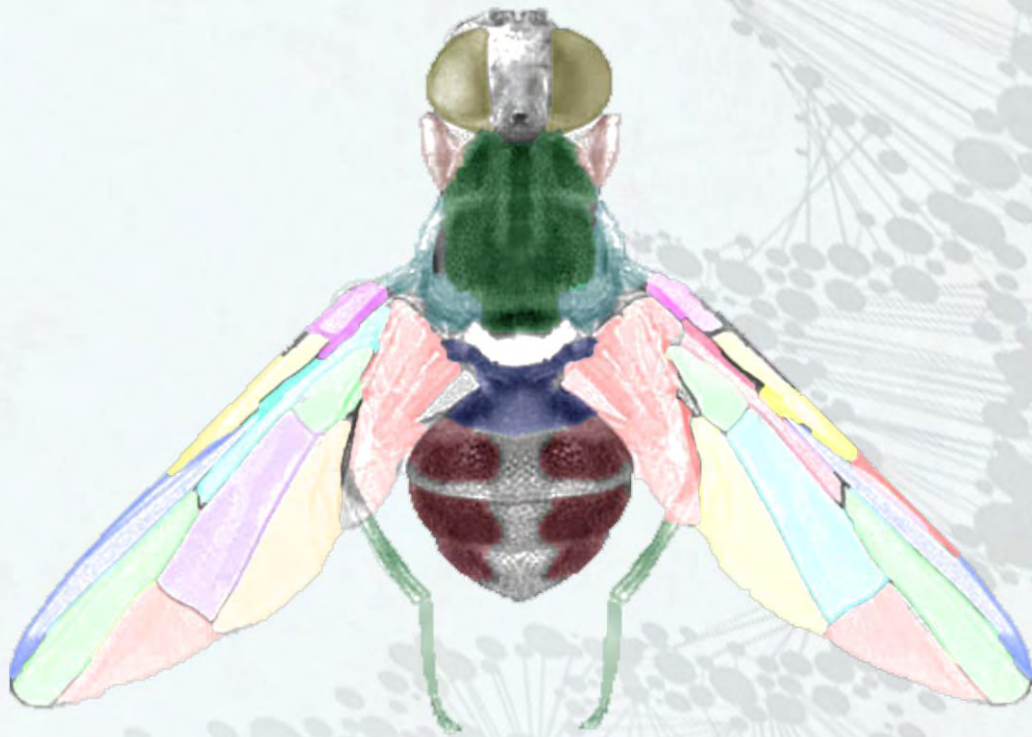


# Μοριακή ανάλυση του αποπτωτικού γονιδίου *hid* στο δάκο της ελιάς *Bactrocera oleae*

Πτυχιακή εργασία  
Βούλγαρης Μενέλαος



Η παρούσα πτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Τίτλος Εργασίας:

Μοριακή ανάλυση του αποπτωτικού γονιδίου *hid* στο δάκο της ελιάς *Bactrocera oleae*.

Title:

Molecular analysis of the apoptotic gene *hid* in the olive fruit fly *Bactrocera oleae*

Μέλη τριμελούς επιτροπής:

Μαθιόπουλος Κωνσταντίνος [Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας]

Θεολογία Σαραφίδου [Επίκουρος Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ζωικών Οργανισμών]

Τσουμάνη Κωνσταντίνα [Συμβασιούχος Διδάσκων Μοριακής Βιολογίας]

# Ευχαριστίες

---

Η περάτωση αυτής της εργασίας οφείλεται σε 3 μέλη της οικογένειας **Τσουμάνη**:

1<sup>η</sup>: Κωσταντίνα ευχαριστώ πολύ. Είσαι κάτι παραπάνω από υπομονετική!

2<sup>η</sup>: Στεφανία ευχαριστώ για την φιλοξενία που μου εξασφάλισε ένα σπίτι με όλη τη σημασία της λέξης για τον καιρό που έγραφα και μια φίλη για όλους τους καιρούς.

3<sup>η</sup>: Τζάρβις ευχαριστώ για την παρέα και τις βόλτες

# Περιεχόμενα

---

<b>ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ</b> .....	<b>4</b>
<b>ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ</b> .....	<b>5</b>
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b> .....	<b>6</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>7</b>
<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....	<b>8</b>
Ο ΔΑΚΟΣ- ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΚΑΙ ΓΕΩΓΡΑΦΙΑ.....	8
ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ ΤΟΥ ΔΑΚΟΥ.....	8
ΖΗΜΙΑ.....	9
ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΟΥ ΔΑΚΟΥ.....	10
<b>ΣΚΟΠΟΣ:</b> .....	<b>21</b>
<b>ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b> .....	<b>22</b>
ΣΥΛΛΟΓΗ ΑΥΓΩΝ ΔΑΚΟΥ:.....	22
ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ RNA:.....	22
ΣΥΝΘΕΣΗ CDNA ΜΕ ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ ΑΠΟ RNA.....	23
ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ CDNA ΜΕ RNAΣΗ.....	24
ΚΑΤΑΚΡΗΜΝΙΣΗ CDNA:.....	24
ΕΙΣΑΓΩΓΗ «ΟΥΡΑΣ» ΑΔΕΝΙΝΩΝ (POLYA TAILING).....	24
RACE-PCR.....	25
ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΠΗΚΤΩΜΑΤΟΣ ΑΓΑΡΟΖΗΣ:.....	25
ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ DNA ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ.....	26
ΑΝΑΚΤΗΣΗ DNA ΑΠΟ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ.....	26
ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ DNA.....	27
ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΣΥΔΕΣΗΣ ΤΜΗΜΑΟΣ DNA ΜΕ ΤΟΝ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟ ΦΡΕΑ (DNA LIGATION).....	27
ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΓΙΑ ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΑΤΡΗΣΗ:.....	27
ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ ΦΟΡΕΑ:.....	28
ΠΕΨΗ ΜΕ ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΑ ΕΝΖΥΜΑ:.....	29
<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b> .....	<b>30</b>
ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΜΕΡΟΥΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ HID (B.OLEAE) ΜΕ 5'RACE PCR.....	30
ΚΛΩΝΟΠΟΗΣΗ ΤΟΥ HID (B.O.).....	32
ΓΟΝΙΔΙΑΚΟΣ ΧΑΡΤΗΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ HID (B.OLEAE).....	33
ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΟΥ HID(B.OLEAE) ΜΕ ΣΥΓΓΕΝΙΚΑ ΕΙΔΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ.....	33
ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΠΡΟΤΥΠΩΝ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ HID (B. OLEAE).....	37
<b>ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΙΚΑ</b> .....	<b>38</b>
<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ</b> .....	<b>40</b>

---

# Περίληψη

---

Ο δάκος της ελιάς *B. oleae* αποτελεί ένα μονοπαράσιτο του καρπού της ελιάς που πλήττει τις καλλιέργειες σε παγκόσμιο επίπεδο προκαλώντας ζημιές 800εκ δολαρίων το χρόνο. Η αντιμετώπισή του έχει στραφεί στην πιο οικολογική και αποτελεσματική «τεχνική του στείρου εντόμου» (SIT). Κατά την τεχνική αυτή απελευθερώνονται μαζικά αρσενικά έντομα, στείρωμένα με ακτινοβολία, τα οποία ζευγαρώνουν με τα αγρίου τύπου θηλυκά χωρίς να παράγουν απογόνους. Με τη χρήση γενετικής μηχανικής επιχειρείται η βελτίωση της SIT με τη δημιουργία διαγονιδιακών εντόμων που παρουσιάζουν φυλοειδική στείρωση προκαλώντας τον θάνατο των θηλυκών απογόνων τους σε πρώιμα αναπτυξιακά στάδια (fsRIDL).

Η fsRIDL έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία σε συγγενικά είδη του δάκου αξιοποιώντας το αποπτωτικό γονίδιο *hid* (head involution defective) ως παράγοντα απόπτωσης στο διαγονίδιο. Το γονίδιο *hid* εμποδίζει τη δράση των αναστολέων των αποπτωτικών κασπασών (IAPs) επιτρέποντας την ενεργοποίηση του μονοπατιού της απόπτωσης.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε το γονίδιο *hid* με σκοπό την ανάλυση και χαρακτηρισμό της αλληλουχίας του για να επιβεβαιωθεί η καταλληλότητά του για χρήση σε σύστημα fsRIDL για το δάκο της ελιάς. Η αλληλουχία του εμφανίζει υψηλή συντήρηση με ήδη χρησιμοποιημένες σε αντίστοιχα συστήματα αλληλουχίες, διατηρώντας 100% ομολογία στις περιοχές της πρωτινής *hid* που είναι απαραίτητες για τη λειτουργία της. Έτσι εντοπίζουμε την καλά χαρακτηρισμένη GHR περιοχή του αμινοτελικού άκρου στην οποία προσδένονται οι IAPs, την αλληλουχία οδηγό για το μιτοχόνδριο του καρβοξυτελικού άκρου καθώς και τις περιοχές φωσφορλίωσης που απενεργοποιούν την πρωτεΐνη. Τέλος, εμφανίζει 100% ομολογία με τις λειτουργικές περιοχές της πρωτεΐνης *hid* της *A. ludens* η οποία έχει χρησιμοποιηθεί ήδη σε διαγονίδιο της *A. ludens* και *A. suspensa*, επιτρέποντας την πιθανή χρήση του διαγονιδίου αυτού και στον δάκο της ελιάς.

---

# Abstract

---

The olive fruit fly *B. oleae* is a pest of the olive fruit and damages olive crops around the world to the amount of 800 million dollars per year. Its management has been now focused on the more eco-friendly and productive “sterile insect technique” (SIT). SIT is the mass rearing and release of male flies, sterilized by irradiation, which mate with the wild type females and produce no offspring. With the use of genetic engineering, there have been attempts to improve SIT with the production of transgenic flies who present sex specific sterility causing the death of all the female offspring in early developmental stages.

FsRIDL has been used with great success on related species to the olive fruit fly utilizing the apoptotic gene *hid* (head involution defective) as a lethality factor in the transgene. The *hid* gene blocks the effect of the inhibitors of the apoptotic pathway (IAPs) allowing its activation.

On this thesis we studied the *hid* gene in order to analyze and characterize its sequence so that we can determine whether it is suitable for use in an fsRIDL system for the live fruit fly. Its sequence shows very high conservation with already used (on other fsRIDL systems) *hid* sequences, retaining 100% homology at the essential regions of the *hid* protein. Thus, we can identify the very well conserved GHR motif at the N-terminus on which the IAPs bind, the driver sequence for the mitochondrion at the C-terminus along with the phosphorylation sites that deactivate the protein. Finally it shows 100% homology with the essential regions of *A. ludens hid* which has already been used in transgenes for *A. ludens* and *A. suspensa* indicating the potential use of the same transgene for the olive fruit fly.

---



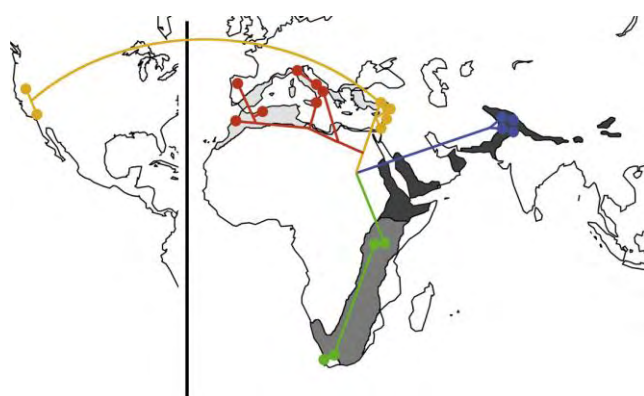
# Εισαγωγή

## Ο ΔΑΚΟΣ- ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΚΑΙ ΓΕΩΓΡΑΦΙΑ

Ο Δάκος της ελιάς (*Bactrocera oleae*) αποτελεί μια εκ των μυγών των φρούτων η οποίες ανήκουν στην οικογένεια των Tephritidae των δίπτερων εντόμων. Αποτελεί παράσιτο αποκλειστικά για την ελιά (*Olea verrucosa*, *O. chrysophylla*, *O. ferruginea* και κυρίως *O. europaea*) ενώ εντοπίζεται τόσο σε μονοκαλλιέργειες ελαιόδεντρων όσο και σε άγριους πληθυσμούς [reviewed in 1].

Γεωγραφικά θεωρείται ότι προήλθε από την υποσαχάρια Αφρική [17] ενώ η εξάπλωσή του οδήγησε σε πληθυσμούς στην λεκάνη της Μεσογείου, τη Μέση Ανατολή και προσφάτως την πολιτεία της California στην Αμερική [2-10,14,15]. Από αυτούς τους πληθυσμούς ξεχωρίζει αυτός της μέσης ανατολής (*asiatica*) όπου εμφανίζει σημαντικές αποκλίσεις από τους υπόλοιπους υποδεικνύοντας εξελικτικό διαχωρισμό σε πρώιμα στάδια. Παράλληλα έχουν παρατηρηθεί εσωτερικές διαφορές στους πληθυσμούς της Μεσογείου [14,15] ενώ αυτός της California πιστεύεται ότι προήλθε από την ανατολική Μεσόγειο [7].

Ως μονοπαράσιτο της ελιάς η εξέλιξη και εξάπλωσή του είναι συνδεδεμένη με την γεωγραφική θέση ελαιόδεντρων (αγρίων και καλλιιεργειών) με μόνη εξαίρεση την Αυστραλία όπου δεν έχει παρατηρηθεί δάκος της ελιάς.



Εικόνα 1: Εξάπλωση του δάκου στον παγκόσμιο χάρτη παράλληλα με τον γεωγραφικό εντοπισμό των ελαιόδεντρων (αποχρώσεις του γκρι)

## ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ ΤΟΥ ΔΑΚΟΥ

Ο δάκος της ελιάς κατά το βιολογικό του κύκλο περνάει από 4 στάδια: αυγό, προνύμφη (η οποία υφίσταται 3 εκδύσεις), νύμφη, ενήλικο έντομο. Η διάρκεια κάθε σταδίου εξαρτάται από τις περιβαλλοντολογικές συνθήκες. Σε ιδανικές θερμοκρασίες το αυγό εκκολάπτεται σε 1 μέρα, η προνύμφη ολοκληρώνει τις εκδύσεις της σε 8, ενώ η νύμφη μεταμορφώνεται σε διάστημα 9 ημερών. Για το δάκο της ελιάς ευνοϊκή είναι η θερμοκρασία κοντά στους 25°C και η υγρασία κοντά στο 80% ενώ μη συμβατές με την επιβίωσή του είναι θερμοκρασίες κάτω των 10°C και άνω των 32°C. Συνολικά κατά τη διάρκεια ενός έτους ο Δάκος διανύει από 2 έως 5 γεννεές [18]. Σημαντικό



ρόλο παίζουν επίσης η προσβασιμότητα σε ελιά αλλά και η ποιότητα του καρπού, με τις μαύρες ελιές να αποτελούν καλύτερο υπόστρωμα από τις πράσινες λόγω της υψηλότερης επιφανειακής θερμοκρασίας τους [18].

Κατά το προνυμφικό στάδιο το έντομο βρίσκεται μέσα στον καρπό της ελιάς και τρέφεται από τους ιστούς του. Στο στάδιο του ενήλικου εντόμου αντίθετα, ο δάκος τρέφεται κατά κόρον με γύρη, νέκταρ και εκκρίσεις φρούτων[1].

Το ενήλικο άτομο ζεί για περίπου 2 μήνες και συζεύγνεται 1 φορά για το θηλυκό και πολλαπλές για το αρσενικό έντομο. Οι θηλυκοί εναποθέτουν 1 αυγό σε κάθε καρπό ενώ μπορεί να εναποθέσουν μέχρι και 10 ημερισίως. Συνολικά κατά τη διάρκεια της ζωής του το ενήλικο θηλυκό άτομο μπορεί να εναποθέσει μέχρι και 400 αυγά [20,21].



Εικόνα 2: Βιολογικός κύκλος του δάκου της ελιάς. Από αριστερά: Ζευγάρισμα, ωοαπόθεση, αυγό, προνύμφη, νύμφη, ενήλικο αμέσως μετά την μεταμόρφωση

## ΖΗΜΙΑ

Κατά την ωοαπόθεση τα ενήλικα θηλυκά έντομα τρυπάνε το επικάρπιο της ελιάς και εναποθέτουν το αυγό στο εσωτερικό το οποίο στη διάρκεια 1 ημέρας περνάει στο στάδιο της προνύμφης. Η προνύμφη τρέφεται από τους ιστούς του καρπού μέχρι να φτάσει στο στάδιο της έκδυσης της, καταναλώνοντας από 45 μέχρι 150mg καρπού δημιουργώντας στοές στο εσωτερικό του που τον αλλοιώνουν. Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας ο καρπός μπορεί να παραμείνει στο δέντρο ή μπορεί να πέσει λόγω της αποδυνάμωσής του. Παράλληλα με τη ζημιά που προκαλεί η αναπτυσσόμενη προνύμφη, έχει παρατηρηθεί ότι τα νύγματα που προκαλούνται στον καρπό κατά την ωοαπόθεση αποτελούν ευνοϊκές εστίες ανάπτυξης βακτηρίων και μυκήτων. Η μόλυνση της ελιάς με μικροοργανισμούς έχει επιπλέον δυσμενείς επιπτώσεις στην ποιότητα του καρπού όπως αυξημένη οξύτητα ενώ καταλήγει στην αποσύνθεση του καρπού[12,13]. Τέλος η ώριμη προνύμφη ανοίγει μια δεύτερη οπή στον καρπό είτε για να εξέλθει και μεταμορφωθεί σε νύμφη στο έδαφος (στην περίπτωση πεσμένου καρπού) είτε νυμφοποιείται στο εσωτερικό του καρπού και ανοίγει την ωπή εξόδου ως ενήλικο έντομο[reviewed in 16].

Όπως είναι αναμενόμενο η ζημιά αυτή στον καρπό της ελιάς έχει σοβαρές επιπτώσεις στην ποιότητα του λαδιού. Αρχικά επειδή η προνύμφη τρέφεται από ιστούς του καρπού υπολογίζεται ότι από τη συνολική σοδιά ο δάκος μπορεί να προκαλέσει απώλειες 11-15%. Ακόμα επηρεάζει τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά της ελιάς και κατ'επέκταση του λαδιού αυξάνοντας την οξύτητα, το βαθμό υπεροξειδίων αλλά και τη γεύση. Υπολογίζεται ότι σε παγκόσμια κλίμακα ο δάκος προκαλεί ζημιά της τάξης των 800εκ δολλαρίων το χρόνο[16].

## ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΟΥ ΔΑΚΟΥ

### ΣΠΡΕΙ ΧΗΜΙΚΑ ΕΝΤΟΜΟΚΤΟΝΑ

Λόγω της σημαντικής ζημίας που προκαλεί ο δάκος στην ελιά είναι απαραίτητη η αντιμετώπισή του. Ένας από τους βασικούς τρόπους αντιμετώπισης είναι ο ψεκασμός με χημικά εντομοκτόνα. Κατά κόρον χρησιμοποιούνται οργανοφωσφορικά, πυρεθροειδή ενώ πρόσφατα στη λίστα προτέθηκε και το spinosad [1, 22, 23]. Τα εντομοκτόνα αυτά χρησιμοποιούνται είτε ως σπρέι επικάλυψης (cover sprays) που εφαρμόζονται πάνω στο φυτό και το προστατεύουν σκοτώνοντας τις προνύμφες αλλά και τα ενήλικα έντομα που έρχονται σε επαφή με αυτό, με είτε ως σπρέι δολώματος (bait sprays) τα οποία περιέχουν και μια προσελκυστική ουσία (ορμόνες ή αμμωνιακά άλατα) και εφαρμόζονται στον περιβάλλοντα χώρο του φυτού όπου προσελκύουν τα έντομα τα οποία αφού έρθουν σε επαφή με ψεκασμένη επιφάνεια πεθαίνουν[28].

