

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας



Σχολή Επιστημών Υγείας

Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

**Διερεύνηση του ρόλου του γονιδίου
yellow στο αναπαραγωγικό σύστημα του
δάκου της ελιάς**



Αγγελοπούλου Άννα

Σεπτέμβριος 2016, Λάρισα

Θέμα Διπλωματικής Εργασίας:

Διερεύνηση του ρόλου του γονίδιου *yellow* στο αναπαραγωγικό σύστημα του δάκου της ελιάς

Study of the *yellow* gene role in the reproductive system of the olive fruit fly

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Μαθιόπουλος Κωνσταντίνος: Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας

Σαραφίδου Θεολογία: Επίκουρος Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ζωικών Οργανισμών

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

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας & Γονιδιωματικής του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, το διάστημα Νοεμβρίου 2015 - Σεπτεμβρίου 2016 υπό την επίβλεψη του Ματθιόπουλου Κωνσταντίνου, καθηγητή Μοριακής Βιολογίας και της Γρηγορίου Μαριλένας, υποψήφιας διδάκτορα.

Ευχαριστίες

Πρώτον από όλους, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή κ. Κωνσταντίνο Μαθιόπουλο που δέχθηκε να πραγματοποιήσω τη διπλωματική μου εργασία στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής του τμήματός μας. Καθ' όλη τη διάρκεια παραμονής μου στο εργαστήριο, η πόρτα του ήταν ανοιχτή για να προσφέρει συμβουλές και καθοδήγηση. Πάντα πρόθυμος και διορατικός, υποστήριζε τη δουλειά μας και μοίραζε τις γνώσεις του σε όλα τα μέλη του εργαστηρίου.

Ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στην υποψήφια διδάκτορα Μαριλένα Γρηγορίου, η οποία ήταν και η υπεύθυνη της διπλωματικής μου. Με την εργατικότητα και την οργανωτικότητα που την διακατέχουν, κατάφερε να συντονίσει το πείραμά μας, παρ' όλες τις δυσκολίες που υπήρχαν. Ήταν πάντοτε διατεθειμένη να λύσει τις απορίες μου και με τις συζητήσεις μας με βοήθησε να διευρύνω τον τρόπο σκέψης μου. Η οξυδέρκεια και η επιμονή της ήταν καθοριστικοί παράγοντες για την πραγμάτωση αυτής της εργασίας. Την ευχαριστώ ιδιαίτερα διότι από την αρχή της συνεργασίας μας με εμπιστεύτηκε και με τα σχόλιά της με παρότρυνε να γίνω καλύτερη.

Επίσης, δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω την μεταπτυχιακή φοιτήτρια Μαρία Αδαμοπούλου για την πολύτιμη βοήθειά της. Με τη θετική της ενέργεια και το χιούμορ της, οι ώρες στο εργαστήριο αλλά και τα ξενύχτια μας στο εντομοτροφείο αποτελούν πλέον μια ευχάριστη ανάμνηση και μπορώ να πω ότι θα μου λείψουν.

Τέλος, ευχαριστώ πολύ όλα τα μέλη του εργαστηρίου και τους συμφοιτητές μου για το φιλικό κλίμα που δημιούργησαν και που με συνεργατικό πνεύμα και αμοιβαίο σεβασμό συνυπάρξαμε χωρίς προβλήματα.

Περίληψη

Ο δάκος της ελιάς, *Bactrocera oleae*, αποτελεί το πιο σημαντικό παράσιτο του καρπού της ελιάς, υποβαθμίζοντας τόσο ποσοτικά όσο και ποιοτικά τις ελαιοκαλλιέργειες. Ο κύριος τρόπος αντιμετώπισής του περιλαμβάνει ψεκασμούς με εντομοκτόνα, όμως η ανθεκτικότητα που αναπτύσσουν τα έντομα και ο επιβλαβής αντίκτυπος που έχουν στο περιβάλλον θέτουν ως επιτακτική ανάγκη τη δημιουργία νέων εναλλακτικών μεθόδων βιολογικού ελέγχου του πληθυσμού του. Τη βάση για τον σχεδιασμό τους θα μπορούσε να αποτελέσει η μελέτη του αναπαραγωγικού συστήματος του δάκου με σκοπό την εύρεση γονιδίων που θα μπορούσαν να αποτελέσουν μοριακούς στόχους για τη μείωση της αναπαραγωγικής τους ικανότητας. Ως τέτοιοι μοριακοί στόχοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν οι πρωτεΐνες που περιέχονται στα υγρά των βοηθητικών αδένων του αναπαραγωγικού συστήματος των αρσενικών. Οι πρωτεΐνες αυτές μεταφέρονται στα θηλυκά κατά τη σύζευξη, επηρεάζοντας την μετασυζευκτική τους συμπεριφορά, όπως π.χ. την ωοαπόθεση. Συνεπώς, η ανάπτυξη μεθόδων που να βασίζονται σε τέτοια μόρια θα μειώσει τους πληθυσμούς του δάκου και ίσως οδηγήσει και στην εξάλειψή του.

Στην παρούσα εργασία εξετάστηκε το γονίδιο *yellow*, το οποίο εκφράζεται στους βοηθητικούς αδένες του αρσενικού δάκου. Τα επίπεδα έκφρασής του στον ιστό καθορίστηκαν με Real-time PCR και μελετήθηκε η διακύμανσή τους από την ημέρα εκκόλαψης του εντόμου μέχρι και την έβδομη ημέρα, στην οποία συμβαίνει η σεξουαλική ωρίμανσή του. Το προφίλ έκφρασης που προέκυψε ενισχύει την υπόθεση ότι το γονίδιο συμμετέχει στην αναπαραγωγική διαδικασία. Για το λόγο αυτό, πραγματοποιήθηκε παροδική αποσιώπησή του με απευθείας έγχυση δίκλωνων μορίων RNA (dsRNA) στην αιμόλεμφο αρσενικών εντόμων. Με Real-time PCR, μελετήθηκε η έκφραση του γονιδίου μετά την αποσιώπηση και διαπιστώθηκε ότι αυτή μειώνεται σε σημαντικό ποσοστό. Στη συνέχεια, έγιναν πειράματα σύζευξης και παρακολούθηθηκε η ωοαπόθεση των θηλυκών που συζεύχθηκαν με τα αρσενικά που έλαβαν το *dsyellow*. Παρατηρήθηκε κάποια μείωση στον συνολικό αριθμό αυγών, πράγμα που αποτελεί μία πρώτη ένδειξη ότι το γονίδιο αυτό συμμετέχει στο κατά πόσο θα είναι επιτυχής η αναπαραγωγή των εντόμων.

Abstract

The olive fruit fly, *Bactrocera oleae*, is worldwide the major pest of olive, causing quantitative and qualitative degradation of the crop. Its management mainly consists of insecticide sprays, which lead to resistant strains and environmental damages, rendering the design of new alternative methods of control a necessity. Studying the reproductive system could be the key in order to find new molecular targets that would reduce the reproductive capacity of the insect. Such molecular targets are the male accessory gland proteins (Acps). These proteins are transferred to females during copulation, affecting their post-mating response, like oviposition. Therefore, the development of methods that rely on this kind of molecules would reduce the population of the olive fruit fly and might lead to its elimination.

This study deals with the *yellow* gene, which is expressed in the male accessory glands of *Bactrocera oleae*. The expression levels of the gene in this tissue were determined with Real-time PCR from the day of adult hatching until the day of mating. The resulting expression profile agrees with the hypothesis that the gene is involved in the reproductive process. Having taken that into consideration, the gene was transiently silenced by injecting dsRNA into the hemolymph of male insects. Gene expression was then evaluated with Real-time PCR and found to be reduced significantly. In addition, the oviposition of females mated with silenced males was monitored and there was some reduction in the total number of eggs. This could be a first indication that the gene is involved in the mating success of the olive fruit fly.

Πίνακας περιεχομένων

1. Εισαγωγή	9
1.1 Ο δάκος της ελιάς	9
1.1.1 Βιολογικός Κύκλος.....	9
1.1.2 Καταστροφή του καρπού της ελιάς	10
1.1.3 Εναλλακτικές μέθοδοι καταπολέμησης του δάκου της ελιάς	10
1.1.3.1 Τεχνική στείρου εντόμου (Sterile Insect Technique – SIT)	11
1.1.3.2 Απελευθέρωση εντόμων που φέρουν επικρατές θνησιγόνο γονίδιο (Release of Insects carrying a Dominant Lethal – RIDL)	13
1.2 Αναπαραγωγικό σύστημα αρσενικών εντόμων	16
1.2.1 Βοηθητικοί αδένες αρσενικών (Male accessory glands – MAGs).....	16
1.3 Συμπεριφορά αρσενικών πριν τη σύζευξη	20
1.4 Πληροφορίες για το γονίδιο <i>yellow</i>	22
2. Σκοπός.....	26
3. Υλικά – Μέθοδοι	27
3.1 Εργαστηριακές Συνθήκες Πειράματος.....	27
3.2 Απομόνωση RNA – RNA Extraction.....	27
3.3 Επεξεργασία με DNase – DNase Treatment	28
3.4 Σύνθεση cDNA με αντίστροφη μεταγραφή	29
3.5 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα (gel) αγαρόζης	29
3.6 Απομόνωση μορίων DNA από πήκτωμα αγαρόζης (gel extraction)	30
3.7 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction – PCR)	31
3.8 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real-time PCR) .	33
3.9 Δημιουργία δίκλωνου RNA (dsRNA)	36
3.10 Παροδική Σίγηση Γονιδίου (RNA silencing).....	37
3.11 Προγράμματα Βιοπληροφορικής και Στατιστικής.....	38
3.11.1 Blast (Basic Local Alignment Search Tool)	38
3.11.2 Omiga	39
3.11.3 GraphPad Prism	39
4. Αποτελέσματα.....	40
4.1 Μελέτη της έκφρασης του γονιδίου <i>yellow</i>	41
4.2 Παροδική σίγηση του γονιδίου <i>yellow</i>	42

4.3 Μελέτη επίδρασης της αποσιώπησης του γονιδίου <i>yellow</i> σε συζευγμένα θηλυκά	44
5. Συζήτηση	46
6.Βιβλιογραφία	51

1. Εισαγωγή

1.1 Ο δάκος της ελιάς

Ο δάκος της ελιάς, *Bactrocera oleae*, είναι ολομετάβολο και πολυκύκλιο έντομο και κατατάσσεται στην οικογένεια *Tephritidae* των Δίπτερων. Εντοπίζεται στις χώρες της Μεσογείου, στην ανατολική και νότια Αφρική, στην Ινδία, τη βόρεια και κεντρική Αμερική καθώς και τη δυτική Ασία. Αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα παράσιτα της ελιάς, αφού η δράση του υποβαθμίζει σε μεγάλο βαθμό την ποιότητα του καρπού.



Εικόνα 1: Θηλυκός (αριστερά) και αρσενικός (δεξιά) δάκος.

1.1.1 Βιολογικός Κύκλος

Ανάλογα με τις περιβαλλοντικές συνθήκες που επικρατούν σε κάθε περιοχή, ο δάκος έχει από 2 έως 5 γενιές τον χρόνο. Ο βιολογικός κύκλος του εντόμου περιλαμβάνει 4 στάδια: α) αυγό (egg), β) προνύμφη (larva), γ) νύμφη (pupa), δ) ενήλικο έντομο (adult) (Ordano et al., 2015).

Στα τέλη της άνοιξης, αν η θερμοκρασία και η υγρασία το επιτρέπουν, τα αρσενικά προσεγγίζουν τα θηλυκά για να συζευχθούν (Fletcher et al., 1983). Τα θηλυκά αποθέτουν τα αυγά τους στο μεσοκάρπιο καρπών ελιάς που δεν έχουν ωριμάσει πλήρως. Η ωοαπόθεση επιτυγχάνεται με τη δημιουργία μιας σχισμής στη σάρκα του καρπού από τον ωοαποθέτη που διαθέτουν τα θηλυκά έντομα. Συνήθως, σε κάθε καρπό αποτίθεται ένα αυγό και κατά μέσο όρο, κάθε



Εικόνα 2: Βιολογικός κύκλος δάκου.

θηλυκό μπορεί να γεννήσει από 200 έως και 500 αυγά. Τα αυγά εκκολάπτονται σε προνύμφες, οι οποίες τρέφονται από το εσωτερικό της σάρκας του καρπού. Κάθε προνύμφη μετατρέπεται σε νύμφη, είτε μέσα στην ελιά, είτε στο έδαφος. Τελικά, από τις νύμφες προκύπτουν τα ενήλικα έντομα. Σε ιδανικές συνθήκες ο κύκλος της

ζωής του δάκου ολοκληρώνεται σε ένα μήνα περίπου, όμως αυτό διαφέρει ανά εποχή. Η διάρκεια κάθε σταδίου καθορίζεται από την θερμοκρασία και την υγρασία που επικρατεί στο περιβάλλον (Tzanakakis et al., 2008).

1.1.2 Καταστροφή του καρπού της ελιάς

Η δράση του δάκου της ελιάς επηρεάζει αρνητικά τα προϊόντα των ελαιοκαλλιεργειών προκαλώντας τόσο ποιοτικές όσο και ποσοτικές απώλειες. Παρά την συστηματική χρήση παρασιτοκτόνων, τουλάχιστον το 15% κάθε σοδειάς



Εικόνα 3: Ελιές προσβεβλημένες από δάκο.

κρίνεται ακατάλληλο για κατανάλωση (Mazomenos et al., 2002) Η ζημιά στην ελιά πραγματοποιείται κυρίως με δυο τρόπους. Αρχικά με την ωσαπόθεση των ενήλικων θηλυκών δημιουργείται μια σχισμή στον καρπό η οποία ευνοεί την ανάπτυξη βακτηρίων (*Xanthomonas*) και μυκήτων (*Camarosporium dalmaticum*). Οι μικροοργανισμοί αυτοί επιταχύνουν το σάπισμα του καρπού και μειώνουν την ποιότητα του ελαιόλαδου καθώς αυξάνουν την οξύτητά του

(Daane et al., 2010). Επίσης, οι προνύμφες καταστρέφουν τον καρπό αφού δημιουργούν στοές στο εσωτερικό του για να τραφούν.

1.1.3 Εναλλακτικές μέθοδοι καταπολέμησης του δάκου της ελιάς

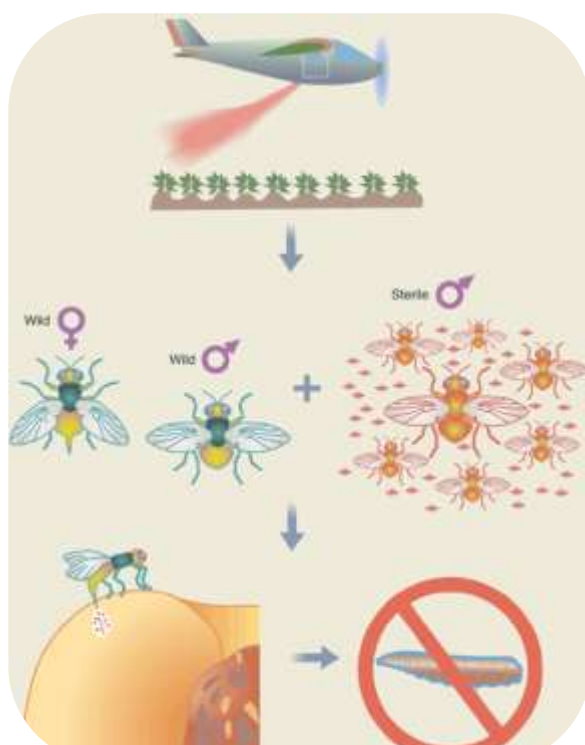
Τα τελευταία 50 χρόνια η παρασιτική δράση του δάκου της ελιάς αντιμετωπίζεται με στρατηγικές που βασίζονται σε χημικά παρασιτοκτόνα, κυρίως οργανοφωσφορικά (organophosphates – OPs) και πιο πρόσφατα πυρεθροειδή. Όμως η χρήση των παρασιτοκτόνων αυτών έχει επιβλαβή αποτελέσματα στο περιβάλλον και οδηγεί στην ανάπτυξη ανθεκτικών στελεχών σε πληθυσμούς αλλά και στη γενικότερη εξάπλωσή τους στη φύση (Skouras et al., 2007 και Margaritoroulos et al., 2008). Λόγω των παραπάνω προβλημάτων κρίθηκε απαραίτητος ο σχεδιασμός πιο αποτελεσματικών μεθόδων.

Γενικά οι μέθοδοι ελέγχου πληθυσμού χωρίζονται σε δύο κατηγορίες: α) τις μεθόδους που με κάποια τροποποίηση στοχεύουν να μειώσουν τους πληθυσμούς και με το πέρασμα του καιρού η τροποποίηση αυτή εξαφανίζεται (population reduction) και β) τις μεθόδους που αντικαθιστούν έναν πληθυσμό με έναν λιγότερο επιβλαβή ή που η τροποποίηση που υφίσταται ο πληθυσμός διατηρείται στις επόμενες γενιές αντικαθιστώντας των αγρίου τύπου (population replacement). Στην πρώτη κατηγορία ανήκει η τεχνική στείρου εντόμου (Sterile Insect Technique – SIT)

και στη δεύτερη η απελευθέρωση εντόμων που φέρουν επικρατές θνησιγόνο γονίδιο (Release of Insects carrying a Dominant Lethal – RIDL).

1.1.3.1 Τεχνική στείρου εντόμου (Sterile Insect Technique – SIT)

Η SIT είναι μια ιδιαίτερα αποτελεσματική μέθοδος για την καταπολέμηση παρασιτικών εντόμων και έχει κάνει την εμφάνισή της εδώ και αρκετά χρόνια (Bushland et al., 1955). Η αρχή της βασίζεται στην εκτροφή, στείρωση και απελευθέρωση σε μία συγκεκριμένη περιοχή μεγάλου αριθμού εντόμων με σκοπό τη μείωση της αναπαραγωγής τους (Dyck et al., 2005 και Alrhey et al., 2008). Η μείωση συμβαίνει μέσω της επιτυχημένης σύζευξης των αγρίου τύπου εντόμων με τα στείρα αφού δεν προκύπτουν απόγονοι (στείρα ωοτοκία). Μάλιστα, αν απελευθερωθούν αρκετά στείρα έντομα, ο πληθυσμός θα μειωθεί και αν η μέθοδος επαναλαμβάνεται συστηματικά για κάποιο χρονικό διάστημα μπορεί και να εξαλειφθεί (Wilke et al., 2009). Υποστηρίζεται ότι είναι ένας φιλικός προς το περιβάλλον τρόπος αντιμετώπισης αφού τα έντομα που απελευθερώνονται είναι στείρα και δεν πρόκειται να διαιωνιστούν στη φύση. Ακόμη, η επίδρασή του είναι ειδο-ειδική.



Εικόνα 4: Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας SIT.

Γενικά, η SIT αφορά την εξαπόλυση αρσενικών και θηλυκών εντόμων. Μετά από πλήθος πειραμάτων φάνηκε ότι είναι πιο αποτελεσματική όταν απελευθερώνονται μόνο αρσενικά (Rendon et al., 2004). Με την τακτική αυτή εμποδίζεται η εισαγωγή στον πληθυσμό μεγάλου αριθμού θηλυκών που μπορούν να καταστρέψουν τις σοδειές, αφού διατηρούν την ικανότητα ωοαπόθεσης. Για να συμβεί αποκλειστική απελευθέρωση αρσενικών είναι απαραίτητος ο φυλοδιαχωρισμός των εκτρεφόμενων εντόμων, πράγμα που αποτελεί πρόβλημα για τα έντομα στα οποία δεν είναι διακριτό το φύλο στα πρώτα αναπτυξιακά στάδια (Leftwich et al., 2015). Για τον σκοπό

αυτό δημιουργήθηκαν ειδικά στελέχη φυλοδιαχωρισμού, τα Genetic Sexing Strains (GSSs). Στα στελέχη αυτά είναι δυνατός ο διαχωρισμός των θηλυκών λόγω κάποιων φαινοτυπικών διαφορών που εμφανίζουν σε σχέση με τα αρσενικά, όπως το χρώμα της νύμφης, την ανοχή στην αλκοόλη και την ευαισθησία στην υψηλή θερμοκρασία.

Τα GSSs δημιουργήθηκαν από μετάθεση αυτοσωμικών γονιδίων στο χρωμόσωμα Υ, το οποίο διαθέτουν μόνο τα αρσενικά. Στην *Ceratitis capitata* χρησιμοποιούνται ήδη με επιτυχία GSSs τα οποία βασίζονται στο χρώμα της νύμφης και την ανοχή στην θερμοκρασία (Franz et al., 1996 και Robinson et al., 1999).

Η επιτυχία της SIT εξαρτάται από διάφορους παράγοντες. Αρχικά, απαιτείται η δημιουργία εγκαταστάσεων μαζικής εκτροφής εντόμων ώστε τα στείρα έντομα να βρίσκονται σε μεγαλύτερη αναλογία από τα αγρίου τύπου σε μια περιοχή. Αυτό είναι απαραίτητο για να διασφαλιστεί ότι υπάρχει μεγαλύτερη πιθανότητα ένα αγρίου τύπου έντομο να συζευχθεί με ένα στείρο και έτσι να μειωθεί ο πληθυσμός. Για παράδειγμα, σε δοκιμή της μεθόδου στην *Ceratitis capitata*, η αναλογία φτάνει στα 50-100 στείρα αρσενικά ανά 1 αγρίου τύπου αρσενικό (Schetelig et al., 2007).

