι παρών και μπορεί να συνδεθεί με το SP που μεταφέρεται με το σπέρμα. Η σύνδεση αυτή θα οδηγήσει στην πρόκληση μετασυζευκτικής δραστηριότητας στο θηλυκό.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε το πείραμα σίγησης μέσω της τροφής. Για το σκοπό αυτό διαχωρίστηκαν τα θηλυκά έντομα σε δυο ομάδες από την πρώτη ημέρα ενήλικου εντόμου και τους χορηγήθηκε τροφή που περιείχε ds-SPR και ds-GFP αντίστοιχα. Έπειτα με βάση το πρότυπο έκφρασης του υποδοχέα στο αναπαραγωγικό σύστημα των θηλυκών εντόμων επιλέχθηκε η μέρα 5 ως ημέρα προσδιορισμού του ποσοστού σίγησης. Όσον αφορά τα αποτελέσματα της σίγησης, διαπιστώθηκε ότι υπάρχει σίγηση του υποδοχέα της τάξης 90% στο θηλυκό αναπαραγωγικό σύστημα ενώ στα θηλυκά κεφάλια μόλις 40%. Η

διαφορά αυτήςως να οφείλεται στην ύπαρξη του εγκεφαλοαιματικού φραγμού που βρίσκεται στον εγκέφαλο των εντόμων (blood-brainbarriers, BBB) και εμποδίζει την διέλευση μορίων προς τον εγκέφαλο.

Τα ποσοστά σίγησης είναι πολύ ενθαρρυντικά και αυτή είναι η πρώτη επιτυχημένη προσπάθεια σίγησης μέσω τροφής σε ενήλικα έντομα *Bactrocera oleae* σύμφωνα με τη διαθέσιμη βιβλιογραφία. Η μέθοδος σίγησης μέσω τροφής, θα μπορούσε να βρει άμεση εφαρμογή στον έλεγχο του πληθυσμού του δάκου καθώς είναι πρακτική και υπό κάποιες συνθήκες εφαρμόσιμη στον αγρό (Huvenne & Smaghe, 2010).

Τέλος για να διαπιστωθεί εάν το ποσοστό σίγησης είναι αρκετό για να προκαλέσει μείωση της αναπαραγωγικής ικανότητας του εντόμου έγινε σύγκριση της παραγωγής αυγών και του χρόνου ζωής μεταξύ των εντόμων που τρέφονταν με ds-SPR και των ds-GFP. Στο διάγραμμα 6 φαίνεται ότι τα έντομα που τρέφονταν με ds-SPR γεννούσαν πολύ μικρότερο αριθμό αυγών σε σχέση με τα control έντομα. Σύμφωνα με το t-test η διαφορά ανάμεσα στους δύο πληθυσμούς είναι στατιστικά σημαντική. Επίσης στο διάγραμμα 7 φαίνεται ότι τα έντομα που τρέφονταν με ds-SPR είχαν μεγαλύτερη διάρκεια ζωής από ότι τα έντομα ελέγχου. Οι παρατηρήσεις αυτές επιβεβαιώνουν τον ρόλο του υποδοχέα SPR στο αναπαραγωγικό σύστημα του δάκου καθώς και ότι το ποσοστό σίγησης μέσω τροφής είναι αρκετό ώστε να προκληθεί μείωση της αναπαραγωγικής ικανότητας.

Μελλοντικές κατευθύνσεις

Αρχικά η πειραματική διαδικασία θα πρέπει να επαναληφθεί σε περισσότερο αριθμό εντόμων με σκοπό την αύξηση της πιστότητας τόσο του ποσοστού σίγησης όσο και του φαινότυπου. Ικανοποιητικό δείγμα θεωρείται εκείνο που έχει τουλάχιστον 50 έντομα σε κάθε ομάδα (ομάδα που διατρέφεται με το ds-SPR και ομάδα που διατρέφεται με το ds-GFP). Επιπλέον κάποιες αλλαγές στην διαδικασία της σίγησης ίσως αυξήσουν ακόμα περισσότερο το ποσοστό σίγησης του γονιδίου (αύξηση βακτηρίων στην τροφή).