Παρόλη την αποτελεσματικότητα των εντομοκτόνων έχουν παρατηρηθεί διάφορα προβλήματα τα οποία έχουν προκαλέσει τη στρόφη σε διαφορετικά μέσα αντιμετώπισης. Αρχικά τα εντομοκτόνα δεν παρουσιάζουν την απαραίτητη ειδοειδικότητα. Έτσι παράλληλα με το δάκο πλήγονται και άλλα είδη εντόμων που υπάρχουν στο περιβάλλον κάποια εκ των οποίων μπορεί να είναι υψηλής οικολογικής αξίας [22]. Ακόμα οι υπερβολικοί ψεκασμοί των φυτών μπορεί να έχουν επιβλαβείς συνέπειες για το ίδιο το φυτό αλλά και την ποιότητα του καρπού του κάτι το οποίο κατ'επέκταση μπορεί να αποβεί βλαπτικό για τον άνθρωπο που το καταναλώνει [24].

Τέλος το πιο σημαντικό είναι ότι ο δάκος (όπως έχει παρατηρηθεί και σε άλλα έντομα) αναπτύσσει σταδιακά αντίσταση στα εντομοκτόνα κάτι το οποίο εντείνεται με την υπερβολική χρήση αυτών [25,26,27,28] [reviewed in 1].

### ΔΑΚΟΠΑΓΙΔΕΣ

Λόγω όλων αυτών των προβλημάτων που προκύπτουν από τη χρήση χημικών εντομοκτόνων υπάρχει μια στρόφη σε διαφορετικούς τρόπους ελέγχου. Μια εκ των συμβατικών εναλλακτικών είναι οι παγίδες, οι οποίες εκτός από μέσο παρακολούθησης του πληθυσμού (κολλώδεις παγίδες) μπορούν να χρησιμοποιηθούν και για τον έλεγχο του. Οι παγίδες λειτουργούν ως δολώματα στα οποία μια ουσία (φερομόνη, υδρολυμένη πρωτεΐνη, αμμωνιακά άλατα και παλαιότερα μολάσσα) ή ένα χαρακτηριστικό (κίτρινο χρώμα, κόκκινο χρώμα, σφαιρικό σχήμα) χρησιμοποιείται για να προσελκύσει το έντομο στην παγίδα όπου υπάρχει είτε κάποια κολλώδης επιφάνεια, είτε υγρό είτε εντομοκτόνο (είτε συνδιασμός αυτών) και προκαλεί τη θανάτωσή του [1,29,30,31,32,33,34,35]



Εικόνα 3: Δακοπαγίδα τύπου McPhail

## ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

Εκτός από τις παγίδες η προσπάθεια για έλεγχο του πληθυσμού του δάκου της ελιάς έχει στραφεί και σε πιο φυσικές-βιολογικές μεθόδους. Κατ'αρχήν ως προκαταρκτικό μέτρο συνιστάται ο καλός καθαρισμός της καλλιέργειας καθώς πολλοί καρποί λόγω της προσβολής τους από το δάκο πέφτουν από το δέντρο αλλά εξακολουθούν να αποτελούν εστία ανάπτυξης των προνύμφων που βρίσκονται μέσα στον καρπό. Έτσι συχνό καθάρισμα του χωραφιού μπορεί να βοηθήσει στη μείωση των αγόνων και κατ'επέκταση του πληθυσμού των δάκων τοπικά [36]. Ακόμα έχει δειχθεί ότι η χρήση σπρέι επικάλυψης kaolin μπορεί να απωθεί τον δάκο λόγω της ανακλαστικής επιφάνειας που δημιουργούν τα σωματίδια kaolin στον καρπό [37,38]. Τέλος η εισαγωγή φυσικών αντιπάλων του δάκου στο περιβάλλον όπως παράσιτα ή θηρευτές του εντόμου μπορεί να συνεισφέρει στη μείωση του πληθυσμού με βιολογικό τρόπο. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι το παράσιτο (*P. concolor*) που έχει εισαχθεί στην περιοχή της Μεσογείου (Ιταλία 1914, Γαλλία 1919).

## ΤΕΧΝΙΚΗ ΣΤΕΙΡΟΥ ΕΝΤΟΜΟΥ (SIT)

### Ιστορία

Η τεχνική του στείρου εντόμου (Sterile Insect Technique, SIT) εμφανίστηκε την δεκαετία του '30. Προτάθηκε αρχικά σε διαφορετικές μορφές από 3 επιστήμονες. Αρχικά ο A.S. Serebrovskii το 1940, ένας Ρώσος γενετιστής που δούλευε στο Moscow State University, πρότεινε τη χρήση χρωμοσωμικών μεταθέσεων ως παράγοντα ελέγχου του πληθυσμού[42]. Στη συνέχεια ο Dr. F. L. Vander-plank, που δούλευε στην καταπολέμηση της μύγας Τσε-Τσε στην Τανζανία, πρότεινε την απελευθέρωση συγγενικών ειδών που ανήκουν στο ίδιο σύμπλεγμα ειδών με το έντομο στόχο, με σκοπό την διαειδική αναπαραγωγή και την δημιουργία έτσι στείρων απογόνων[43,44]. Τέλος η μορφή της τεχνικής που χρησιμοποιείται μέχρι σήμερα προτάθηκε από τον Αμερικάνο E.F. Knippling ο οποίος έθεσε την ιδέα της στείρωσης εντόμων στο εργαστήριο τα οποία κατ'επέκταση απελευθερώνονται στο περιβάλλον και ανταγωνίζονται τα αγρίου τύπου για το ζευγάρι με τα θηλυκά [40]. Η ιδέα του εφαρμόστηκε πρώτη φορά το 1951 στοχεύοντας στο *Callitroga hominivorax* στο νησί Sanibel έξω από την California και κατάφερε σχεδόν να εξαλείψει τον πληθυσμό. Η επόμενη πιο εκτενής προσπάθεια στο νησί Curacao κατάφερε την πλήρη εξάλειψη του ενδογενούς πληθυσμού *Callitroga hominivorax* του νησιού [41] [reviewed in 39,45].

### Πώς λειτουργεί

Κατά την SIT έχουμε μαζική εκτροφή εντόμων στο εργαστήριο τα οποία όταν φτάσουν το απαραίτητο μέγεθος πληθυσμού υφίστανται μια διαδικασία στείρωσης. Αυτή η διαδικασία μπορεί να είναι είτε χημική, είτε με χρήση ραδιενέργειας (κυρίως ακτίνες γ) και αποτελεί μια ευαίσθητη διαδικασία. Τα έντομα μόλις στείρωθούν απελευθερώνονται στην περιοχή, όπου απαιτείται ο έλεγχος του ενδογενούς εντόμου, με σκοπό τη διασταύρωσή τους με τον φυσικό πληθυσμό. Οι διασταυρώσεις αυτές δεν θα δώσουν απογόνους οδηγώντας σε μείωση του αγρίου πληθυσμού [39].

Στο στάδιο της εκτροφής τα έντομα πρέπει να βρίσκονται σε κατάλληλες συνθήκες θερμοκρασίας, κατάλληλες συνθήκες υγρασίας, να λαμβάνουν τα απαραίτητα θρεπτικά από την τροφή τους και να τους παρέχονται ιδανικές συνθήκες ωοαπόθεσης και θρέψης των μη ενήλικων εντόμων ώστε να επιτευχθεί η αύξηση του εργαστηριακού πληθυσμού. Παράλληλα συχνές αναμύξεις του εργαστηριακού πληθυσμού με έντομα αγρίου τύπου βοηθάνε στη διατήρηση ενός υγιούς πληθυσμού και αντιπαλεύουν τις επιπτώσεις της ομομουξίας. Τέλος είναι σημαντικό να διατηρούνται οι βιολογικοί κύκλοι των εργαστηριακών εντόμων σε συγχρονισμό με τον πληθυσμό αγρίου τύπου που αποτελεί στόχο ώστε μετά την απελευθέρωση των στείρων εντόμων να συμπήπει η περίοδος αναπαραγωγής τους [45,46].

Για τη στείρωση των εντόμων χρησιμοποιείται ακτινοβολία (ακτίνες γ, ακτίνες χ), έκθεση στην οποία έχει βρεθεί ότι προκαλεί στείρωση [47]. Συνήθως χρησιμοποιείται η πιο οικονομική γ-ακτινοβολία. Η ακτινοβολία δημιουργεί τυχαίες μεταλλάξεις στο γαμετικό υλικό των εντόμων προκαλώντας το φαινόμενο των Επικρατών Θνησιγόνων Μεταλλάξεων, όπου στο γαμέτη αναπτύσσονται αρκετές επικρατείς θνησιγόνες μεταλλάξεις έτσι ώστε ανεξαρτήτως του άλλου φυλετικού γαμέτη όλοι οι απόγονοι να είναι νεκροί [39]. Είναι σημαντική η λεπτομερής ανάλυση των επιπτώσεων της ακτινοβολίας για την εύρεση της κατάλληλης ποσότητας η οποία προκαλεί στείρωση στο έντομο αλλά δεν επηρεάζει τη δυνατότητά του να ζευγαρώσει και να εναποθέσει σπέρμα (στην περίπτωση των αρσενικών). Αυτό είναι κρίσιμης σημασίας γιατί ενώ το αρσενικό έντομο μπορεί να ζευγαρώσει πολλές φορές, το θηλυκό μόνο μια [21]. Πάνω σε αυτό το χαρακτηριστικό των μυγών των φρούτων βασίζεται και η τεχνική του στείρου εντόμου όπου το στείρο αρσενικό ζευγαρώνει με το αγρίου τύπου θηλυκό ουσιαστικά κάνοντάς το απροσπέλαστο για τα αγρίου τύπου αρσενικά ενώ παράλληλα δεν παράγονται απόγονοι.

Κατά την απελευθέρωση των εντόμων έχει βρεθεί ότι η αποτελεσματικότητα μειώνεται ραγδαία όταν ο εργαστηριακός πληθυσμός που απελευθερώνονται αποτελείται και από αρσενικά και από θηλυκά έντομα. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι τα στείρα έντομα πολλές φορές ζευγαρώνουν μεταξύ τους μειώνοντας την αλληλεπίδραση με τον άγριο πληθυσμό. Αυτό συμβαίνει και λόγω ευκολίας, αρσενικά και θηλυκά απελευθερώνονται μαζί και βρίσκονται σε κοντινή απόσταση μεταξύ τους συγκριτικά με τα αγρίου τύπου τα οποία είναι διάσπαρτα στην καλλιέργεια στόχο, αλλά και λόγω της μειωμένης ανταγωνιστικότητας των εντόμων που προκαλείται από την ακτινοβολία και τα κάνει λιγότερο αποτελεσματικά στην προσέλκυση αγρίου τύπου εντόμου για να ζευγαρώσουν. Έτσι η τεχνική οδηγήθηκε στο να στοχεύει στην εξάλειψη των εργαστηριακών θηλυκών πριν την απελευθέρωση. Η επιλογή των αρσενικών έγινε γιατί τις περισσότερες μύγες των φρούτων το βλαπτικό έντομο είναι το θηλυκό, χαρακτηριστικό το οποίο κυρίως οφείλεται στην ωοαπόθεση στα φρούτα. Για το λόγο αυτό προτιμάται η απελευθέρωση στείρων αρσενικών

## Sterile insect technique

ZAP MALE FLIES WITH RADIATION  
TO MAKE THEM STERILE



RELEASE MILLIONS OF STERILE MALES



MALES MATE WITH WILD FEMALES



BUT EGGS DON'T HATCH



εντόμων τα οποία ανταγωνίζονται με τα αρσενικά αγρίου τύπου για να ζευγαρώσουν με τα θηλυκά. Ακόμα η ιδιότητα των θηλυκών να ζευγαρώνουν μια φορά βοηθάει στην πιο αποτελεσματική λειτουργία της τεχνικής καθώς το κάθε στείρο αρσενικό που απελευθερώνεται μπορεί να ζευγαρώσει με πολλά θηλυκά αγρίου τύπου [45,46].

Η SIT επομένως ξεκινάει με την εκτροφή μεγάλου πληθυσμού εντόμων, την εξάλειψη των θηλυκών και μετά την στείρωση των εναπομείναντων αρσενικών. Το τελευταίο στάδιο είναι η απελευθέρωση του εργαστηριακού στείρου πληθυσμού στην καλλιέργεια στόχο. Σε αυτό το στάδιο πρέπει να δοθεί προσοχή στο μέγεθος του εργαστηριακού πληθυσμού που χρειάζεται να απελευθερωθεί, το οποίο εξαρτάται από τον πληθυσμό αγρίου τύπου και την αποτελεσματικότητα ζευγαρώματος. Πριν την απελευθέρωση ο πληθυσμός αγρίου τύπου πρέπει να μελετηθεί ως προς το μέγεθός του, τον ρυθμό εξάπλωσής του και την γεωγραφική του τοποθέτηση. Ακόμα πρέπει να εξακριβωθεί πόση από την ανταγωνιστικότητα στο ζευγάρωμα των στείρων αρσενικών έχει χαθεί.

Με βάση αυτούς τους παράγοντες πρέπει να απελευθερωθεί κατάλληλος αριθμός στείρων αρσενικών ώστε να οδηγήσει στη μείωση του πληθυσμού αγρίου τύπου (αντιστρόφως ανάλογος της μείωσης ανταγωνιστικότητας, ανάλογος του μεγέθους του πληθυσμού, ανάλογος του ρυθμού εξάπλωσης). Το τελικό αποτέλεσμα κυμαίνεται μεταξύ 3x και 5x του αγρίου πληθυσμού [39,45].

Τέλος η τεχνική στείρου εντόμου λειτουργεί σε βάθος χρόνου (>2 γενεές) και δεν δίνει αποτελέσματα όσο άμεσα όσο αυτά των εντομοκτόνων. Για την επιτυχημένη εφαρμογή της χρειάζεται η απελευθέρωση εκ νέου στείρων αρσενικών ανά τακτά χρονικά διαστήματα έτσι ώστε ο πληθυσμός των στείρων εντόμων να διατηρείται σταθερός ενώ αυτός των αγρίου τύπου να μειώνεται. Έτσι με την πάροδο του χρόνου η αναλογία στείρων προς γόνιμα αρσενικά αυξάνεται βελτιώνοντας την απόδοση της τεχνικής. Αξίζει να σημειωθεί ότι η απελευθέρωση στείρων αρσενικών έχει νόημα και μετά την εξάπλωση του πληθυσμού αγρίου τύπου καθώς λειτουργεί ως ανασταλτικός παράγοντας για την εκ νέου μετανάστευση εντόμων από κοντινές περιοχές [45]. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το πρόγραμμα SIT της California για την αποτροπή εισόδου βλαπτικών εντόμων από το Μεξικό όπου γίνονται συχνές απελευθερώσεις στην κοιλάδα στα σύνορα μεταξύ των δύο.

### Παραδείγματα εφαρμογών της SIT

Αφού έγινε η αρχή με τα πειράματα αντιμετώπισης του *Callitroga hominivorax* το 1951, αναπτύχθηκαν προγράμματα εξάλειψής του με μεγάλη επιτυχία στην Αμερική, τη Χιλή, το Μεξικό, την Αργεντινή ενώ το 1990 ξεκίνησε πρόγραμμα και στην Νότια Αφρική. Η τεχνική όμως αναπτύχθηκε και χρησιμοποιήθηκε και σε πληθώρα άλλων εντόμων όπως: *Anastrepha ludens* και *Ceratitis Capitata* [48], *Bactrocera tryoni*[49], *Bactrocera cucurbitae* [50], *Glossina palpalis gambiensis* [51], *Glossina palpalis palpalis* [52], *Glossina austeni* [53], *Glossina fuscipes fuscipes* [54], *Anopheles albimanus* [55], *Anopheles quadrimaculatus* [56], *Culex pipiens quinquefasciatus* [57], *Culex pipiens fatigans*[58], *Aedes albopictus* [59] [reviewed in 60].

Παράλληλα έγιναν προσπάθειες ανάπτυξης της τεχνικής για το δάκο της ελιάς το 1972 [61]. Η προσπάθεια παρόλα αυτά δεν απέδωσε λόγω προβλημάτων που εμφανίστηκαν στη μαζική εκτροφή αλλά και την ορθή στείρωση των αρσενικών δάκων. Έτσι το 1980 η προσπάθεια ανάπτυξης SIT για το δάκο της ελιάς έπαψε με τη χρηματοδότηση να μη βρίσκεται πια λόγω των δυσκολιών



που είχαν προκύψει. Παρόλα αυτά νέες έρευνες για τις συνθήκες εκτροφής (συμβιωτικά βακτήρια και δοσολογία τροφής) και στείρωσης του δάκου επανέφεραν την προσπάθεια στο προσκήνιο. Βέβαια εκλείπουν ακόμα έρευνες για τη διαδικασία μαζικής εκτροφής του εντόμου (μέγεθος κλουβιών κλπ) ενώ δρομολογούνται προσπάθειες ανάπτυξης συστήματος φυλοδιαχωρισμού ώστε να επιτευχθεί αρσενικός μόνο πληθυσμός για τη στείρωση[63].

### **Προβλήματα-Βελτιώσεις της SIT:**

Ένα από τα βασικά προβλήματα που εμφανίζει η SIT είναι η δυσκολία μαζικής εκτροφής των εντόμων. Για την επιτυχία της τεχνικής είναι απαραίτητο να μπορούν να παράγονται τεράστιες ποσότητες εντόμων ανά τακτά χρονικά διαστήματα για να μπορεί να διατηρείται (με συχνές απελευθερώσεις) σταθερά υψηλός ο αριθμός των στείρων αρσενικών ώστε να μειώνεται προοδευτικά ο αγρίου τύπου πληθυσμός. Για να επιτευχθεί αυτό πρέπει να εξεταστούν πολλοί παράγοντες και να βρεθούν οι ιδανικές μεταβλητές που θα επιτρέπουν τη σωστή μαζική εκτροφή με το μικρότερο δυνατό κόστος. Ένας από τους παράγοντες που έχει βρεθεί να βελτιώνει τα αποτελέσματα της εκτροφής, αντιπαλεύοντας τις αρνητικές επιδράσεις της ομομιξίας και λοιπών επιβλαβών παραγόντων της εργαστηριακής εκτροφής, είναι η παροχή προβιοτικών στα έντομα [73]. Η μικροβιακή πανίδα των εντόμων έχει βρεθεί ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην υγεία και την ανάπτυξή τους με αποτέλεσμα οι εργαστηριακοί πληθυσμοί οι οποίοι έρχονται σε επαφή με πολύ λιγότερους μικροοργανισμούς σε σχέση με τους αγρίου τύπου να εμφανίζουν μειονέκτημα [75]. Παράλληλα η διαδικασία στείρωσης πρέπει επίσης να εξεταστεί ενδελεχώς και να βρεθεί η απαραίτητη ποσότητα ακτινοβολίας που είναι όσο το δυνατόν λιγότερο βλαπτική για το έντομο, την επιβίωσή του αλλά και την ανταγωνιστικότητά του για ζευγάρωμα σε σχέση με τα αγρίου τύπου αρσενικά[45].