Άλλο ένα σημαντικό στοιχείο για την αποτελεσματικότητα της μεθόδου είναι οι τρόποι στείρωσης που χρησιμοποιούνται. Ο πιο συνηθισμένος είναι με τη χρήση ακτινών Χ ή γ στο στάδιο της νύμφης λόγω της ευκολίας χειρισμού τους (Dyck et al., 2005). Λόγω των συνεχόμενων μιτωτικών διαιρέσεων που συμβαίνουν σε αυτό το στάδιο, οι επιδράσεις της ακτινοβολίας μπορεί να επηρεάσουν αρνητικά την επιβίωση του εντόμου. Γι' αυτό το λόγο πρέπει να δοθεί ιδιαίτερη σημασία στην ποσότητα της ακτινοβολίας που θα δεχθούν τα έντομα αλλά και σε ποια στιγμή του κύκλου ζωής τους θα γίνει αυτό. Αυτές οι δύο παράμετροι διαφέρουν ανάλογα με το είδος και το γένος του εντόμου. Έχει παρατηρηθεί ότι τα έντομα που ακτινοβολούνται σε πρώιμο στάδιο σε μεγάλο βαθμό δεν επιβιώνουν. Παράλληλα, έντομα που καθυστερούν να ακτινοβοληθούν διατηρούν μέρος της γονιμότητάς τους, πράγμα μη επιθυμητό για την SIT (Mastrangelo et al., 2010). Επιπλέον, η δόση της ακτινοβολίας φαίνεται ότι επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό τη συμπεριφορά των αρσενικών και γενικότερα τη διάρκεια ζωής των εντόμων. Συγκεκριμένα, έχει παρατηρηθεί ότι τα στείρα αρσενικά είναι λιγότερο ανταγωνιστικά από τα άγρια κατά την προσέγγιση των θηλυκών. Τέλος, η μείωση της ανταγωνιστικότητας των στείρων αρσενικών με τα αγρίου τύπου επηρεάζεται και από τις συνθήκες εκτροφής καθώς είναι διαφορετικές από αυτές που υπάρχουν στη φύση και δεν προσαρμόζονται εύκολα. (Briceno et al., 2002 και Lux et al., 2002).

Η τεχνική SIT εφαρμόζεται για την καταπολέμηση διαφόρων ειδών κουνουπιών, των κύριων φορέων ασθενειών (Benedict et al., 2003). Σημαντική πρόοδος έχει γίνει και για τη μείωση του πληθυσμού της *Ceratitis capitata* στις περιοχές ανάμεσα στην Κεντρική Αμερική και του Μεξικού (Henderichs et al., 1983). Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε ευρέως εναντίον εντόμων της οικογένειας των *Tephritidae*, όπως του *Bactrocera curcubitae* (Kuba et al., 1996). Συγκεκριμένα, το 1972 έγινε η πρώτη προσπάθεια καταπολέμησης του εντόμου μέσω της SIT σε ένα νησιωτικό σύμπλεγμα στο ιαπωνικό αρχιπέλαγος. Ο πληθυσμός μειώθηκε θεαματικά με αποτέλεσμα η ιαπωνική κυβέρνηση να εφαρμόσει την ίδια τεχνική και σε άλλα

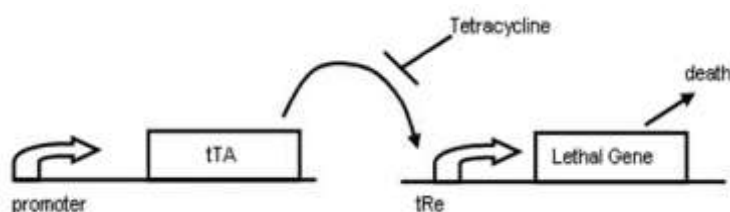
νησιωτικά συμπλέγματα τα έτη 1984, 1986 και 1989. Τελικά, ο πλήρης έλεγχος του εντόμου επιτεύχθηκε το 1987, 1986 και 1989 αντίστοιχα (Kakinohana et al., 1997). Για τον δάκο της ελιάς δυο προσπάθειες αυτής της μεθόδου καταγράφηκαν στο παρελθόν, χωρίς σημαντικά αποτελέσματα. Η πρώτη προσπάθεια έγινε στις αρχές του 1970 όπου περίπου 150.000 έντομα (αρσενικά και θηλυκά) στείρωθηκαν μέσω γ-ακτινοβολίας και απελευθερώθηκαν στη φύση σε συγκεκριμένες περιοχές. Στο τέλος της εποχής συγκομιδής, η σύγκριση της προσβολής των ελαιοκαλλιεργειών που απελευθερώθηκαν τα στείρα έντομα με τις υπόλοιπες περιοχές δεν έδωσε μείωση της προσβολής. Το ίδιο αποτέλεσμα υπήρξε και στην προσπάθεια απελευθέρωσης στείρων εντόμων στα τέλη της δεκαετίας του '70 σε ένα μικρό Ελληνικό νησί. Σημαντική παρατήρηση είναι η διαφορά της ώρας σύζευξης που σημειώθηκε μεταξύ των δύο πληθυσμών. Ως αποτέλεσμα τα αγρίου τύπου έντομα δεν μπορούσαν να συζευχθούν με τα ακτινοβολημένα (Economidou et al., 1977 και Economidou, 2002).

1.1.3.2 Απελευθέρωση εντόμων που φέρουν επικρατές θνησιγόνο γονίδιο (Release of Insects carrying a Dominant Lethal – RIDL)

Η RIDL αποτελεί μία παραλλαγή της συμβατικής SIT δίνοντας λύση στα παραπάνω προβλήματα της SIT. Διαφέρει καθώς σε αυτή τη μέθοδο τα έντομα που εξαπολύονται δεν ακτινοβολούνται για να γίνουν στείρα αλλά είναι ομόζυγα για ένα επικρατές θνησιγόνο γονίδιο (Alrhey, 2007). Αν συζευχθούν με άγριους πληθυσμούς οι απόγονοι θα είναι ετερόζυγοι για το γονίδιο αυτό και θα πεθάνουν σε πολύ πρώιμο αναπτυξιακό στάδιο. Ως αποτέλεσμα ο πληθυσμός θα μειωθεί σημαντικά (Heinrich and Scott, 2000). Για τους σκοπούς της μαζικής εκτροφής και απελευθέρωσης του διαγονιδιακού στελέχους, η δράση του θνησιγόνου γονιδίου πρέπει να μπορεί να καταστέλλεται μέσω κάποιου συστατικού στην τροφή των εντόμων ή μέσω κάποιου περιβαλλοντικού παράγοντα που δεν υπάρχει στη φύση αλλά υπάρχει στις εγκαταστάσεις εκτροφής (Benedict and Robinson, 2003).

Ο έλεγχος της έκφρασης του θνησιγόνου γονιδίου γίνεται με τη βοήθεια του οπερονίου Tn10 του βακτηρίου *Escherichia coli* που του προσδίδει ανθεκτικότητα στην τετρακυκλίνη (Thomas et al., 2000 και Gong et al., 2005). Συγκεκριμένα, η πρωτεΐνη που προσδίδει την ανθεκτικότητα (TetA) κωδικοποιείται από ένα τμήμα του τρανσποζονίου Tn10. Απουσία τετρακυκλίνης ο καταστολέας TetR προσδέεται ισχυρά στο χειριστή tetO, εμποδίζοντας τη μεταγραφή του γονιδίου που προσδίδει ανθεκτικότητα στην τετρακυκλίνη. Η προσθήκη τετρακυκλίνης παρεμποδίζει την πρόσδεση του καταστολέα, επιτρέποντας την έναρξη της μεταγραφής. Το σύστημα tet τροποποιήθηκε κατάλληλα και οδήγησε στη δημιουργία ενός υβριδικού μεταγραφικού παράγοντα, ο οποίος ονομάστηκε tTA και έχει την ικανότητα να λειτουργεί στα ευκαρυωτικά κύτταρα. Το γονίδιο του tTA συνδυάζει τμήματα από

δύο διαφορετικούς μεταγραφικούς παράγοντες: α) την περιοχή του καταστολέα Tet η οποία προσδέεται στο DNA και β) το τμήμα μιας πρωτεΐνης του ερπητοϊού VP16 το οποίο ευθύνεται για την ενεργοποίηση της μεταγραφής. Η υβριδική πρωτεΐνη που προκύπτει λειτουργεί ως ενεργοποιητής της μεταγραφής και προσδέεται στον χειριστή tetO μόνο απουσία τετρακυκλίνης. Επομένως, όταν ο χειριστής tetO εισαχθεί ανοδικά ενός στοιχειώδους υποκινητή, τότε η υβριδική πρωτεΐνη προσδέεται σε αυτόν ενεργοποιώντας τη μεταγραφή. Η προσθήκη τετρακυκλίνης εμποδίζει την πρόσδεση του ενεργοποιητή Tet-VP16 στον tetO και έτσι η μεταγραφή σταματά. Το σύστημα αυτό ονομάζεται tet-off επειδή επιτρέπει την απενεργοποίηση ενός γονιδίου με την προσθήκη τετρακυκλίνης (Watson et al., 2007).



Εικόνα 5: Ο μηχανισμός δράσης του συστήματος τετρακυκλίνης tet-off.

Τα πρώτα μοντέλα RIDL δημιουργήθηκαν στην *Drosophila melanogaster* και πρόσφατα η τεχνική χρησιμοποιήθηκε και στην *Ceratitidis capitata*. Στην δεύτερη εφαρμόστηκε μία θηλεο-ειδική RIDL, η fsRIDL (female-specific RIDL) μέσω της τοποθέτησης της πρωτεΐνης tTA υπό τον έλεγχο ενός υποκινητή που υπάρχει μόνο στα θηλυκά (Fu et al., 2007). Αφαιρώντας την τετρακυκλίνη από το διατροφικό μέσο της γενιάς των εντόμων που πρόκειται να απελευθερωθεί, τα θηλυκά πεθαίνουν. Τα αρσενικά που επιβιώνουν είναι ετερόζυγα για ένα θηλεο-ειδικό θνησιγόνο γονίδιο. Έτσι, η σύζευξη των διαγονιδιακών αρσενικών με τα άγρια θηλυκά οδηγεί στον θάνατο των μισών θηλυκών απογόνων, μειώνοντας έτσι την αναπαραγωγική ικανότητα του άγριου πληθυσμού (Alphey et al., 2002). Η αποτελεσματικότητα της μεθόδου μπορεί να αυξηθεί αν χρησιμοποιηθούν αρσενικά ομόζυγα για ένα θηλεο-ειδικό θνησιγόνο γονίδιο (Schliekelman et al., 2000) αλλά και με την πολλαπλή εισαγωγή της διαγονιδιακής κατασκευής έτσι ώστε να βελτιωθεί η διείσδυση της θνησιμότητας σε περίπτωση που η μία κατασκευή δεν είναι ενεργή (Gong et al., 2005).

Μαθηματικά μοντέλα έχουν δείξει ότι η RIDL έχει μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα από την παραδοσιακή SIT κυρίως εναντίον κουνουπιών φορέων ασθενειών, όπως ο δάγκειος πυρετός (Thomas et al., 2000, Atkinson, 2002, Gould και Schliekelman 2004). Το κύριο πλεονέκτημα της μεθόδου είναι ότι δεν χρησιμοποιεί ακτινοβολία. Αυτό συμβάλλει και στη μείωση των εξόδων για την αντιμετώπιση των παράσιτων (καθώς απαιτούνται ειδικές εγκαταστάσεις για την εφαρμογή της ακτινοβολίας)

αλλά και στην καλύτερη προσαρμογή των στείρων εντόμων με το περιβάλλον. Άλλο ένα πλεονέκτημα της μεθόδου είναι ότι δεν επηρεάζει την ποιότητα του σπέρματος των εντόμων, πράγμα πολύ σημαντικό για έντομα που ζευγαρώνουν παραπάνω από μία φορές.

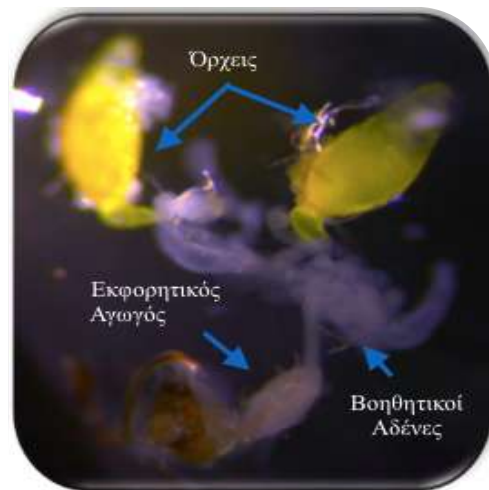
Όσον αφορά το δάκο της ελιάς, το 2012 έγινε προσπάθεια για τη δημιουργία ενός συστήματος fsRIDL για την καταπολέμησή του. Οι ερευνητές βασίστηκαν σε μια κατασκευή που είχε χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για την ανάπτυξη της ίδιας μεθόδου στην *Ceratitis capitata*. Έτσι δημιουργήθηκε το πρώτο διαγονιδιακό στέλεχος για τον έλεγχο του πληθυσμού του *Bactrocera oleae*, το OX3097D-Bol. Η σύζευξη των αρσενικών αυτών με άγρια θηλυκά είχε ως αποτέλεσμα τον θάνατο θηλυκών απογόνων στα πρώτα στάδια της νύμφης απουσία καταστολέα. Επίσης, τα διαγονιδιακά αρσενικά φάνηκε να είναι ανταγωνιστικά απέναντι στα άγρια, σε βαθμό υψηλότερο από αυτόν των στείρων αρσενικών της SIT. Άλλο ένα σημαντικό στοιχείο είναι ότι τα αρσενικά του νέου στελέχους εκδηλώνουν επιθυμία για σύζευξη την ίδια χρονική περίοδο με τον άγριο πληθυσμό, πράγμα που σε αντίστοιχη προσπάθεια με την SIT δεν είχε παρατηρηθεί και αποτέλεσε βασικό πρόβλημα. Ακόμη, αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι τα αρσενικά αυτά κατάφεραν να προκαλέσουν τη χαρακτηριστική μετασυζευκτική μη δεκτικότητα που παρουσιάζουν τα θηλυκά. Τέλος μετά από πιλοτική δοκιμή του στελέχους σε θερμοκήπια του Πανεπιστημίου Κρήτης, ο πληθυσμός εξαλείφθηκε 12 εβδομάδες μετά την απελευθέρωση των διαγονιδιακών εντόμων (Ant et al., 2012).

Ενώ έχουν υπάρξει προτάσεις χρήσης της RIDL για την καταπολέμηση του δάκου στην Καταλονία, έχουν απορριφθεί εξαιτίας ασυμφωνίας μεταξύ της κυβέρνησης και της εταιρείας αλλά και εξαιτίας αδυναμίας της εταιρείας Oxitec να αποδείξει ότι η απελευθέρωση διαγονιδιακών εντόμων δεν θα προκαλέσει προβλήματα στο περιβάλλον. Επιπλέον, το υψηλό κόστος που απαιτεί η εφαρμογή της μεθόδου αποτέλεσε πρόσθετο ανασταλτικό παράγοντα (Oxitec). Φαίνεται λοιπόν πως η ανάγκη για τη δημιουργία αποτελεσματικών και φιλικών προς το περιβάλλον μεθόδων βιολογικού ελέγχου υπάρχει ακόμα. Για την ανάπτυξη τέτοιων τεχνικών, σημαντικός στόχος θα μπορούσε να αποτελέσει το αναπαραγωγικό σύστημα των εντόμων.

1.2 Αναπαραγωγικό σύστημα αρσενικών εντόμων

Δομή και Λειτουργία

Και στα δύο φύλα το αναπαραγωγικό σύστημα εντοπίζεται στο κοιλιακό τμήμα των εντόμων (Barr, 1974). Όπως στα περισσότερα είδη *Bactrocera*, έτσι και στους αρσενικούς δάκους το σύστημα αναπαραγωγής περιλαμβάνει τα εξωτερικά γεννητικά όργανα και τα εξής εσωτερικά: το ζεύγος όρχεων, τον σπερματικό πόρο (*vas deferens*), τους βοηθητικούς αδένες (*male accessory glands*, στο εξής θα αναφέρονται ως MAGs), τον σπερματικό σάκο και τον εκφορητικό αγωγό (Martin and Allen, 2001).



Εικόνα 6: Αναπαραγωγικό σύστημα αρσενικού άτομο *Bactrocera oleae*.

Στους όρχεις παράγονται τα σπερματοζωάρια και υπάρχουν σπερματοκύτταρα σε διάφορα στάδια διαφοροποίησης. Κάθε όρχις φαίνεται να συνδέεται με τον σπερματικό πόρο με έναν μοναδικό σωλήνα και όχι με περισσότερους, όπως συμβαίνει σε άλλα έντομα (Barr, 1974). Ο σπερματικός πόρος οδηγεί στους MAGs. Αυτοί μπορούν να προέρχονται από τη στιβάδα του εξωδέρματος ή του μεσοδέρματος. Στο δάκο έχει επιβεβαιωθεί η ύπαρξη τριών τέτοιων αδένων (Klowden, 2007), οι οποίοι ενώνονται με τον σπερματικό σάκο, όπου αποθηκεύεται το σπέρμα. Κατά τη σύζευξη το σπέρμα μεταφέρεται μέσω του εκφορητικού αγωγού στα θηλυκά έντομα για γονιμοποίηση (Barr, 1974 και Marchini et al., 2006).

1.2.1 Βοηθητικοί αδένες αρσενικών (Male accessory glands – MAGs)

Τα σπερματοζωάρια που παράγονται από τους όρχεις κατά τη σπερματογένεση παραμένουν στα θυλάκια των όρχεων μέχρι να επέλθει η σεξουαλική ωρίμανση του εντόμου. Αλλά ακόμα και τότε δεν είναι πλήρως ικανά να γονιμοποιήσουν ωάρια. Καθώς το σπέρμα περνά από τους MAGs και τον εκφορητικό αγωγό, εμπλουτίζεται από τα υγρά που υπάρχουν εκεί, αυξάνοντας έτσι τη γονιμότητά του. Οι MAGs αποτελούν πηγή πολλών πρωτεϊνών, πεπτιδίων (*accessory gland proteins/peptides – ACPs*) αλλά και λιπιδίων, τα οποία επιτελούν διαφορετικές λειτουργίες.

Στα δίπτερα, οι πρωτεΐνες που συντίθενται και εκκρίνονται από τους MAGs αποτελούν μέρος των σπερματικών υγρών και κατά τη σύζευξη, μεταφέρονται στα θηλυκά μαζί με το σπέρμα. (Wei et al., 2015). Η μεταφορά τους μπορεί να γίνει είτε μέσω των σπερματοφόρων, είτε μέσω των σπερματικών υγρών. Τα σπερματοφόρα είναι πρωτεϊνικά καψίδια που περιέχουν σπερματοζωάρια και σπερματικά υγρά (Frattini et al., 2009). Στο *Anopheles* και στη *Drosophila*, αφού τα σπερματικά υγρά

εισέλθουν στα θηλυκά, φυλάσσονται σε ένα ειδικά διαμορφωμένο για την αποθήκευσή τους όργανο, τη σπερματοθήκη (Schnakenberg et al., 2011). Ανάλογα με το είδος ο αριθμός των σπερματοθηκών ποικίλει (Clements, 1992).

Στη *Drosophila melanogaster* αλλά και σε πολλά είδη κουνουπιών, έρευνες έχουν δείξει ότι οι σπερματικές εκκρίσεις παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο καθώς προκαλούν αλλαγές τόσο στην φυσιολογία όσο και στην συμπεριφορά των θηλυκών. Αυτές οι αλλαγές περιλαμβάνουν μείωση της συζευκτικής δεκτικότητας σε επόμενες απόπειρες, αυξημένη ωογένεση και ωοαπόθεση, αυξημένη πρόσληψη τροφής και ύπνου, επαγωγή ανοσοαπόκρισης αλλά και μειωμένη διάρκεια ζωής (Charman et al., 2004, Ram et al., 2007, Gillot et al., 2003, Avila et al., 2011). Για να εκδηλωθεί αυτή η μετασυζευκτική απόκριση δεν είναι απαραίτητη η σύζευξη των εντόμων. Στα είδη των *Aedes* και *Culex* η μεταμόσχευση ιστών MAGs ή η ένεση των εκκρίσεών τους στην αιμόλεμφο παρθένων θηλυκών, είναι αρκετή για να αποτρέψει επόμενη σύζυξή τους και να επάγει την ωοαπόθεση (Craig et al., 1967, Young et al., 1987, Leahy et al., 1965, Fuchs et al., 1968, 1969 και 1970).

Γενικά, ο βασικός τρόπος δράσης των πρωτεϊνών των σπερματικών υγρών φαίνεται να είναι συντηρημένος ανάμεσα στα είδη καθώς ετερόλογη μεταμόσχευση ιστών MAGs ανάμεσα σε *Aedes aegypti*, *Culex pipiens* και *Drosophila melanogaster* οδηγεί στην επαγωγή της ωοαπόθεσης παρθένων θηλυκών όλων των ειδών (Leahy et al. 1943). Αντίθετα, στο γένος *Anopheles* παρατηρείται ανομοιομορφία στην επίδραση της μεταμόσχευσης MAGs αλλά και των ενέσεων εκκρίσεών τους. Όσον αφορά τις μεταμοσχεύσεις, υπάρχει μείωση στη συζευκτική δεκτικότητα στα παρθένα θηλυκά *Anopheles quadrimaculatus* (Craig et al., 1967) αλλά όχι στα *Anopheles gambiae* και στα *Anopheles albimanus* (Klowden et al., 2001). Αυτό ίσως να οφείλεται στο ότι προκειμένου να είναι δραστικά τα συστατικά των εκκρίσεων των βοηθητικών αδένων πρέπει να επεξεργαστούν από πρωτεάσες που υπάρχουν στη μήτρα των θηλυκών εντόμων (Riehle et al., 2002). Επιπλέον, στο *Anopheles gambiae* φαίνεται να παίζει ρόλο και η περιοχή που θα γίνει η ένεση, αφού οι ενέσεις στο θώρακα είναι πιο αποτελεσματικές σε σχέση με αυτές που έγιναν στην κοιλιακή χώρα (Shutt et al., 2010). Μια πιθανή εξήγηση για αυτό είναι ότι οι υποδοχείς πρόσδεσης των πρωτεϊνών που περιέχονται στο σπέρμα και στους MAGs βρίσκονται στο θώρακα.