Όσον αφορά τον φαινότυπο θα μπορούσαν να παρατηρηθούν επιπλέον δραστηριότητες της μετασυζευκτικής συμπεριφοράς των εντόμων. Για παράδειγμα, να εξεταστεί η σεξουαλική δεκτικότητα σε επόμενο ζευγάρι, η διάρκεια ύπνου και η κινητική δραστηριότητα, όπως επίσης και η σύγκριση της έκφρασης των αντιμικροβιακών πεπτιδίων πριν και μετά την σύζευξη.

Ακόμα κρίνεται απαραίτητη η ανάλυση της έκφρασης του υποδοχέα και μετά την έβδομη ημέρα ενήλικης ζωής αλλά και σε άλλα αναπτυξιακά στάδια καθώς υπάρχουν στοιχεία για έκφρασή του κατά το στάδιο του αυγού και το προνυμφικό στάδιο (Poelsetal., 2010). Η ανάλυση της έκφρασης σε αυτά τα στάδια θα μπορούσε να βοηθήσει στον πλήρη καθορισμό του ρόλου του υποδοχέα. Επίσης απαραίτητο είναι να εξακριβωθεί ότι ο υποδοχέας δεν εκφράζεται στο αναπαραγωγικό σύστημα του οργανισμού *Bactrocera oleae* όπως συμβαίνει και στην *Drosophila melanogaster*.

Επιπλέον η διαδικασία της σίγησης θα μπορούσε να επαναληφθεί μέσω μικροέγχυσης (injection) αντί για τροφή ώστε να συγκριθεί η αποτελεσματικότητα των δύο μεθόδων αλλά και τα ίδια τα αποτελέσματα. Το πλεονέκτημα της μεθόδου αυτής είναι ότι το ποσοστό ds-RNA που εισάγεται στον οργανισμό είναι σταθερό μεταξύ των εντόμων ενώ γίνεται

κατευθείαν έγχυση στην αιμολέμφο του εντόμου παραλείποντας την γαστρεντερική οδό που ακολουθεί η μέθοδος σίγησης μέσω τροφής.

Τέλος μία στρατηγική που θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί αντί της RNA σίγησης είναι η πλήρης απαλοιφή του υποδοχέα του συζευκτικού πεπτιδίου (SPR) μέσω του συστήματος CRISPR-Cas9 ώστε να έχουμε πλήρη έλλειψη της πρωτεΐνης. Αυτό ίσως οδηγούσε σε διαφορετικά συμπεράσματα καθώς το εναπομείναν ποσοστό πρωτεΐνης μπορεί να είναι αρκετό για να επιτελέσει ένα μέρος της βιολογικής της λειτουργίας.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Γ

Γεννάδιος Π.Γ.(1986). Ασθένειαι της ελαιιάς. Ελληνική Γεωργία 5: 193- 214.

Γιαμβριάς Χ.(1998). Εντομολογικοί εχθροί ελιάς. Αθήνα, εκδόσεις Α. Σταμουλής. 126 σελ.

Ζ

Ζιώγας Β. (1996). Ο Δάκος της ελιάς. Πειραιά, εκδόσεις Υπουργίου Γεωργίας. Περιφεριακό κέντρο προστασίας φυτών και ποιοτικού ελέγχου Πειραιά, 109 σελ.

Τ

Τζανακάκης Μ.Ε., Κατσόγιαννος Β.Ι. (2003). Εντομα καρποφόρων δέντρων και αμπέλου. ΑγροΤύποςΑΕ (Βιβλίο)

Α

Aaij C., Borst P. (1972). The gel electrophoresis of DNA. *Biochim. Biophys. Acta*, 269:192

Abbot P., Dill L.M. (2001). Sexually transmitted parasites and sexual selection in the milkweed leaf beetle, *Labidomera clivicollis*. *Oikos*. 92, 91–100

Adams E.M., Wolfner M.F. (2007). Seminal proteins but not sperm induce morphological changes in the *Drosophila melanogaster* female reproductive tract during sperm storage. *J Insect Physiol.* 53, 319-31.

Aigaki T., Fleischmann I., Chen P.S., Kubli E. (1991). Ectopic expression of sex peptide alters reproductive behavior of female *D. melanogaster*. *Neuron*. 7,557-63

Avila F.W., Ram K.R., Qazi M.C B., Wolfner M.F. (2010). Sex peptide is required for the efficient release of stored sperm in mated *Drosophila* females. *Genetics* 186, 595–600.