Ακόμη είναι απαραίτητο να γίνουν ακριβείς έλεγχοι για τον αγρίου τύπου πληθυσμό της περιοχής ώστε να απελευθερωθεί κατάλληλη(επαρκής) ποσότητα στείρων αρσενικών η οποία να οδηγήσει στη μείωση του πληθυσμού, καθώς και ακριβείς έλεγχοι του γεωγραφικού εντοπισμού των αγρίου τύπου εντόμων στην περιοχή ώστε να επιτευχθεί η καλύτερη δυνατή στοχοποίηση τους κατά την απελευθέρωσή των στείρων αρσενικών. Οι διαδικασίες αυτές είναι χρονοβόρες αλλά και κοστοβόρες και σε συνδυασμό με την ανάγκη κατάλληλων εγκαταστάσεων, προσωπικού, κλουβιών μεταφοράς και πρώτων υλών θέτουν ένα οικονομικό βάρος στην τεχνική [39].

Λόγω του κόστους ανάπτυξης του πληθυσμού στο εργαστήριο έχει προταθεί ο συνδυασμός χημικών εντομοκτόνων με την SIT. Κατά τη διαδικασία αυτή η περιοχή ψεκάζεται πρώτα με εντομοκτόνα τα οποία έχουν άμεση και βραχυπρόθεσμη δράση πετυχαίνοντας μείωση του πληθυσμού. Ακολούθως ξεκινάει η απελευθέρωση των στείρων εντόμων (SIT) σε υπόβαθρο μικρότερου αγρίου πληθυσμού. Έτσι απαιτείται μικρότερη ποσότητα στείρων εντόμων ενώ παράλληλα μπορούν να επιτευχθούν μεγαλύτερες αναλογίες στείρων προς αγρίου τύπου εξασφαλίζοντας πιο καλό αποτέλεσμα [39].

Ένα άλλο πρόβλημα της SIT είναι η ανάγκη φυλοδιαχωρισμού των εντόμων. Όπως προαναφέρθηκε στις περισσότερες των περιπτώσεων στείρωνονται και απελευθερώνονται αμιγώς αρσενικοί πληθυσμοί δημιουργώντας την ανάγκη διαχωρισμού των δύο φύλων ώστε να απομονωθούν τα αρσενικά έντομα. Σε κάποια έντομα ο διαχωρισμός λόγω μορφολογίας είναι εφικτός (μέγεθος νύμφης, χρόνος πριν την έκδυση), παρόλα αυτά αποτελεί ένα μη ιδανικό τρόπο

γιατί δε μπορεί να εφαρμοστεί σε όλους τους τύπους εντόμων ενώ σχεδόν ποτέ δεν αποδίδει αμιγώς μονοφυλετικούς πληθυσμούς [64].

Μια ακόμα προβληματική πλευρά της συμβατικής SIT είναι τα προβλήματα που προκαλούνται στο έντομο κατά τη διαδικασία στείρωσής του. Ο κύριος τρόπος στείρωσης που χρησιμοποιείται, η γ-ακτινοβολία, προκαλεί τυχαίες μεταλλάξεις και χρωμοσωμικές μεταθέσεις στο έντομο. Παρόλο που αυτά είναι απαραίτητα για την επίτευξη της επικρατούς θνησιγόνου μετάλλαξης στους γαμέτες, προκαλεί και άλλα προβλήματα στο έντομο. Αρχικά υψηλές δόσεις της ακτινοβολίας μπορεί να σκοτώσουν το έντομο ενώ ακόμα και χαμηλές δόσεις επηρεάζουν τη βιωσιμότητα του και την δυνατότητα επιβίωσής του στο περιβάλλον. Επιπλέον έχουν αρνητικές συνέπειες στην ανταγωνιστικότητα των αρσενικών για προσέλκυση θηλυκών προς ζευγάρωμα. Έτσι μετά την απελευθέρωση των στείρων εντόμων ο εργαστηριακός πληθυσμός αντιμετωπίζει σημαντικό μειονέκτημα στην προσέλκυση των αγρίου τύπου θηλυκών σε σχέση με τα αγρίου τύπου αρσενικά. Αυτό προκαλεί μείωση της αποτελεσματικότητας της SIT με αποτέλεσμα να απαιτείται απελευθέρωση μεγαλύτερου αριθμού στείρων εντόμων για να καλυφθεί η απώλεια από την αναποτελεσματικότητα τους να ζευγαρώσουν [36,39].

Τέλος ένα ακόμα ζήτημα που προκύπτει και χρήζει βελτίωσης στην SIT είναι η αδυναμία αποτελεσματικής ανίχνευσης των εργαστηριακών εντόμων μετά την απελευθέρωσή τους. Η τεχνική θα επωφελούνταν από τη δυνατότητα ανίχνευσης των στείρων εντόμων καθώς έτσι θα μπορούσαμε να παρακολουθούμε τη διασπορά των απελευθερωμένων εντόμων στην περιοχή, την επιβίωσή τους στο περιβάλλον, την αποτελεσματικότητά τους στο να ζευγαρώσουν αλλά και να παρακολουθούμε τον αγρίου τύπου πληθυσμό για να γνωρίζουμε την επιτυχία ή μη της τεχνικής. Παρόλα αυτά οι τρόποι ανίχνευσης που χρησιμοποιούνται είναι αναποτελεσματικοί και εγείρουν νέα προβλήματα. Το ράντισμα των νυμφών με φθορίζουσα μπογιά ή η προσθήκη μπογιάς στην τροφή των εντόμων πριν την απελευθέρωσή τους είναι ακριβά, εξασθενούν με το χρόνο ενώ μπορεί να μειώσουν περεταίρω την ανταγωνιστικότητα ως προς το ζευγάρωμα των στείρων αρσενικών [64].

## ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΜΗΧΑΝΙΚΗ ΣΤΗΝ SIT

Με την εμφάνιση της γενετικής μηχανικής αναπτύχθηκε πληθώρα εργαλείων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για το χαρακτηρισμό γονιδίων, την απομόνωσή τους αλλά και τη δημιουργία διαγονιδιακών οργανισμών. Έτσι η έρευνα στράφηκε προς τη γενετική μηχανική για να λύσει τα προβλήματα της SIT και να βελτιώσει την τεχνική. Με τα εργαλεία αυτά μπορούμε να δημιουργήσουμε διαγονιδιακά έντομα τα οποία να περιέχουν

- γονίδια σήμανσης για την ανίχνευση και παρακολούθηση του εργαστηριακού πληθυσμού μετά την απελευθέρωση
- γενετικό μηχανισμό φυλοδιαχωρισμού
- Γενετικό μηχανισμό στείρωσης



Ο στόχος είναι να δημιουργηθούν διαγονιδιακά έντομα που θα ενσωματώνουν συνδυασμό των παραπάνω δημιουργώντας ένα στέλεχος εντόμου που θα μπορεί να αναπτυχθεί στο εργαστήριο με τις επιθυμητές ιδιότητες και να επιφέρει τα επιθυμητά αποτελέσματα μετά την απελευθέρωσή του [64,65,74]. Θα μπορεί να εκτραφεί δηλαδή στο εργαστήριο κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες και πριν την απελευθέρωση η αλλαγή κάποιων συνθηκών να εξοντώνει αποκλειστικά τα θηλυκά άτομα. Μετά την απελευθέρωση τα αρσενικά θα είναι ανταγωνιστικά ως προς τον άγριο πληθυσμό αλλά μετά τη γονιμοποίηση των άγριων θηλυκών θα γεννιούνται μόνο αρσενικά έντομα καθώς οι θηλυκοί απόγονοι θα πεθαίνουν σε πρώιμο αναπτυξιακό στάδιο.

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως η σήμανση των στείρων εντόμων γινόταν αναποτελεσματικά πριν την ανάπτυξη των γενετικών τεχνικών. Η νέες τεχνικές αντίθετα στοχεύουν στην ενσωμάτωση φθορίζουσων πρωτεϊνών στο γονιδίωμα του εντόμου (GFP/DsRed) για την αποτελεσματική σήμανσή του. Με αυτόν τον τρόπο μπορεί να επιτευχθεί μια οικονομική λύση, χωρίς αρνητικές επιπτώσεις στη βιωσιμότητα ή την ανταγωνιστικότητα των διαγονιδιακών εντόμων, με συνεχή έκφραση στα έντομα και με δυνατότητα μετάδοσής τους στους απογόνους (χρήσιμο εργαλείο για τη μελέτη ποσοστού επιτυχημένου ζευγαρώματος) [78,79]. Παρόλα αυτά αξίζει να σημειωθεί ότι νεκρά έντομα που συλλέγονται στις παγίδες χάνουν τη γονιδιακή σήμανσή τους μετά από κάποιο διάστημα κάνοντας απαραίτητο το συχνότερο έλεγχο για συλλογή δεδομένων [64,65,69,70]. Η πολλά υποσχόμενη για μελλοντικά γενετικά SIT προγράμματα σήμανση με GFP έχει χρησιμοποιηθεί για το *Pectinophora gossypiella* με επιτυχία [76].

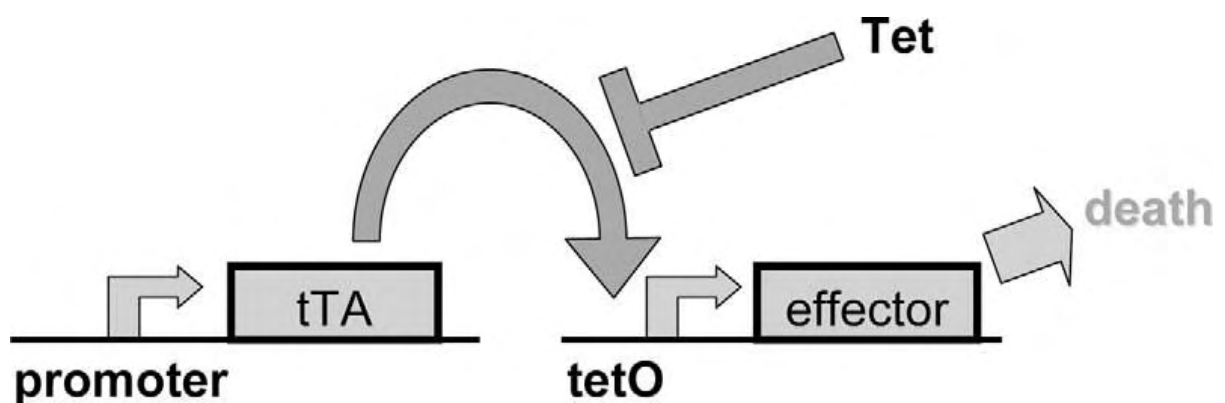
Ακόμα έχει προταθεί και η χρήση του συστήματος για τη σήμανση του σπέρματος του εντόμου. Με αυτόν τον τρόπο μπορεί να ανιχνευτεί το διαγονιδιακό έντομο (σημασμένες γονάδες), οι απόγονοί του αλλά και να ανιχνευτούν τα αγρίου τύπου θηλυκά που έχουν ζευγαρώσει με τα στείρα απελευθερωμένα αρσενικά. Η μέθοδος αυτή έχει εφαρμοστεί στο κουνούπι όπου χρησιμοποιήθηκε ως μηχανισμός φυλοδιαχωρισμού, αφού η πρωτεΐνη σήμανσης εκφραζόταν μόνο στο σπέρμα των αρσενικών εντόμων [77].

Το επόμενο σημαντικό ζήτημα στο οποίο έρχονται να συνεισφέρουν οι τεχνικές γενετικής μηχανικής είναι ο φυλοδιαχωρισμός. Όπως προαναφέρθηκε είναι απαραίτητο να αναπτυχθεί τρόπος κατά τον οποίο να μπορούμε να απομονώνουμε μόνο τα αρσενικά έντομα για απελευθέρωση εξουδετερώνοντας τα θηλυκά. Παρόλα αυτά η βιωσιμότητα των θηλυκών μέχρι και το τελευταίο στάδιο της εκτροφής είναι απαραίτητη, επομένως υπάρχει ανάγκη ανάπτυξης ενός συστήματος το οποίο θα προκαλεί θάνατο στα θηλυκά έντομα είτε κατόπιν ενεργοποίησης ενός μηχανισμού ή κατόπιν απενεργοποίησης του αναστολέα του μηχανισμού [64]. Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί διάφοροι τρόποι με τη χρήση γενετικής μηχανικής αξιοποιώντας διαφορετικούς μηχανισμούς. Αρχικά έχει χρησιμοποιηθεί η ευαισθησία σε θερμοκρασία (tsI) στη μεσογειακή μύγα όπου αναπτύχθηκαν θηλυκά άτομα τα οποία πεθαίνουν όταν δεν αναπτύσσονται στην απαραίτητη θερμοκρασία. Με αυτό τον τρόπο στις εγκαταστάσεις εκτροφής τα έντομα εκτρέφονται στην σωστή θερμοκρασία και πριν την απελευθέρωσή τους, εκτίθενται στην βλαπτική θερμοκρασία που σκοτώνει τα θηλυκά άτομα. Παρόλη την επιτυχία του εν λόγω συστήματος αντιμετωπίζει το ίδιο πρόβλημα που αντιμετωπίζουν όλα τα συστήματα κλασσικής γενετικής μηχανικής, δηλαδή ότι το σύστημα πρέπει να αναπτύσσεται εκ νέου για κάθε είδος-στόχο (χαρακτηρισμός νέων γονιδίων ευαίσθητων στη θερμοκρασία) καθώς δεν μπορεί το ίδιο σύστημα να εμφανίσει την ίδια απόδοση σε άλλα έντομα [80,81].

Μία άλλη μέθοδος που γνώρισε ευρεία χρήση είναι η μετάθεση επικρατούς γονιδίου επιλογής στο Υ χρωμόσωμα. Κατά τη μέθοδο αυτή με τη χρήση μεταθετών στοιχείων τοποθετείται στο Υ χρωμόσωμα ένα γονίδιο ανθεκτικότητας (πχ σε κάποιο αντιβιοτικό) με σκοπό την εφαρμογή του περιοριστικού παράγοντα πριν την απελευθέρωση και την κατ'επέκταση θανάτωση μόνο των θηλυκών ατόμων που δεν παρουσιάζουν την ανθεκτικότητα [82]. Η μέθοδος αυτή παρόλα αυτά έχει δεχτεί εκτεταμένη κριτική καθώς παρουσιάζει αρκετά προβλήματα. Αρχικά η χρήση μεταθετών στοιχείων για χρωμοσωμικές μεταθέσεις διατρέχει τον κίνδυνο της αντιστροφής ακυρώνοντας την λειτουργία της μεθόδου. Ακόμα οι χρωμοσωμικές μεταθέσεις πολλές φορές μειώνουν την βιωσιμότητα και ανταγωνιστικότητα των εντόμων, ενώ εμμένει το ζήτημα της ανάπτυξης της μεθόδου εκ νέου για κάθε έντομο-στόχο [65,71,72,83].

Ένα άλλο νέο πολλά υποσχόμενο σύστημα που αξίζει να αναφερθεί είναι η χρήση ενδονουκλεασών για την καταστροφή ριβωσωμικών (rDNA) γονιδίων του Χ χρωμοσώματος. Με αυτόν τον τρόπο οι γαμέτες που έχουν χ χρωμόσωμα δεν επιβιώνουν δίνοντας έτσι ένα πολύ μεγάλο ποσοστό (>90%) μόνο αρσενικών απογόνων [85, 86, 87]. Πρόσφατα μάλιστα η προσέγγιση αυτή έγινε και με τη χρήση του συστήματος CrispR-Cas9 με το γονίδιο της Cas9 να ενσωματώνεται στο γονιδίωμα υπό τον γαμετοειδικό υποκινητή της β τουμπουλίνης μαζί με αλληλουχία οδηγό RNA (U6 υποκινητής) που στοχεύει τα ριβοσωμικά γονίδια του Χ-χρωμοσώματος [88].

Στο εργαστήριο του L. Alphey το 2000 όμως αναπτύχθηκε μια νέα τεχνική η οποία εξασφαλίζει την εξόντωση των θηλυκών εντόμων υπό τον έλεγχο ενός συστήματος ανατροφοδότησης που λειτουργεί με απενεργοποίηση αναστολέα πριν την απελευθέρωση [84]. Η τεχνική βασίζεται στο σύμπλοκο tTA το οποίο εκφράζει έναν ενεργοποιητή γονιδίου στον οποίο έχει ενσωματωθεί η TetR αλληλουχία αναγνώρισης. Έτσι απουσία τετρακυκλίνης η πρωτεΐνη συνδέεται στον υποκινητή και τον ενεργοποιεί. Όταν όμως προστεθεί τετρακυκλίνη (πχ μέσω της τροφής των εντόμων) αυτή συνδέεται στον ενεργοποιητή και τον εμποδίζει να ενεργοποιήσει τον υποκινητή του γονιδίου στόχου. Μικρές ποσότητες τετρακυκλίνης είναι αρκετές για να έχουν την ανασταλτική επίδραση στην έκφραση του γονιδίου. Για την επίτευξη του φυλοειδικού συστήματος θανάτωσης θηλυκών σε πρώιμο εμβρυικό στάδιο (FSEL) το σύστημα χρειάζεται να έχει τα εξής στοιχεία[64,65,70].:



Πρώτον ο υποκινητής που επάγει την έκφραση του tTA πρέπει να είναι ενεργός μόνο σε θηλυκά άτομα και συγκεκριμένα σε εμβρυικό αναπτυξιακό στάδιο. Το σύστημα είναι σχεδιασμένο έτσι ώστε πριν την ωοπόθεση να μην επέρχεται θάνατος του εμβρύου καθώς η τετρακυκλίνη μέσω της τροφής που δέχεται η μητέρα είναι αρκετή για να καταστέλλει το σύστημα στο έμβρυο. Αυτό είναι εξαιρετικά σημαντικό για να μπορεί να λειτουργήσει η μαζική εκτροφή [70]. Αφού όμως γίνει η

ωοαπόθεση σε περίπτωση που το αυγό δεν βρίσκεται σε θρεπτικό υλικό με τετρακυκλίνη πεθαίνει. Έτσι κατά τη διάρκεια της εκτροφής τα αυγά τοποθετούνται σε θρεπτικό με τετρακυκλίνη ενώ στο τελικό στάδιο όπου πρέπει να γίνει η εξόντωση των θηλυκών τα αυγά τοποθετούνται σε θρεπτικό χωρίς τετρακυκλίνη.

Το δεύτερο είναι το αποπτωτικό γονίδιο που θα προκαλέσει τη θανάτωση του εμβρύου όταν ενεργοποιηθεί ο υποκινητής του. Το γονίδιο αυτό είναι επιθυμητό να είναι επικρατές και ομόζυγο για να εξασφαλίζει τη μέγιστη ενεργότητα και τη σίγουρη θανάτωση των θηλυκών ατόμων πρώτης γενιάς μετά την απελευθέρωση [74]. Ακόμα και στη δεύτερη γενιά τα αρσενικά που θα γεννηθούν είναι ετερόζυγα ως προς το γονίδιο θανάτωσης οπότε εξακολουθούν να μπορούν να προκαλέσουν θάνατο 50% των επόμενων θηλυκών απογόνων. Έχει προταθεί η εισαγωγή του συστήματος σε πολλαπλούς γονιδιακούς τόπους ώστε να αποτυγχάνεται μεταβίβαση του αποπτωτικού γονιδίου για περισσότερες από 1 γενιά [64,89]. Αξίζει να σημειωθεί ότι το σύστημα αυτό ουσιαστικά μπορεί να αντικαταστήσει τη συμβατική SIT, καταργώντας την ανάγκη για ακτινοβολία και αντικαθιστώντας την με την φυλοειδική εμβρυική θνησιμότητα η οποία δεν έχει αρνητικές συνέπειες στην επιβίωση και την ανταγωνιστικότητα του εργαστηριακού πληθυσμού.