Πειράματα στη *Drosophila* έδειξαν ότι η αυξημένη παραγωγή αυγών και η μείωση στη συζευκτική δεκτικότητα που παρατηρούνται μετά το ζευγάρισμα μπορεί να διαρκούν για μικρό ή μεγάλο χρονικό διάστημα (Xue et al., 2000). Στην πρώτη περίπτωση, ενέσεις των εκκρίσεων των MAGs σε παρθένα θηλυκά του είδους *Drosophila melanogaster* προκαλούν τις αλλαγές που παρατηρούνται στα θηλυκά μετά τη σύζευξη, για διάστημα 1-2 ημερών (Chen et al., 1988) και εξαρτώνται από την ύπαρξη των Acps και όχι του σπέρματος. Στη δεύτερη περίπτωση, η διατήρηση της απόκρισης αυτής για έως και μία εβδομάδα απαιτεί τη μεταφορά σπέρματος

στις σπερματοθήκες των θηλυκών (Gromko et al., 1984, Manning et al., 1962 και 1967), ένα φαινόμενο γνωστό και ως “sperm effect”. Το φαινόμενο αυτό πραγματοποιείται με την πρόσδεση των πεπτιδίων που υπάρχουν στα MAGs στο μαστίγιο των σπερματοζωαρίων. Έτσι, τα σπερματοζωάρια μεταφέρουν τις πρωτεΐνες αυτές στις σπερματοθήκες και τις απελευθερώνουν σταδιακά, οδηγώντας στην εμφάνιση των συμπεριφορών που παρατηρούνται στα θηλυκά μετά τη συνουσία (Peng et al., 2005, Liu et al., 2003, Charman et al., 2003).

Άλλες έρευνες σε αρσενικά υβρίδια *Anopheles gambiae*/*Anopheles melas* με κατεστραμμένους όρχεις αλλά άρτια ανεπτυγμένους MAGs, κατέληξαν στο ότι τα έντομα αυτά ήταν ικανά να προκαλέσουν την χαρακτηριστική μετασυζευκτική συμπεριφορά των θηλυκών (Bryan, 1968). Επιπλέον, στο *Anopheles gambiae* έγινε RNA – σίγηση του γονιδίου *zero growth population (zpg)*, η οποία οδήγησε σε μη λειτουργικά σπερματικά κύτταρα χωρίς να επηρεάσει τους MAGs. Τα αρσενικά αυτά παρόλο που δεν παρήγαγαν σπέρμα, κατάφεραν μετά από σύζευξη να αυξήσουν την ωοαπόθεση και να εμποδίσουν την συζευκτική δεκτικότητα των θηλυκών. Προκύπτει λοιπόν, ότι για την εμφάνιση των αλλαγών αυτών στη φυσιολογία και τη συμπεριφορά των θηλυκών δεν είναι απαραίτητη η ύπαρξη σπέρματος (Thailayil et al., 2011).

Άλλο ένα χαρακτηριστικό των MAGs που τους καθιστά ιδιαίτερα σημαντικούς είναι ότι οι εκκρίσεις τους σε κάποια είδη εντόμων συσσωματώνονται σε μία ζελατινώδη μορφή σχηματίζοντας το λεγόμενο “mating plug” (Giglioli et al., 1966). Η ύπαρξή του είναι πολύ χρήσιμη καθώς στο *Anopheles gambiae* έχει δειχθεί ότι μειώνει την επιτυχία επόμενης συνουσίας και είναι απαραίτητο για την αποθήκευση του σπέρματος (Rogers et al., 2009). Στο ίδιο κουνούπι, το plug πέπτει στον κόλπο του θηλυκού 26-36 ώρες μετά τη σύζευξη, από πρωτεάσες που υπάρχουν εκεί, μια διαδικασία που ίσως να παράγει παράγοντες που να επηρεάζουν τη συμπεριφορά του θηλυκού (Rogers et al., 2009, Mancini et al., 2011).

Mating plugs υπάρχουν και σε άλλα είδη όπως στη *Drosophila melanogaster*, στο *Cressida cressida* και το *Bombus terrestris*. Στη *Drosophila melanogaster*, το mating plug χωρίζεται στο μπροστινό και το πίσω μέρος. Το πίσω μέρος αποτελείται από πρωτεΐνες του εκφορητικού βολβού του αρσενικού (PEB-me, PEBII και PEBIII) και σχηματίζεται 3 λεπτά μετά από την έναρξη της σύζευξης, πριν τη μεταφορά του σπέρματος (Lung et al., 2001). Το μπροστινό μέρος διαμορφώνεται μετά τη μεταφορά σπέρματος, από τις πρωτεΐνες που υπάρχουν στα MAGs, όπως το Acr36DE. Είναι απαραίτητο καθώς εμποδίζει την επιστροφή του σπέρματος στα όργανα αποθήκευσής του (Lung et al., 2001). Στο *Cressida cressida* τα αρσενικά μεταφέρουν ένα εξωτερικό plug (sphragis), το οποίο μπλοκάρει το εξωτερικό τμήμα του θηλυκού που χρησιμοποιείται για το ζευγάρωμα, εμποδίζοντάς το έτσι να ξανασυζευχθεί (98). Στο *Bombus terrestris*, ένα λιπαρό οξύ που αποτελείται από

λινολεϊκό υπάρχει στο mating plug και καθιστά τα θηλυκά μη δεκτικά για επόμενη γονιμοποίηση (Baer et al., 2001). Στο δάκο της ελιάς, *Bactrocera oleae*, δεν παρατηρήθηκε ο σχηματισμός mating plug.

Οι λειτουργίες των Acps καλύπτουν ένα ευρύ φάσμα. Υψηλή έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεάσες και πεπτιδάσες παρατηρείται στους ιστούς MAGs των *Drosophila melanogaster*, *Anopheles gambiae* και *Anopheles aegypti*. Τα ένζυμα αυτά κάνοντας τομές στις πρωτεΐνες και τα πεπτίδια τα καθιστούν ενεργά (Heifetz et al., 2005, Ram et al., 2006). Για παράδειγμα, η οβουλίνη (ovulin – Acp26Aa) αποτελεί έναν σημαντικό ρυθμιστή της ωορρηξίας και της ωοαπόθεσης στη *Drosophila melanogaster*. Μεταφέρεται στα θηλυκά ως προπροορμόνη και επεξεργάζεται από μία σπερματική πρωτεάση (Ram et al., 2006).

Ακόμη, υπάρχουν άφθονες σερπίνες και άλλοι αναστολείς πρωτεασών, οι οποίοι έχουν ρόλο στην γονιμότητα των αρσενικών (Murer et al., 2001) αλλά και τσαπερονίνες, οι οποίες διευκολύνουν την αναδίπλωση των πρωτεϊνών και τις αλληλεπιδράσεις σπέρματος και ωαρίου (Asquith et al., 2005). Στη *Drosophila* επίσης μεταφέρονται στα θηλυκά μέσω σύζευξης λιπάσες, οι οποίες επηρεάζουν τη συμπεριφορά κατά την ωοαπόθεση, τη δεκτικότητα σε επόμενη σύζευξη (Meikle et al., 1990) και παρέχουν ενέργεια στο σπέρμα (Walker et al., 2006).

Στους MAGs της *Drosophila melanogaster* εκφράζονται πολλά γονίδια οξειδοαναγωγικών ενζύμων. Το κυριότερο είναι η προπυλ-4-υδρολάση, που εμπλέκεται στην υδροξυλίωση του κολλαγόνου, μια διαδικασία απαραίτητη για την ακεραιότητα και τη λειτουργικότητα της εξωκυτταρικής μεμβράνης που πιθανώς να παίζει κάποιο ρόλο στους MAGs (Xu et al., 2009). Στους MAGs του *Anopheles gambiae*, η πλειονότητα των οξειδοαναγωγικών πρωτεϊνών είναι οξειδάσες. Ένας σημαντικός αριθμός από αυτές εμπλέκεται στη σύνθεση εκδυστεροϊδών ορμονών, οι οποίες μεταφέρονται στα θηλυκά κατά τη σύζευξη και ελέγχουν την παραγωγή αυγών μετά την πρόσληψη αίματος (Bai et al., 2010). Στους MAGs του *Aedes aegypti*, υπάρχουν κυρίως αφυδρογονάσες, οι οποίες συμμετέχουν στον μεταβολισμό και στη δημιουργία του συμπλόκου της ATP συνθάσης. Το σύμπλοκο αυτό το συμβάλλει στην παραγωγή ενέργειας για τη δημιουργία πρωτεϊνών στους εκκριτικούς αδένες (Sirof et al., 2008 και 2011). Επίσης, στη *Drosophila* και στο *Aedes* υπάρχουν και λεκτίνες, οι οποίες εικάζεται ότι συμμετέχουν στην αναγνώριση του ωαρίου από το σπερματοζώαριο (Clark, 2011).

Μερικές από τις πιο γνωστές Acps στη *Drosophila melanogaster* είναι οι Acp70A και Acp36DE (McGraw et al., 2008). Το sex peptide ή αλλιώς Acp70A έχει δειχθεί ότι αποτρέπει την επανασύζευξη των εντόμων, αυξάνει την παραγωγή αυγών, μειώνει την διάρκεια ζωής των θηλυκών, επηρεάζει την αντίληψη του χώρου και της κίνησης αλλά και αυξάνει την πρόσληψη τροφής. Το πεπτίδιο αυτό προσδένεται σε υποδοχείς G-πρωτεϊνών στους αισθητικούς νευρώνες του θηλυκού, οδηγώντας σε

μεταβολή της φυσιολογίας και της συμπεριφοράς του εντόμου (Gioti et al., 2012). Η Acpr36DE είναι μία γλυκοπρωτεΐνη, η οποία αν δεν μεταφερθεί στα θηλυκά, εκείνα αποθηκεύουν μόνο το 10% του σπέρματος που θα αποθήκευαν φυσιολογικά (Neubaum et al., 1999). Αλλά και στο *Anopheles gambiae*, ανακαλύφθηκε μια πρωτεΐνη με το όνομα *matrone*, η οποία συντίθεται στους MAGs και μπορεί να προκαλέσει μείωση της συζευκτικής δεκτικότητας στα θηλυκά (Fuchs et al., 1968, 1969 και 1970). Η πρωτεΐνη αυτή χωρίζεται σε δύο τμήματα, το ένα εκ των οποίων φαίνεται να αποτελεί έναυσμα της ωοαπόθεσης (Hiss et al., 1972). Επιπλέον, στα είδη *Apriona germari* και *Heliothis virescens* παράγεται από τους MAGs η νεανική ορμόνη (Juvenile Hormone, JH), η οποία μεταφέρεται στα θηλυκά μέσω της σύζευξης και συμβάλλει στην ωρίμανση των αυγών (Pszczolkowski et al., 2006 και Tian et al., 2010).

Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι στον εκφορητικό αγωγό αλλά και στους MAGs πολλών εντόμων έχουν ταυτοποιηθεί πεπτίδια με αντιμικροβιακή δράση, τα οποία μπορούν να προστατεύσουν τον ωοαγωγό αλλά και τους γαμέτες των εντόμων από μικροβιακούς και άλλους παράγοντες (Avila et al., 2011 και Lung et al., 2001).

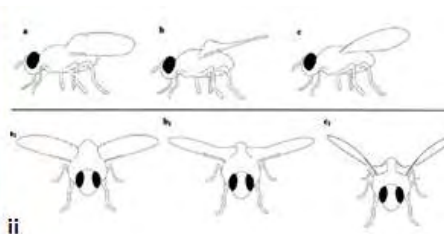
1.3 Συμπεριφορά αρσενικών πριν τη σύζευξη

Ανεξαρτήτως φύλου, τα έντομα ωριμάζουν σεξουαλικά από την 5η έως και την 8η μέρα της ζωής τους (Benelli et al., 2014). Τα θηλυκά άτομα συζευγνύονται μόνο μία φορά όσο ζουν, ενώ στα αρσενικά δεν υπάρχει περιορισμός (Tzanakakis et al., 1968 και Zervas, 1982). Σε πολλά δίπτερα, η χαρακτηριστική συμπεριφορά της σύζευξης φαίνεται να ακολουθεί κιρκάδιο ρυθμό. Ο δάκος δεν αποτελεί εξαίρεση και ξεκινάει τη διαδικασία σύζευξης τις τελευταίες 3-4 ώρες της φωτόφασης (Loher et al., 1979). Γενικότερα, η συμπεριφορά που εμφανίζουν τα έντομα κατά τη σύζευξη μπορεί να χωριστεί σε 3 φάσεις. Αρχικά, το αρσενικό αναζητά σύντροφο και λαμβάνει ερεθίσματα (οπτικά και οσμής) που το οδηγούν να πλησιάσει το θηλυκό. Ιδιαίτερα σημαντική στη διαδικασία αυτή είναι μία φερορμόνη που ελευθερώνεται από τα παρθένα θηλυκά έντομα, κύριο μόριο της οποίας είναι το 1,7-dioxaspiro[5.5]undecane (DSU) (Baker et al., 1980). Στη δεύτερη φάση, το θηλυκό αποφασίζει αν θα συμβεί το ζευγάρωμα ανάλογα με την ποιότητα των δονήσεων των φτερών του αρσενικού. Τελικά, το αρσενικό κάνει μία ή περισσότερες προσπάθειες σύζευξης (Benelli et al., 2012).

Πιο συγκεκριμένα, οι συμπεριφορές που μπορεί να εμφανίσει το αρσενικό για να προσελκύσει το θηλυκό αλλά και στις απόπειρες σύζευξης είναι οι παρακάτω:

- I. Επέκταση φτερού (wing extension): Απομάκρυνση των φτερών από το σώμα με κλίση 90°.

- II. Τοποθέτηση (mounting): Το αρσενικό προσαρμόζεται στο σώμα του θηλυκού με σκοπό τη σύζευξη.
- III. Ταλάντευση (swaying): Το κάτω μέρος των ποδιών του αρσενικού παραμένει στο ίδιο σημείο ενώ το υπόλοιπο σώμα του κινείται ελαφρώς προς τα αριστερά και τα δεξιά.
- IV. Υπτιασμός (supination): Κίνηση του φτερού, έτσι ώστε η εσωτερική του πλευρά να αντικρίζει προς τα πάνω.
- V. Εναλλασσόμενα πόδια (alternating legs): Τα αρσενικά κουνούν τα πίσω πόδια, ένα τη φορά, εναλλάσσοντάς τα. Με την κίνηση που κάνουν ακουμπούν ελαφρά τα τελευταία τμήματα του κοιλιακού τους χώρου.
- VI. Προσέγγιση (approach): Το αρσενικό κατευθύνεται προς το θηλυκό.
- VII. Άγγιγμα (touching): Με το μπροστινό μέρος των ποδιών τους τα αρσενικά ακουμπούν τα θηλυκά.
- VIII. Περπάτημα στα πλάγια (Sidestepping)
- IX. Στροβίλισμα (twirl): Το αρσενικό στριφογυρίζει, κάνοντας κύκλο 180° ή 360°. Μπορεί να γίνει μέχρι και 3 συνεχόμενες φορές.
- X. Δονήσεις φτερού (wing buzzing): Τα αρσενικά προσαρμόζουν τα φτερά τους έτσι ώστε κουνώντας τα να ακούγεται χαρακτηριστικός ήχος δόνησης. Όταν ξεκινούν οι δονήσεις τα φτερά βρίσκονται κοντά στην κοιλιά και παράλληλα με το έδαφος (εικόνα 7ii, a και a1). Με αργό ρυθμό σηκώνονται προς το πάνω, έως ότου φτάσουν στο πιο ψηλό σημείο (εικόνα 7ii, b και b1). Τότε επιστρέφουν στην αρχική τους θέση (εικόνα 7ii, c και c1) (Villamil, 2012).



Εικόνα 7: i) Υπτιασμός και ii) δονήσεις φτερών σε αρσενικό δάκο

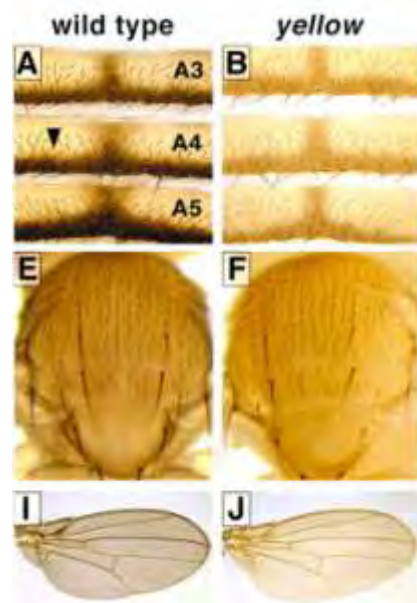
Γενικότερα, στην οικογένεια Tephritidae η διαδικασία της σύζευξης είναι μηχανικά απαιτητική για το αρσενικό. Ο κόλπος του θηλυκού είναι ένα λεπτός και μακρύς σωλήνας με σχήμα S, ο οποίος βοηθάει στην επέκταση του ωοαποθέτη. Το διεισδυτικό όργανο του αρσενικού πρέπει να εισχωρήσει βαθιά στο θηλυκό ώστε να ελευθερώσει το σπέρμα όσο το δυνατόν πιο κοντά στη σπερματοθήκη, κάτι που δεν είναι ιδιαίτερα εύκολο λόγω της περίπλοκης ανατομίας του. Χαρακτηριστική είναι η ίνα που δημιουργείται και ενώνει τα γεννητικά όργανα των εντόμων, η οποία διασφαλίζει τη μεταφορά των σπερματικών υγρών (Marchini et al., 2001).

1.4 Πληροφορίες για το γονίδιο *yellow*

Ο οργανισμός στον οποίο μελετήθηκε για πρώτη φορά το γονίδιο *yellow* είναι η *Drosophila melanogaster*. Στο έντομο αυτό το γονίδιο χαρακτηρίζεται ως ένα φυλοσύνδετο υπολειπόμενο γονίδιο και έχουν ανακαλυφθεί συνολικά 14 *yellow-like* γονίδια. Τέτοια γονίδια εντοπίζονται και σε άλλα έντομα όπως στα *Apis mellifera*, *Drosophila pseudoobscura*, *Aedes aegypti*, *Anopheles gambiae*, *Tribolium castaneum*, *Bombyx mori*, αλλά και σε άλλους οργανισμούς όπως στο σκώληκα *Caenorhabditis elegans* και τη ζύμη *Saccharomyces cerevisiae*. Για το δάκο δεν υπάρχει σχετική αναφορά.

Όλα αυτά τα γονίδια παρουσιάζουν ένα κοινό χαρακτηριστικό, την συντηρημένη περιοχή MRPJ (Ferguson et al., 2011), πράγμα λογικό αφού εξελικτικά, το *yellow* σχετίζεται με τις πρωτεΐνες Major Royal Jelly (MRJPs) της μέλισσας *Apis mellifera*. Οι πρωτεΐνες αυτές είναι το κύριο συστατικό του βασιλικού πολτού από τον οποίο τρέφεται η μέλισσα που θα γίνει βασίλισσα. Τουλάχιστον μια τέτοια πρωτεΐνη, η MRJP3, παράγεται σε ένα τμήμα του εγκεφάλου των ενηλίκων, το οποίο είναι γνωστό ότι εμπλέκεται σε ποικίλες συμπεριφορές που εμφανίζουν τα είδη (Maleszka et al., 2000).

Οι προσπάθειες για την αποσαφήνιση της λειτουργίας του γονιδίου *yellow* ξεκινούν από πολύ παλιά και ακόμα και σήμερα δεν είναι ξεκάθαρη. Μετά από παρατήρηση των αποτελεσμάτων κάποιων μεταλλάξεων του γονιδίου στη *Drosophila melanogaster*, διαπιστώθηκε ότι συμμετέχει στο μονοπάτι σύνθεσης της μελανίνης. Αυτό γιατί οι μεταλλάξεις του οδηγούσαν είτε σε διαφορετικό πρότυπο είτε σε πιο ανοιχτό χρωματισμό του σώματος των εντόμων (Lindsley et al., 1968 και Nash, 1976). Το πως επηρεάζει το *yellow* το παραπάνω μονοπάτι δεν είναι γνωστό. Η Geyer (1986) προτείνει ότι το παράγωγο του γονιδίου είναι μία δομική πρωτεΐνη που συμβάλλει στον σχηματισμό ενός παραγώγου ντοπαμίνης, της indole-5,6 quinone, η οποία συμμετέχει στον χρωματισμό.



Εικόνα 8: Επίδραση μηδενικής μεταλλάξης του γονιδίου *yellow* στην χρώση του σώματος στη *Drosophila melanogaster*.

Επιπλέον, υπάρχει η ιδέα ότι το γονίδιο συμβάλλει γενικότερα στον σχηματισμό κατεχολαμινών, επηρεάζοντας τη μετάδοση νευρικών σημάτων και κατ' επέκταση προκαλώντας κάποιες αλλαγές στη συμπεριφορά των εντόμων (Burnet et al., 1974).

Αυτό δεν είναι απίθανο, αφού από πολύ νωρίς παρατηρήθηκε ότι τα αρσενικά του είδους *Drosophila melanogaster* με κίτρινο σώμα είναι λιγότερο δραστήρια κατά τη διαδικασία της σύζευξης σε σχέση με τα αγρίου τύπου (Sturtevant, 1915). Μετά από μια σειρά πειραμάτων επιβεβαιώθηκε ότι αυτά τα αρσενικά εκδηλώνουν σε μικρότερο βαθμό κάποιες χαρακτηριστικές κινήσεις και συμπεριφορές που εμφανίζονται κατά την πολιορκία των θηλυκών εντόμων και κάνουν λιγότερες απόπειρες σύζευξης. Πιο συγκεκριμένα, παρουσιάζουν μικρότερο ποσοστό και μικρότερη διάρκεια δόνησης των φτερών τους, αλλά και μειωμένο προσανατολισμό που τα αποτρέπει να ακολουθούν τα θηλυκά. Ακόμη, δείχνουν καθυστέρηση στην πολιορκία των θηλυκών σε σχέση με τα φυσιολογικά. Επίσης, η απαραίτητη για το κάλεσμα των θηλυκών επέκταση του φτερού μειώνεται κατά 50% και όταν τα θηλυκά διώχνουν με τα πίσω πόδια τα αρσενικά, εκείνα δεν είναι ικανά να φέρουν αντίσταση. Όλα τα παραπάνω έχουν ως αποτέλεσμα αυτά τα αρσενικά να έχουν μειωμένη επιτυχία σύζευξης σε σχέση με τα φυσιολογικά (Batstock, 1956). Τα πειράματα επαναλήφθηκαν από διάφορους επιστήμονες και όλοι εντόπισαν την μειωμένη ικανότητα των αρσενικών με μετάλλαξη στο γονίδιο *yellow* να είναι ανταγωνιστικά απέναντι στα φυσιολογικά, τη λιγότερο έντονη πολιορκία προς τα θηλυκά αλλά και τη μικρότερη σε διάρκεια σύζευξη (Dow, 1976 και Wilson et al., 1976). Μειωμένη επιτυχία ζευγαρώματος δείχθηκε και σε πειράματα με *Drosophila subobscura* (Rendel, 1945), *Drosophila pseudoobscura* (Tan, 1946) και *Drosophila willistoni* (Basso da Silva et al., 2005).