Avila F.W., Mattei A.L., Wolfner M.F. (2015). Sex peptide receptor is required for the release of stored sperm by mated *Drosophila melanogaster* females. *J Insect Physiol.* 76, 1-6

Β

Bartlett, JMS. Stirling, D. (2003). "A Short History of the Polymerase Chain Reaction". *PCR Protocols. Methods in Molecular Biology*. 226 (2nd ed.). pp. 3–6. doi:10.1385/1-59259-384-4:3. ISBN 1-59259-384-4.

Bateman A.J. (1948). Intra-sexual selection in *Drosophila*. *Hereditas* 2, 349–368.

Borovsky D. (2005). Insect peptide hormones and RNA-mediated interference (RNAi): promising technologies for future plant protection. *Phytoparasitica*. 33, 109–112

Bouletreau-Merle J. (1976). Destruction of the pars intercerebralis in *Drosophila melanogaster*: effect on the fecundity and the stimulation through copulation]. *J. Insect Physiol.* 22, 933–940.

Bretman A., Lawniczak M.K., Boone J., Chapman T. (2010). A mating plug protein reduces early female remating in *Drosophila melanogaster*. *J Insect Physiol.* 56, 107-13

Broumas T., Haniotakis G. (1987) Further studies on the control of the olive fruit fly by Mass-Trapping. Paper presented in the proceeding of the 2nd international symposium on fruit flies, Crete 1986.

C

Carton Y., Frey F., Nappi A. (1992). Genetic determinism of the cellular immune reaction in *Drosophila melanogaster*. *Heredity*. 69, 393–399

Carvalho G.B., Kapahi P., Anderson D.J., Benzer S (2006). Allochrine modulation of feeding behaviour by the sex peptide of *Drosophila*. *Curr. Biol*. 16, 692–696.

Chapman T., Liddle L.F., Kalb J.M, Wolfner M.F., Partridge L. (1995). Cost of mating in *Drosophila melanogaster* females is mediated by male accessory gland products. *Nature* 373, 241–244.

Chapman T., Bangham J., Vinti G., Seifried B., Lung O., Wolfner M.F., Smith H.K., Partridge L. (2003). The sex peptide of *Drosophila melanogaster*: female post-mating responses analyzed by using RNA interference. *100*, 9923-8.

Chapman T., Davies S.J. (2004). Functions and analysis of the seminal fluid proteins of male *Drosophila melanogaster* fruit flies. *Peptides*. 25, 1477–1490

Chen P.S., Stumm-Zollinger E., Aigaki T., Balmer J., Bienz M., Bohlen P. (1988). A male accessory gland peptide that regulates reproductive behavior of female *D. melanogaster*. *Cell*. 54, 291-298

D

De Gregorio E., Spellman P., Tzou P., Rubin G., Lemaitre B. (2002). The Toll and Imd pathways are the major regulators of the immune response in *Drosophila*. *EMBO J*. 21, 2568–2579

De Velasco B., Erclik T., Shy D., Sclafani J., Lipshitz H., McInnes R., Hartenstein V. (2007). Specification and development of the pars intercerebralis and pars lateralis, neuroendocrine command centers in the *Drosophila* brain. *Dev. Biol*. 302, 309–323.

E

F

Feng K., Palfreyman M.T., Häsemeyer M., Talsma A., Dickson B.J. (2014). Ascending SAG neurons control sexual receptivity of *Drosophila* females. *Neuron*. 83, 135-48

Fire A., Xu S.Q., Montgomery M.K., Kostas S.A., Driver S.E., Mello C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806–811.

Fisher, M. P., Dingman, C. W. (1971). Role of molecular conformation in determining the electrophoretic properties of polynucleotides in agarose-acrylamide composite gels. *Biochemistry*, 10:895

Foltenyi K., Greenspan R.J., Newport J.W. (2007). Activation of EGFR and ERK by rhomboid signaling regulates the consolidation and maintenance of sleep in *Drosophila*. *Nat. Neurosci*. 10, 1160–1167.