Μια ακόμα προσέγγιση που έχει χρησιμοποιηθεί είναι η χρήση υποκινητή της εμβρυογένεσης σε συνδυασμό με φυλοειδικό (μόνο θηλυκά) ιντρόνιο που ενσωματώνεται στο γονίδιο του tTA. Έτσι λόγω της παρουσίας του ιντρονίου στα αρσενικά άτομα δεν μπορεί να γίνει το μάτισμα και ο tTA εκφράζεται μόνο στα θηλυκά, ενώ ο υποκινητής εξασφαλίζει την έκφραση σε εμβρυικό στάδιο [96].

Ένα σημαντικό πλεονέκτημα του συστήματος είναι η ασφάλεια που προσφέρει σε περίπτωση που κάποια έντομα ξεφύγουν κατά λάθος από τις εγκαταστάσεις εκτροφής. Κατά τη συμβατική SIT κάτι τέτοιο μπορεί να είναι πολύ βλαπτικό καθώς τα έντομα στερώνονται στο τελευταίο στάδιο της διαδικασίας και μια τυχαία απελευθέρωση μπορεί να προκαλέσει έξαρση του πληθυσμού κυρίως αν οι εγκαταστάσεις βρίσκονται σε περιοχή όπου έχει εξαληφθεί ή βρίσκεται υπό έλεγχο ο άγριος πληθυσμός. Αντίθετα, με την fsRIDL, τα έντομα που τυχόν αποδράσουν δε μπορούν να επιβιώσουν στο περιβάλλον καθώς η έλλειψη τετρακυκλίνης θα ενεργοποιήσει το σύστημα και δε θα παραχθούν απόγονοι.

Έχουν αναπτυχθεί διάφορες τεχνικές για την ενσωμάτωση των γονιδίων και υποκινητών του συστήματος στο έντομο στόχο. Η αρχή έγινε με το στοιχείο P που λειτουργεί αποκλειστικά στη *Drosophila melanogaster* και στη συνέχεια βρέθηκαν μηχανισμοί που εφαρμόζονται ευρέως σε όλα τα έντομα. Ο πιο συχνά χρησιμοποιούμενος είναι η χρήση της τρανσποζάσης για ενσωμάτωση του συστήματος από ένα πλασμιδιακό φορέα στο γονιδίωμα των γαμετών. Άλλοι μηχανισμοί που έχουν αναπτυχθεί είναι η Cre ρεκομπινάση (σύστημα Cre-loxP), η φC31 Int ρεκομπινάση, αλλά και το σύστημα RMCE (recombinase-mediated cassette exchange). Η πιο πρόσφατη και πιο υποσχόμενη τεχνική είναι η CrispR-Cas9 (σύστημα MCR) η οποία έχει πολύ υψηλά ποσοστά ανασυνδυασμού και πολύ υψηλή ακρίβεια ένθεσης του γονιδιακού συστήματος στο γονιδίωμα του εντόμου [90,91,92].

Το σύστημα της ρεκομπινάσης που χρησιμοποιείται έως τώρα έχει κάποιες προβληματικές αλλά έχουν γίνει προσπάθειες βελτίωσής του. Αρχικά το πρόβλημα που δημιουργείται από τη φύση του συστήματος, δηλαδή η πιθανότητα αναστροφής και εξαγωγής του γονιδίου μπορεί να καταπολεμηθεί είτε με εισαγωγή του, πολλές φορές, σε διαφορετικούς γονιδιακούς τόπους (ακόμα και αν αναστραφεί ένα τα υπόλοιπα εξακολουθούν να λειτουργούν). Αλλιώς μπορεί να γίνει

στοχευμένη εξαγωγή των αλληλουχιών ανασυνδυασμού εμποδίζοντας την ρεκομπινάση να αλληλεπιδράσει με το γονίδιο ξανά [64,73,93].

Τέλος πρέπει να τεθεί το ζήτημα των κανονισμών και νομοθεσίας που μπορεί να αποτελέσουν εμπόδιο στην χρήση των γενετικά τροποποιημένων εντόμων. Όταν γενετικά τροποποιημένοι οργανισμοί βρίσκονται κάτω από πολύ αυστηρό έλεγχο και κοινωνική αντιπάθεια παρόλο που τα συγκεκριμένα έντομα είναι σχεδιασμένα για να εξοντώνουν τον πληθυσμό στον οποίο ανήκουν και επομένως είναι μη βλαπτικά για το περιβάλλον. Είναι χαρακτηριστικό ότι στην Ευρώπη, σε αντίθεση με την Αμερική, μέχρι και σήμερα τα γενετικά τροποποιημένα τρόφιμα αντιμετωπίζονται με τρομερό σκεπτικισμό ενώ οι καλλιέργειές του εμποδίζονται από το νόμο[94]. Μέχρι λοιπόν να επανανοηματοδοτήσουμε έννοιες και να γίνει κοινωνική γνώση η φύση των ΓΤΟ, τα διαγονιδιακά έντομα που στοχεύουν σε οικολογική (μη χημική) αντιμετώπιση των εντόμων-παρασίτων, και κατασκευάζονται με καλά μελετημένα συστήματα μετά από χρόνια έρευνα, θα αντιμετωπίζονται με πιο πολύ γραφειοκρατεία από τα ακτινοβολημένα έντομα της συμβατικής SIT.

Η τεχνική της fsRIDL έχει αποτελέσει το νέο βήμα στην εξέλιξη της ST και με τη βοήθεια των μεθόδων γενετικής μηχανικής έχουν αναπτυχθεί συστήματα για αρκετά έντομα. Η αρχή έγινε με τον οργανισμό μοντέλο *D.melanogaster* όπου το 2000 δοκιμάστηκε με επιτυχία το σύστημα [84]. Από τότε έχουν αναπτυχθεί συστήματα για την *C.capitata* [95,96], την *A.suspensa* [97], το *B.mori* [98], την *Anastrepha ludens* [99] και τον δάκο της ελιάς *B.oleae* [100].

## ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ HID:

Το γονίδιο hid χαρακτηρίστηκε πρώτη φορά στη *D.melanogaster* το 1991 ως ένας εκ των ρυθμιστών της ανάπτυξης της κεφαλής και συγκεκριμένα του σταδίου εμπλοκής κεφαλής, από όπου πήρε και το όνομά του (head involution defective) [101]. Το 1995 όμως μια σειρά ερευνών του γονιδιακού τόπου H99 στον οποίο εμπεριέχεται το γονίδιο hid κατέληξε στο συμπέρασμα πως ο κύριος ρόλος του είναι η επαγωγή της απόπτωσης στο κύτταρο. Η λειτουργία του αυτή εξηγούσε και το ρόλο του στην ανάπτυξη της κεφαλής αφού η εμπλοκή κεφαλής απαιτεί την απόπτωση συγκεκριμένων κυττάρων. Η ερευνητική ομάδα κατέληξε στο συμπέρασμα αυτό μετά από γενετικά πειράματα όπου που έδειξαν ότι ελλείψει του γονιδιακού αυτού τόπου (H99) δεν μπορούσε να επιτευχθεί απόπτωση. Μετά την ανάλυση της περιοχής ταυτοποιήθηκαν και χαρακτηρίστηκαν τρία αποπτωτικά γονίδια το *rpr*, το *hid* και το *grim* [102,103,104]. Ένα τέταρτο αποπτωτικό γονίδιο ταυτοποιήθηκε το 2002 και ονομάστηκε *sickle* [105].

Μελέτη της αλληλουχίας των τριών αυτών γονιδίων κατέληξε στην ανακάλυψη μιας συντηρημένης κοινής περιοχής στο αμινοτελικό άκρο και των τριών ενώ παράλληλα στο *hid* ταυτοποιήθηκαν και πιθανές θέσεις φωσφορυλίωσης [103,104]. Με αρχή την κοινή αυτή περιοχή τους αλλά και νέα πειράματα που ακολούθησαν τέθηκε η υπόθεση συνεργατικής δράσης των γονιδίων [106]. Παράλληλα η κοινή τους αλληλουχία βρέθηκε να παίζει βασικό ρόλο στην αλληλεπίδρασή τους με τις DIAP (πρωτεΐνες αναστολής απόπτωσης) αναστέλλοντας την αλληλεπίδραση των DIAP με τη Dronc προκασπάση και τη ρύθμισή της [107,110]. Έτσι αρχίζει να

διαφαίνεται ένας μηχανισμός λειτουργίας των αποπτωτικών αυτών γονιδίων αφού εμποδίζουν τον αναστολέα απόπτωσης να καταστείλει τις αποπτωτικές κασπάσες.

Την ίδια περίοδο ανακαλύπτεται και ένας ρυθμιστικός μηχανισμός του hid μέσω της φωσφορυλίωσής του από το μονοπάτι των RAS/MAPK. Η αλυσίδα αντιδράσεων ξεκινάει από τον αυξητικό παράγοντα EGFR ο οποίος ενεργοποιεί το μονοπάτι RAS/MAPK το οποίο με τη σειρά του φωσφορυλιώνει και αδρανοποιεί το hid. Έτσι κατά την έκφραση του αυξητικού παράγοντα το κύτταρο δε μπορεί να μπει σε διαδικασία απόπτωσης [108,109,122].

Ακόμα παρατηρείται ο μιτοχονδριακός εντοπισμός της πρωτεΐνης hid όπου και υφίσταται τις απαραίτητες τροποποιήσεις για να καταστεί πλήρως ενεργή. Ο εντοπισμός της στο μιτοχόνδριο είναι απαραίτητος για την αποτελεσματική δράση της, και οφείλεται σε μια αλληλουχία της κοντά στο καρβοξυτελικό άκρο [111, 122]. Η σημασία του γονιδίου hid καταδεικνύεται και από την υψηλή εξελικτική συντήρηση που παρουσιάζει αφού πειράματα in vitro επιβεβαιώνουν πως η πρωτεΐνη hid της *D.melanogaster* μπορεί να επάγει την απόπτωση σε κυτταρική σειρά θηλαστικών (HeLa cells)[111].

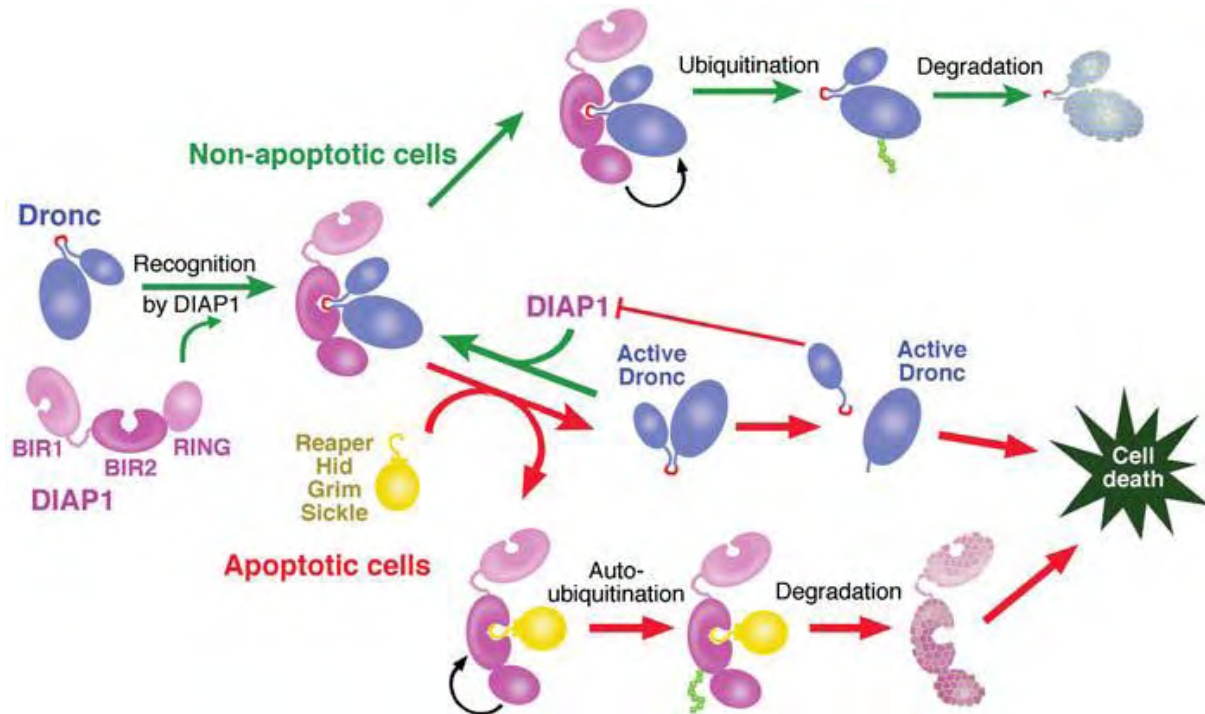
Στα πλαίσια της προσπάθειας αποκρυπτογράφησης του μονοπατιού των αποπτωτικών γονιδίων προκύπτει πως τα 3 γονίδια εμπλέκονται στο ίδιο μονοπάτι μέσω διαφορετικών μηχανισμών ενεργοποίησης, ρύθμισης και στόχου ενώ η συνεργιστική τους δράση μπορεί να επιφέρει απόπτωση με μεγάλη αποτελεσματικότητα. Είναι πια ξεκάθαρο πως λειτουργούν στο μονοπάτι των κασπασών και επηρεάζουν την καταστολή τους μέσω των DIAP, ενώ πειράματα με τον καταστολέα των κασπασών p35 δείχνουν ότι το hid δεν αλληλεπιδρά άμεσα με τις κασπάσες αλλά με το DIAP [112]. Η αλληλεπίδραση τους με τις DIAP γίνεται μέσω της περιοχής BIR η οποία αποτελεί και την περιοχή πρόσδεσης της Dronc για τη ρύθμισή της [113]. Η Dronc με τη σειρά της είναι μια προκασπάση η οποία κόβει και ενεργοποιεί την DrICE μια αποπτωτική κασπάση. Έτσι με την αναστολή της Dronc επέρχεται αναστολή της απόπτωσης.

Ο τρόπος που το hid πετυχαίνει την επαγωγή της απόπτωσης αρχίζει να ξεκαθαρίζει το 2002 όπου ανακαλύπτεται πως η πρωτεΐνη hid μετά την πρόσθεσή της στη DIAP προκαλεί την αυτο-ουβικιτιλίωσή της και κατ'έπекταση την αποικοδόμησή της στο πρωτεάσωμα. Η αλυσίδα γεγονότων που προκαλείται ξεκινάει με τη μη καταστολή της Dronc η οποία αυτοενεργοποιείται, ενεργοποιεί την DrICE και έτσι προκαλείται η απόπτωση [117,118].

Απουσία του hid η DIAP προσδέεται μέσω της περιοχής BIR2 στην Dronc και η περιοχή RING την ουβικιτιλιώνει στέλνοντάς την προς αποικοδόμηση. Έτσι δεν μπορεί να υποστεί ενεργοποίηση η DrICE και δεν επέρχεται απόπτωση. Το hid προσδέεται στην BIR2 περιοχή της DIAP, ανταγωνιζόμενο την πρόσδεση της Dronc και εμποδίζοντάς την, έτσι ώστε η DIAP ελλείψει υποστρώματος αυτοουβικιτιλιώνεται, μέσω της RING περιοχής της, και οδηγείται στην αποικοδόμηση [115,118,119].

Οι άλλες δύο αποπτωτικές πρωτεΐνες *grg*, *grim* λειτουργούν και αυτές στο μονοπάτι των κασπασών απλά μέσω διαφορετικού μηχανισμού. Οι *grg*, *grim* προσδέονται στην περιοχή BIR1 (άμεσα καταστολή της DrICE από την DIAP) ενώ η hid προσδέεται κυρίως στην BIR2 (έμμεση καταστολή μέσω Dronc). Ακόμη έχει ανακαλυφθεί πως η πρωτεΐνη *grg* σχηματίζει ομοδιμερή αλλά και ετεροδιμερή με την hid τα οποία είναι απαραίτητα για τον εντοπισμό της *grg* στο μιτοχόνδριο.

Απουσία hid η rpr έχει μειωμένη δραστηριότητα που οφείλεται στην αδυναμία της να οδηγηθεί στο μιτοχόνδριο [116,120,121,123].



## Σκοπός:

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η κλωνοποίηση και ο χαρακτηρισμός του πλήρους ανοιχτού αναγνωστικού πλαισίου του προαποπρωτικού γονιδίου head involution defective (hid) του δάκου της ελιάς (*B. oleae*) και των ρυθμιστικών περιοχών του. Το γονίδιο hid επιλέχθηκε καθώς αποτελεί ένα καλά μελετημένο και συντηρημένο αποπτωτικό γονίδιο για τις μύγες των φρούτων το οποίο έχει χρησιμοποιηθεί ως αποπτωτικός παράγοντας σε διαγονίδια για την παραγωγή διαγονιδιακών σειρών εντόμων.

Η μερική αλληλουχία του γονιδίου ήταν γνωστή και για αυτό επιχειρήθηκε η ενίσχυση και αλληλούχιση της υπόλοιπης αλληλουχίας του γονιδίου και ανοδικών ρυθμιστικών στοιχείων του με στόχο την συγκριτική μελέτη των περιοχών του γονιδίου και της λειτουργίας του. Επικεντρωθήκαμε στο χαρακτηρισμό των περιοχών της πρωτεΐνης hid που έχουν βρεθεί να είναι απαραίτητες για τη λειτουργία της σε συγγενικά μελετημένα είδη, και επιδιώξαμε τον εντοπισμό ομολογίας και πιθανής κοινής λειτουργίας για τις περιοχές αυτές στο hid του δάκου. Τέλος η ανάκτηση δημοσιευμένων δεδομένων RNAseq μας επέτρεψε να δούμε τα πρότυπα έκφρασης του γονιδίου κατά την ανάπτυξη του δάκου και τη σύγκρισή του με τον καλά μελετημένο οργανισμό μοντέλο *D.melanogaster*.

# Υλικά και Μέθοδοι

---

## ΣΥΛΛΟΓΗ ΑΥΓΩΝ ΔΑΚΟΥ:

Στο εργαστήριο διατηρείται στέλεχος του δάκου *Bactrocera oleae* το οποίο χρησιμοποιείται για τις πειραματικές διαδικασίες. Διατηρείται σε συνθήκες  $23\pm 2^{\circ}\text{C}$  και υγρασία  $65\pm 5\%$ , σε ειδικά διαμορφωμένα ξύλινα κλουβιά  $30\times 30\times 30$  εκατοστών. Για την ωαπόθεση των αυγών του δάκου υπάρχει στο κλουβί ειδικά διαμορφωμένος κώνος.

Έτσι για τα αυγά που συλλέχθηκαν χρησιμοποιήθηκε απιονισμένο νερό για το ξέπλυμα του εσωτερικού του κώνου και τη συλλογή τους σε ένα τρυβλίο. Ακολούθως ελέγχθηκε η ακαιριαιότητά τους στο στερεοσκόπιο και τοποθετήθηκαν σε διηθητικό χαρτί διαβρεγμένο με προπιονικό οξύ για την επώασή τους. Μετά το πέρας του χρονικού διαστήματος που μας ενδιέφερε (12ώρες και 15ώρες) το κάθε αυγό μεταφέρεται σε erpendorf 1,5ml που περιέχει 50μl Trisur και τοποθετείται στους  $-80^{\circ}\text{C}$  για να διατηρηθεί μέχρι να χρησιμοποιηθεί.

## ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ RNA:

Η διαδικασία απομόνωσης του RNA έγινε βάση του πρωτοκόλλου TRIsure (BIOLINE), κατά το οποίο εκτυλίσσεται σε 4 στάδια. Ομογενοποίηση αυγού (έγινε μηχανικά στο erpendorf με έμβολο), Λύση κυττάρων, διαχωρισμός RNA/πρωτεϊνών, ανάκτηση RNA. Η διαδικασία λαμβάνει χώρα σε καθαρό πάγο χωρίς RNάση και με χρήση αποστειρωμένων υλικών για την προστασία των μορίων RNA που είναι ευαίσθητα.

## Υλικά:

- Αυγό δάκου
- TRIsure
- BCP
- Ισοπροπανόλη
- Αιθανόλη 75%
- Καθαρό απιονισμένο νερό
- Αποστειρωμένο έμβολο χωρίς RNάση

## Μεθοδολογία:

Τα αυγά που διατηρούνται στους  $-80^{\circ}\text{C}$  ξεπαγώνονται σταδιακά στον πάγο και φυγοκεντρώνται για να συγκεντρωθεί το υλικό στο erpendorf. Ακολουθούν τα βήματα:

1. Ομογενοποίηση και ξέπλυμα του εμβόλου με 50μl trisol [συνολικός όγκος 100μl]
2. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5min
3. Vortex και ξανά Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5min
4. Φυγοκέντρηση τους  $4^{\circ}\text{C}$  στα 12.000g για 10min



5. Μεταφορά το υπερκειμένου σε νέα σωληνάκια erpendorf
6. Προσθήκη BCP 10μl και ανάδευση για 15sec [OXI Vortex]
7. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 2min
8. Φυγοκέντρηση στους 4°C 12.000g για 18min
9. Μεταφορά της υδατικής φάσης σε νέο σωληνάκι στον παγο [45μl]
10. Προσθήκη ισοπροπανόλης (45μl) και 0,5μl γλυκογόνου
11. Vortex και σύντομη φυγοκέντρηση
12. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1h
13. Φυγοκέντρηση στους 4°C 12.000g για 30min
14. Απόχυση του υπερκειμένου
15. Πρόσθεση αιθανόλης 75% με βάση την αναλογία 200μl αιθανόλη σε 140μl υδατικής φάσης } x3
16. Φυγοκέντρηση στους 4°C 7.500g για 5min και απόχυση του υπερκειμένου
17. Η αιθανόλη απομακρυνεται και το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει σε αποστειρωμένες συνθήκες
18. Αναδιάλυση του ιζήματος σε 8μl καθαρού απιονισμένου νερού

## ΣΥΝΘΕΣΗ CDNA ΜΕ ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ ΑΠΟ RNA

Κατά την αντίστροφη μεταγραφή το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση δημιουργεί cDNA από μήτρα μονόκλωνου RNA. Έτσι από το RNA καταλήγουμε σε δίκλωνο cDNA το οποίο μας είναι απαραίτητο για την ενίσχυση προϊόντων με PCR.

### Υλικά

- Ολικό RNA [ $>1\mu\text{g}$ ]
- Τυχαίοι εκινητές [450ng]
- dNTPs [2mM]
- Αντίστροφη μεταγραφάση [200units]
- Ρυθμιστικό δάλυμα ενζύμου
- Αναστολέας ριβονουκλεασών [40units]

### Μεθοδολογία

1. Επώαση στους 70°C για 10 λεπτά (αποδιάταξη)
2. Επώαση στους 42 °C για 3,5 λεπτά (υβριδοποίηση)
3. Επώαση στους 48 °C για 40 λεπτά (επιμήκυνση)
4. Επώαση στους 80 °C για 10 λεπτά (απενεργποίηση ενζύμου)
5. Επώαση στους 4 °C μέχρι το επόμενο βήμα

Η διαδικασία λαμβάνει χώρα σ θερμοκυκλοποιητή.

## ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ CDNA ΜΕ RNAΣΗ

### Υλικά:

- cDNA
- Ένζυμο Rνάση
- Ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμου
- Καθαρό απιονισμένο νερό

### Μεθοδολογία

1. Επώαση για 60 λεπτά στους 37 °C (καταστροφή μορίων RNA από την RNAση)
2. Επώαση για 10 λεπτά στους 65 °C (απενεργοποίηση του ενζύμου)

## ΚΑΤΑΚΡΗΜΝΙΣΗ CDNA:

### Υλικά:

- cDNA (μετά την επεξεργασία με την RNAση) [30μl]
- CH<sub>3</sub>COONa [30μl]
- Ισοπροπανόλη [300μl]
- Γλυκογόνο [0,5μl]
- Καθαρό απιονισμένο νερό [270μl]
- Αιθανόλη 70%

### Μεθοδολογία

1. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά
2. Φυγοκέντρηση σε έγιστη ταχύτητα για 20 λεπτά
3. Απόχυση του υπερκείμενου και προσθήκη αιθανόλη 70%. (300μl) [ανακινώ ελεφρά]
4. Φυγοκέντρηση σε μέγιστη ταχύτητα για 5 λεπτά
5. Η αιθανόλη απομακρύνεται και το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει σε αποστειρωμένες συνθήκες
6. Αναδιάλυση του ιζήματος σε 15μl καθαρού απιονισμένου νερού

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ «ΟΥΡΑΣ» ΑΔΕΝΙΝΩΝ (POLYA TAILING)

### Υλικά:

- cDNA
- dATPs
- Ένζυμο τρανσφεράση ακραίων δεοξυριβονουκλεοτιδίων (TdT)
- Ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμου
- Καθαρό απιονισμένο νερό

## Μεθοδολογία

1. Επώαση για 15 λεπτά στους 37 °C (προσθήκη dATPs στα άκρα των μορίων cDNA)
2. Επώαση για 10 λεπτά στους 70°C (απενεργοποίηση του ενζύμου)

## RACE-PCR

Κατά τη διαδικασία της RACE-PCR επιχειρείται να ενισχυθεί κομμάτι DNA για τη ενίσχυση του οποίου έχουμε έναν υποκινητή (το οπίσθιο) ενώ ως εμπρόσθιο εκκινητής χρησιμοποιείται ολιγονουκλεοτίδια θυμινών (oligo dT) το οποίο είναι συμπληρωματικό στην πολυαδενική ουρά που έχει εισαχθεί στο cDNA.

### Υλικά:

- polyA-cDNA
- dNTPs: 10mM
- οπίσθιος ειδικός εκκινητής: 10pmol/μl
- MgCl<sub>2</sub> : 25mM
- Ταq πολυμεράση
- Ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμου
- Εμπρόσθιος εκκινητής Oligo DT: 10pmol/μl
- Adapt DT: 10pmol/μl

### Μεθοδολογία:

1. Επώαση στους 94°C για 5 min
2. Επώαση στους 55 °C για 5 λεπτά
3. Επώαση στους 72 °C για 30 λεπτά
4. Επώαση στους 94 °C για 30 δευτερόλεπτα
5. Επώαση στους 55 °C για 45 δευτερόλεπτα
6. Επώαση στους 72 °C για 2 λεπτά
7. Επώαση στους 94 °C για 40 δευτερόλεπτα
8. Επώαση στους 55 °C για 45 δευτερόλεπτα
9. Επώαση στους 72 °C για 15 λεπτά
10. Επώαση στους 4 °C μέχρι τη χρήση

Η διαδικασία λαμβάνει χώρα σε θερμοκυκλοποιητή.

## ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΠΗΚΤΩΜΑΤΟΣ ΑΓΑΡΟΖΗΣ:

### Υλικά:

- Αγαρόζη
- Διάλυμα TBE
- Βρωμιούχο αιθίδιο

### Μεθοδολογία (για πήκτωμα 100ml περιεκτικότητας 1,2% σε αγαρόζη)

1. Ζυγισή 1,2ml αγαρόζη και προσθήκη σε κωνική φυάλη

2. Προσθήκη 100ml TBE
3. Θέρμανση της κωνικής φυάλης σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι να διαλυθεί πλήρως η αγαρόζη
4. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι η θερμοκρασία του διαλύματος να μειωθεί
5. Προσθήκη 4ml BrEt και ανάδευση
6. Εισαγωγή του διαλύματος σε ειδικό καλούπι με χτενάκια για πηγαδάκια
7. Επώαση σε ερμοκρασία δωματίου μέχρι την πήξη και αφαίρεση των χτενών

## ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ DNA ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

### Υλικά:

- Πήκτωμα αγαρόζης
- DNA
- Διάλυμα φόρτωσης
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης
- Ανιχνευτής

### Μεθοδολογία:

1. Προσθήκη διαλύματος φόρτωσης στα δείγματα
2. Τοποθέτηση πηκτώματος στη συσκευή ηλεκτροφόρησης
3. Προσθήκη TBE μέχρι την επικάλυψη του πηκτώματος
4. Εισαγωγή δειγμάτων στα πηγαδάκια του πηκτώματος
5. Εισαγωγή του μάρτυρα σε ένα πηγαδάκι
6. Ηλεκτροφόρηση στην κατάλληλη τάση για επαρκές χρονικό διάστημα μέχρι το διαχωρισμό των ζωνών
7. Επιβεβαίωση της εικόνας σε UV φωτισμό

## ΑΝΑΚΤΗΣΗ DNA ΑΠΟ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Η ανάκτηση DNA από πηκτωμα αγαρόζης γίνεται για την απόκτηση του DNA συγκεκριμένου μεγέθους που μας ενδιαφέρει (παομόνωση συγκεκριμένης ζώνης) αλλά και για τον καθαρισμό του DNA από προσμύξεις που υπάρχουν στο διάλυμα της PCR (εκκινητές, ένζυμο, ρυθμιστικά διαλύματα, δεοξυριβονουκλεοτίδια κλπ)

Η ανάκτηση έγινε σύμφωνα με το kit GF1-Vivantis

## ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ DNA

Η διαδικασία κλωνοποίησης του DNA περιλαμβάνει την εισαγωγή του τμήματος DNA που σκεύουμε να κλωνοποιήσουμε σε πλασμιδιακό φορέα που περιέχει γονίδιο αντίστασης σε αντιβιοτικό, το μετασχηματισμό βακτηριακών κυττάρων με το εν λόγω πλασμίδιο, την καλλιέργεια των κυττάρων στο αντιβιοτικό που παρέχει αντίσταση ο πλασμιδιακός φορέας με αποτέλεσμα την επιβίωση μόνο των μετασχηματισμένων κυττάρων. Παράλληλα ο πλασμιδιακός φορέας περιέχει γονίδιο έκφρασης του lacZa το οποίο σε συνδυασμό με το lacZb που εκφράζεται στο κύτταρο επάγουν την έκφραση της β-γαλακτοσιδάσης η οποία μεταβολίζει το X-gal και χρωματίζει τα κύτταρα μπλε. Το γονίδιο αυτό όταν εισαχθεί το τμήμα DNA που κλωνοποιείται διακόπτεται με αποτέλεσμα την μη εμφάνιση του μπλε χρώματος. Έτσι από τις βακτηριακές αποικίες που επιβίωσαν επιλέγονται αυτές που δεν έχουν μπλέ χρώμα. Η διαδικασία καταλήγει με μια ομοιογενή βακτηριακή καλλιέργεια τα κύτταρα της οποίας όλα περιέχουν το μετασχηματισμένο πλασμίδιο.

## ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΣΥΝΔΕΣΗΣ ΤΜΗΜΑΟΣ DNA ΜΕ ΤΟΝ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟ ΦΡΕΑ (DNA LIGATION)

### Υλικά:

- Τμήμα DNA (ένθεμα)
- PBS-T vector (πλασμιδιακός φορέας) (50ng)
- T4 DNA λιγάση (1, 5units)
- Υθμιστικό διάλυμα ενζύμου
- Καθαρό απιονισμένο νερό

### Μεθοδολογία:

1. Αρχικά υπολογίζουμε την ποσότητα DNA ενθέματος που θα εισαχθεί στον πλασμιδιακό φορέα με βάση τον τύπο: 
$$ng\ DNA = \frac{ng\ πλασμιδίου * μέγεθος\ DNA(bp) * μοριακός\ λόγος(\frac{1}{3})}{μέγεθος\ πλασμιδίου\ (bp)}$$
2. Επώαση στους 22°C για 60 λεπτά

## ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΓΙΑ ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΑΤΡΗΣΗ:

### Υλικά:

- Ανασυνδιασμένοι πλασμιδιακοί φορείς (προϊόν της αντίδρασης σύνδεσης)
- Δεκτικά κύτταρα DH5a
- Θρεπτικό υλικό SOC
- X-Gal
- IPTG

- LB-agar
- αμπικιλίνη

### Μεθοδολογία:

1. Σταδιακό ξεπάγωμα κυττάρων (50μl/σωληνάκι) από τους -80 °C σε πάγο.
2. Αραιωση του δείγματος με τον ανασυνδιασμένο φορέα 1/10 με καθαρό απιονισμένο νερό
3. Προσθήκη 2μl από το αραιωμένο δείγμα σε σωληνάκι με τα δεκτικά κύτταρα
4. Επώαση στον πάγο για 1 λεπτό
5. Μεταφορά του μείγματος σε προψυγμή κψελίδα και τοπθέτησή της στην υποδοχή της συσκευής ηλεκτροδιάτρησης
6. Εφαρμογή ηλεκτρικού παλμού 13,8kV/cm
7. Προσθήκη 1ml διαλύματος SOC
8. Ανάδευση και μεταφορά σε αποστειρωμένο σωλήνα
9. Επώαση του μείγματος στις 180rpm στους 37 °C για 60 λεπτά
10. Επίστρωση 200μl της καλλιέργειας (+30μl X-Gal και 3μl IPTG) σε τρυβλίο με αποστειρωμένο LB-agar-αμπικιλίνη(100μg/ml) [σε ασηπτικές συνθήκες κάτω από φλόγιστρο]
11. Από τις αποικίες επιλέγονται οι λευκές (απουσία μπλε χρώματος άρα είσοδος DNA)
12. Επώαση σε θρεπτικό υλικό Lb-broth για 16 ώρες στους 37 °C στις 180rpm

### ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ ΦΟΡΕΑ:

#### Υλικά:

- Διάλυμα Jet
- Διάλυμα Alkali
- Διάλυμα CH<sub>3</sub>COOK pH=4,8
- Ισοπροπανόλη
- Αιανόλη 70%
- Διάλυμα TE-RNase

#### Μεθοδολογία:

1. Μεταφορέα σε erpendorf (1,5μl) των αποικιών από την κορεσμένη υγρή βακτηριακή καλλιέργεια.
2. Φυγοκέντριση 3min 3000rpm και υπερκειμένου. Διατήρηση του ιζήματος στον πάγο.
3. Πρόσθεση 100μl παγωμένου διαλύματος jet και vortex για 1λεπτό (ισοοσμωτικό διάλυμα).
4. Επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
5. Πρόσθεση 200μl διαλύματος Alkali. Ανάδευση αναποδογυρίζοντας το erpendorf 5 φορές Επώαση για 3-5 λεπτά στον πάγο (λύση των κυττάρων).
6. Πρόσθεση 150μl διαλύματος παγωμένου CH<sub>3</sub>COOK pH=4,8, vortex και επώαση στον πάγο για 8-10 λεπτά (εξουδετέρωση alkali)
7. Φυγοκέντριση για 5 λεπτά σε μέγιστη ταχύτητα και το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο σωληνάκι erpendorf.

8. Πρόσθεση ίσου όγκου ισοπροπανόλης, vortex και επώαση 20-30min σε θερμοκρασία δωματιου (Κατακρήμνηση).
9. Φυγοκέντρηση 5 λεπτά σε μέγιστη ταχύτητα και αφαίρεση υπερκειμένου.
10. Προσθήκη μισού όγκου αιθανόλη 70% (απομάκρυνση των εναπομείναντων αλάτων) Ήπια ανάδευση
11. Φυγοκέντρηση 10λεπτα σε μέγιστη ταχύτητα και αφαίρεση υπερκειμένου
12. Η αιθανόλη απομακρυνεται και το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει σε αποστειρωμένες συνθήκες
13. Αναδιάλυση του ιζήματος σε 15μl διαλύματος TE-RNAse
14. Διατήρηση στους 4°C.

## **ΠΕΨΗ ΜΕ ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΑ ΕΝΖΥΜΑ:**

### **Υλικά:**

- DNA (100-500ng)
- Ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμου
- Ένζυμο περιορισμού (2units)
- Καθαρό απιονισμένο νερό

### **Μεθοδολογία:**

1. Προσθήκη των υλικών σε σωληνάκι erpendorf με τελικό όγκο 10μl
  2. Ανάδευση
  3. Επώαση στους 37°C για 1 ώρα
-



# Αποτελέσματα-Συζήτηση

---

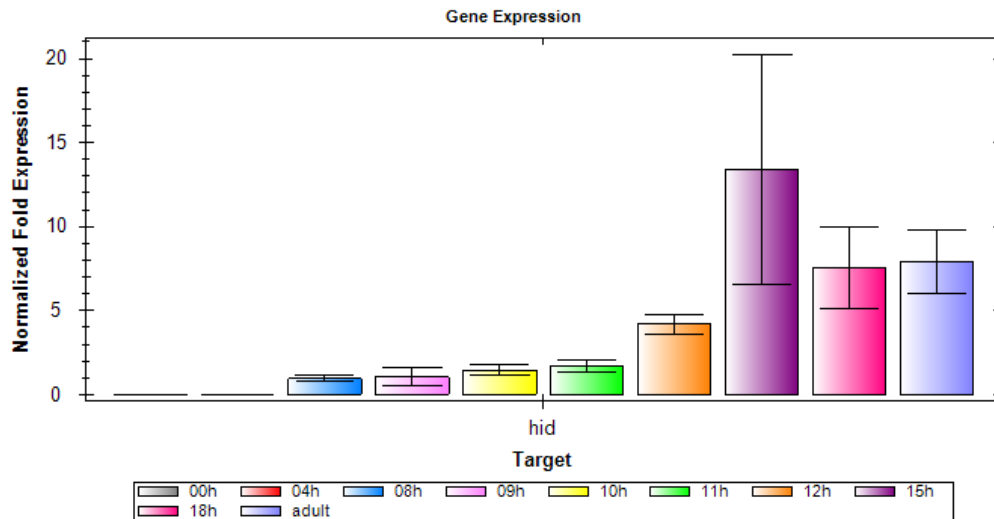
Η εργασία αυτή είχε ως στόχο να χαρακτηρίσει το γονίδιο *hid* του δάκου της ελιάς και αποτελεί κομμάτι συντονισμένης προσπάθειας που επιχειρεί να δημιουργήσει σύστημα *fsRIDL* στο δάκο. Ο χαρακτηρισμός και η αλληλούχιση του γονιδίου *hid* λοιπόν αποσκοπεί στη χρήση του ως αποπτωτικό παράγοντα στο συγκεκριμένο διαγονίδιο.

Το γονίδιο *hid* αποτελεί ένα από τα 3 βασικά προαποπτωτικά γονίδια των εντόμων *hid*, *grg*, *grim*. Ο ρόλος του είναι να ενεργοποιεί το μονοπάτι των αποπτωτικών κασπασών εμποδίζοντας τη δράση των αναστολέων των κασπασών. Μελέτες έχουν δείξει ότι κατά την έκφρασή του ενεργοποιεί το μονοπάτι της απόπτωσης τόσο στον οργανισμό προέλευσής του όσο και σε ετερόλογους οργανισμούς, αφού εμφανίζει υψηλή συντήρηση. Επιπρόσθετα από την αποπτωτική δράση που εμφανίζει καθεαυτό το γονίδιο *hid*, παίζει ρόλο και στην αποπτωτική δράση του γονιδίου *grg* του οποίου εξασφαλίζει τον μιτοχondριακό εντοπισμό, μέσω ετεροδιμερισμού των δύο.