Κάποιος θα μπορούσε να υποστηρίξει ότι μπορεί τα θηλυκά επηρεάζονται από το διαφορετικό χρωματισμό στο σώμα και από διαφορετικά οσφρητικά σήματα που πιθανώς παράγουν τα αρσενικά και δεν έλκονται από εκείνα. Αυτό δεν ισχύει καθώς θηλυκά που ήρθαν σε επαφή με αγρίου τύπου αρσενικά και με αρσενικά με μεταλλάξεις στο *yellow*, κατά τη σύζευξη τα απέφευγαν και τα απωθούσαν στον ίδιο βαθμό. Η ίδια απόπειρα έγινε και με θηλυκά χωρίς κεραίες, οι οποίες χρησιμοποιούνται για να αντιληφθούν δονήσεις και οσφρητικά σήματα. Σε αυτήν την περίπτωση η επιτυχία σύζευξης με αρσενικά της δεύτερης κατηγορίας ήταν μειωμένη. Άρα, η μικρότερη επιτυχία σύζευξης δεν οφείλεται στο ότι τα θηλυκά επεξεργάζονται διαφορετικά τα ερεθίσματα των αρσενικών με μεταλλάξεις στο γονίδιο *yellow*. Ακόμη, το αποτέλεσμα του δεύτερου πειράματος δείχνει ότι ίσως η μειωμένη δόνηση των φτερών δεν είναι ο κύριος λόγος της λιγότερο ενεργητικής συμπεριφοράς των αρσενικών αλλά μόνο μία πλευρά αυτής (Batstock, 1956).

Αργότερα, ανακαλύφθηκε ότι η πρωτεΐνη *yellow* εκκρίνεται από κύτταρα της επιδερμίδας (Kornegos et al., 1992) αλλά και από νευρικά κύτταρα (Radovic et al., 2002). Η πρωτεΐνη είναι μη αυτόνομη για μικρές αποστάσεις στην επιδερμίδα (Hannah, 1953) και φαίνεται να μεταφέρεται και σε άλλα κύτταρα μετά την έκκρισή της από τους προνυμφικούς νευροβλάστες (Radovic et al., 2002 και Drapeau et al., 2003). Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, έγιναν προσπάθειες να αποδειχθεί ότι η

πρωτεΐνη λειτουργεί είτε σαν ορμόνη, είτε σαν αυξητικός παράγοντας και συνδέεται σε υποδοχείς που ελέγχουν την αύξηση, τη μορφολογία και τη λειτουργία των γειτονικών κυττάρων. Όπως συμβαίνει συνήθως στις ορμόνες, έτσι και η *yellow* έχει μια υδροφοβική αλληλουχία – σήμα από 21 αμινοξέα, που κατευθύνει το πεπτίδιο στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Εκεί το σήμα αυτό κόβεται και η πρωτεΐνη μπορεί να γλυκοσυλιωθεί σε δύο πιθανές θέσεις ασπαραγίνης. Βιοχημικά λοιπόν, η πρωτεΐνη *yellow* μοιάζει με ορμόνη ή αυξητικό παράγοντα. Αν η *yellow* δρα με αυτόν τον τρόπο κατά τη μεταμόρφωση, ίσως βοηθάει τους νευρώνες να σχηματίσουν νέες κινήσεις και/ή να απαντούν σε αισθητικά σήματα που λαμβάνουν ως ενήλικα έντομα. Επίσης, η πρωτεΐνη μπορεί να κατευθύνει το κομμάτι του κεντρικού νευρικού συστήματος που ελέγχει στα αρσενικά τους μύες που διεκπεραιώνουν την επέκταση του φτερού ή να συμβάλλει στην επεξεργασία χημειοαισθητικών ερεθισμάτων που ενεργοποιούν την επέκταση του φτερού (Drapeau et al., 2003).

Μετά από μελέτη της επιτυχίας σύζευξης σε 12 υπομορφικά και 3 μηδενικά μεταλλάγματα του γονιδίου *yellow* στη *Drosophila melanogaster* παρατηρήθηκε ότι τα μηδενικά παρουσίασαν μεγαλύτερα ποσοστά αποτυχίας σε σχέση με τα υπομορφικά. Επιπλέον τα μηδενικά παρουσιάζουν 50% μείωση της επέκτασης του φτερού, κάτι πολύ πιθανό να ευθύνεται και στη μειωμένη επιτυχία σύζευξης των αρσενικών αυτών. Εκτοπική έκφραση του γ^+ ήταν αρκετή για να επαναφέρει την επιτυχία σύζευξης σε φυσιολογικά επίπεδα. Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα των υπομορφικών μεταλλαγμάτων κατάφεραν να βρουν μια ρυθμιστική περιοχή 300 αμινοξέων στο γονίδιο *yellow*, της οποίας η λειτουργία είναι απαραίτητη για την επιτυχημένη σύζευξη των αρσενικών. Ονομάστηκε ρυθμιστική περιοχή επιτυχίας σύζευξης (mating success regulatory sequence - MRS). Ένα τμήμα 35 βάσεων της περιοχής αυτής είναι πολύ συντηρημένο στο γένος *Drosophila* και προβλέπεται ότι σε αυτό προσδένεται τουλάχιστον ένας μεταγραφικός παράγοντας που εμπλέκεται στον καθορισμό του φύλου (Drapeau et al., 2005).

Άλλο ένα ενδιαφέρον χαρακτηριστικό για το συγκεκριμένο γονίδιο είναι ότι το προϊόν του φαίνεται να σχετίζεται με τους αρρενοειδικούς μεταγραφικούς παράγοντες που κωδικοποιούνται από το γονίδιο *fruitless* στον εγκέφαλο εντόμων *Drosophila melanogaster*. Οι μεταγραφικοί αυτοί παράγοντες ελέγχουν έναν καταρράκτη γεγονότων απαραίτητων για τη σωστή ανάπτυξη της συμπεριφοράς και του φύλου των αρσενικών. Στις προνύμφες τρίτου σταδίου, στάδιο πολύ σημαντικό για την μετέπειτα εκδήλωση της χαρακτηριστικής συμπεριφοράς των αρσενικών φάνηκε ότι σε πολλούς νευροβλάστες εκφράζεται τόσο το *yellow*, όσο και το *fruitless* (Radovic et al., 2002). Η συσσώρευση της πρωτεΐνης *yellow* στο κεντρικό νευρικό σύστημα διακόπτεται σε ορισμένα μεταλλάγματα για το *fruitless*. Έτσι κατέληξαν ότι το *yellow* είναι είτε άμεσος στόχος των μεταγραφικών παραγόντων που προέρχονται από το *fruitless*, είτε βρίσκεται καθοδικά του μονοπατιού του γονιδίου αυτού (Drapeau et al., 2002). Διαφορές εντοπίστηκαν και σε προνύμφες

Drosophila melanogaster που έχουν υποστεί μεταλλάξεις στον γονίδιο *yellow*. Πιο συγκεκριμένα, οι αγρίου τύπου προνύμφες τρίτου σταδίου κινούνται σε πιο ίσια μονοπάτια σε σχέση με προνύμφες ομόλογες για μετάλλαξη. Επίσης, τα μονοπάτια που σχηματίζουν είναι 10 φορές πιο περίπλοκα από ότι του αγρίου τύπου, αφού έχουν πολύ περισσότερες κυκλικές κινήσεις. Ακόμη, οι προνύμφες με τη μετάλλαξη φαίνεται να λυγίζουν το σώμα τους 2,5 φορές πιο συχνά από ότι οι αγρίου τύπου (Inestrosa et al., 1996).

Συμπερασματικά, το *yellow* είναι πλειοτροπικό γονίδιο αφού οι μεταλλάξεις σε αυτό επηρεάζουν διαφορετικά χαρακτηριστικά. Μάλιστα μετά από πειράματα που διεξάχθηκαν στη *Drosophila melanogaster*, παρατηρήθηκε και μωσαϊκισμός καθώς οι συνέπειες της κάθε μετάλλαξης στο πρότυπο χρωματισμού του σώματος διαφέρουν σε κάποιο βαθμό ανάλογα με το είδος της (Burnet et al., 1980 και Drapeau et al., 2006)

2. Σκοπός

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε το γονίδιο *yellow* με σκοπό να διαπιστωθεί ο πιθανός ρόλος του στο αναπαραγωγικό σύστημα του *Bactrocera oleae*. Το γονίδιο αυτό εντοπίστηκε σε διαθέσιμες μεταγραφόμενες αλληλουχίες που προέκυψαν με σύγκριση RNAseq από το αρσενικό γεννητικό σύστημα του δάκου (βοηθητικοί αδένες, εκσπερματικός αγωγός και βαλβίδα) πριν και δώδεκα ώρες μετά τη σύζευξη. Στο πλαίσιο αυτό, καθορίστηκαν τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου με ποσοτική Real-time PCR σε ιστούς που προήλθαν από τους βοηθητικούς αδένες του αναπαραγωγικού συστήματος αρσενικών δάκων. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε παροδική σίγησή του μέσω RNAi, και περαιτέρω μελέτη των επιπέδων έκφρασής του προκειμένου να απορριφθεί ή όχι η παραπάνω υπόθεση.

3. Υλικά – Μέθοδοι

3.1 Εργαστηριακές Συνθήκες Πειράματος

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία χρησιμοποιήθηκε ο εργαστηριακός πληθυσμός δάκου (*Bactrocera oleae*) του εργαστήριου Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Οι συνθήκες στις οποίες διαβίωναν τα έντομα ήταν σταθερές, με θερμοκρασία στους 25°C, υγρασία περίπου 58% και φωτοπερίοδο 12:12 (φως:σκοτάδι).

3.2 Απομόνωση RNA – RNA Extraction

Σκοπός της διαδικασίας αυτής είναι η απομόνωση του ολικού RNA που βρίσκεται στους ιστούς του εντόμου. Χρησιμοποιήθηκε το TRI REAGENT- RNA/DNA/ PROTEIN ISOLATION REAGENT της εταιρείας Molecular Research Center, INC. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε με βάση το πρωτόκολλο του παρασκευαστή (Chomczynski 1987 και 1993).

Υλικά	Ποσότητα
Απομονωμένος ιστός με TRI reagent	50 μl
TRI reagent	150 μl
BCP	20 μl
Ισοπροπανόλη	0,5X του όγκου του TRI reagent
Γλυκογόνο	0,5 μl
75% Αιθανόλη	200 μl
H₂O	15 μl

Μεθοδολογία

Οι απομονωμένοι ιστοί διατηρήθηκαν σε θερμοκρασία -80°C σε 50 μl TRI reagent. Αφού ξεπάγωσαν τα δείγματα, έγινε μία σύντομη φυγοκέντρηση και ακολουθήθηκαν τα παρακάτω βήματα:

1. Ομογενοποίηση των δειγμάτων με αποστειρωμένο pestle
2. Ξέπλυμα των pestles με 150 μl TRI reagent ώστε να μην υπάρχουν υπολείμματα ιστών στα pestles και vortex
3. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά
4. Φυγοκέντρηση στους 4°C, στα 12.000g για 10 λεπτά
5. Μεταφορά υπερκειμένου σε καινούριο erpendorf

6. Προσθήκη 20 μl BCP και δυνατή ανάδευση με το χέρι για 15 δευτερόλεπτα
7. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 2 έως 15 λεπτά
8. Φυγοκέντρηση στους 4°C, στα 12.000g για 15 λεπτά
9. Μεταφορά υπερκλειμένου σε καινούριο erpendorf
10. Προσθήκη 100 μl παγωμένης ισοπροπανόλης και 0,5 μl γλυκογόνου
11. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 έως 10 λεπτά
12. Φυγοκέντρηση στους 4°C, στα 12.000g για 8 λεπτά
13. Αφαίρεση υπερκλειμένου και πλύση με 200 μl 75% αιθανόλης
14. Φυγοκέντρηση στους 4°C, στα 12.000g για 5 λεπτά
15. Αφαίρεση αιθανόλης με πιπέτα, στέγνωμα του ιζήματος και αναδιάλυσή του με 15 μl ζεστού (50°C) H₂O.

3.3 Επεξεργασία με DNase – DNase Treatment

Η ύπαρξη γονιδιωματικού DNA στα δείγματα που έχουν προκύψει μετά την απομόνωση του RNA μπορεί να οδηγήσει σε λανθασμένα αποτελέσματα. Κρίνεται λοιπόν απαραίτητη η επεξεργασία των δειγμάτων με DNase, ένζυμο που καταστρέφει το ελεύθερο DNA, οδηγώντας στην απομάκρυνση τυχόν υπολειμμάτων του (Dotti & Borin, 2011).

Για κάθε δείγμα χρησιμοποιούνται:

Υλικά	Ποσότητα
RNA	15 μl
H₂O	2,5 μl
Turbo Buffer	2 μl
DNase enzyme	0,5 μl
Τελικός όγκος	20 μl

Μεθοδολογία

1. Προσθήκη RNA, H₂O, Turbo Buffer (προηγείται vortex) και ενζύμου DNase σε PCR σωληνάκι σύμφωνα με τη σειρά και τις συγκεντρώσεις του παραπάνω πίνακα
2. Επώαση στους 37°C για 30 λεπτά
3. Vortex και προσθήκη 2,5 μl Inactivation Buffer
4. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά
5. Φυγοκέντρηση στα 11.000g για 2 λεπτά
6. Μεταφορά υπερκλειμένου σε καινούριο PCR σωληνάκι
7. Διατήρηση δειγμάτων στους -80°C ή μετάβαση στη σύνθεση cDNA με αντίστροφη μεταγραφή.

3.4 Σύνθεση cDNA με αντίστροφη μεταγραφή

Κατά την αντίστροφη μεταγραφή, το μονόκλωνο RNA που έχει απομονωθεί μετατρέπεται σε δίκλωνο μέσω της σύνθεσης μιας συμπληρωματικής αλυσίδας με τη βοήθεια του ενζύμου της αντίστροφης μεταγραφάσης. Η διαδικασία αυτή είναι κατάλληλη τόσο για την ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης του υπό μελέτη γονιδίου, όσο και για την προστασία του γενετικού υλικού, αφού το RNA είναι αρκετά ασταθές μόριο (Coffin, 1997).

Ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο για το ένζυμο RT-MMULV, της BioLabs. Για κάθε δείγμα χρησιμοποιούνται:

Υλικά	Ποσότητα
RNA	20 μl
Random Primers	2 μl
H₂O	61 μl
10X Buffer	10 μl
dNTPs	5 μl
RNase inhibitor	1 μl
RT-MMULV	1 μl
Τελικός όγκος	100 μl

Μεθοδολογία

1. Προσθήκη RNA και τυχαίων εκκινήτων σε PCR σωληνάκι
2. Επώαση σε θερμοκυκλοποιητή στους 70°C για 10 λεπτά
3. Επώαση στον πάγο για 5 λεπτά
4. Προσθήκη των υπόλοιπων αντιδραστηρίων σύμφωνα με τη σειρά και τις συγκεντρώσεις του παραπάνω πίνακα
5. Επώαση σε θερμοκυκλοποιητή στους 42°C για 1 ώρα και στους 70°C για 10 λεπτά.

3.5 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα (gel) αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση αποτελεί την πιο διαδεδομένη μέθοδο διαχωρισμού μορίων νουκλεϊκής και πρωτεϊνικής προέλευσης. Κατά την ηλεκτροφόρηση παρέχεται ηλεκτρικό ρεύμα μέσω ηλεκτροδίων στο πήκτωμα και παρατηρείται η κίνηση των μορίων προς τα ηλεκτρόδια. Η κίνηση αυτή είναι ανάλογη με το φορτίο τους και αντιστρόφως ανάλογη με το μέγεθός τους. Επομένως τα περισσότερα φορτισμένα και μικρότερα μόρια απομακρύνονται περισσότερο από το αρχικό σημείο, ενώ τα μεγαλύτερα και λιγότερο φορτισμένα λιγότερο, οπότε επέρχεται διαχωρισμός. Με

το τέλος της εφαρμογής του ηλεκτρικού πεδίου, οι ενώσεις σταματούν την κίνηση τους και συσσωρεύονται σε μεγάλες συγκεντρώσεις σε ευδιάκριτες ζώνες (μπάντες) (Stellwagen, 2009).

Μεθοδολογία

Για την παρασκευή 40 ml πηκτώματος 1% περιεκτικότητας σε αγαρόζη:

1. Προσθήκη 40ml TBE 0,5 X και 0,4gr αγαρόζης σε κωνική φιάλη
2. Ζύγιση της φιάλης
3. Θέρμανση της φιάλης στον φούρνο μικροκυμάτων, αναδεύοντας συχνά μέχρι να διαλυθεί πλήρως η αγαρόζη
4. Ψύξη της κωνικής φιάλης σε τρεχούμενο νερό με ταυτόχρονη ανάδευση
5. Προσθήκη απιονισμένου νερού έως ότου η μάζα της φιάλης να είναι ίδια με εκείνη του βήματος 2
6. Προσθήκη 1,5 ml βρωμιούχου αιθιδίου και ανάδευση
7. Μεταφορά του πηκτώματος σε καλούπια και δημιουργία μικρών πηγαδιών στο πήκτωμα
8. Αναμονή μέχρι τη στερεοποίηση του πηκτώματος
9. Τοποθέτηση του πηκτώματος στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και προσθήκη TBE 0,5 X έως ότου να καλυφθεί η επιφάνεια του πηκτώματος
10. Φόρτωση δειγμάτων και του μάρτυρα μοριακού βάρους 1kb/1000bp σε συγκέντρωση 0.1 μg/μl στα πηγαδάκια.

3.6 Απομόνωση μορίων DNA από πήκτωμα αγαρόζης (gel extraction)

Η ανάκτηση από πήκτωμα είναι μία τεχνική που χρησιμεύει στην απομόνωση ενός επιθυμητού τμήματος ακέραιου DNA, αφού έχει προηγηθεί η ηλεκτροφόρησή του. Μόλις ολοκληρωθεί η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης, η ανάκτηση περιλαμβάνει τέσσερα βασικά βήματα: α) ταυτοποίηση των επιθυμητών τμημάτων, β) απομόνωση των αντίστοιχων ζωνών του πηκτώματος, γ) απομόνωση του DNA από αυτές τις ζώνες και δ) απομάκρυνση των συνοδευτικών αλάτων και προσμίξεων (Pun, 1990).

Μεθοδολογία

Αρχικά, το πήκτωμα αγαρόζης εκτίθεται σε UV ακτινοβολία προκειμένου να εντοπιστούν οι επιθυμητές ζώνες DNA και με μία λεπίδα αφαιρούνται. Η έκθεση του πηκτώματος στην ακτινοβολία πρέπει να είναι η ελάχιστη δυνατή για να αποτραπεί πιθανή μεταλαξίγνεση του DNA. Η απομόνωση του DNA από το

πήκτωμα έγινε με τη χρήση του kit GF-1, Nucleic Acid Extraction Kit της εταιρείας Vivantis.

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

3.7 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction – PCR)

Με την PCR επιτυγχάνεται η σύνθεση ενός τμήματος DNA, ανεξαρτήτου προελεύσεως “in vitro”. Σε χρονικό διάστημα λίγων ωρών, η συγκεκριμένη περιοχή του DNA που επεκτείνεται (DNA στόχος), πολλαπλασιάζεται σε ένα μεγάλο αριθμό αντιγράφων. Ο αριθμός των αντιγράφων εξαρτάται από τον αριθμό των κύκλων της αντίδρασης. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην κινητική επανασύνδεσης των αποδιαταγμένων συμπληρωματικών αλυσίδων δίκλωνου νουκλεϊκού οξέος.

Το DNA στόχος αποτελεί το πρότυπο DNA στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης και ως αφετηρίες χρησιμοποιούνται δύο συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια, οι εκκινητές. Οι εκκινητές έχουν δομή συμπληρωματική προς τις πλευρικές αλληλουχίες του DNA στόχου, ο καθένας αντίστοιχα προς τον έναν κλώνο του στόχου και με αντίθετη κατεύθυνση.

Η PCR πραγματοποιείται μέσω θερμικών κύκλων, οι οποίοι περιλαμβάνουν μία σειρά επαναλαμβανόμενων εναλλαγών θερμοκρασίας. Αρχικά, με την αύξηση της θερμοκρασίας το DNA αποδιατάσσεται. Στη συνέχεια, με τη μείωση της θερμοκρασίας οι εκκινητές υβριδίζονται στους αντίστοιχους κλώνους DNA. Έπειτα, η θερμοκρασία αυξάνεται ξανά με σκοπό την επέκταση και τον πολλαπλασιασμό

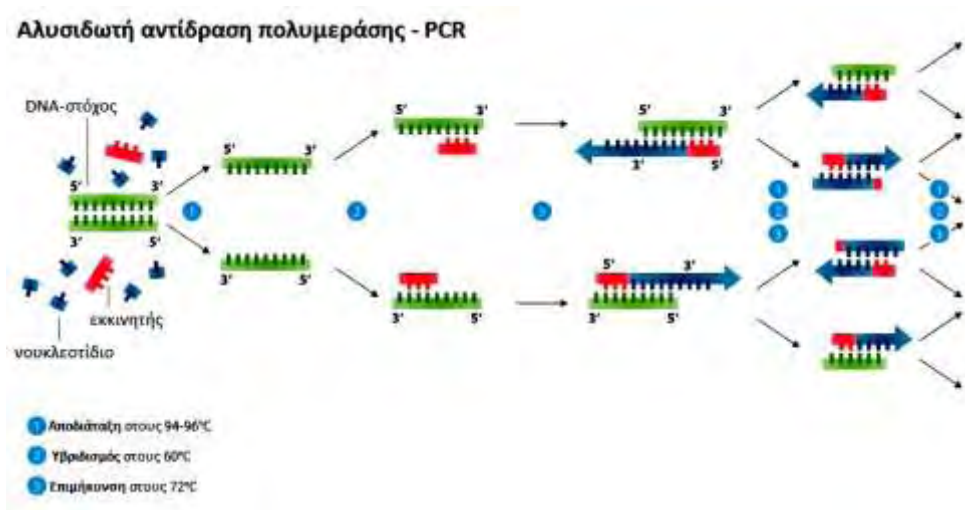
των αλυσίδων DNA, μέσω του ενζύμου DNA πολυμεράση. Με τους επαναλαμβανόμενους κύκλους λοιπόν, η αλληλουχία στόχος πολλαπλασιάζεται με εκθετικό ρυθμό.