Foster S.P. (1993). Neural inactivation of sex pheromone production in mated lightworm apple moths, *Epiphyas postvittana* (Walker). *J. Insect Physiol.* 39, 267–273.

Fowler K., Partridge L. (1989). A cost of mating in female fruit flies. *Nature* 338, 760–761.

G

Gerard, G.F., Grandgenett, D.P. (1975). *J. Virol.* 15, 785-797

Gordon K.H.J, Waterhouse P.M.(2007). RNAi for insect-proof plants. *Nature Biotechnology* 25, 1231–1232.

Grishok A. (2005). RNAi mechanisms in *Caenorhabditis elegans*. *FEBS Letters* 579, 5932–5939.

H

Hakim R.S., Baldwin K., Smagghe G. (2010). Regulation of midgut growth, development, and metamorphosis. *Annual Review of Entomology* 55, in press

Hartl, Daniel L., Jones, Elizabeth W. (2001). *Genetics: Analysis of Genes and Genomes*, Fifth Edition.

Häsemeyer M., Yapici N., Heberlein U., Dickson B.J. (2009). Sensory neurons in the *Drosophila* genital tract regulate female reproductive behavior. *Neuron*. 61, 511-8

Herndon L.A., Wolfner M.F. (1995). A *Drosophila* seminal fluid protein, Acp26Aa, stimulates egg laying in females for 1 day after mating. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92, 10114- 8.

Helling R.B., Goodman H. M., Boyer H.W. (1974). Analysis of R. EcoRI fragments of DNA from lambdaoid bacteriophages and other viruses by agarose-gel electrophoresis. *J. Virol.*, 14:1235

Huvenne H., Smagghe G. (2010). Mechanisms of dsRNA uptake in insects and potential of RNAi for pest control: a review. *J. Insect Physiol.* 56, 227-35

I

Isaac R. E., Li C., Leedale A.E., Shirras A. D. (2010). *Drosophila* male sex peptide inhibits siesta sleep and promotes locomotor activity in the post-mated female. *Proc. R. Soc. B.* 277, 65-70

J

Jose A.M., Hunter C.P. (2007). Transport of sequence-specific RNA interference information between cells. *Annual Review of Genetics* 41, 305–330

Jurenka R.A., Fabrias G., Ramaswamy S., Roelofs W.L. (1993). Control of pheromone biosynthesis in mated redbanded leafroller moths. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 24, 129–137.

K

Kalb J.M., DiBenedetto A.J., Wolfner M.F. (1993). Probing the function of *Drosophila melanogaster* accessory glands by directed cell ablation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 90, 8093- 7

Kim Y.J., Bartalska K., Audsley N., Yamanaka N., Yapici N., Lee J.Y., Kim Y.C., Markovic M., Isaac E., Tanaka Y., Dickson B.J. (2010). MIPs are ancestral ligands for the sex peptide receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107, 6520-5

Kubli E. (1992). The sex- peptide. *Bioessays*. 14, 779- 84

Kubli E. (2003). Sex- Peptides: seminal peptides of the *Drosophila* male. *Cell Mol Life Sci*. 60, 1689-704.

L

Lawniczak M., Begun D.A. (2004). Genome-wide analysis of courting and mating responses in *Drosophila melanogaster* females. *Genome*. 47, 900–910

Lehane M.J., Billingsley P.F. (Eds.) (1996). *Biology of the Insect Midgut*. Chapman & Hall, London

Li X., Zhang M., Zhang H. (2011). RNAi interference of four genes in adult *Bactrocera dorsalis* by feeding their dsRNAs. *PLoS One*. 6, e17788.

Li X., Dong X., Zou C., Zhang H. (2015). Endocytic pathway mediates refractoriness of insect *Bactrocera dorsalis* to RNA interference. *Sci Rep*. 5, 8700.

Liu H., Kubli E. (2003). Sex-peptide is the molecular basis of the sperm effect in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100, 9929-33

Livak K.J., Schmittgen T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻($\Delta\Delta C_T$) Method. *Methods* 25, 402-8.