Λόγω της λειτουργίας του αυτής το γονίδιο *hid* επιλέχθηκε να εισαχθεί σε διαγονίδια για *fsRIDL* ως αποπτωτικός τελεστής. Έχει χρησιμοποιηθεί σε *fsRIDL* σύστημα στη *D. melanogaster*, στην *C. capitata*, στην *A. ludens* και στην *A. suspensa*. Μάλιστα το διαγονίδιο για την *A. suspensa* περιέχει το γονίδιο *hid* της *A. ludens* καθώς τα συγγενικά αυτά είδη εμφανίζουν ελάχιστες διαφορές στην αλληλουχία του γονιδίου με τις λειτουργικές και ρυθμιστικές περιοχές να εμφανίζουν σχεδόν 100% συντήρηση. Έτσι στα πλαίσια του στόχου δημιουργίας διαγονιδίου για *fsRIDL* στο δάκο της ελιάς επιχειρήθηκε η απομόνωση, αλληλούχιση και ο χαρακτηρισμός του γονιδίου *hid* του δάκου.

## ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΜΕΡΟΥΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *HID* (*B.OLEAE*) ΜΕ 5'RACE PCR

Ο πρώτος στόχος λοιπόν της εργασίας αυτής ήταν η απομόνωση του πλήρους γονιδίου *hid* του δάκου της ελιάς με σκοπό την αλληλούχιση και τον χαρακτηρισμό του. Συγκεκριμένα στοχεύαμε στην απομόνωση του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης και των ρυθμιστικών στοιχείων του. Για το λόγο αυτό χρειαζόταν να παραχθεί συμπληρωματικό δίκλωνο DNA (cDNA) από RNA καθώς το γονιδιωματικό DNA περιέχει τα ιντρόνια που δεν μας ενδιέφεραν. Για την απομόνωση του RNA ήταν σημαντική η επιλογή της βέλτιστης χρονικής στιγμής έτσι ώστε να υπάρχει υψηλή έκφραση του γονιδίου. Έτσι απομονώθηκαν αυγά του δάκου της ελιάς 12 και 15 ωρών μετά την ωοαπόθεση καθώς έχει δειχθεί πως το γονίδιο *hid* εκφράζεται σε υψηλότερα επίπεδα κατά αυτές τις χρονικές περιόδους (Εικόνα 1 ) [125]. Από τα αυγά αυτά απομονώθηκε RNA το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα για RT-PCR για την παραγωγή δίκλωνου cDNA.



Εικόνα 4: Πρότυπα έκφρασης του γονιδίου hid κατά την ανάπτυξη του δάκου της ελιάς [125]

Από ήδη δημοσιευμένα δεδομένα RNAseq [hid\_C52174\_g1\_i1] γνωρίζαμε μεγάλο τμήμα της αλληλουχίας του γονιδίου αλλά χρειαζόμασταν ακόμα ένα μέρος της 5' αλληλουχίας αλλά και τα 5' ρυθμιστικά στοιχεία. Για την απομόνωση του υπόλοιπου γονιδίου καθώς και των 5' ρυθμιστικών περιοχών του χρησιμοποιήθηκε η τεχνική 5'RACE PCR. Για την τεχνική αυτή χρησιμοποιήθηκαν 2 ανάστροφοι εκκινητές οι οποίοι σχεδιάστηκαν με βάση τη μερική αλληλουχία που ήταν διαθέσιμη ώστε να προσδένονται στο εσωτερικό του γονιδίου, και ένας ολιγο-θυμινικός (oligodT) εμπρόσθιος. Για να μπορέσει να ενισχυθεί το γονίδιο με την PCR εισάχθηκαν πολυαδενινικές (polyA) αλληλουχίες στα άκρα των κομματιών cDNA συμπληρωματικές προς τον oligodT εκκινητή.

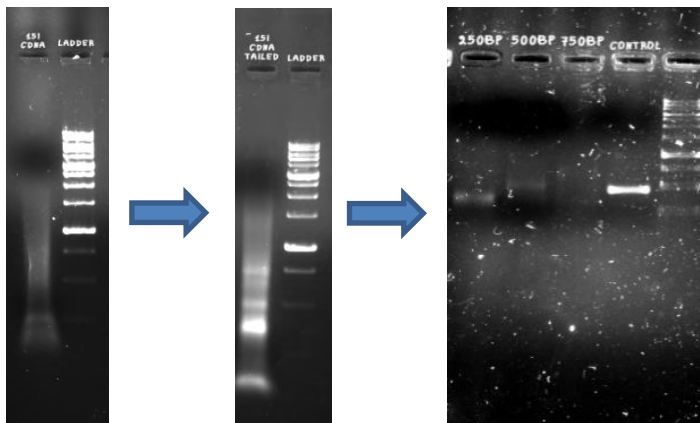


Εικόνα 5: Ανοιχτό αναγνωστικό πλαίσιο του γονιδίου hid με ουρά πολυΑδενινική και σημεία πρόσδεσης εσωτερικών εκκινητών GSP1, GSP2. Με κίτρινο η μερική αλληλουχία του γονιδίου που ήταν γνωστή.

Έτσι ο oligodT εκκινητής χρησιμοποιήθηκε μαζί με έναν εκ των 2 ανάστροφων εκκινητών για την PCR. Η 5'RACE PCR έγινε σε 2 στάδια. Πρώτο στάδιο ενίσχυσης έγινε με τον oligodT εκκινητή και τον GSP1 ανάστροφο εκκινητή που είναι ο εξωτερικός με μήτρα το polyA-cDNA. Τα παράγωγα της PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης και απομονώθηκαν. Το απομονωμένο παράγωγο χρησιμοποιήθηκε σαν μήτρα για την PCR δεύτερου σταδίου στην οποία παράλληλα με τον oligodT εκκινητή χρησιμοποιήθηκε ο GSP2 εσωτερικός ανάστροφος εκκινητής για πιο ειδικά αποτελέσματα.

## ΚΛΩΝΟΠΟΗΣΗ ΤΟΥ HID (B.O.)

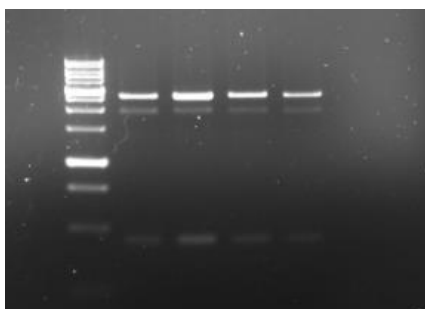
Τα παράγωγα του δεύτερου σταδίου ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης και απομονώθηκαν για να κλωνοποιηθούν. Απομονώθηκαν 3 μπάντες (250bp, 500bp, 750bp) οι οποίες κατόπιν ηλεκτροφορήθηκαν ξεχωριστά για να ποσοτικοποιηθούν με βάση control δείγμα 450bp. Οι 3 αυτές ζώνες οδηγήθηκαν προς κλωνοποίηση καθώς ακόμα και η μικρότερη (250bp) ήταν αρκετή για να μας δώσει την υπόλοιπη αλληλουχία του γονιδίου καθώς ο εκκινητής GSP2 έπιανε ακριβώς 250 νουκλεοτίδια εσωτερικά του γονιδίου.



Εικόνα 6:

Από αριστερά : Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης: i) προϊόντος 1<sup>ου</sup> σταδίου 5'RACE-PCR, ii) προϊόντων 2<sup>ου</sup> σταδίου 5'RACE-PCR, iii) απομονωμένων τελικών προϊόντων 5'RACE-PCR με control δείγμα (1kb Blue DNA Ladder/Morganville Scientific DL0200)

Στη συνέχεια οι απομονωμένες ζώνες εισήχθησαν σε κατάλληλο πλασμιδιακό φορέα ο οποίος χρησιμοποιήθηκε για να μετασηματίσει με ηλεκτροδιάτρηση κύτταρα *E.coli* DH5a. Τυχαίες μετασηματισμένες αποικίες επιλέχθηκαν και από αυτές απομονώθηκε το πλασμιδιακό DNA. Μετά την απομόνωσή του, ο φορέας υποβλήθη σε πέψη με περιοριστικά ένζυμα (PvuII). Από την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της πέψης δεν επιβεβαιώθηκε η εισαγωγή του προϊόντος PCR στο φορέα. Η διαδικασία επαναλήφθηκε πολλές φορές με διαφορετικά προτόκωλλα χωρίς να δώσει θετικό αποτέλεσμα.



Εικόνα 7: Τζέλ ηλεκτροφόρισης πλασμιδιακών φορέων μετά από πέψη με περιοριστικό ένζυμο (PvuII). Όλα τα δείγματα (3 απομονωμένα προϊόντα RACE-PCR + control) απέτυχαν να ενσωματωθούν στον φορέα.

## ΓΟΝΙΔΙΑΚΟΣ ΧΑΡΤΗΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ HID (B.OLEAE)

Παράλληλα με τις προσπάθειες κλωνοποίησης του γονιδίου, ήταν σε εξέλιξη η αλληλούχιση του τρανσκριπτόματος (RNAseq) και του γονιδιώματος (DNAseq) του δάκου που γινόταν από το εργαστήριο. Αξιοποιώντας αυτά τα δεδομένα μπορέσαμε να ξεπεράσουμε τις δυσκολίες κλωνοποίησης του απαραίτητου τμήματος του γονιδίου για την ανάκτηση της αλληλουχίας του και να εντοπίσουμε τελικά την πλήρη αλληλουχία του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης και των



Εικόνα 8: Γονιδιακός χάρτης του hid B.oleae (LOC106621213) Πηγή i5K

Έτσι αποκτήσαμε τον πλήρη χάρτη του γονιδιακού τόπου του hid (LOC 106621213) ο οποίος μεταγράφεται σε mRNA μήκους 38.222bp ενώ περιέχει:

**Εξόνιο 1:** 515bp [μόνο 5' αμετάφραστη περιοχή]

**Εξόνιο 2:** 738bp [περιέχει 5' αμετάφραση περιοχή και 81bp από το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης]

**Εξόνιο 3:** 547bp [ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης]

**Εξόνιο 4:** 202bp [ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης]

**Εξόνιο 5:** 1045bp [199bp από το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης και 3' αμετάφραστη περιοχή]

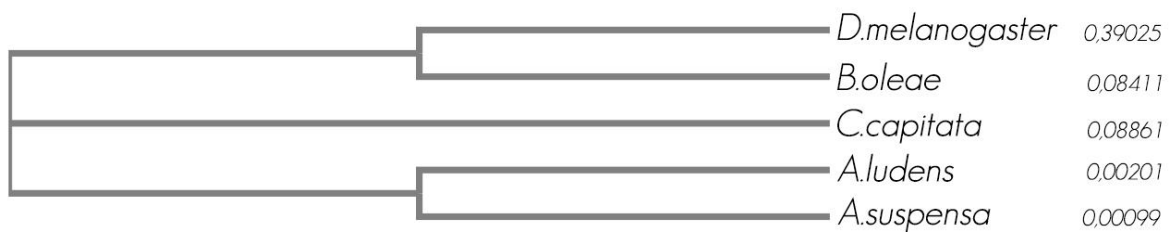
Το mRNA λοιπόν μετά το μάτισμά του δίνει μια αλυσίδα 3047bp εκ των οποίων το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης είναι τα 1029bp, από το οποίο προκύπτει μια πρωτεΐνη 342 αμινοξέων (aa).

## ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΟΥ HID(B.OLEAE) ΜΕ ΣΥΓΓΕΝΙΚΑ ΕΙΔΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ.

Όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή το αποπτωτικό γονίδιο του hid και κατ'επέκταση η πρωτεΐνη που εκφράζεται από αυτό είναι συντηρημένα σε μεγάλο βαθμό ενώ διατηρούν τη λειτουργικότητά τους ακόμα και σε διαφορετικούς οργανισμούς. Για το λόγο αυτό εντοπίσαμε τις αλληλουχίες συγγενικών οργανισμών του δάκου και τις συγκρίναμε μεταξύ τους για να εντοπίσουμε την εξελικτική απόσταση, διαφορές και ομοιότητες καθώς και συντηρημένες και χαρακτηρισμένες περιοχές οι οποίες θα μπορούσαν να μας δώσουν πληροφορίες για τη λειτουργία της πρωτεΐνης.

Επιλέχθηκαν οι οργανισμοί *C. capitata*, *A. ludens*, *A. suspensa*, *D. melanogaster* για διαφορετικούς λόγους. Η *D. melanogaster* γιατί ως οργανισμός μοντέλο είναι η καλύτερα μελετημένη με χαρακτηρισμένες περιοχές στην πρωτεΐνη του hid και γνωστή αλληλουχία. Οι υπόλοιπες 3 ως συγγενικά είδη στα οποία το γονίδιο hid είτε έχει χαρακτηριστεί και αλληλουχηθεί (*A. ludens*) είτε έχει χρησιμοποιηθεί σε fsRIDL προγράμματα.

Αρχικά να σημειωθεί ότι το μέγεθος της πρωτεΐνης hid του δάκου της ελιάς είναι ανάλογο με τα μεγέθη των πρωτεϊνών των συγγενικών ειδών ενώ παρατηρείται υψηλή ομολογία. Μόνη εξαίρεση η *D. melanogaster* στην οποία η πρωτεΐνη hid αποτελείται από περισσότερα αμινοξέα από τις μύγες των φρούτων (410aa > ~340aa).



Εικόνα 9 Φυλογενετικό δέντρο (Simple Phylogeny/EBI) με βάση την πρωτεϊνική αλληλουχία του hid



*D.melanogaster* MAVPFYLP<sup>E</sup>EGGADDVA<sup>S</sup>SSSSGASGNSS<sup>P</sup>HNHPLPSSASSSVSSSGVSSASASSASSSSSA

*Boleae* MAVVFYM<sup>E</sup>EGGDDSA<sup>S</sup>SSSSGGHGSAGS

*C.capitata* MAVVFYM<sup>E</sup>EGGDDTA<sup>S</sup>SSSSGGHSSTGS

*A.ludens* MAVVFYM<sup>E</sup>EAGADDA<sup>S</sup>SSSSSGSHGSGGS

*A.suspensa* MAVVFYM<sup>E</sup>EAGADDA<sup>S</sup>SSSSSGSHGSGGS

\*\*\* \*:\*:\*:\*:\*:\* \* \* \* \* \* . . .

*D.melanogaster* SSDGASSAASQSPNTTTSSATQT<sup>M</sup>QSP<sup>L</sup>PTDQVLYALYEWV<sup>R</sup>MYQSQQSAPQIFQYPPP

*Boleae* --GSAASSTSQSPNT-TTSATQT<sup>M</sup>QSP<sup>L</sup>PPHFMA-----FYQ-Y-MNATAFQYPPP

*C.capitata* --GSAASSTSQSPNT-TTSATQT<sup>M</sup>QSP<sup>L</sup>VNPYPMVALCEA-LLYQSM-NNPPAFQYPPP

*A.ludens* --GSAASSTSQSPNT-TTSATQT<sup>M</sup>QSP<sup>L</sup>MASPHIVMALCE-AVYQSL-NNPPAFQYPPP

*A.suspensa* --GSAASSTSQSPNT-TTSATQT<sup>M</sup>QSP<sup>L</sup>MASPHIVMALCE-AVYQSL-NNPPAFQYPPP

. . \* : \*

*D.melanogaster* PSCN-----FTGGDVFFPHGHPN<sup>S</sup>NP<sup>H</sup>PR<sup>T</sup>PTSVSFS<sup>S</sup>SGE

*Boleae* APCCQVHSPSPYTGSGGGSGPAGSGVNGEVFFPL-----SLSTPR<sup>T</sup>PTSVSYAAGE

*C.capitata* APCCPVHSPSPFTGGSV-----GGANGEVFFPI-----SRSTPR<sup>T</sup>PTSVSFAAGE

*A.ludens* APCCHVHSPSPYTG-----GGGGEVFFPP-----SRSTPR<sup>T</sup>PTSVSFAAGE

*A.suspensa* APCCHVHSPSPYTG-----GGGGEVFFPP-----SRSTPR<sup>T</sup>PTSVSFAAGE

: \* : \*

*D.melanogaster* EYNFFRQQQPQPHPSY--PAPST<sup>P</sup>QPMPPQSAPP<sup>M</sup>HCSHSYPQ<sup>S</sup>AHMMPHHSAPFGMG

*Boleae* ENTFFRHHNISGGCSS-----GPHLQPPQSAPP<sup>M</sup>SSSHNG--AHSQPAPQQYQPYT

*C.capitata* ENTFFRHHNISGGGGGCGSSSSATHLQPPQSAPP<sup>M</sup>SSSHNN--AHSQTAPQ-QYQQYT

*A.ludens* ENTFFRQHNISSGYSN----TQHLQPPQSAPP<sup>M</sup>SSSHTS--AHSQTPQ-QYQQYS

*A.suspensa* ENTFFRQHNISSGYSS----TQHLQPPQSAPP<sup>M</sup>SSSHTS--AHSQTPQ-QYQQYS

\* . \* \* \* : : : . . . \* : :

*D.melanogaster* TYYAGYTPPP<sup>T</sup>PLTANASTCTGNV--FGATEATTHQR<sup>T</sup>CVASTSTATASTSTAASSTSSCG

*Boleae* YPHYQYTPPP<sup>T</sup>PLTANASTCTGNV--FGSTEATTHQR<sup>T</sup>CVASTST-----STQSCM

*C.capitata* YPHYQYTPPP<sup>T</sup>PLTANASTCTGNV--FGSTEATTHQR<sup>T</sup>CVASTST-----STQSCM

*A.ludens* YPHYQYTPPP<sup>T</sup>PLTANASTCTGNV--FGSTEATTHQR<sup>T</sup>CVASTST-----STQSCM

*A.suspensa* YPHYQYTPPP<sup>T</sup>PLTANASTCTGNV--FGSTEATTHQR<sup>T</sup>CVASTST-----STQSCM

: \*

*D.melanogaster* VAPKMRLQRSQSDAARRKRLT--STGEDEREYQSDHEATWDFGDRYDNFTAGRERLQEF

*Boleae* MSGHSRLHRSLSDAQKRSRRST-TNDDEREYHSEHETS<sup>W</sup>DEFDDRFDNFTAGRERLQEF

*C.capitata* AKGHARLHRSLSDAQKRSRRSTNANDDERECHSEHETS<sup>W</sup>DEFDDRFDNFTAGRERLQEF

*A.ludens* AKGHARLHRSFSDAQKRSRRST-TNDDERECHSEHETS<sup>W</sup>DEFDDRFDNFTAGRERLQEF

*A.suspensa* AKGHARLHRSFSDAQKRSRRST-TNDDERECHSEHETS<sup>W</sup>DEFDDRFDNFTAGRERLQEF

: \*

*D.melanogaster* NGRIPPRKKKSSNSHSSSSNPNVCHTDSQSGGTSQAESGAIHGHI<sup>S</sup>QQRQ<sup>V</sup>ERERQKAKA

*Boleae* NGRIPPRKKKDVPKS-----KSEK<sup>V</sup>

*C.capitata* NGRIPPRKKKDVPKS-----RAER-

*A.ludens* NGRIPPRKKKDVPKS-----KSEK-

*A.suspensa* NGRIPPRKKKDVPKS-----KSEK-

\* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* . . . : \*

*D.melanogaster* EKKKPQSFTWPTVVTVFVLAMGCGFFAAR

*Boleae* RERPFKGIWPTVVTVIVVAMGCGFLVTR

*C.capitata* --KQFKAFIWPTVVTVIVVAMGCGFLVAR

*A.ludens* --KQFKAFIWPTVVTVIVVAMGCGFLVAR

*A.suspensa* --KQFKAFIWPTVVTVIVVAMGCGFLVAR

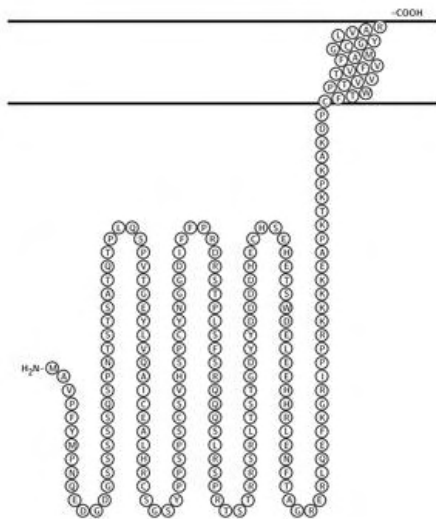
: : \*

Εικόνα 10: Παράθεση-σύγκριση πρωτεϊνικής αλληλουχίας του hid στους οργανισμούς *D.melanogaster*, *B.oleae*, *C.capitata*, *A.ludens*, *A.suspensa*. Με κίτρινη υπογράμμιση η αλληλουχία του N-τελικού άκρου που εντοπίζεται σε όλες τις προαποπρωτεϊνικές πρωτεΐνες. Με μπλέ υπογράμμιση η C-τελική αλληλουχία του hid που προκαλεί τη μεταφορά του στο μιτοχόνδριο. Με μαύρη υπογράμμιση η περιχή πλούσια σε S/T που είναι συντηρημένη σε όλα τα είδη των μυγών που παρατίθενται. Με μαύρη περιστοίχιση τα σημεία φωσφορυλίωσης. Πηγή Clustal

Από τη στοιχίση και σύγκριση των πρωτεϊνών έγινε εμφανής η υψηλή συντήρησή της πρωτεΐνης hid και συγκριμένα των ρυθμιστικών περιοχών της. Η περιοχή του Ντελικού άκρου η οποία είναι και η αλληλουχία πρόσδεσης στους αναστολείς των κασπασών, επιτελώντας το λειτουργικό έργο της πρωτεΐνης, είναι συντηρημένη μεταξύ των οργανισμών με διαφορές να εμφανίζονται μόνο με την *D.melanogaster*. Μεταξύ των υπόλοιπων οργανισμών υπάρχει απόλυτη συντήρηση γεγονός που υποδεικνύει ότι η πρωτεΐνη δρα με τον ίδιο μηχανισμό και στο δάκο της ελιάς.