Στάδια PCR

- I. Στάδιο εκκίνησης (initialization step): Ενεργοποίηση της DNA πολυμεράσης με εφαρμογή υψηλής θερμοκρασίας (94-95°C).
- II. Στάδιο αποδιάταξης (denaturation step): Έναρξη του πρώτου κύκλου της αντίδρασης και αποδιάταξη του DNA με θέρμανση στους 94-95°C για 30 δευτερόλεπτα.
- III. Στάδιο υβριδοποίησης (annealing step): Μείωση της θερμοκρασίας στους 50-65°C για 30 δευτερόλεπτα με σκοπό να συμβεί ο υβριδισμός των εκκινητών στους κλώνους του DNA. Η θερμοκρασία αυτή ονομάζεται T_{an} και διαφέρει ανάλογα με το ζεύγος των εκκινητών. Γενικά ισχύει $T_{an} = T_m - 5$.
- IV. Στάδιο επιμήκυνσης (elongation step): Αύξηση της θερμοκρασίας στους 72-74°C προκειμένου η DNA πολυμεράση να συνθέσει τον συμπληρωματικό κλώνο για κάθε μονόκλωνη αλυσίδα DNA.

Ο πρώτος κύκλος της αντίδρασης αποτελείται από τα τέσσερα παραπάνω στάδια.

- V. Στάδιο τελικής επιμήκυνσης (final elongation): Στον τελευταίο κύκλο η αντίδραση διατηρείται στους 72°C για πέντε λεπτά ώστε όλα τα μονόκλιωνα τμήματα να προλάβουν να γίνουν δίκλιωνα.
- VI. Στάδιο διατήρησης (final hold): Μείωση της θερμοκρασίας στους 4-15°C επ' αόριστον για διατήρηση της αντίδρασης για μικρό χρονικό διάστημα (Burnett et al., 2003).



Εικόνα 9: Τα στάδια της PCR.

Μεθοδολογία

Υλικά	Carρχική	Στελική	Ποσότητα
DNA (γενωμικό ή cDNA)	-	-	2 μl
Buffer	10X	1X	2 μl
dNTPs	10mM	0,2mM	0,4 μl
Εκκινητής F	10pctol/μl	0,35pctol/μl	0,7 μl
Εκκινητής R	10pctol/μl	0,35pctol/μl	0,7 μl
Ταq πολυμέραση	5u/μl	1u	0,2 μl
H ₂ O	-	-	14 μl
Τελικός όγκος			20 μl

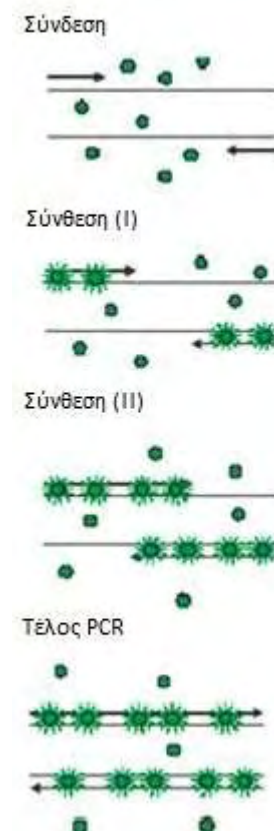
Σε κάθε σωληνάκι PCR προστίθενται τα υλικά με τη σειρά και στις συγκεντρώσεις που αναγράφονται στον παραπάνω πίνακα. Κατόπιν, αυτά τοποθετούνται στον θερμοκυκλοποιητή, όπου προσδιορίζονται οι συνθήκες της αντίδρασης.

3.8 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real-time PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-time PCR, qPCR) είναι μία τεχνική μοριακής βιολογίας που βασίζεται στις αρχές της συμβατικής PCR. Παρουσιάζει μεγαλύτερη ακρίβεια και αποδοτικότητα σε μικρότερο χρόνο απ' ότι η απλή PCR, ενώ ταυτόχρονα δίνει τη δυνατότητα παρακολούθησης της πορείας σύνθεσης του DNA σε κάθε κύκλο αντίδρασης. Χρησιμοποιείται για τον πολλαπλασιασμό, την ανίχνευση καθώς και την ποσοτικοποίηση ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA σε πραγματικό χρόνο. Επιπλέον η μέθοδος αυτή εφαρμόζεται και για την σύγκριση της ποσότητας ίδιας αλληλουχίας σε διαφορετικά δείγματα.

Ένας τρόπος παρακολούθησης της σύνθεσης του DNA που παράγεται κατά την αντίδραση περιλαμβάνει τη σήμανση των αντιγράφων με μη ειδικά φθορίζοντα μόρια, όπως το SYBR Green I (Εικόνα 10). Τα μόρια αυτά εκπέμπουν φθορισμό, ο οποίος αυξάνεται ανάλογα με την αύξηση του αριθμού των αντιγράφων και μετράται σε κάθε κύκλο. Ένα μειονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι ότι τα μόρια αυτά παρεμβάλλονται

Χρωστική SYBR Green I

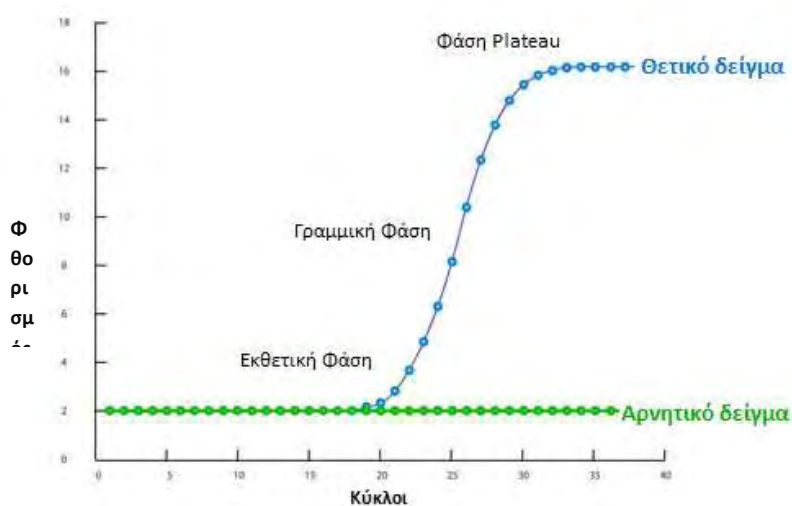


Εικόνα 10: Χρήση χρωστικής SYBR για την παρακολούθηση της Real-time PCR

σε οποιαδήποτε δίκλινα τμήματα DNA, που σημαίνει ότι τελικά το σήμα που προκύπτει μπορεί να οφείλεται και στην ύπαρξη διμερών των εκκινητών ή άλλων μη ειδικών προϊόντων. Το SYBR Green εκπέμπει πράσινο φως με τη χρήση μπλε ακτινοβολίας.

Τα δείγματα προς ανάλυση παρακολουθούνται με τη βοήθεια αυτοματοποιημένου ειδικού μηχανήματος για την Real-time PCR που είναι συνδεδεμένο με υπολογιστή και παρέχει τη δυνατότητα επεξεργασίας των αποτελεσμάτων ποσοτικοποίησης. Στους πρώτους κύκλους της αντίδρασης ο φθορισμός δεν είναι έντονος. Με το πέρασμα των κύκλων το DNA-στόχος πολλαπλασιάζεται, επέρχεται η εκθετική φάση της αντίδρασης και έτσι γίνεται εντονότερος. Όταν το προϊόν έχει ενισχυθεί σε τέτοιο βαθμό ώστε να δώσει σήμα φθορισμού, τότε ο κύκλος στον οποίο συμβαίνει αυτό ονομάζεται κύκλος ποσοτικοποίησης (C_q) ή threshold cycle (C_T). Στους τελευταίους κύκλους της αντίδρασης, η δραστηριότητα του ενζύμου αρχίζει να μειώνεται και τα διαθέσιμα υλικά λιγοστεύουν με αποτέλεσμα το DNA-στόχος να μην ενισχύεται περαιτέρω. Στο σημείο αυτό η αντίδραση φτάνει σε κορεσμό και σταματάει (φάση plateau).

Επιπλέον, στη Real-time PCR προκειμένου η ποσοτικοποίηση των προϊόντων να συμβεί με ακρίβεια χρησιμοποιούνται γονίδια αναφοράς, δηλαδή γονίδια με σταθερή έκφραση στους εκάστοτε ιστούς (housekeeping genes, hkg). Έχουν το ρόλο του εσωτερικού μάρτυρα (control) στην αντίδραση και είναι απαραίτητα για την κανονικοποίηση της έκφρασης του γονιδίου στόχου.



Εικόνα 11: Σχηματική απεικόνιση καμπύλης φθορισμού Real-time PCR

Τέλος, είναι ιδιαίτερα σημαντικό μετά το τέλος της αντίδρασης να παρατηρηθεί η καμπύλη αποδιάταξης (melting curve). Στην καμπύλη αυτή παρουσιάζεται η θερμοκρασία τήξης (T_m) των προϊόντων και μπορεί να διαπιστωθεί η παρουσία διμερών των εκκινητών και άλλων μη ειδικών προϊόντων.

Προκειμένου η Real-time PCR να έχει τη μέγιστη αποτελεσματικότητα λαμβάνονται υπόψη τα εξής χαρακτηριστικά:

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

Η τιμή efficiency, E, υπολογίζεται από τον τύπο: $E = 10^{-1/\text{slope}}$, ενώ ως ποσοστό υπολογίζεται από τον τύπο: $\% \text{ Efficiency} = (E-1) \times 100\%$.

Στο συγκεκριμένο πείραμα για την μελέτη και την επεξεργασία των αποτελεσμάτων της Real-time PCR χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα CFX Manager Software (Bio-Rad CFX96). Η ποσοτικοποίηση του γονιδίου-στόχου έγινε με τη μέθοδο σύγκρισης των C_T (ΔC_T -method) (Biorad Laboratories, Real-time PCR Applications guide, 2006).

Μεθοδολογία

Αντιδραστήρια

- ◆ cDNA
- ◆ Εκκινητές
- ◆ iTaq Universal SYBR Green Supermix (περιέχει hot start iTaq DNA polymerase, dNTPs, $MgCl_2$, SYBR[®] Green I dye)
- ◆ H_2O

Ο συνολικός όγκος της κάθε αντίδρασης είναι 15 μ l. Ανάλογα με την ποσότητα cDNA που προστίθεται αλλά και τον αριθμό των αντιδράσεων, οι ποσότητες των παραπάνω αντιδραστηρίων για τη δημιουργία του Master Mix ποικίλουν. Τα αντιδραστήρια τοποθετούνται σε ειδικά PCR tube strips και στη συνέχεια στον θερμοκυκλοποιητή. Για κάθε δείγμα, εκτός από την ενίσχυση με το ζεύγος εκκινητών του γονιδίου που μας ενδιαφέρει, πραγματοποιείται και μία αντίδραση με τους εκκινητές του γονιδίου αναφοράς. Ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το 14:3:3.

Συνθήκες Real-Time PCR:

50°C για 2 λεπτά

95°C για 3 λεπτά

Για 50 κύκλους: 95°C για 10 δευτερόλεπτα

55°C για 20 δευτερόλεπτα

72°C για 30 δευτερόλεπτα

3.9 Δημιουργία δίκλωνου RNA (dsRNA)

Για τη δημιουργία του dsRNA χρησιμοποιήθηκε ως εκμαγείο DNA προϊόν PCR που φέρει την αλληλουχία του υποκινητή T7. Ο υποκινητής αυτός αποτελεί τη θέση πρόσδεσης της RNA πολυμεράσης για την αντίστροφη μεταγραφή (Martin et al., 2005).

Αντιδραστήρια

- ◆ Προϊόν PCR
- ◆ H₂O
- ◆ Ριβονουκλεοτίδια
- ◆ 10X Reaction Buffer
- ◆ RNA Polymerase Enzyme Mix
- ◆ Turbo DNase
- ◆ Διάλυμα οξικού αμμωνίου
- ◆ Φαινόλη, χλωροφόρμιο
- ◆ 70% αιθανόλη
- ◆ Ισοπροπανόλη

Μεθοδολογία

Η μετατροπή των προϊόντων PCR σε δίκλωνο RNA πραγματοποιήθηκε με βάση το πρωτόκολλο του MEGAscript® Kits της Ambion και τις οδηγίες του παρασκευαστή:

1. Ξεπάγωμα των αντιδραστηρίων τοποθετώντας στον πάγο τα διαλύματα των ριβονουκλεοτιδίων και το 10X Reaction Buffer στον πάγκο σε θερμοκρασία δωματίου
2. Προσθήκη των πέντε πρώτων αντιδραστηρίων σε errendorf σε θερμοκρασία δωματίου με τη σειρά και στις παρακάτω ποσότητες που αναγράφονται παρακάτω:

Αντιδραστήρια	Ποσότητα
Προϊόν PCR	7 μl
Ριβονουκλεοτίδια (ATP, CTP, GTP, UTP)	4 μl από το καθένα
10X Reaction Buffer	4 μl
RNA Polymerase Enzyme Mix	4 μl
H₂O	9 μl
Τελικός όγκος	40 μl

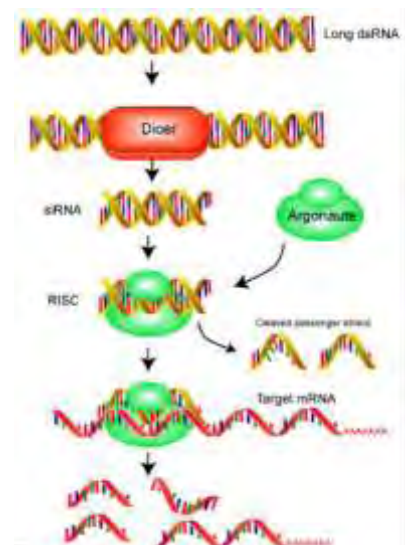
3. Καλή ανάμειξη με πιπέτα
4. Επώαση στους 37°C για 16 ώρες
5. Προσθήκη 2 μl Turbo DNase και επώαση στους 37°C για 15 λεπτά
6. Προσθήκη 115 μl H₂O και 15 μl οξικού αμμωνίου

7. Προσθήκη ίσης ποσότητας φαινόλης/χλωροφορμίου
8. Φυγοκέντρηση για 3 λεπτά σε μέγιστη ταχύτητα
9. Μεταφορά υπερκλειμένου και προσθήκη ενός όγκου χλωροφορμίου
10. Φυγοκέντρηση για 3 λεπτά σε μέγιστη ταχύτητα
11. Μεταφορά υπερκλειμένου και προσθήκη ίσου όγκου παγωμένης ισοπροπανόλης
12. Επώαση στον πάγο για 30 λεπτά
13. Φυγοκέντρηση για 45 λεπτά στους 4°C
14. Αφαίρεση υπερκλειμένου και πλύση με ίσο όγκο 70% αιθανόλης
15. Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στους 4°C
16. Αφαίρεση αιθανόλης με πιπέτα
17. Στέγνωμα του ιζήματος για 15 λεπτά περίπου και προσθήκη 25 μl ζεστού (50°C) H₂O
18. Ηλεκτροφόρηση μικρής ποσότητας RNA για ποσοτικοποίηση.

3.10 Παροδική Σίγηση Γονιδίου (RNA silencing)

Η γονιδιακή σίγηση είναι ένας γενικός όρος που χρησιμοποιείται για να περιγράψει την αναστολή της έκφρασης ενός συγκεκριμένου γονιδίου. Αποτελεί μία μεταγραφική διαδικασία, η οποία αρχικά πραγματοποιείται με την εισαγωγή του δίκλωνου RNA (dsRNA) και καταλήγει στην αποσιώπηση του γονιδίου-στόχου.

Ο μηχανισμός αρχίζει RNAi από το ένζυμο *dicer*, μια RNase. Το ένζυμο αυτό διασπά την διπλή αλυσίδα RNA (dsRNA) για να δημιουργήσει δίκλινα θραύσματα 20–25 βάσεων. Τα θραύσματα αυτά ονομάζονται siRNAs. Τα siRNAs ενσωματώνονται σε ένα πρωτεϊνικό σύμπλοκο, το RISC. Κατόπιν το σύμπλοκο κατευθύνεται σε εκείνα τα mRNA τα οποία είναι συμπληρωματικά με τα siRNAs και τα κόβει, με αποτέλεσμα την αποσιώπηση των εκάστοτε γονιδίων. Η πρωτεΐνη Argonaute είναι το κύριο συστατικό της RISC και μεσολαβεί στην αναγνώριση του στόχου και την κοπή αυτού (Agrawal et al., 2003).



Εικόνα 12: Μέθοδος RNAi.

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

Μεθοδολογία

- 1.Σύνδεση του μηχανήματος και καθαρισμός του σύμφωνα με τις οδηγίες του
- 2.Επιλογή γυάλινης βελόνας quartz και κοπή της κατάλληλα έτσι ώστε να χρησιμοποιηθεί για την έγχυση
- 3.Γέμισμα της βελόνας με mineral oil προσεκτικά ώστε να μην δημιουργηθούν φυσαλίδες
- 4.Τοποθέτηση της βελόνας στο μηχάνημα
- 5.Γέμισμα της βελόνας με το dsRNA
- 6.Ένεση των αναισθητοποιημένων εντόμων με το dsRNA είτε ανάμεσα στα φτερά είτε κάτω από το ένα φτερό. Τα έντομα έχουν αναισθητοποιηθεί με τοποθέτηση τους στους -20°C για 5 λεπτά.

Σημειώνεται ότι η ένεση σε κάθε έντομο γίνεται εις διπλούν για μεγαλύτερα ποσοστά επιτυχίας και περιλαμβάνει τη μεταφορά 69nl του dsRNA κάθε γονιδίου.

3.11 Προγράμματα Βιοπληροφορικής και Στατιστικής

Για τον σχεδιασμό και την διεξαγωγή του πειράματος καθώς και για την επεξεργασία των αποτελεσμάτων ήταν απαραίτητη η χρήση των προγραμμάτων:

3.11.1 Blast (Basic Local Alignment Search Tool)

Το πρόγραμμα Blast παρέχει τη δυνατότητα σύγκρισης και στοίχισης νουκλεοτιδικών και πρωτεϊνικών αλληλουχιών με βάση την ομολογία που εμφανίζουν. Ο χρήστης εισάγει την αλληλουχία που τον ενδιαφέρει και το πρόγραμμα αναζητά αλληλουχίες στις διαθέσιμες βάσεις δεδομένων που να παρουσιάζουν ομολογία με ολόκληρη την αλληλουχία ή με κάποιο τμήμα της. Υπάρχουν διάφορες υποκατηγορίες του προγράμματος Blast ανάλογα με το είδος της αναζήτησης:

- Blastn → σύγκριση νουκλεοτιδικών αλληλουχιών
- Blastx → σύγκριση νουκλεοτιδικών αλληλουχιών μεταφρασμένων σε όλα τα πιθανά αναγνωστικά πλαίσια με πρωτεϊνικές αλληλουχίες
- Blastp → σύγκριση πρωτεϊνικών αλληλουχιών
- tBlastn → σύγκριση πρωτεϊνικών αλληλουχιών με νουκλεοτιδικές αλληλουχίες μεταφρασμένες σε όλα τα πιθανά αναγνωστικά πλαίσια

Επιπλέον, το πρόγραμμα διαθέτει πολλές παραμέτρους, η αλλαγή των οποίων οδηγεί στην διαφοροποίηση των κριτηρίων και κατ' επέκταση των αποτελεσμάτων της αναζήτησης (Μπαξεβάνης, 2016).

Στην παρούσα εργασία η αναζήτηση πραγματοποιήθηκε μέσω του Blastp, με σκοπό να εντοπιστεί αν η πρωτεϊνική ακολουθία που μας ενδιαφέρει εμφανίζει ομολογία ανάμεσα στη *Drosophila melanogaster* και τον δάκο.

- Primer Blast: Ο σχεδιασμός των εκκινήτων που χρησιμοποιήθηκαν στη Real-time PCR έγινε μέσω του προγράμματος αυτού.

3.11.2 Omiga

Το πρόγραμμα Omiga αποτελεί ένα εργαλείο 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. Ακόμη μέσω αυτού μπορεί να γίνει στοίχιση και σύγκριση αλληλουχιών με τη χρήση του αλγόριθμου BLAST και τις διαθέσιμες βάσεις δεδομένων (Kramer, 2001).

3.11.3 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 (Hazewinkel & Michiel, 2001).

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

4. Αποτελέσματα

Με βάση δεδομένα RNAseq του εργαστηρίου που προέκυψαν από σύγκριση μεταγραφικών αλληλουχιών αναπαραγωγικού ιστού ώριμων σεξουαλικά αρσενικών εντόμων έβδομης ημέρας, πριν τη σύζευξή τους και 12 ώρες μετά από αυτή, επιλέχθηκε το γονίδιο *yellow*.

Μέσω του προγράμματος Blastp, διαπιστώθηκε ότι το προϊόν του γονιδίου αυτού παρουσιάζει ομολογία σε ποσοστό 73% με την πρωτεΐνη *yellow* της *Drosophila melanogaster*, για ποσοστό κάλυψης 87% και με E-value=0.