Lung O., Wolfner M.F. (1999). *Drosophila* seminal fluid proteins enter the circulatory system of the mated female fly by crossing the posterior vaginal wall. *Insect Biochem Mol Biol*. 29, 1043-52

M

McDonald M.J., Rosbash M. (2001). Microarray analysis and organization of circadian gene expression in *Drosophila*. *Cell*. 107, 567–578

McDougall P. (2008). *AgriService 2008*. In: *Crop Analysis*, Saughland Phillips McDougall, pp. 532–768.

McGraw L.A., Gibson G., Clark A.G., Wolfner M.F. (2004). Genes regulated by mating, sperm, or seminal proteins in mated female *Drosophila melanogaster*. *Curr. Biol*. 14, 1509–1514

Mueller J.L., Ripoll D.R., Aquadro C.F., Wolfner M.F. (2004). Comparative structural modeling and inference of conserved protein classes in *Drosophila* seminal fluid. *Cell Mol Life Sci*. 101, 13542-7

Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G., Erlich H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 51 Pt 1:263-73

N

Niven J.E., Graham C.M., Burrows M. (2008). Diversity and evolution of the insect ventral nerve cord. *Annu. Rev. Entomol*. 53, 253-71

O

P

Peng J., Chen S., Büsser S., Liu H., Honegger T., Kubli E. (2005). Gradual release of sperm bound sexpeptide controls female postmating behavior in *Drosophila*. *Curr Biol*. 15, 207-13

Peng J, Zipperlen P., Kubli E. (2005). *Drosophila* sex-peptide stimulates female innate immune system after mating via the Toll and Imd pathways. *Curr Biol.* 15, 1690-4

Pilpel N., Nezer I., Applebaum S.W., Heifetz Y. (2008). Mating-increases trypsin in female *Drosophila* hemolymph. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 38, 320-330

Poels J., Van Loy T., Vandersmissen H.P., Van Hiel B., Van Soest S., Nachman R.J., Vanden Broeck J. (2010). Myoinhibiting peptides are the ancestral ligands of the promiscuous *Drosophila* sex peptide receptor. *Cell Mol Life Sci.* 67,3511-22

Poiani A. (2006). Complexity of seminal fluid: a review. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 60,289-310

Ponchel F, Toomes C, Bransfield K, Leong F.T, Douglas S.H, Field S.L, Bell S.M, Combaret V., Puisieux A, Mighell A.J (2003). "Real-time PCR based on SYBR-Green I fluorescence: An alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions" (w). *BMC Biotechnol.*3: 18. doi:10.1186/1472-6750-3-18.

Price D.R.G., Gatehouse J.A. (2008). RNAi-mediated crop protection against insects. *Trends in Biotechnology* 26, 393–400.

Q

R

Raabe M. (1987). Insect reproduction: Regulation of successive steps. *Laboratoire de Neuroendocrinologie des insectes, universite P. et M. curie CNRS, Paris, France.*

Ravi Ram K., Ji S., Wolfner M.F. (2005). Fates and targets of male accessory gland proteins in mated female *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochem Mol Biol.* 35, 1059-71

Ravi Ram K., Wolfner M.F. (2007). Seminal influences: *Drosophila* Acps and the molecular interplay between males and females during reproduction. *Integr Comp Biol.* 47, 427-45

Resh V.H., Carde R.T.(2009). *Encyclopedia of insects* (2o edition). Elsevier (Book)

Rezával C., Pavlou H.J., Dornan A.J., Chan Y.B., Kravitz E.A., Goodwin S.F. (2012). Neural circuitry underlying *Drosophila* female postmating behavioral responses. *Curr Biol.* 22, 1155-65

Roessel P., Brand A.H. (2004). Spreading silence with Sid. *Genome Biology* 5, 208.

Roth, M.J., Tanese, N. and Goff, S.P. (1985). *J. Biol. Chem.* 260, 9326-9335.

S

Sakai T., Watanabe K., Ohashi H., Sato S., Inami S., Shimada N., Kitamoto T. (2014). Insulin-producing cells regulate the sexual receptivity through the painless TRP channel in *Drosophilavirgin* females. *PLoS ONE* 9, e88175.

Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press. [ISBN0879693096](#).