Επίσης μια περιοχή καθοδικά του αμινοτελικού άκρου πλούσια σε σερίνες/θρεονίνες που έχει εντοπιστεί και στη *D.melanogaster* εμφανίζεται και στους υπόλοιπους οργανισμούς (συμπεριλαμβανομένου και του δάκου) αλλά με μικρότερο μήκος. Ο δάκος εμφανίζει ποσοστό S/T 52,7% (19/36) σε σύγκριση με τη *D. melanogaster* που εμφανίζει αντίστοιχα 58,2% (39/67).

Ακόμα η C-τελική περιοχή η οποία χρησιμεύει στο να οδηγεί την πρωτεΐνη στο μιτοχόνδριο εμφανίζει επίσης εξαιρετικά υψηλή συντήρηση με αλλαγές που εντοπίζονται στην *D.melanogaster*.



**Εικόνα 11: Πρόσδεση του υδρόφοβου Στελικού άκρου της πρωτεΐνης στην εξωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου**

Η περιοχή αποτελείται κατά κόρον από υδρόφοβα αμινοξέα (A,V,I,L,M,F,Y,W) που βοηθούν την πρωτεΐνη να προσδεθεί στην εξωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου.

Παράλληλα η πρωτεΐνη hid υφίσταται ρύθμιση μέσω φωσφορυλίωσης από το μονοπάτι των RAS/MAPK. Η ρύθμιση αυτή είναι εξαιρετικά σημαντική καθώς η φωσφορυλιωμένη πρωτεΐνη παύει να είναι ενεργή[108]. Οι RAS/MAPK αναγνωρίζουν Σερίνες(S) ή Θρεονίνες(T) ως αμινοξέα φωσφορυλίωσης, οι οποίες βρίσκονται σε αλληλοχίες P-X-S/T-P[126]. Με βάση αυτή την αλληλουχία εντοπίστηκαν τα σημεία φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης hid του δάκου και έγινε σύγκριση με αυτά που παρατηρούνται στους υπόλοιπους οργανισμούς. Όλοι οι οργανισμοί εμφανίζουν 3 κοινά σημεία φωσφορυλίωσης σε συντηρημένες περιοχές ενώ 2 ακόμα εντοπίζονται στην *D.melanogaster* χωρίς να υπάρχουν στους υπόλοιπους.

Επίσης μια περιοχή καθοδικά του αμινοτελικού άκρου πλούσια σε σερίνες/θρεονίνες που έχει εντοπιστεί και στη *D.melanogaster* εμφανίζεται και στους υπόλοιπους οργανισμούς (συμπεριλαμβανομένου και του δάκου) αλλά με μικρότερο μήκος. Ο δάκος εμφανίζει ποσοστό S/T 52,7% (19/36) σε σύγκριση με τη *D. melanogaster* που εμφανίζει αντίστοιχα 58,2% (39/67).

Η συνολική ομολογία που παρατηρείται μεταξύ των επιλεγμένων οργανισμών όσον αφορά τις κύριες αυτές ρυθμιστικές περιοχές της πρωτεΐνης hid καταδικνύει τον εμφανώς κοινό μηχανισμό δράσης τους αλλά και πιθανή δυνατότητα να εμφανίζουν δραστηριότητα κατά την ετερόλογη χρήση τους.

Επίσης, η επιβεβαίωση πως η πρωτεϊνική αλληλουχία του hid εμφανίζει τόσο μεγάλη ομολογία με τις αντίστοιχες πρωτεΐνες οργανισμών στους οποίους έχει δημιουργηθεί fsRIDL



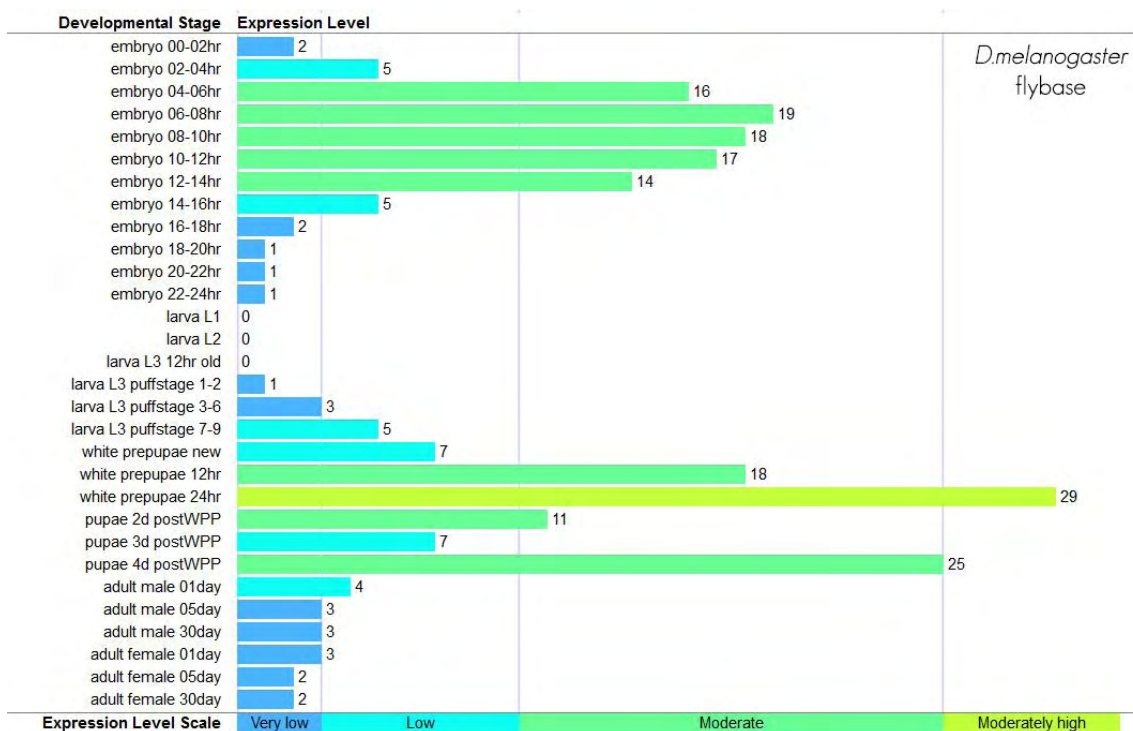
σύστημα υποδεικνύει πως το hid λειτουργεί και στο δάκο της ελιάς με τον ίδιο μηχανισμό και μας οδηγεί στο συμπέρασμα πως θα μπορούσε να λειτουργήσει σε ένα διαγονίδιο για το δάκο.

Τέλος, δεδομένης της ομολογίας που εμφανίζει η πρωτεΐνη hid του δάκου με αυτήν της *A. luidens* μπορούμε να υποθέσουμε ότι η ήδη ενσωματωμένη σε διαγονίδιο αλληλουχία της *A. luidens* θα λειτουργήσει στον δάκο όπως λειτούργησε και στην *A. suspensa*.

## ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΠΡΟΤΥΠΩΝ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ HID (*B. OLEAE*)

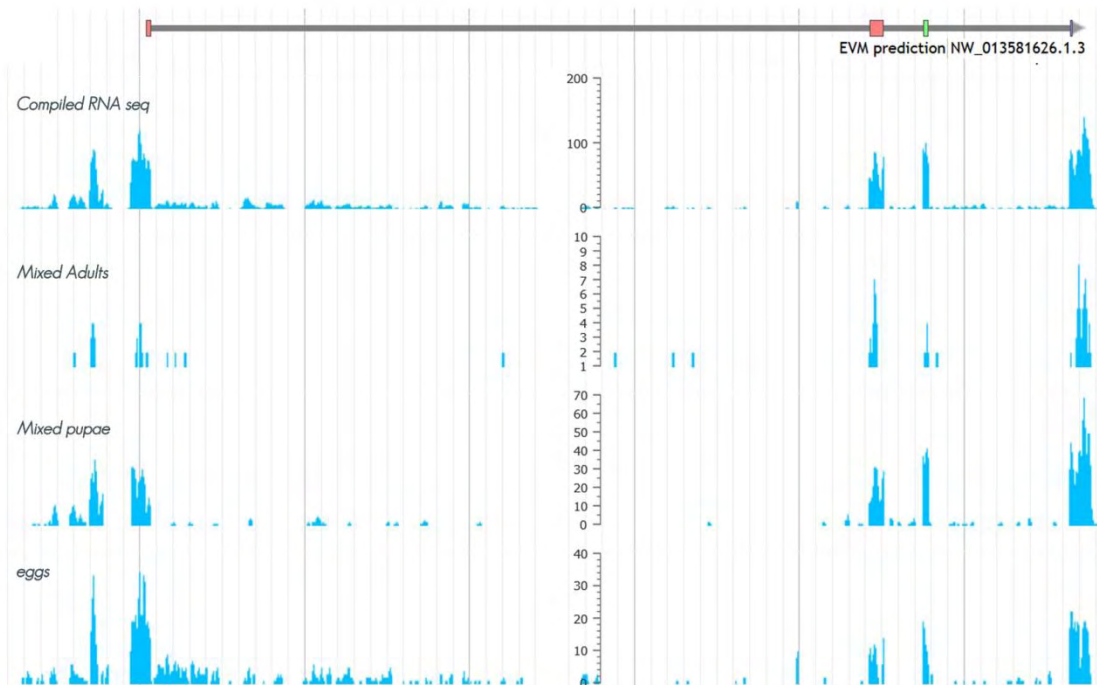
Το γονίδιο hid στη *D. melanogaster* εκφράζει μια προποπτική πρωτεΐνη η οποία ενεργοποιεί το μονοπάτι της απόπτωσης στα κύτταρα. Ο ρόλος του είναι κυρίως στην ανάπτυξη του εντόμου και συγκεκριμένα στο στάδιο της νύμφης (pupa) κατά το οποίο εκφράζεται για να εξασφαλίσει την 360ο περιστροφή των άκρων στον εμπροσθοπίσθιο άξονα καθώς και στην μορφοποίηση των φτερών. Ακόμα συμμετέχει στην μορφογενετική αναδιοργάνωση της περιοχής της εμβρυική κεφαλής στα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια (αυγό).[101]

Τα πρότυπα έκφρασης αυτά επιβεβαιώνονται και από δεδομένα τρανσκριπτομικής ανάλυσης δημοσιευμένα στη διαδικτυακή πλατφόρμα flybase.



Εικόνα 12: Πρότυπο έκφρασης του γονιδίου hid στη *D.melanogaster* [πηγή flybase]

Με βάση δεδομένα αλληλούχισης του RNA που ανακτήθηκαν από την διαδικτυακή πλατφόρμα i5k για το δάκου της ελιάς παρατηρήσαμε πως και το γονίδιο *hid* του μεταγράφεται σε μεγαλύτερο βαθμό κατά τα στάδια της νύμφης και του αυγού, ενώ έχει πολύ χαμηλή έκφραση στα ενήλικα έντομα.



Εικόνα 13: Πρότυπα έκφρασης του γονιδίου *hid* στο στάδιο του ενήλικου εντόμου, του αυγού και της νύμφης. Πηγή i5K

Τα δεδομένα αυτά υποστηρίζουν περαιτέρω την συντήρηση της πρωτεΐνης *hid* η οποία πέραν της υψηλής ομολογίας στην αλληλουχία, παρουσιάζει πανομοιότυπα πρότυπα έκφρασης μεταξύ του δάκου και της *D.melanogaster*.

## Συμπερασματικά

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε και χαρακτηρίστηκε το προ-αποπτωτικό γονίδιο *hid* του δάκου της ελιάς. Τα αποτελέσματα με βάση την γονιδιακή αλλά και την πρωτεϊνική αλληλουχία του ανέδειξαν υψηλή συντήρηση με συγγενικά ήδη στα οποία το *hid* έχει χρησιμοποιηθεί ως αποπτωτικός παράγοντας στο διαγονίδιο της *fsRIDL*. Έτσι προκύπτει ότι:

1. Το γονίδιο *hid* είναι μια σωστή επιλογή αποπτωτικού παράγοντα για την κατασκευή διαγονιδίου στον δάκο. Το συμπέρασμα αυτό βασίζεται στην σχεδόν 100% ομολογία που εμφανίζουν οι λειτουργικές περιοχές της πρωτεΐνης *hid* με τις αντίστοιχες της *A.ludens* που

έχει ήδη χρησιμοποιηθεί σε διαγονίδιο καθώς και στα πανομοιότυπα πρότυπα έκφρασης του hidRNA με τη *D.melanogaster* που οδηγούν στο συμπέρασμα κοινού μηχανισμού λειτουργίας. Πλήρης επιβεβαίωση μπορεί να επέλθει στο μέλλον με πειράματα έκφρασης του hid και μελέτης του φαινοτύπου που προκαλούν διάφορες διαγραφές χρήσιμων περιοχών του. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με εκτοπική έκφραση του hid του δάκου της ελιάς σε κυτταρική σειρά της *D.melanogaster* για την επιβεβαίωση του αποπτωτικού του φαινοτύπου. Επιπροσθέτως θα επιβεβαιωθεί και ο επιμέρους ρόλος της κάθε συγκεκριμένης περιοχής και ο κοινός μηχανισμός δράσης του hid B.o. με τα ήδη μελετημένα hid των *A.ludens* και *D.melanogaster*.

2. **Τα σημεία φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης hid του δάκου είναι χαρακτηρισμένα και μπορούν αν απαλλοιφούν.** Όπως έχει αναφερθεί και προηγουμένως η φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης hid από το μονοπάτι των RAS/MAPK οδηγεί στην απενεργοποίησή της. Έτσι η τελική αλληλουχία που θα χρησιμοποιηθεί για το διαγονίδιο του δάκου πρέπει να μην έχει τα σημεία φωσφορυλίωσης εξασφαλίζοντας την ανεμπόδιστη λειτουργία του hid κατά την έκφρασή του. Για το σκοπό αυτό θα πρέπει να σχεδιαστούν μεταλλάξεις στα 3 σημεία φωσφορυλίωσης που χαρακτηρίστηκαν αντικαθιστώντας την S ή T που αποτελεί υπόστρωμα των κινασών σε A.
3. **Το γονίδιο της *A.ludens* μπορεί να χρησιμοποιηθεί στο διαγονίδιο για το δάκο της ελιάς *B.oleae*.** Μεταξύ των λειτουργικών περιοχών της πρωτεΐνης hid της *A.suspensa* και της *A.ludens* υπάρχει ομολογία 100%. Έτσι στο διαγονίδιο που κατασκευάστηκε για την *A.suspensa* χρησιμοποιήθηκε το ήδη μελετημένο και χαρακτηρισμένο hid της *A.ludens*. Με βάση την σχεδόν 100% ομολογία που εμφανίζει η πρωτεΐνη hid του δάκου όσον αφορά τις λειτουργικές περιοχές με την πρωτεΐνη της *A.ludens* συμπεραίνουμε ότι το διαγονίδιο που περιέχει το hid της *A.ludens* θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί στις μοριακές κατασκευές για την ανάπτυξη του συστήματος fsRIDL στο δάκο.

Τέλος, αντίστοιχες μελέτες γίνονται παράλληλα και για τον εμβρυικό υποκινητή που θα χρησιμοποιηθεί στο διαγονίδιο καθώς και για το θηλυκο-ειδικό ιντρόνιο που θα εξασφαλίζει τη φυλοειδικότητα του συστήματος. Το σύστημα fsRIDL για το δάκο της ελιάς είναι υπό ανάπτυξη με την επίτευξή του να έχει μεγάλη σημασία για την βελτίωση της αντιμετώπισης του εντόμου.

Η επίτευξή του fsRIDL συστήματος θα σηματοδοτήσει μια νέα εποχή στην αντιμετώπιση του δάκου της ελιάς με οικολογικό τρόπο, ελεγχόμενο και αποδοτικό, επιβεβαιώνοντας την σημασία της επιστήμης στην καθημερινότητα του ανθρώπου και στη βελτίωση της ποιότητας ζωής του.