Χρησιμοποιώντας ως μήτρα την αλληλουχία του γονιδίου σχεδιάστηκαν δυο ζευγάρια εκκινητών: α) για να καθοριστεί αρχικά το πρότυπο έκφρασης του γονιδίου από την ημέρα μεταμόρφωσης του εντόμου σε ενήλικο (ημέρα 0) έως και την ημέρα της σεξουαλικής του ωρίμανσης κατά την οποία πραγματοποιείται η σύζευξη (ημέρα 7) και β) για την διερεύνηση του ρόλου του γονιδίου μέσω παροδικής αποσιώπησής του σε αρσενικά έντομα (εικόνα 13 και πίνακας 1).

```
ATGCAACTGCAGCTGCACACCAACTTACAACAACAAATCCCCTAATACTCTTTGCTGCCAC
ACTTGCCACCCTACTCCGGCCACACCCGGCTAGCGCCGCCTACTCCGCTGATTTGCACGATG
ACCCTGCTGACGTAGCCGACACCCGCTGCTGCTGACTATGACAGCTACGGCCACCACAGCAAC
AAGTATGTGAGTAAAGTGCAGATAAAAAATCCATTGGCTGCACTCACCTTCCAGCTGAGCGGCAA
CAACCTGCAGTGGCCTTGCAGTGCACCAAGAGCATTTACGTCCAATCCGGTCGGTATGTGC
CGCGCAATGTGATCGTGACGCGCGCCCAACTGCGACGTGATGACGCCTTTGTGGCACTACCG
CGCTATAAACAGGGTGTGCCATTTACATTTGGGTGCGGTGCAATTGAAGCGGGGTCAGTGTGT
GGCCAAGATTTGCGCCATATCCGTGCTGGGCCATACAGGAGGAGGGCAATTTGTCAGGCGTTGC
AGTCCGTCGTCGACATCGCTGTGGATCCCAATGGTCTCCTCTGGGCTTTGGACGTGGGACTT
GTGAACACATTTGGAACAACCGATACGCCGTTGTGGACCAAAAATGTAGCAATCAACACGGC
TGACAACAAAGTAGTAAAGATCATCGACCTGAGTGATCTCGTAACGGCTGAGTCCCGCTTGC
AGTTCATAGTGGTGGACTACTCCAAGGACAACAAGCCGTTTCGTATATGTTGCTGACGCCGGA
GCACGCAGCATACTCGTCTACGATATAGCCGGCGACAAATCGTATCGCATCGTTTTACCTAA
AGCCACTGCACCTACTACCACCGATGTGCTTTATATGGCGCTCACCGCCACACCCGGATGGCA
CATCGACACTGTACTTCACGTATCTTAGCTCACCGCGTCTGTACTCCATACGTGGACAGTAT
TTGCGTGTGGACAGGGTGCCGGTTTCGATTGTGCGATGTGGGCGCCAAGCCTTATGGCAAGCA
AATGGTGCTGCTCGGCGCCGATGGTGGCACGAATTGTTCTTCCGTTACAAGGGTGAAAACG
ACATATATATGTGGAACCTCGGAGACTTGCTTCAAATCAGCCAATTTAAAAGATGTACAACAT
GGCGGTGATTGTGCGCTGTCGACACAGGTGCTGCCCGCCATAGGCGCTTCATGTGGGCTTT
GGAGAGCAATTTCCATGATTTTCATATCGGAACGAACGGGTTGCAATGGTGCATCGATTGTTT
TGCATCCCGTAGTGCGCGAATGTAATGACTAAGGGTTCGCAGTGAGATGGTAGTTTTAAGTGA
ATTGTTTTGAAGTTTTTAAAAAATGTGTTTTTTTGTTTTTTGTAGTTTACAAATATGTTTCGTCT
```

Εικόνα 13: Αλληλουχία γονιδίου *yellow* στο δάκο της ελιάς. Με γκρι επισημαίνονται οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για το σχηματισμό *dsRNA* ενώ με κίτρινο οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την *Real-time PCR*.

	Εκκινητής F (5' → 3')	Εκκινητής R (5' → 3')	Ta	Μήκος προϊόντος (bp)
Real-time PCR	TTGCGTGTTGGACAGGGTGC	AATTCGTGCCACCATCGGCG	55 °C	97
ds-yellow	Taatacgactcactataggg-CATTTACGTCCAATCCGGTC	Taatacgactcactataggg-TCGCCGGCTATACGTAGA	55 °C	315

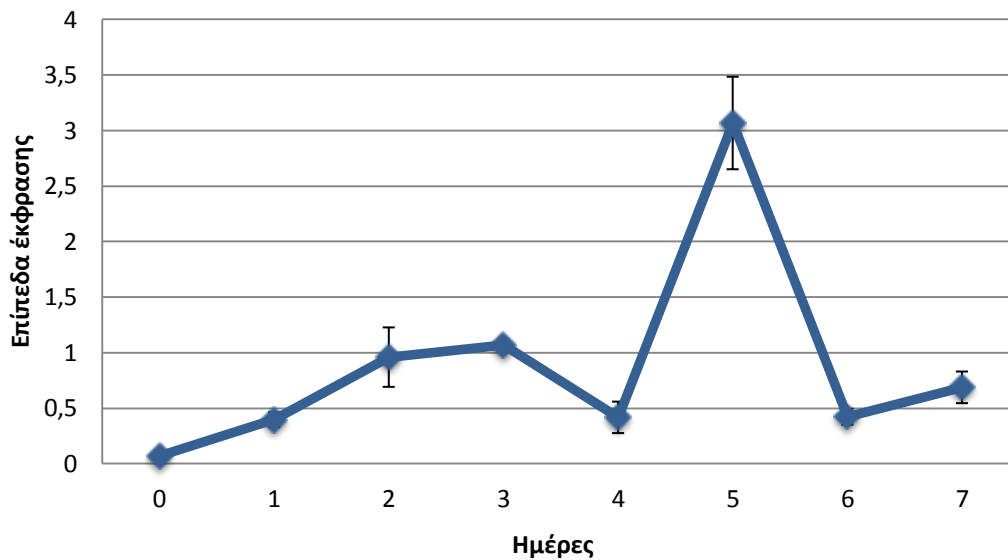
Πίνακας 1: Ακολουθίες, θερμοκρασία υβριδισμού και μήκος προϊόντος ενίσχυσης των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την Real-time PCR και τον σχεδιασμό του dsRNA.

4.1 Μελέτη της έκφρασης του γονιδίου yellow

Για να μελετηθούν τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *yellow* σε αρσενικούς δάκους, απομονώθηκε γενετικό υλικό δέκα εντόμων από τους ιστούς των βοηθητικών αδένων και του εκφορητικού αγωγού τις ημέρες μηδέν (0) έως επτά (7). Ακολούθησε η μετατροπή του σε cDNA και η διεξαγωγή αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-time PCR) ώστε να καθοριστούν τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου ξεχωριστά για κάθε μέρα.

Στο γράφημα που ακολουθεί (Γράφημα 1) παρουσιάζεται το προφίλ έκφρασης του γονιδίου *yellow* από την ημέρα μεταμόρφωσης του εντόμου σε ενήλικο (ημέρα 0) έως και την ημέρα της σεξουαλικής του ωρίμανσης κατά την οποία πραγματοποιείται η σύζευξη (ημέρα 7). Τα επίπεδα έκφρασης έχουν προκύψει από δύο βιολογικά δείγματα (2 biological replicates). Από την πρώτη στιγμή της ζωής του ενήλικου εντόμου μέχρι και την τρίτη ημέρα παρατηρείται μία αύξηση στην έκφραση του γονιδίου, ενώ την τέταρτη μειώνεται και φτάνει περίπου στα επίπεδα της πρώτης ημέρας. Την πέμπτη ημέρα φαίνεται ότι το γονίδιο αποκτά το μέγιστο της έκφρασής του. Την επόμενη ημέρα η έκφραση μειώνεται ξανά και φτάνει στα επίπεδα της τέταρτης και της πρώτης μέρας ενώ την έβδομη ημέρα παρατηρείται μια μικρή αύξηση.

Προφίλ έκφρασης yellow



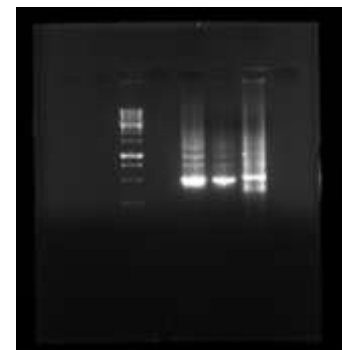
Γράφημα 1: Προφίλ έκφρασης του γονιδίου yellow σε ιστούς βοηθητικών αδένων και εκφορητικού αγωγού αρσενικών ατόμων όπως προέκυψε από τη μελέτη δύο βιολογικών δειγμάτων. Για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο σταθερής έκφρασης 14:3:3. Οι μπάρες σφάλματος υποδεικνύουν τη διακύμανση των επιπέδων έκφρασης ανάμεσα στα δύο βιολογικά δείγματα.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε παροδική αποσιώπηση του γονιδίου για να παρατηρηθεί τυχόν επίδρασή του στα έντομα.

4.2 Παροδική σίγηση του γονιδίου yellow

Με βάση το πρότυπο έκφρασης του γονιδίου πραγματοποιήθηκε παροδική σίγηση του και απομόνωση ιστών την μέρα με την μεγαλύτερη έκφραση (5^η μέρα) και ημέρα που γίνεται η σύζευξη (7^η μέρα) σε αρσενικά έντομα.

Μήτρα για τη δημιουργία δίκλωνων τμημάτων RNA (dsRNA) αποτέλεσε το προϊόν ενίσχυσης cDNA, το οποίο προέκυψε μετά από αντίστροφη μεταγραφή του RNA βοηθητικών αδένων και εκφορητικού αγωγού αρσενικών εντόμων 7^{ης} ημέρας. Απαραίτητο βήμα για την ενίσχυση του επιθυμητού τμήματος ήταν ο σχεδιασμός εκκινητών μέσω του προγράμματος E-RNAi, που να φέρουν στο 5' άκρο τους την αλληλουχία του T7 υποκινητή. Η αλληλουχία αυτή απαιτείται ώστε η T7 πολυμεράση να μπορέσει να ξεκινήσει τη διαδικασία της μεταγραφής. Στη συνέχεια, τα προϊόντα της PCR ηλεκτροφορήθηκαν με σκοπό να γίνει



Εικόνα 14: Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης του PCR προϊόντος yellow (σειρά: Ladder, πυκνό dsyellow, 1:10 dsyellow, 1:10 dsGFP).

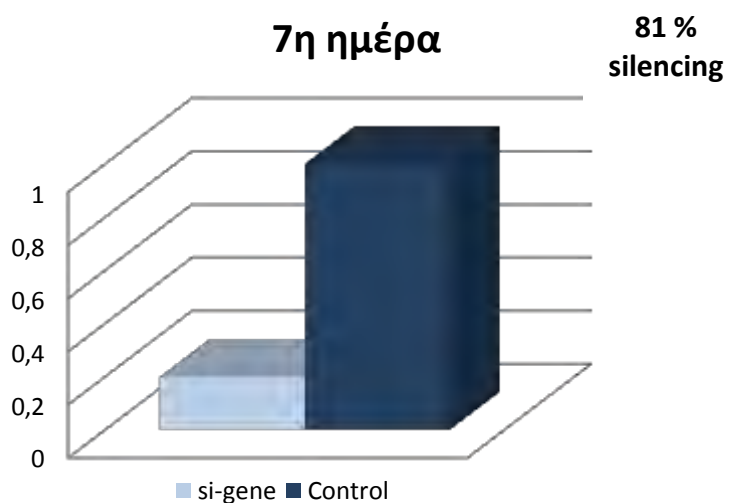
ποσοτικοποίηση και να διασφαλιστεί ότι δεν υπάρχουν παραπροϊόντα. Από την ποσοτικοποίηση σύμφωνα με το μάρτυρα μοριακού βάρους προέκυψε ότι η συγκέντρωση του προϊόντος ενίσχυσης για το γονίδιο yellow είναι 500ng/μl (Εικόνα 14).

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε έγχυση δίκλωνων τμημάτων RNA (dsRNA) του υπό μελέτη γονιδίου στην αιμόλεμφο των αρσενικών, τις ημέρες μηδέν και ένα. Ως δείγμα ελέγχου (control) χρησιμοποιήθηκε ίδιος αριθμός εντόμων, στα οποία εγχύθηκε δίκλωνο τμήμα RNA του γονιδίου GFP (dsGFP). Το γονίδιο αυτό είναι ιδανικό ως τέτοιο δείγμα καθώς δεν παρουσιάζει ομολογία με το γονιδίωμα του δάκου και συνεπώς οποιαδήποτε αλλαγή παρατηρηθεί στα έντομα που έχει γίνει η έγχυση του dsRNA του θα οφείλεται στον χειρισμό των εντόμων κατά την πειραματική διαδικασία και όχι στη σίγηση. Προκειμένου να ελεγχθεί η επιτυχία της διαδικασίας αποσιώπησης του γονιδίου *yellow*, απομονώθηκαν ιστοί βοηθητικών αδένων πέντε ημέρες μετά την έγχυση του dsRNA. Η μέρα αυτή επιλέχθηκε διότι την πέμπτη ημέρα το γονίδιο παρουσιάζει το μέγιστο της έκφρασής του. Επιπλέον, λήφθηκε δείγμα και την έβδομη ημέρα η οποία είναι η ημέρα διεξαγωγής των πειραμάτων σύζευξης, ώστε να είναι γνωστό το επίπεδο έκφρασης του γονιδίου και να μπορούν να ερμηνευθούν πιο ολοκληρωμένα τυχόν φαινοτυπικές διαφορές.

Στα παρακάτω γραφήματα απεικονίζεται η έκφραση του γονιδίου *yellow* σε αρσενικά έντομα που δέχθηκαν ένεση με το *dsyellow* σε σύγκριση με τα αρσενικά έντομα που ενέθηκαν με *dsGFP*. Παρατηρούμε ότι την πέμπτη ημέρα η έκφραση του γονιδίου έχει μειωθεί κατά 46% (Γράφημα 2). Την έβδομη μέρα, το γονίδιο συνεχίζει να παρουσιάζει μειωμένη έκφραση σε ποσοστό 81% (Γράφημα 3). Για το ποσοστό της πέμπτης ημέρας ήταν διαθέσιμα δύο βιολογικά δείγματα, ενώ για την έβδομη ένα.



Γράφημα 2: Επίπεδα έκφραση του γονιδίου *yellow* σε αρσενικά έντομα *B. oleae* την 5η ημέρα.

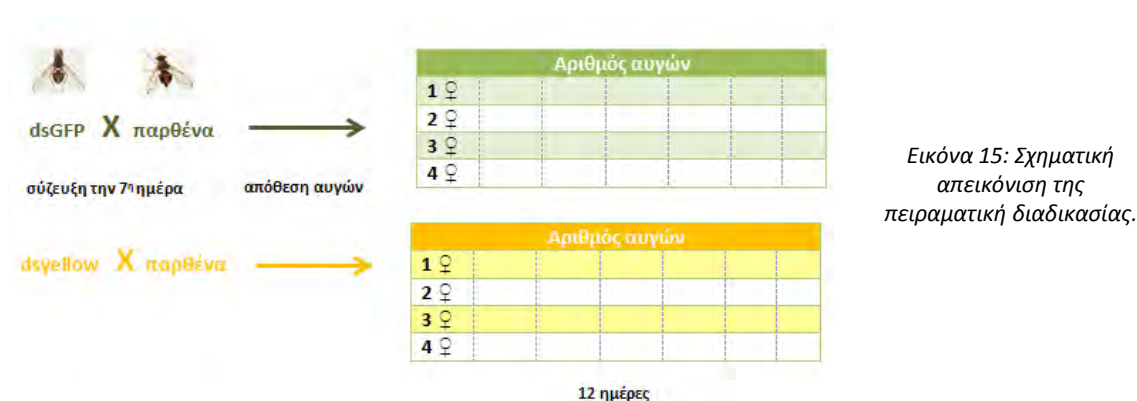


Γράφημα 3: Επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *yellow* σε αρσενικά άτομα *B. oleae* την 7η ημέρα.

4.3 Μελέτη επίδρασης της αποσιώπησης του γονιδίου *yellow* σε συζευγμένα θηλυκά

Για να εξεταστεί αν το ποσοστό αποσιώπησης του γονιδίου *yellow* είναι ικανό να μειώσει την ωοαπόθεση των θηλυκών, πραγματοποιήθηκε σύζευξη παρθένων θηλυκών μεταξύ αρσενικών στα οποία είχε γίνει έγχυση το *dsyellow* και control αρσενικών.

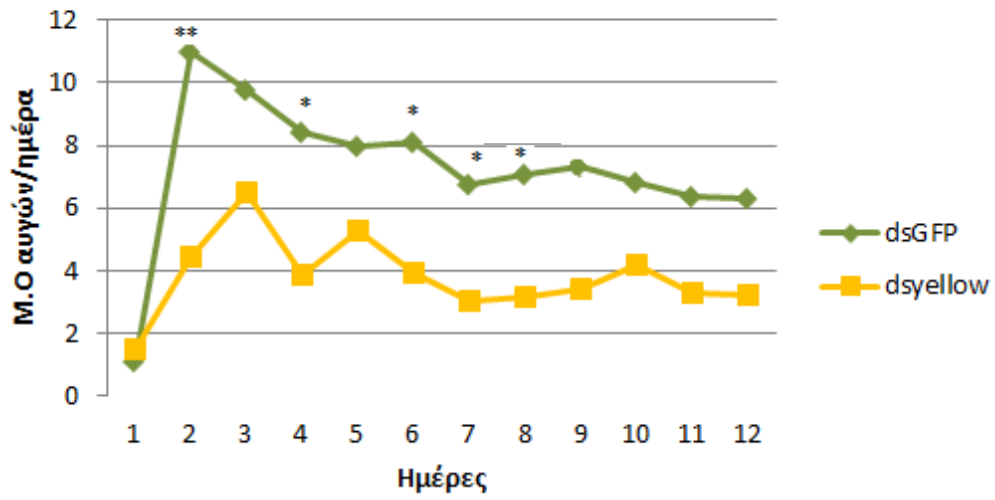
Αρχικά, για την διεξαγωγή του πειράματος ήταν απαραίτητος ο διαχωρισμός των αρσενικών και θηλυκών εντόμων την ημέρα μεταμόρφωσής τους από νύμφες και η μετέπειτα διατήρησή τους σε διαφορετικά κλουβιά. Την έβδομη ημέρα, κατά τις απογευματινές ώρες έντομα και των δύο φύλων ελευθερώνονται σε ένα κλουβί προκειμένου να συζευχθούν. Τα έντομα που πραγματοποιούσαν σύζευξη απομονώνονταν από τον υπόλοιπο πληθυσμό για να μην αναμιχθούν με τα μη συζευγμένα. Για να θεωρηθεί το ζευγάρι επιτυχημένο πρέπει να διαρκέσει τουλάχιστον μία ώρα. Αφού ολοκληρωθεί η σύζευξη, τα θηλυκά έντομα απομονώνονται σε ξεχωριστά κλουβιά. Ακολουθεί η καταγραφή της ωοαπόθεσης για διάστημα δώδεκα ημερών. Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε παρουσιάζεται σχηματικά στην εικόνα 15.



Εικόνα 15: Σχηματική απεικόνιση της πειραματική διαδικασίας.

Το διάγραμμα που ακολουθεί (Γράφημα 4) έχει προκύψει από τη σύγκριση του μέσου όρου απόθεσης αυγών ανά ημέρα είκοσι επτά θηλυκών των δύο ομάδων. Φαίνεται ότι η μειωμένη ωοαπόθεση διατηρείται όλο το διάστημα των δώδεκα ημερών, με τη μεγαλύτερη στατιστική σημαντικότητα να σημειώνεται τη δεύτερη, την τέταρτη την έκτη, την έβδομη και την όγδοη ημέρα. Η στατιστική σημαντικότητα των αποτελεσμάτων καθορίστηκε μέσω του προγράμματος Graphpad prism 7 και απεικονίζεται με *, για $p < 0,05$. Επιπλέον, αξίζει να σημειωθεί ότι παρατηρήθηκε η αναλογία φύλου και δεν υπήρξε σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων.

Ωοαπόθεση



Γράφημα 4: Μέσος όρος αυγών ανά ημέρα θηλυκών που έχουν συζευχθεί με αρσενικά στα οποία έγινε έγχυση dsyellow και dsGFP. Το * χρησιμοποιείται ως ένδειξη στατιστικής σημαντικότητας για $p < 0,05$.

5. Συζήτηση

Ο δάκος της ελιάς, *Bactrocera oleae*, είναι ο κυριότερος εχθρός των ελαιόκαρπων και αποτελεί έντομο μεγάλης οικονομικής σημασίας λόγω των ποιοτικών και ποσοτικών καταστροφών που προκαλεί στις καλλιέργειες. Έως σήμερα, η αντιμετώπισή του περιλαμβάνει συμβατικά μέσα (παγίδες, ψεκασμοί με παρασιτοκτόνα), τα οποία δεν είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικά και φιλικά προς το περιβάλλον. Επομένως, προκύπτει η ανάγκη για σχεδιασμό νέων εξειδικευμένων μεθόδων καταπολέμησης του δάκου. Πιστεύεται ότι η μελέτη του αναπαραγωγικού του συστήματος μπορεί να αποτελέσει τη βάση για την εύρεση μοριακών στόχων, η εκμετάλλευση των οποίων πιθανόν να οδηγήσει σε μειωμένη αναπαραγωγική ικανότητα και κατ' επέκταση στον έλεγχο του πληθυσμού του. Τέτοια μόρια κλειδιά θα μπορούσαν να αποτελέσουν οι πρωτεΐνες των βοηθητικών αδένων (Acps) του αναπαραγωγικού συστήματος των αρσενικών. Οι πρωτεΐνες αυτές μεταφέρονται στα θηλυκά μέσω της σύζευξης, επηρεάζοντας τη μετασυζευκτική συμπεριφορά και φυσιολογία τους. Συνεπώς, η δημιουργία μεθόδων που να βασίζονται στην απουσία αυτών των πρωτεϊνών ίσως να οδηγήσουν στην ύπαρξη ενός φαινοτύπου που να έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του πληθυσμού. Επιθυμητά χαρακτηριστικά αυτού του φαινοτύπου μπορούν να αφορούν τον χρόνο σύζευξης, την απόθεση αυγών, την επιτυχία σύζευξης, τον αριθμό των προνυμφών και των ενηλίκων που προκύπτουν, τον επιτυχή σχηματισμό ενηλίκων εντόμων και την αναλογία φύλου των απογόνων.

Στόχος αυτής της διπλωματικής εργασίας είναι η μελέτη και η διερεύνηση του ρόλου του γονιδίου *yellow* στο αναπαραγωγικό σύστημα του δάκου της ελιάς. Το γονίδιο αυτό επιλέχθηκε από διαθέσιμα δεδομένα RNAseq του εργαστηρίου, τα οποία προέκυψαν από αναλύσεις των μεταγράφων πριν και δώδεκα ώρες μετά τη σύζευξη, σε αναπαραγωγικό ιστό αρσενικών. Όπως αναλύθηκε και στην εισαγωγή, το γονίδιο *yellow* επηρεάζει την αναπαραγωγή των αρσενικών εντόμων στη *Drosophila melanogaster* καθώς οι μεταλλάξεις του μεταβάλουν την συμπεριφορά των αρσενικών κατά την πολιορκία και τη σύζευξη, μειώνοντας τελικά την επιτυχία του ζευγαρώματος. Ο τρόπος που γίνεται αυτό δεν είναι γνωστός και υπάρχουν πολλές υποθέσεις σχετικά με την λειτουργία του.