Sambrook K.J., Russel D.W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd ed.). Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press. [ISBN 0-879-69576-5](#). Chapter 8: In vitro Amplification of DNA by the Polymerase Chain Reaction

Schmidt T., Choffat Y., Schneider M., Hunziker P., Fuyama Y., Kubli E. (1993). *Drosophila suzukii* contains a peptide homologous to the *Drosophila melanogaster* sex-peptide and functional in both species. *Insect Biochem Mol Biol.* 23, 571-9

Sheldon A.L., Zhang J., Fei H., Levitan I.B. (2011). SLOB, a SLOWPOKE channel binding protein, regulates insulin pathway signaling and metabolism in *Drosophila*. *PLoS ONE* 6, e23343.

Siga S. (2003). Anatomy and functions of brain neurosecretory cells in diptera. *Microsc. Res. Tech.* 62, 114–131.

Strausfeld N.J. (1976). Atlas of insect brain. Springer- Verlag Berlin Heidelberg (Book)

Styger D. (1992). Molekulare Analyse des Sexpeptidgens aus *Drosophila melanogaster*. P.h.D. thesis, University of Zurich, Switzerland

Swanson W.J., Vacquier V. D. (2002). The rapid evolution of reproductive proteins. *Nat Rev Genet.* 3, 137-34

T

Terhzaz S., Rosay P., Goodwin S.F., Veenstra J.A. (2007). The neuropeptide SIFamide modulates sexual behavior in *Drosophila*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 352, 305–310.

Thomas S., Yves C., Stephan K., Eric K. (1992). The *Drosophila melanogaster* Sex-peptide: a Molecular Analysis of Structure-Function Relationships. *J. Insect Physiol* 39, 361-368

Timmons L., Court D.L, Fire A. (2001). Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*.

U

V

Verma, I.M. (1975). *J. Virol.* 15, 843-854.

Volz J., Muller H.M., Zdanowicz A., Kafatos F.C., Osta M.A. (2006). A genetic module regulates the melanization response of *Anopheles* to *Plasmodium*. *Cellular Microbiology* 8, 1392–1405.

W

Wang J., Barr M. (2005). RNA Interference in *Caenorhabditis elegans*. *Methods in enzymology* 392, 36-55.

Watson J.D, Baker T.A, Bell S.P, Gann A., Levine M., Losick R. (2004). *Molecular Biology of the Gene* (Fifth ed.). San Francisco: Benjamin Cummings. ISBN 0-321-22368-3.

Whangbo J.S., Hunter CP (2008). Environmental RNA interference. *Trends in Genetics* 24, 297–305.

Wigby S., Chapman T. (2005). Sex peptide causes mating costs in female *Drosophila melanogaster*. *Curr Biol.* 15, 316-21

Wigby S., Slack C., Grönke S., Martinez P., Calboli F.C., Chapman T., Partridge L. (2011). Insulin signalling regulates remating in female *Drosophila*. *Proc. Biol. Sci.* 278, 424–431.

Wolfner M.F. (2002). The gifts that keep on giving: physiological functions and evolutionary dynamics of male seminal proteins in *Drosophila*. *Heredity* (Edinb). 88, 85-93

Wong A., Albright S.N., Wolfner M.F. (2006). Evidence for structural constraint on ovulin, a rapidly evolving *Drosophila melanogaster* seminal protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103, 18644-9.

X

Xue L., Noll M. (2000). *Drosophila* female sexual behavior induced by sterile males showing copulation complementation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97, 3272-5

Y

Yang C.H., Rumpf S., Xiang Y., Gordon M.D., Song W., Jan L.Y., Jan Y.N. (2009). Control of the postmating behavioral switch in *Drosophila* females by internal sensory neurons. *Neuron*. 61, 519-26

Yapici N., Kim Y.J., Ribeiro C., Dickson B.J. (2008). A receptor that mediates the post-mating switch in *Drosophila* reproductive behaviour. *Nature*. 451, 33-7

Z

Zerofsky M., Harel E., Silverman N., Tatar M. (2005). Aging of the innate immune response in *Drosophila melanogaster*. *Aging Cell*. 4, 103-108

Zheng W., Liu Y., Zheng W., Xiao Y., Zhang H. (2015). Influence of the silencing sex-peptide receptor on *Bactrocera dorsalis* adults and offspring by feeding with ds-spr. *Journal of Asia-Pacific Entomology*. 18, 477-481