Σε αυτή τη διπλωματική εργασία γίνεται η πρώτη αναφορά του γονιδίου αυτού σε αναπαραγωγικό ιστό αρσενικών εντόμων *Bactrocera oleae*. Με την χρήση της αλληλουχίας του γονιδίου στο δάκο σχεδιάστηκαν εκκινητές για τη δημιουργία του προτύπου έκφρασής του. Για το σκοπό αυτό συλλέχθηκαν αναπαραγωγικοί ιστοί βοηθητικών αδένων και εκφορητικού αγωγού από την ημέρα που εκκολάπτεται το ενήλικο έντομο (ημέρα μηδέν), έως την ημέρα που θεωρείται σεξουαλικά ώριμο (ημέρα επτά).

Στο πρότυπο έκφρασης παρατηρήθηκε ότι τις ημέρες μηδέν και ένα υπάρχει ελάχιστη έκφραση του γονιδίου, η οποία σταδιακά αυξάνεται μέχρι και την τρίτη

ημέρα. Την τέταρτη ημέρα παρουσιάζει μια μικρή ελάττωση, ενώ την πέμπτη ημέρα φαίνεται ότι το γονίδιο αποκτά το μέγιστο της έκφρασής του. Την έκτη ημέρα τα επίπεδα έκφρασης μειώνονται ξανά, ενώ την έβδομη υπάρχει μια μικρή αύξηση (Γράφημα 1). Σύμφωνα με αυτές τις παρατηρήσεις μπορούμε να υποθέσουμε ότι η πρωτεΐνη που παράγει το γονίδιο αυτό είναι απαραίτητη για την επιτυχία της σύζευξης. Η παρουσία της στο αναπαραγωγικό σύστημα εξασφαλίζει ότι όταν έρθει η στιγμή της σύζευξης θα είναι διαθέσιμη είτε να μεταφερθεί στα θηλυκά, είτε να επηρεάσει την αναπαραγωγική διαδικασία στα αρσενικά. Επιπλέον, την ημέρα που το έντομο ωριμάζει σεξουαλικά υπάρχει ένδειξη ότι η πρωτεΐνη ίσως αρχίζει να παράγεται ξανά. Αυτό συμβαδίζει με το γεγονός ότι οι αρσενικοί δάκοι είναι πολυγαμικοί και επομένως ίσως είναι απαραίτητη η παρουσία της πρωτεΐνης στο αναπαραγωγικό σύστημα σε όλη τη διάρκεια της σεξουαλικής ζωής του εντόμου.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε παροδική αποσιώπηση του γονιδίου για να παρατηρηθεί τυχόν φαινοτυπική επίδρασή του στα έντομα. Κατά την παροδική σίγηση, έγινε έγχυση δίκλωνων τμημάτων RNA (dsRNA) τις ημέρες μηδέν και ένα, χρησιμοποιώντας ως γονίδιο ελέγχου το GFP. Κατόπιν, λήφθηκαν δείγματα ιστών βοηθητικών αδένων τις ημέρες πέντε (ημέρα μεγαλύτερης έκφρασης σύμφωνα με το πρότυπο έκφρασης του γονιδίου) και επτά (ημέρα πραγματοποίησης της σύζευξης) ώστε να διαπιστωθεί αν η σίγηση ήταν αποτελεσματική. Παρατηρήθηκε επιτυχία της μεθόδου σε ποσοστό 46% την πέμπτη ημέρα και 81% την έβδομη ημέρα (Γράφημα 2 και 3). Το ποσοστό της πέμπτης ημέρας προήλθε από δύο βιολογικά δείγματα ενώ της έβδομης από ένα. Το αυξημένο ποσοστό της έβδομης ημέρας προκαλεί προβληματισμό καθώς θα ήταν αναμενόμενο με το πέρασμα των ημερών να μειώνεται η επίδραση των δίκλωνων τμημάτων και όχι να αυξάνεται. Αυτό πιθανώς να οφείλεται στο ότι το αποτέλεσμα αυτό είναι από ένα βιολογικό δείγμα καθώς δεν υπήρχε αρκετός αριθμός εντόμων για την συλλογή δυο βιολογικών δειγμάτων ή από τεχνικά λάθη κατά τη διαδικασία της απομόνωσης του RNA που είχαν σαν αποτέλεσμα την μειωμένη ποσότητα cDNA στο συγκεκριμένο δείγμα. Η συλλογή τουλάχιστον δυο βιολογικών δειγμάτων είναι απαραίτητη για την διεξαγωγή στατιστικά σημαντικών αποτελεσμάτων.

Έπειτα, πραγματοποιήθηκε σύζευξη των αρσενικών που είχαν ενεθεί με το dsGFP και το *dsyellow* με παρθένα θηλυκά, με σκοπό να διαπιστωθεί αν το ποσοστό αποσιώπησης που επιτεύχθηκε είναι ικανό να παρεμποδίσει την αναπαραγωγική διαδικασία. Όπως έχει αναφερθεί, σε knock-out στελέχη της *Drosophila melanogaster* το γονίδιο επηρεάζει σημαντικά τη συμπεριφορά του αρσενικού κατά τη σύζευξη (Badstock 1956, Drapeau et al., 2005). Στη συγκεκριμένη περίπτωση δεν παρατηρήθηκε κάποια διαφορά στη συμπεριφορά του αρσενικού, κάτι που ίσως οφείλεται είτε στη μη σωστή παρατήρηση της σύζευξης είτε στο ότι πραγματοποιήθηκε παροδική σίγηση του γονιδίου σε ενήλικα έντομα, ενώ οι νευρώνες που καθορίζουν την “αρρενωπότητα” και έχει δειχθεί ότι σχετίζονται με

την πρωτεΐνη *yellow* σχηματίζονται στην προνύμφη τρίτου σταδίου (Drapeau et al., 2002). Επιπλέον, σε knock-out έντομα του ίδιου εντόμου παρατηρείται πιο ανοιχτός χρωματισμός στο σώμα του εντόμου (Lindsley et al., 1968 και Nash, 1976). Στη δική μας μελέτη δεν φάνηκε κάτι τέτοιο μιας και η σίγηση του γονιδίου ήταν παροδική, έγινε σε ενήλικα έντομα και τα προϊόντα του μονοπατιού σύνθεσης της μελανίνης είχαν ήδη παραχθεί.

Τα συζευγμένα θηλυκά τοποθετήθηκαν σε ξεχωριστά κλουβιά και καταγράφηκε η ωοαπόθεσή τους για 12 συνεχόμενες ημέρες (Γράφημα 4). Όλο αυτό το χρονικό διάστημα, φαίνεται ότι η ωοαπόθεση των θηλυκών που συζεύχθηκαν με αρσενικά *dsyellow* είναι μειωμένη με στατιστικά σημαντική διαφορά τις ημέρες δύο, τέσσερα, έξι, επτά και οκτώ. Ο τρόπος που γίνεται αυτό δεν μπορεί να γίνει γνωστός από τα συγκεκριμένα δεδομένα. Ίσως η πρωτεΐνη *yellow* να μεταφέρεται στα θηλυκά κατά τη σύζευξη προκαλώντας μια σειρά αλληλεπιδράσεων στο έντομο που έχουν ως αποτέλεσμα τη μετασυζευκτική δραστηριότητα των θηλυκών π.χ αυξημένη ωοαπόθεση, είτε απλά να χρησιμοποιείται ως πρωτεΐνη-σκαλωσιά για τη μεταφορά σημαντικών πρωτεϊνών των βοηθητικών αδένων στο θηλυκό. Μια άλλη περίπτωση είναι η πρωτεΐνη *yellow* να παραμένει στο αρσενικό έντομο και να συμμετέχει στην παραγωγή των εκκριτικών υγρών των βοηθητικών αδένων. Έτσι, η ελάττωση της έκφρασης του γονιδίου πιθανώς να οδηγεί στην ύπαρξη λιγότερο εμπλουτισμένων και λειτουργικών εκκριτικών υγρών, έχοντας ως αποτέλεσμα τη μειωμένη γονιμότητα των αρσενικών σε σχέση με τα έντομα αγρίου τύπου.

Συμπερασματικά, η σίγηση του γονιδίου *yellow* σε αρσενικά έντομα φαίνεται να μειώνει την ωοαπόθεση των θηλυκών, αναδεικνύοντάς το ως πιθανό μοριακό στόχο για το σχεδιασμό καινοτόμων μεθόδων καταπολέμησης.

⇒ Μελλοντικές προοπτικές

Από τα παραπάνω δεδομένα προκύπτει ότι απαιτείται περαιτέρω μελέτη του γονιδίου *yellow* για να διασαφηνιστεί πλήρως ο ρόλος του. Αρχικά, το πείραμα πρέπει να επαναληφθεί χρησιμοποιώντας μεγαλύτερο αριθμό εντόμων. Κρίνεται απαραίτητη η συλλογή περισσότερων βιολογικών δειγμάτων για τον καθορισμό του ακριβούς ποσοστού αποσιώπησης του γονιδίου μέσω ενέσεων τόσο την ημέρα μέγιστης έκφρασης, όσο και την ημέρα που πραγματοποιείται η σύζευξη. Ικανοποιητικό δείγμα θεωρείται εκείνο που έχει τουλάχιστον 50 έντομα σε κάθε ομάδα (ομάδα που ενίεται με το *dsyellow* και ομάδα που ενίεται με το *dsGFP*).

Σε περίπτωση που το ποσοστό μείωσης της έκφρασης του γονιδίου δεν είναι ικανοποιητικό, η πραγματοποίηση αλλαγών πιθανώς να οδηγήσει στην αύξηση της αποσιώπησης του. Αυτό ίσως είναι καθοριστικό για τη διεξαγωγή διαφορετικών

συμπερασμάτων καθώς το εναπομείναν ποσοστό πρωτεΐνης (μετά από τη μια φορά σίγησης που πραγματοποιήθηκε σε αυτήν τη διπλωματική εργασία), μπορεί να είναι αρκετό για να επιτελέσει ένα μέρος της βιολογικής της λειτουργίας. Στην αύξηση της αποσιώπησης θα μπορούσε να συμβάλει η α) επανάληψη της έγχυσης του dsRNA την τέταρτη ημέρα (δηλαδή την ημέρα πριν αποκτήσει το γονίδιο τη μέγιστη έκφραση) β) έγχυση περισσότερων dsRNAs σχεδιασμένων με βάση διαφορετικά μέρη του γονιδίου προκειμένου να αυξηθούν οι στόχοι σίγησης και να γίνει αποτελεσματικότερη αποσιώπηση της περιοχής, γ) έγχυση dsRNAs σχεδιασμένων στη ρυθμιστική περιοχή επιτυχίας σύζευξης (mating success regulatory sequence – MRS) που έχει εντοπιστεί στη *Drosophila*. Η περιοχή αυτή προέκυψε από σύγκριση 12 υπομορφικών μεταλλαγμάτων για το γονίδιο *yellow* και είναι απαραίτητη για την επιτυχημένη σύζευξη των αρσενικών (Drapeau et al., 2005).

Έγχυση dsRNA θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί και σε άλλο αναπτυξιακό στάδιο όπως στο στάδιο της προνύμφης. Σύμφωνα με τον Drapeau (2005) οι νευρώνες που διαμορφώνουν την αρρενωπότητα του αρσενικού σχηματίζονται στο τρίτο στάδιο προνύμφης. Συνεπώς σίγηση στη συγκεκριμένη χρονική στιγμή ίσως να ενισχύσει την φαινοτυπική επίδραση του γονιδίου στα ενήλικα αρσενικά κατά τη σύζευξη.

Επιπλέον, συνδυαστική αποσιώπηση του γονιδίου *yellow* με ένα γονίδιο που επηρεάζει με διαφορετικό τρόπο τη γονιμότητα των αρσενικών (π.χ. γονίδια που συμμετέχουν στην κινητικότητα σπέρματος ή που κωδικοποιούν πρωτεΐνες απαραίτητες για τη λειτουργικότητα των MAGs) θα οδηγούσε στην εμφάνιση εντονότερου φαινοτύπου στην ωοαπόθεση των θηλυκών.

Για τον καθορισμό της φαινοτυπικής επίδρασης της αποσιώπησης του γονιδίου και την εξακρίβωση του ρόλου του στην επιτυχία της αναπαραγωγής θα βοηθούσε η ταυτόχρονη καταγραφή των αυγών, των νυμφών και της αναλογίας φύλου των απογόνων. Η χρήση καμερών υψηλής ανάλυσης και καταγραφή της διαδικασίας της σύζευξης για κάθε ζευγάρι ξεχωριστά θα συνέβαλε στην λεπτομερέστερη παρατήρηση της συμπεριφοράς του αρσενικού κατά τη σύζευξη καθώς κάποιες αλλαγές στη συζευκτική συμπεριφορά του ίσως να μην είναι ορατές στο ανθρώπινο μάτι.

Η επίδραση του γονιδίου στην ωοαπόθεση όπως καταγράφηκε στην συγκεκριμένη εργασία δίνει το έναυσμα για να καταστεί το γονίδιο *yellow* υποψήφιο μόριο-στόχος για το σχεδιασμό νέων μεθόδων ελέγχου του δάκου. Ως εναλλακτική της SIT και της RIDL θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί η παροδική σίγηση του γονιδίου μέσω RNAi ή η απενεργοποίησή του μέσω CRISPR-Cas9, ώστε να απελευθερωθούν αρσενικά με μικρότερη αναπαραγωγική ικανότητα σε σχέση με τα αγρίου τύπου. Όμως, το συγκεκριμένο γονίδιο δεν θα μπορούσε να αποτελέσει μοναδικό στόχο για τον σχεδιασμό αυτών των μεθόδων. Συγκεκριμένα, η δημιουργία knock-out

αρσενικών για το *yellow* και η μη παρουσία της πρωτεΐνης στο νευρικό σύστημα στο τρίτο προνυμφικό στάδιο της *Drosophila* μειώνει την ανταγωνιστικότητα των αρσενικών κατά την πολιορκία των θηλυκών σε σχέση με τα αγρίου τύπου έντομα (Drapeau et al., 2005). Αυτό το χαρακτηριστικό δεν είναι επιθυμητό αφού στα πλαίσια μιας εναλλακτικής μεθόδου καταπολέμησης τα αρσενικά που εξαπολύονται θα πρέπει να είναι ανταγωνιστικά έναντι των αρσενικών αγρίου τύπου, αλλά και για να εκδηλωθεί ο φαινότυπος της αποσιώπησης του γονιδίου (μειωμένη ωοαπόθεση θηλυκών) πρέπει να υπάρξει σύζευξη. Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, ο σχεδιασμός μίας μεθόδου βασισμένης στο σύστημα CRISPR-Cas9 προσφέρει ευελιξία και αποτελεί μια ενδιαφέρουσα πρόταση. Η κατασκευή μιας κασέτας, στην οποία η παραγωγή της νουκλεάσης Cas9 ελέγχεται από τον υποκινητή ενός γονιδίου που εκφράζεται αποκλειστικά στο αναπαραγωγικό σύστημα του ενήλικου εντόμου, θα έχει ως αποτέλεσμα τα διαγονιδιακά αρσενικά να έχουν την ίδια δυνατότητα σύζευξης με τα αγρίου τύπου και παράλληλα ως ενήλικα να μην παράγουν στο αναπαραγωγικό τους σύστημα την πρωτεΐνη *yellow*.

Αξίζει να σημειωθεί ότι το γονίδιο *yellow* ήταν το πρώτο που μελετήθηκε στη *Drosophila melanogaster* με σκοπό να φανεί αν το σύστημα CRISPR μπορεί να εφαρμοστεί με επιτυχία, λόγω του διαφορετικού χρωματισμού που προκαλούν οι μεταλλάξεις του στα έντομα (Basset et al., 2013). Επιπλέον, μελετήθηκε το αποτέλεσμα της σίγησης του γονιδίου στο αναπαραγωγικό σύστημα μέσω του συστήματος CRISPR-Cas9, σε θηλυκά έντομα *Anopheles gambiae* και φάνηκε ότι οδηγεί σε στειρότητα (Hammond et al., 2015). Επομένως, ενδιαφέρον θα παρουσίαζε να γίνει μία αντίστοιχη μελέτη σε αρσενικά και θηλυκά έντομα *Bactrocera oleae* με σκοπό τη δημιουργία μια εναλλακτικής μεθόδου ελέγχου του πληθυσμού του.

6.Βιβλιογραφία

1. Agrawal N, Dasaradhi PVN, Mohmmmed A, Malhotra P, Bhatnagar RK, Mukherjee SK. 2003. RNA interference: Biology, Mechanism and Applications, Microbiol. Mol. Biol. Rev. December vol. 67 no. 4 657-685
2. Alphey L, Nimmo D, O'Connell S, Alphey N. 2008. Insect Population Suppression Using Engineered Insects. Advances in Experimental Medicine and Biology 627: 93-103
3. Alphey L. 2007. Engineering insects for the Sterile Insect Technique. In: Area-wide control of insect pests: from research to field implementation (Vreysen, M, Robinson, A and Hendrichs, J, eds.). pp. 51-60. Springer, Dordrecht, The Netherlands
4. Ant T, Koukidou M, Rempoulakis P, Gong H, Economopoulos A, Vontas J, Alphey L. 2012. Control of the olive fruit fly using genetics-enhanced sterile insect technique. BMC Biology, 10:51
5. Asquith KL, Harman AJ, McLaughlin EA, Nixon B, Aitken RJ. Localization and significance of molecular chaperones, heat shock protein 1, and tumor rejection antigen gp96 in the male reproductive tract and during capacitation and acrosome reaction. Biology of reproduction. 2005;72(2):328.
6. Atkinson P. W. 2002. Genetic engineering in insects of agricultural importance. Insect Biochemistry and Molecular Biology 32: 1237-42
7. Avila FW, Sirot LK, LaFlamme BA, Rubinstein CD, Wolfner MF. Insect seminal fluid proteins: identification and function. Annu. Rev. Entomol. 56(2011) 21–40
8. Baer B, Morgan ED, Schmid-Hempel P. A nonspecific fatty acid within the bumblebee mating plug prevents females from remating. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2001;98(7):3926
9. Bai H, Gelman DB, Palli SR. Mode of action of methoprene in affecting female reproduction in the African malaria mosquito, Anopheles gambiae. Pest management science. 2010;66(9):936-43.
10. Baker R, Herbert RH, Howse PE, Jones OT, Francke W, Reith W (1980) Identification and synthesis of the major sex pheromone of the olive fly, Dacus oleae. J Chem Soc Chem Commun 1:52–54
11. Barr AR. 1974. Symposium on reproduction of arthropods of medical and veterinary importance. Reproduction in Diptera of medical importance with special reference to mosquitoes. J.Med. Ent. Vol. 11, no. 1: 35-40
12. Bartlett, J. M. S.; 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
13. Basso da Silva L et al. 2005. Mating activity of *yellow* and *sepia* Drosophila willistoni mutants

14. Batstock M. 1956. A gene mutation which changes a behavior pattern. *Evolution*, Vol. 10, No. 4 (Dec., 1956), pp. 421-439
15. Benedict MQ, Robinson AS. 2003. The first releases of transgenic mosquitoes: an argument for the sterile technique. *TRENDS in Parasitology* Vol.19 No.8 August
16. Benelli G, Canale A, Bonsignori G, Ragni G, Stefanini C, Raspi A. 2012. Male wing vibration in the mating behavior of the olive fruit fly *Bactrocera oleae* (Rossi) (Diptera: Tephritidae). *J Insect Behav* 25:590–603
17. Benelli G. 2014. Aggressive Behavior and Territoriality in the Olive Fruit Fly, *Bactrocera oleae* (Rossi) (Diptera: Tephritidae): Role of Residence and Time of Day. *Journal of Insect Behavior* 27:145-161
18. Briceno RD, Eberhard WG, Vilardi JC, Liedo P, Shelly TE. 2002. Variation in the intermittent buzzing songs of male medflies (Diptera: Tephritidae) associated with geography, mass-rearing, and courtship success. *Florida Entomologist* 85:32–40
19. Bryan JH. Results of consecutive matings of female *Anopheles gambiae* species B with fertile and sterile males. 1968
20. Burnet B, Wilson R. 1980. Pattern mosaicism for behavior controlled by the *yellow* locus in *Drosophila melanogaster*. *Genet. Res., Camb.* 36, pp. 235-247
21. Burnet B. Et al., 1974. Activity and sexual behaviour in *Drosophila melanogaster*. *Behavior Genetics* 4, 227-235
22. Bushland RC, Lindquist AW, and Knipling EF. 1955. Eradication of Screw-Worms through Release of Sterilized Males. *Science* 122: 287-8
23. Chapman T, Bangham J, Vinti G, Seifried B, Lung O, Wolfner MF, et al. The sex peptide of *Drosophila melanogaster*: female post-mating responses analyzed by using RNA interference. *Proceedings of the National Academy of Sciences*.
24. Chapman T, Davies SJ. Functions and analysis of the seminal fluid proteins of male *Drosophila melanogaster* fruit flies. *Peptides*. 2004;25(9):1477-90
25. Chen PS, Stumm-Zollinger E, Aigaki T, Balmer J, Bienz M, Bohlen P. A male accessory gland peptide that regulates reproductive behavior of female *D. melanogaster*. *Cell*. 1988;54(3):291-8
26. Chomczynski P (1993) A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *BioTechniques*,15, 532-537
27. Chomczynski P and Sacchi N (1987) Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*,162, 156-159
28. Clark GF. Molecular models for mouse sperm-oocyte binding. *Glycobiology*. 2011;21:3-5
29. Clements AN. The biology of mosquitoes, Vol. 1, development. Nutrition and Reproduction Chapman & Hall. 1992
30. Coffin JM. 1997. Overview of Reverse transcription. Cold Spring Harbor Laboratory Press

31. Craig GB. Mosquitoes: female monogamy induced by male accessory gland substance. *Science*. 1967;156(3781):1499
32. Daane KM, Marshall WJ. 2010. Olive Fruit Fly: Managing an Ancient Pest in Modern Times. *Annu. Rev. Entomol.* 55:151–69
33. Dotti I, Bonin S. 2011. Guidelines for Molecular Analysis in Archive tissues, Springer-Verlag Berlin Heidelberg
34. Dow M. 1976. Selection for mating success of *yellow* mutant *Drosophila melanogaster*: Behavioral Changes. *Behavioral Biology* 16, 233-239, Abstract No. 5169
35. Drapeau M. 2003. A novel hypothesis on the biochemical role of the *Drosophila Yellow* protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 311 (2003) 1–3
36. Drapeau MD, Cyran SA, Viering MM, Geyer PK, Long AD. 2006. A cis-regulatory sequence within the *yellow* locus of *Drosophila melanogaster* required for normal male mating success. *Genetics* 172: 1009–1030
37. Drapeau MD, Radovic A, Wittkopp PJ, Long AD. 2002. A gene necessary for normal male courtship *yellow*, acts downstream of fruitless in the *Drosophila melanogaster* larval brain. *Inc. J Neurobiol* 55: 53–72
38. Dyck A, Hendrichs J, Robinson AS. 2005. *The Sterile Insect Technique: Principles and Practice in Area- Wide Integrated Pest Management* Heidelberg. Germany: Springer
39. Eberhard W. 2005. Threading a needle with reinforced thread: intromission in *Ceratitis capitata* (Diptera, Tephritidae). *Can. Entomol.* 137: 174–181
40. Economopoulos AP, Avtzis N, Zervas G, Tsitsipis J, Haniotakis G, Tsiropoulos G, Manoukas A (1977). Experiments on control of olive fly, *Dacus oleae* (Gmelin), by combined effect of insecticides and releases of gamma-ray sterilized insects. *J Applied Entomol* 83:201-215
41. Economopoulos AP. 1979. Prospects for the controlling of *Dacus oleae* (Gmelin) (Diptera-Tephritidae) by methods that do not involve insecticides. The sterile insect release technique and olfactory visual traps, integrated approach
42. Economopoulos AP: The olive fruit fly, *Bactrocera (Dacus) oleae* (Gmelin) (Diptera: Tephritidae): its importance and control; previous SIT research and pilot testing. International Atomic Energy Agency, Vienna, Austria; 2002
43. Ferguson LC, Green J, SurrIDGE A, Jiggins CD. 2011. Evolution of the insect *Yellow* gene family. *Mol. Biol. Evol.* 28(1):257–272
44. Fletcher BS, Kapatos ET. 1983. The influence of temperature, diet and olive fruits on the maturation rates of female olive flies at different times of the year. *Entomol. Exp. Appl.* 33:244–52
45. Franz G, Kerremans P, Rendon P, Hendrichs J. 1996. Development and application of genetic sexing systems based for the Mediterranean fruit fly based on a temperature sensitive lethal, pp. 185–196 in *Fruit Fly Pests*. A

- World Assessment of Their Biology and Management, edited by B.A. McPheron & G.J. Steck, St. Lucie Press
46. Fu G, Condon CC, Epton MJ, Gong P, Jin L, Condon GC, Morrison NI, Dafa'alla TH, Alphey L. 2007. Female-specific insect lethality engineered using alternative splicing. *Nature Biotechnology*, Vol. 25, No.3: 353-357
 47. Fuchs MS, Craig Jr GB, Despommier DD. The protein nature of the substance inducing female monogamy in *Aedes aegypti*. *Journal of Insect Physiology*. 1969;15(4):701-9
 48. Fuchs MS, Craig Jr GB, Hiss EA. The biochemical basis of female monogamy in mosquitoes. I. Extraction of the active principle from *Aedes aegypti*. *Life sciences*. 1968;7(16):835
 49. Fuchs MS, Hiss EA. The partial purification and separation of the protein components of matrone from *Aedes aegypti*. *Journal of insect physiology*. 1970;16(5):931-9
 50. Geyer PK, Spana C, Corres VG. 1986. On the molecular mechanism of gypsy-induced mutations at the *yellow* locus of *Drosophila melanogaster*. *The EMBO Journal* vol.5 no. 10 pp.2657-2662
 51. Giglioli ME, Mason GF. The mating plug in anopheline mosquitoes, 1966;41:123-9
 52. Gillott C. Male accessory gland secretions: modulators of female reproductive physiology and behavior. *Annual Review of Entomology*. 2003;48(1):163-84
 53. Gioti A, Wigby S, Wertheim B, Schuster E, Martinez P, Pennington CJ et al. (2012). Sex peptide of *Drosophila melanogaster* males is a global regulator of reproductive processes in females. *Proc Biol Sci* 279 :4423 –4432.
 54. Gong P, Epton M, Fu G, Scaife S, Hiscox A, Condon K, Condon G, Morrison N, Kelly D, Dafa'alla T, Coleman P, and Alphey L. 2005. A dominant lethal genetic system for autocidal control of the Mediterranean fruitfly. *Nature Biotechnology* 23: 453-6
 55. Gould F, Schliekelman P. 2004. Population genetics of autocidal control and strain replacement. *Annual Reviews of Entomology* 49: 193-217
 56. Gromko MH, Newport MEA, Kortier MG. Sperm dependence of female receptivity to remating in *Drosophila melanogaster*. *Evolution*. 1984:1273-82
 57. Hannah A. 1953. Non-autonomy of *yellow* in gynandromorphs of *Drosophila melanogaster*, *Journal of Experimental Zoology* 123, 523–560
 58. Hazewinkel, Michiel, ed. 2001, "Student test", *Encyclopedia of Mathematics*, Springer, ISBN 978-1-55608-010-4
 59. Heifetz Y, Vandenberg LN, Cohn HI, Wolfner MF. Two cleavage products of the *Drosophila* accessory gland protein ovulin can independently induce ovulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(3):743

60. Heinrich J., and Scott M. 2000. A repressible female-specific lethal genetic system for making transgenic insect strains suitable for a sterile-release program. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 97: 8229-32
61. Hendrichs J, Ortiz G, Liedo P, Schwarz A. 1983. Six years of successful medfly program in Mexico and Guatemala, pp 353–365. In R. Cavalloro (ed.), *Proceedings, Symposium: Fruit Flies of Economic Importance*. CEC/IOBC International Symposium, 16–19 November 1982, Athens, Greece. A. A. Balkema, Rotterdam, The Netherlands
62. Hiss EA, Fuchs MS. The effect of matrone on oviposition in the mosquito, *Aedes aegypti*. *Journal of insect physiology*. 1972;18(11):2217-27
63. Inestrosa NC, Sunkel CE, Arriagada J, Godoy-Herrera R. 1996. Abnormal development of the locomotor activity in *yellow* larvae of *Drosophila*: a cuticular defect?, *Genetica* 97: 205-210
64. Kakinohama H, Miyatake T, Yamagishi M. 1997. Quality control in mass-reared melon fly after the eradication from Japan: results from artificial selection experiments. *Bulletin Agricultural Experiment Station* 18:9-17
65. Klowden MJ. 2007. Elsevier. *Physiological Systems in Insects*: 203-206
66. Klowden MJ. Sexual receptivity in *Anopheles gambiae* mosquitoes: absence of control by male accessory gland substances. *Journal of Insect Physiology*. 2001;47(7):661-6
67. Kornezos A, Chia W. 1992. Apical secretion and association of the *Drosophila yellow* gene product with developing larval cuticle structures during embryogenesis. *Mol Gen Genet* 235:397405
68. Kramer JA. 2001. Omiga: a PC-based sequence analysis tool. *Mol Biotechnol. Sep*;19(1):97-106
69. Kuba H, Kohama T, Kakinohana H, Yamagishi M, Kinjo K, Sokei Y, Nakasone T, and Nakamoto Y. 1996. The successful eradication programs of the melon fly in Okinawa, pp. 543–550. In B. A. McPheron and G. J. Steck (eds.), *Fruit fly pests. A world assessment of their biology and management*. St. Lucie Press, Delray Beach, FL, USA
70. Leahy MG, Craig GB. Accessory gland substance as a stimulant for oviposition in *Aedes aegypti* and *A. albopictus*. *Mosquito News*. 1965;25:448-52
71. Leahy SMG. Non-specificity of the male factor enhancing egg-laying in Diptera. *Journal of Insect Physiology*. 1967;13(8):1283-92
72. Leftwich PT, Bolton M, Chapman T. 2015. Evolutionary biology and genetic techniques for insect control. *Evolutionary Applications* ,Ltd 9 212–230
73. Lindsley DL, Grell EH. 1968. Genetic variations of *Drosophila melanogaster*. Publication 627, Carnegie Institute of Washington, Washington DC
74. Liu H, Kubli E. Sex-peptide is the molecular basis of the sperm effect in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(17):9929

75. Loher W, Zervas G, 1979, The mating rhythm of the olive fruit fly, *Dacus oleae* Gmelin. *Zeitschrift für Angewandte Entomologie* 88, 425–435
76. Lung O, Kuo L, Wolfner MF, *Drosophila* males transfer antibacterial proteins from their accessory gland and ejaculatory duct to their mates. *J. InsectPhysiol.* 47 (2001) 617–622
77. Lung O, Kuo L, Wolfner MF. *Drosophila* males transfer antibacterial proteins from their accessory gland and ejaculatory duct to their mates. *Journal of Insect Physiology.* 2001;47(6):617-22
78. Lung O, Wolfner MF. Identification and characterization of the major *Drosophila melanogaster* mating plug protein. *Insect Biochemistry and Molecular Biology.* 2001;31(6-7):543-51
79. Lux SA, Vilardi JC, Liedo P, Gaggi K, Calcagno GE, Munyiri FN, Vera MT et al. 2002. Effects of irradiation on the courtship behavior of medfly (*Diptera*, Tephritidae) mass reared for the sterile insect technique. *Florida Entomologist* 85:102–112
80. Maleszka R, Kucharski R. 2000. Analysis of *Drosophila yellow-b* cDNA reveals a new family of proteins related to the Royal Jelly proteins in the honeybee and to an orphan protein in an unusual bacterium *Deinococcus radiodurans*. *Biochem Biophys Res Commun* 270:773–776
81. Mancini E, Tamaro F, Baldini F, Via A, Raimondo D, George P, et al. Molecular evolution of a gene cluster of serine proteases expressed in the *Anopheles gambiae* female reproductive tract. *BMC evolutionary biology.* 2011;11(1):72
82. Manning A. A Sperm Factor Affecting the Receptivity of *Drosophila Melanogaster* Females. *Nature.* 1962;194(4825):252-3
83. Manning A. The control of sexual receptivity in female *Drosophila*. *Animal Behaviour.* 1967;15(2-3):239-50
84. Marchini D, Del Bene G, Falso LF and Dallai R. 2001. Structural organization of the copulation site in the medfly *Ceratitis capitata* (*Diptera*: Tephritidae) and observations on sperm transfer and storage. *Arthropod Structure and Development*, 30: 39–54
85. Marchini D, Del Bene G. Comparative fine structural analysis of the male reproductive accessory glands in *Bactrocera oleae* and *Ceratitis capitata* (*Diptera*, Tephritidae). *Italian Journal of Zoology.* March 2006; 73(1): 15–25
86. Margaritopoulos JT, Skavdis G, Kalogiannis N, Nikou D, Morou E, Skouras PJ, Tsitsipis JA, Vontas J: Efficacy of the pyrethroid alpha-cypermethrin against *Bactrocera oleae* populations from Greece, and improved diagnostic for an iAChE mutation. *Pest Manag Sci* 2008, 64:900–908
87. Martin A, Allen L. 2001. CRC Press. *Fruit Flies (Tephritida) Phylogeny and Evolution of Behavior*: 915

88. Martin CG, Esposito EA, Theis K, Gong P. 2005. Structure and Function in Promoter Escape by T7 RNA polymerase. *Progress in nucleic acid research and molecular biology*, vol.80, p323-347
89. Mastrangelo T, Parker AG, Jessup A, Pereira R, Orozco-Davila D, Islam A, Dammalage T, Walder JMM. 2010. A new generation of X ray irradiators for insect sterilization. *Journal of Economic Entomology*, 103(1):85-94
90. Mazomenos BE et al. 2002. Attract and kill of the olive fruit fly *Bactrocera oleae* in Greece as a part of an integrated control system. *IOBC wprs Bulletin* Vol. 25
91. McGraw L, Clark A, Wolfner M. 2008. Post-mating gene expression profiles of female *Drosophila melanogaster* in response to time and to four male accessory gland proteins. *Genetics* 179: 1395–1408
92. Meikle DB, Sheehan KB, Phillis DM, Richmond RC. Localization and longevity of seminal-fluid esterase 6 in mated female *Drosophila melanogaster*. *Journal of Insect Physiology*. 1990;36(2):93-101.
93. Murer V, Spetz JF, Hengst U, Altrogge LM, De Agostini A, Monard D. Male fertility defects in mice lacking the serine protease inhibitor protease nexin-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2001;98(6):3029
94. Nash WG. 1976. Patterns of pigmentation color states regulated by the y locus in *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* 48, 336-343
95. Neubaum, D. M., and M. F. Wolfner, 1999 *Drosophila* females require a seminal fluid protein, Acp36DE, to store sperm efficiently. *Genetics* 153: 845–857
96. Ninive Aguiar Colonello-Frattini, Klaus Hartfelder. Differential gene expression profiling in mucus glands of honey bee (*Apis mellifera*) drones during sexual maturation*. *Apidologie*, Springer Verlag (Germany), 2009, 40 (4), <10.1051/apido/2009009>. <hal-00891980>
97. Ordano M, Engelhard I, Rempoulakis P, Nemny-Lavy E, Blum M, Yasin S et al. 2015. Olive Fruit Fly (*Bactrocera oleae*) Population Dynamics in the Eastern Mediterranean: Influence of Exogenous Uncertainty on a Monophagous Frugivorous Insect. *PLoS ONE* 10(5): e0127798. doi:10.1371/journal.pone.0127798
98. Orr AG, Rutowski RL. The function of the sphragis in *Cressida Cressida* (Fab.)(Lepidoptera, Papilionidae): a visual deterrent to copulation attempts. *Journal of natural history*. 1991;25(3):703-10
99. Peng J, Chen S, Busser S, Liu H, Honegger T, Kubli E. Gradual release of sperm bound sex-peptide controls female postmating behavior in *Drosophila*. *Current biology*. 2005;15(3):207-13
100. Press Release: Oxitec's olive fly strain could become first GM insect to undergo field evaluation in the EU
101. Pszczolkowski MA, Tucker A, Srinivasan A, Ramaswamy SB. On the functional significance of juvenile hormone in the accessory sex glands of male *Heliothis virescens*. *J. Insect Physiol.* 52 (2006) 786–794.

102. Pun KK, Kam W. Extraction of nucleic acids from agarose gel--a quantitative and qualitative comparison of four different methods. *Prep Biochem.* 1990;20(2):123–135
103. Radhakrishnan P, Marchini D, Taylor WP. Ultrastructure of male reproductive accessory glands and ejaculatory duct in the Queensland fruit fly. *Bactrocera tryoni* (Diptera: Tephritidae). 2008. *Arthropod Structure & Development* 38 (2009) 216–226
104. Radovic A, Wittkopp PJ, Long AD, Drapeau MD. 2002. Immunohistochemical colocalization of *Yellow* and male-specific *Fruitless* in *Drosophila melanogaster* neuroblasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 293 (2002) 1262–1264
105. Ram KR, Wolfner MF. Seminal influences: *Drosophila* Acps and the molecular interplay between males and females during reproduction. *Integrative and Comparative Biology.* 2007;47(3):427-45
106. Ravi Ram K, Sirot LK, Wolfner MF. Predicted seminal astacin-like protease is required for processing of reproductive proteins in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2006;103(49):18674
107. Real – time PCR Application guide, Bio-rad Laboratories, 2006
108. Rendel JM. 1945. Normal and selective matings in *Drosophila subobscura*. *J. Genet.* 46: 287-302
109. Rendon P., McInnis DO, Lance D, Stewart J. 2004. Medfly (Diptera: Tephritidae) genetic sexing: large-scale field comparison of males-only and bisexual sterile fly releases in Guatemala. *Journal of Economic Entomology* 97:1547–1553
110. Riehle MA, Garczynski SF, Crim JW, Hill CA, Brown MR. Neuropeptides and peptide hormones in *Anopheles gambiae*. *Science.* 2002;298(5591):172
111. Robinson AS, Franz G, Fisher K. 1999. Genetic sexing strains in the medfly, *Ceratitis capitata*: development, mass rearing and field application. *Trends Entomol.* 2: 81–104
112. Rogers DW, Baldini F, Battaglia F, Panico M, Dell A, Morris HR, et al. Transglutaminase-mediated semen coagulation controls sperm storage in the malaria mosquito. *PLoS biology.* 2009;7(12):e1000272
113. Schetelig MF, Caceres C, Zacharopoulou A, Franz G, Wimmer EA. 2009. Conditional embryonic lethality to improve the sterile insect technique in *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *BMC Biology* 2009, 7:4
114. Schliekelman, P., Gould, F., 2000. Pest control by the release of insects carrying a female-killing allele on multiple loci. *J. Econ. Entomol.* 93 (6), 1566–1579
115. Schnakenberg SL, Matias WR, Siegal ML. Sperm-storage defects and live birth in *Drosophila* females lacking spermathecal secretory cells. *PLoS Biol.* 2011;9(11):e1001192.

116. Shutt B, Stables L, Aboagye, Antwi F, Moran J, Tripet F. Male accessory gland proteins induce female monogamy in anopheline mosquitoes. *Medical and Veterinary Entomology*. 2010;24(1):91-4
117. Sirot LK, Hardstone MC, Helinski MEH, Ribeiro JMC, Kimura M, Deewatthanawong P, et al. Towards a Semen Proteome of the Dengue Vector Mosquito: Protein Identification and Potential Functions. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2011;5(3):e989.
118. Sirot LK, Poulson RL, Caitlin McKenna M, Girnary H, Wolfner MF, Harrington LC. Identity and transfer of male reproductive gland proteins of the dengue vector mosquito, *Aedes aegypti*: potential tools for control of female feeding and reproduction. *Insect biochemistry and molecular biology*. 2008;38(2):176-89.
119. Skouras PJ, Margaritopoulos JT, Seraphides NA, Ioannides IM, Kakani EG, Mathiopoulos KD, Tsitsipis JA: Organophosphate resistance in olive fruit fly, *Bactrocera oleae*, populations in Greece and Cyprus. *Pest Manag Sci* 2007, 63:42–48
120. Stellwagen NC. 2009. Electrophoresis of DNA in agarose gels, polyacrylamide gels and in free solution. *Electrophoresis* 2009 June ;30(Suppl 1): S188–S195
121. Sturtevant A. 1915. Experiments on sex recognition and the problem of sexual selection in *Drosophila*
122. Tan GC. 1946. Genetics of sexual isolation between *Drosophila pseudoobscura* and *Drosophila persimilis*. *Genetics* 31: 558-573
123. Thomas D. D., Donnelly C. A., Wood R. J., and Alphey L. S. 2000. Insect population control using a dominant, repressible lethal genetic system. *Science* 287: 2474-6
124. Tian L, Ji BZ, Liu SW, Jin, F, Gao J, Li S. Juvenile hormone III produced in male accessory glands of the longhorned beetle, *Apriona germari*, is transferred to female. *Insect Biochem Physiol*. 2010 Sep;75(1):57-67, doi: 10.1002/arch.20385
125. Tzanakakis M. Springer, *Encyclopedia of Entomology*. 2008. Second Edition: 2666-2669
126. Tzanakakis ME, Tsitsimpis JA, Economopoulos AP. 1968. Frequency of mating in females of the olive fruit fly under laboratory conditions. *J Econ Entomol* 61:1309–1312
127. Villamil SC. 2012. Behaviors Related to Reproduction of the Olive Fruit Fly, *Bactrocera oleae* (Rossi) (Diptera: Tephritidae), in Northern California. University of California. UMI Number: 3555441, σελ 56
128. Walker MJ, Rylett CM, Keen JN, Audsley N, Sajid M, Shirras AD, et al. Proteomic identification of *Drosophila melanogaster* male accessory gland proteins, including a pro-cathepsin and a soluble gamma-glutamyl transpeptidase. *Proteome science*. 2006;4(1):9.

129. Watson JD, Caudy AA, Myers RM, Witkowski JA. 2007. Ανασυνδυασμένο DNA, Γονίδια και γονιδιώματα – Μια συνοπτική παρουσίαση. Ακαδημαϊκές εκδόσεις I. Μπάσδρα. Πρώτη Ελληνική Έκδοση, σελ: 178-179
130. Wei et al. Transcriptome analysis to identify genes for peptides and proteins involved in immunity and reproduction from male accessory glands and ejaculatory duct of *Bactrocera dorsalis*. *Peptides* (2015). <http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2015.08.007>
131. Wilke AB, Nimmo DD, St John O, Burini Kojin B, Capurro ML, Marrelli MT. 2009. Mini-review: Genetic enhances to the sterile insect technique to control mosquito populations. *AsPac J. Mol. Biol. Biotechnol.* –Vol. 17 (3) : 65-74
132. Wilson R, Burnet B, Eastwood L, Connolly K. 1976. Behavioural pleiotropy of the *yellow* gene in *Drosophila melanogaster*. *Genet. Res., Camb.* 28, pp. 75-88
133. Xu R, Boudreau A, Bissell MJ. Tissue architecture and function: dynamic reciprocity via extra-and intra-cellular matrices. *Cancer and Metastasis Reviews.* 2009;28(1):167-76
134. Xue L, Noll M (2000) *Drosophila* female sexual behavior induced by sterile males showing copulation complementation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 3272–3275
135. Young ADM, Downe AER. Male accessory gland substances and the control of sexual receptivity in female *Culex tarsalis*. *Physiological entomology.* 1987;12(2):233-9
136. Zervas GA. 1982. Reproductive physiology of *Dacus oleae* (Gmel.) (Diptera: Trypetidae). Comparison of a wild and artificially reared flies. *Geoponica* (in Greek) 282:10–14
137. Μπαξεβάνης Α, Ouellette BFA. 2016. Βιοπληροφορική, Ένας πρακτικός οδηγός για την ανάλυση γονιδίων και πρωτεϊνών. 3^η έκδοση, Επιστημονικές εκδόσεις Παρισιάνου