GATGTGCCAAAATCAAAGTCAGAGAAGAAGGTGAGAGAAAAGACCATTCAAGGGCTTCATCTGGCCCACTG  
TCGTACAGTCATCGTTGTTGCAATGGGTTGTGGCTTCCTTGTACGCGATGAGTGCACCAAATGTGAAG  
CTCGTGCAGCAACAGCCGAGCTATACTTACAATTTAAAAAGCAAGCAACAGTAAAGCAATGCAAAAAA  
AAGATTTACACTTAAAGAATAAATAAATAAAAAATAAATAAATTTTGGAGAAAAACATTAAAAAACAAAGCA  
CAAATGAAAAGTGTTAAAAACAGCCAGAACGCCTTGGGCTTTTCAAGGCAATAAAGGGATATGAAAGAGA  
AATATCTAAAGGTAAAGAAATTTTCGTACAGAAATGTGAAACGTGAAAGTGAATTTATGGAAGCGCAAGTAG  
CGCGTGAACGAGGGCAATGTACGCCGCGCCACATTTAAGAGGACACAGTGGTGAGCGGCTTGACAGAGA  
AATATTTTCGAGAGTGAAACGTGAGGTAGTTTTTAATTTTAAACGATTTGCGGATCTACTGAGGAAAGA  
GCTCATCAAACCGCAGCAATGTAAACGAAAGAGTTGAAGAGCGAGGAAAAGAGAAAAGAGACGGCGT  
CATGGCGAGAGAGAGAGATGATAGCGAGCAAAGCGCACCGTGTGCGACAACGAAACCGAATTTTTTAA  
TCAACGAAGCTTTTCTTACACACCACAAACACAAACGAACTCAAAGGCGAAAACAAAACCTTAAAAACGT  
ATTGAAAGCGAAAACTAACATTTTTTAAACACAAGCAAATAATATTTTTGTAAAAATGTAGGCATTTATAG  
TAGATATATACATACATATGCACGCATACGAGTATTTGACTGAAAATCTCTGCCGTATTTGGACGTGGAA  
ATTTTCGCATATACAAACATATGAATTGCAACTGCCGTTAAGTGTAAGCAACTTGTGCTTGAAAAAGTATT  
TTTCTACTGAGAATTTGTACGTTTTTTTATCTAAATGTGTAACAGACAAGACTGTTTCAGAAGTTGTTAG  
GCAGCATTTGTACTAAGACAATTTAAAAATTGAGAAA

Πρωτεΐνη B.o.hid:

>XP\_014095435.1 PREDICTED: cell death protein hid isoform X1 [Bactrocera oleae]

MAVVFFYMPEGGGDDSSASSSSGGHGSAGSGSAASSTSQSPNNTTTSATQTPMQSPLPPHFMMAFYQYMNATA  
FQYPPPASPCCQVHSPSPYTGSGGGSGPAGSGVNGEVFFPLSLSTPRTPTSVSYAAGEENTFFRHHNI  
SGGCSSGPHLQPPQSAPPMPSSSHNGAHSQPAPQQYQPYTYPYQYTPPPTPLTANASTCTGNVFGATE  
ATTHQRGCVATASTSTSTSCGMSGHSLRSLSDAQKRSRRTSTTNDDEREYHSEHETSWDEFDDRFDN  
FTAGRERLQEFNGRIPPRKKKKDVPKSKSEKKVRERPFKGF IWPTVVTVIVVAMGCGFLVTR

Πρωτεΐνη A.l.hid:

>AFH35882.1 hid [Anastrepha ludens]

MAVVFFYMPEAGADDSASSSSGSHSGSGSASSTSQSPNNTTTSATQTPMQSPLMASPHIVMALCEAVYQ  
SLNNTPAFQYPPPASPCHVHSPSPYTGSGGGGEVFFPPSRSTPRTPTSVSFAAGEENTFFRQHNISSG  
YSNTQHLQPPQSAPPMPSSHTSAHSQTTTQQYQQYSYPHYQYTPPPTPLTANASTCTGNVFGSTEATT  
HQRTCVASTSTSTQSCMAKGHARLHRSFSDAQKRSRRTSTTNDDERECHSEHETSWDEFDDRYDNFTAGR  
ERLQEFNGRIPPRKKKKDVPKSKSEKKQFKAF IWPTVVTVIVVAMGCGFLVAR

Πρωτεΐνη A.s.hid:

>AEF30451.1 hid [Anastrepha suspensa]

MAVVFFYMPEAGADDSASSSSGSHSGSGSASSTSQSPNNTTTSATQTPMQSPLMASPHIVMALCEAVYQ  
SLNNTPAFQYPPPASPCHVHSPSPYTGSGGGGEVFFPPSRSTPRTPTSVSFAAGEENTFFRQHNISSG  
YSSTQHLQPPQSAPPMPSSHTSAHSQTTTQQYQQYSYPHYQYTPPPTPLTANASTCTGNVFGSTEATT  
HQRTCVASTSTSTQSCMAKGHARLHRSFSDAQKRSRRTSTTNDDERECHSEHETSWDEFDDRYDNFTAGR  
ERLQEFNGRIPPRKKKKDVPKSKSEKKQFKAF IWPTVVTVIVVAMGCGFLVAR

Πρωτεΐνη D.m.hid:

>AAA79985.1 head involution defective protein [Drosophila melanogaster]

MAVFFYLPEGGADDVASSSSGASGNSSPHNHLPLSSASSSVSSSGVSSASASSASSSSASSDGAASAAS  
QSPNNTTSSATQTPMQSPLPTDQVLYALYEWVRMYQSQQSAPQIFQYPPPSPSCNFTGGDVFFPHGHPNP  
NSNPHRPTPTSVSFSGEEYNFRQQPQPHPSYPAPSTPQPMPPQSAPPMHCSHSYPQQSAHMMPHHS  
APFGMGTTYAGYTPPPTNTASAGTSSSSAAGFWGHGPHSPFTSTSTPLSAPVAPKMLQRSQSDAARR  
KRLTSTGEDEREYQSDHEATWDEFDRYDNFTAGRERLQEFNGRIPPRKKKSSNSHSSSSNPNVCHTDSQ  
SGGTSQAESGAIHGHSIQQRQVERERQKAKAEKKKQSF TWPTVVTVFVLAMGCGFFAAR

Πρωτεΐνη C.c.hid:

XP\_004522142.1 cell death protein hid [Ceratitis capitata]

MAVVFFYMPEGGGDDTASSSSGGHSSSTGSGSAASSTSQSPNNTTTSATQTPMQSPLVNPYVVALCEALLYQ  
SMNPPAFQYPPPASPCCPVHSPSPFTGGVGGANGEVFFPISRSTPRTPTSVSFAAGEENTFFRHHNI  
SGGGGGGCSSSATHLQPPQSAPAMQQSSHNNAHSQTAPQQYQYTYPYQYTPPPTPLTANASTCTGGN  
LFNGSTEATTHQRTCVASTSTATASTSTAASSTSSCGAKGHARLHRSLSDAQKRSRRSSTNANDDERECHS  
EHETSWDEFDDRYENFTAGRERLQEFNGRIPPRKKKKDVPKSRRAERKQFKAF IWPTVVTVIVVAMGCGFL  
VAR

1. Daane, K.M. and Johnson, M.W., 2010. Olive fruit fly: managing an ancient pest in modern times. *Annual review of entomology*, 55, pp.151-169.
2. White, I.M., 2006. Taxonomy of the Dacina (Diptera: Tephritidae) of Africa and the middle East. *African Entomology*, 2006(1), pp.1-156.
3. Nardi, F., Carapelli, A., Dallai, R. and Frati, F., 2003. The mitochondrial genome of the olive fly *Bactrocera oleae*: two haplotypes from distant geographical locations. *Insect Molecular Biology*, 12(6), pp.605-611.
4. Manousis, T. and Moore, N.F., 1987. Control of *Dacus oleae*, a major pest of olives. *International Journal of Tropical Insect Science*, 8(01), pp.1-9.
5. Rice, R., Phillips, P., Stewart-Leslie, J. and Sibbett, G., 2003. Olive fruit fly populations measured in central and southern California. *California Agriculture*, 57(4), pp.122-127.
6. Copeland, R.S., White, I.M., Okumu, M.I.L.L.I.C.E.N.T., Machera, P.E.R.I.S. and Wharton, R.A., 2004. Insects associated with fruits of the Oleaceae (Asteridae, Lamiales) in Kenya, with special reference to the Tephritidae (Diptera). *Bishop Mus Bull Entomol*, 12, pp.135-164.
7. Zygouridis, N.E., Augustinos, A.A., Zalom, F.G. and Mathiopoulos, K.D., 2009. Analysis of olive fly invasion in California based on microsatellite markers. *Heredity*, 102(4), pp.402-412
- Rice, R.E., 2000. Bionomics of the olive fruit fly *Bactrocera (Dacus) oleae*. *UC Plant Protection Quarterly*, 10(3), pp.2-5.
8. Augustinos, A.A., Stratikopoulos, E.E., Zacharopoulou, A. and Mathiopoulos, K.D., 2002. Polymorphic microsatellite markers in the olive fly, *Bactrocera oleae*. *Molecular Ecology Notes*, 2(3), pp.278-280.
9. Ramezani, S., Blibech, I., Rei, F.T., Van Asch, B. and Da Costa, L.T., 2015. *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae) in Iran: An invasion from the middle west. *European Journal of Entomology*, 112(4), p.713.
10. Nardi, F., Carapelli, A., Dallai, R., Roderick, G.K. and Frati, F., 2005. Population structure and colonization history of the olive fly, *Bactrocera oleae* (Diptera, Tephritidae). *Molecular Ecology*, 14(9), pp.2729-2738.
11. Tsitsipis, J.A., 1977. Effect of constant temperature on the eggs of the olive fruit fly, *Dacus oleae* (Diptera, Tephritidae). In *Annales de Zoologie Ecologie Animale*.
12. Neuenschwander, P. and Michelakis, S., 1978. The infestation of *Dacus oleae* (Gmel.)(Diptera, Tephritidae) at harvest time and its influence on yield and quality of olive oil in Crete. *Journal of Applied Entomology*, 86(1-4), pp.420-433.
13. Medjkouh, L., Tamendjari, A., Keciri, S., Santos, J., Nunes, M.A. and Oliveira, M.B.P.P., 2016. The effect of the olive fruit fly (*Bactrocera oleae*) on quality parameters, and antioxidant and antibacterial activities of olive oil. *Food & function*, 7(6), pp.2780-2788.
14. Nardi, F., Carapelli, A., Boore, J.L., Roderick, G.K., Dallai, R. and Frati, F., 2010. Domestication of olive fly through a multi-regional host shift to cultivated olives: Comparative dating using complete mitochondrial genomes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 57(2), pp.678-686.
15. Augustinos, A.A., Mamuris, Z., Stratikopoulos, E.E., D'Amelio, S., Zacharopoulou, A. and Mathiopoulos, K.D., 2005. Microsatellite analysis of olive fly populations in the Mediterranean indicates a westward expansion of the species. *Genetica*, 125(2), pp.231-241.
16. Malheiro, R., Casal, S., Baptista, P. and Pereira, J.A., 2015. A review of *Bactrocera oleae* (Rossi) impact in olive products: from the tree to the table. *Trends in Food Science & Technology*, 44(2), pp.226-242.
17. Metcalf, R.L., 1990. Chemical ecology of Dacinae fruit flies (Diptera: Tephritidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 83(6), pp.1017-1030.

18. Kapatos, E.T. and Fletcher, B.S., 1984. The phenology of the olive fly, *Dacus oleae* (Gmel.)(Diptera, Tephritidae), in Corfu. *Journal of Applied Entomology*, 97(1-5), pp.360-370.
19. Neuenschwander, P. and Michelakis, S., 1979. Determination of the lower thermal thresholds and day-degree requirements for eggs and larvae of *Dacus oleae* (Gmel.)(Diptera: Tephritidae) under field conditions in Crete, Greece. *Mitteilungen. Bulletin*.
20. Tzanakakis, M.E., 2003. Seasonal development and dormancy of insects and mites feeding on olive: a review. *Netherlands Journal of Zoology*, 52(2), pp.87-224.
21. Fletcher, B.S., 1987. The biology of dacine fruit flies. *Annual review of entomology*, 32(1), pp.115-144.
22. Thomas, D.B. and Mangan, R.L., 2005. Nontarget impact of spinosad GF-120 bait sprays for control of the Mexican fruit fly (Diptera: Tephritidae) in Texas citrus. *Journal of economic entomology*, 98(6), pp.1950-1956.
23. Vossen, P.; Varela, L., et al. (2005). Olive Fruit Fly. UCCE Sonoma County
24. Denholm, I. and Rowland, M.W., 1992. Tactics for managing pesticide resistance in arthropods: theory and practice. *Annual review of entomology*, 37(1), pp.91-112.
25. Margaritopoulos, J.T., Skavdis, G., Kalogiannis, N., Nikou, D., Morou, E., Skouras, P.J., Tsitsipis, J.A. and Vontas, J., 2008. Efficacy of the pyrethroid alpha-cypermethrin against *Bactrocera oleae* populations from Greece, and improved diagnostic for an iAChE mutation. *Pest management science*, 64(9), pp.900-908.
26. Vontas, J.G., Hejazi, M.J., Hawkes, N.J., Cosmidis, N., Loukas, M. and Hemingway, J., 2002. . *Insect molecular biology*, 11(4), pp.329-336.
27. Sagri, E., Reczko, M., Gregoriou, M.E., Tsoumani, K.T., Zygouridis, N.E., Salpea, K.D., Zalom, F.G., Ragoussis, J. and Mathiopoulos, K.D., 2014. Olive fly transcriptomics analysis implicates energy metabolism genes in spinosad resistance. *BMC genomics*, 15(1), p.714.
28. Kakani, E.G., Zygouridis, N.E., Tsoumani, K.T., Seraphides, N., Zalom, F.G. and Mathiopoulos, K.D., 2010. Spinosad resistance development in wild olive fruit fly *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae) populations in California. *Pest management science*, 66(4), pp.447-453.
29. Haniotakis, G.E., Kozyrakis, E. and Bonatsos, C., 1986. Control of the olive fruit fly, *Dacus oleae* Gmel.(Dipt., Tephritidae) by mass trapping: Pilot scale feasibility study. *Journal of Applied Entomology*, 101(1-5), pp.343-352.
30. Aluja, M. and Norrbom, A. eds., 1999. *Fruit flies (Tephritidae): phylogeny and evolution of behavior*. Crc Press.
31. Robinson, A.S., 1989. *Fruit flies, their biology, natural enemies and control*.
32. Katsoyannos, B.I. and Kouloussis, N.A., 2001. Captures of the olive fruit fly *Bactrocera oleae* on spheres of different colours. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 100(2), pp.165-172.
33. Baker, R., Herbert, R., Howse, P.E., Jones, O.T., Francke, W. and Reith, W., 1980. Identification and synthesis of the major sex pheromone of the olive fly (*Dacus oleae*). *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, (2), pp.52-53.
34. Haniotakis, G.E., Mazomenos, B.E. and Tumlinson, J.H., 1977. A sex attractant of the olive fruit fly, *Dacus oleae* and its biological activity under laboratory and field conditions. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 21(1), pp.81-87.
35. Broumas, T., Haniotakis, G., Liaropoulos, C., Tomazou, T. and Ragoussis, N., 2002. The efficacy of an improved form of the mass-trapping method, for the control of the olive fruit

- fly, *Bactrocera oleae* (Gmelin)(Dipt., Tephritidae): pilot-scale feasibility studies. *Journal of Applied Entomology*, 126(5), pp.217-223.
36. Vreysen, M.J., Robinson, A.S. and Hendrichs, J. eds., 2007. *Area-wide control of insect pests: from research to field implementation*. Springer Science & Business Media.
  37. Novasource, 2011, protect a Wide Variety of organic crops with surround® Wpcrop protectant
  38. Saour, G. and Makee, H., 2004. A kaolin-based particle film for suppression of the olive fruit fly *Bactrocera oleae* Gmelin (Dip., Tephritidae) in olive groves. *Journal of Applied Entomology*, 128(1), pp.28-31.
  39. Klassen, W., 2004. Sterile Insect Technique. In *Encyclopedia of Entomology* (pp. 2099-2118). Springer Netherlands.
  40. Knipling, E.F., 1955. Possibilities of insect control or eradication through the use of sexually sterile males. *Journal of Economic Entomology*, 48(4), pp.459-462.
  41. Baumhover, A.H., Graham, A.J., Bitter, B.A., Hopkins, D.E., New, W.D., Dudley, F.H. and Bushland, R.C., 1955. Screw-worm control through release of sterilized flies. *Journal of Economic Entomology*, 48(4), pp.462-466.
  42. Serebrovskii, A.S., 1940, On the possibility of a new method of insect control. *Zoologicheskii zhurnal*, 19, pp618-630
  43. Vanderplank, F.L., 1944. Hybridization between *Glossina* species and suggested new method for control of certain species of tsetse. *Nature*, 154(3915), pp.607-608.
  44. Vanderplank, F.L., 1947. EXPERIMENTS IN THE HYBRIDISATION OF TSETSE-FLIES (*GLOSSINA*, DIPTERA) AND THE POSSIBILITY OF A NEW METHOD OF CONTROL. *Ecological Entomology*, 98(1), pp.1-18.
  45. Krafur, E.S., 1998. Sterile insect technique for suppressing and eradicating insect population: 55 years and counting. *Journal of Agricultural Entomology*, 15(4), pp.303-317.
  46. Knipling, E.F., 1979. The basic principles of insect population suppression and management. *The basic principles of insect population suppression and management.*, (512).
  47. Müller, H.J., 1950. Some present problems in the genetic effects of radiation. *Journal of Cellular Physiology*, 35(S1), pp.9-70.
  48. Rendon, P., Hendrichs, C.J., Malavasi, A., Gersabeck, E., Burnett, W., Macheel, B., Stewart, J. and Montoya, P., 2009. United States, Mexico, and Guatemala Fruit Fly Emergence and Release Facilities Review. *Final Report. APHIS-USDA*.
  49. Fisher, K., 1996. Queensland fruit fly (*Bactrocera tryoni*): eradication from Western Australia.
  50. Yosiaki, I.T.O., Kakinohana, H., Yamagishi, M. and Kohama, T., 2003. Eradication of the melon fly, *Bactrocera cucurbitae*, from Okinawa, Japan, by means of the sterile insect technique, with special emphasis on the role of basic studies. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 6(2), pp.119-129.
  51. Politzar, H. and Cuisance, D., 1984. An integrated campaign against riverine tsetse, *Glossina palpalis gambiensis* and *Glossina tachinoides* by trapping, and the release of sterile males. *International Journal of Tropical Insect Science*, 5(05), pp.439-442.
  52. Takken, V., Oladunmade, M.A., Dengwat, L., Feldmann, H.U., Onah, J.A., Tenabe, S.O. and Hamann, H.J., 1986. The eradication of *Glossina palpalis palpalis* (Robineau-Desvoidy)(Diptera: Glossinidae) using traps, insecticide-impregnated targets and the sterile insect technique in central Nigeria. *Bulletin of entomological research*, 76(02), pp.275-286.



53. Vreysen, M.J., Saleh, K.M., Ali, M.Y., Abdulla, A.M., Zhu, Z.R., Juma, K.G., Dyck, V.A., Msangi, A.R., Mkonyi, P.A. and Feldmann, H.U., 2000. *Glossina austeni* (Diptera: Glossinidae) eradicated on the island of Unguja, Zanzibar, using the sterile insect technique. *Journal of economic entomology*, 93(1), pp.123-135.
54. Oloo, F.P., Langley, P.A., Luyimbazi, F. and Ogwal, L.M., 2000. Integration of the sterile insect technique (SIT) and autosterilisation lethality in the eradication of *Glossina fuscipes fuscipes* Newst.(Diptera, Glossinidae) in Buvuma Islands in Lake Victoria, Uganda. In *Area-wide control of fruit flies and other insect pests. Joint proceedings of the international conference on area-wide control of insect pests, 28 May-2 June, 1998 and the Fifth International Symposium on Fruit Flies of Economic Importance, Penang, Malaysia, 1-5 June, 1998* (pp. 311-314). Penerbit Universiti Sains Malaysia.
55. Lofgren, C.S., Dame, D.A., Breeland, S.G., Weidhaas, D.E., Jeffery, G., Kaiser, R., Ford, H.R., Boston, M.D. and Baldwin, K.F., 1974. Release of chemosterilized males for the control of *Anopheles albimanus* in El Salvador. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 23(2), pp.288-297
56. DAME, D.A., WOODARD, D.B., FORD, H.R. and WEIDHAAS, D.E., 1964. Field behavior of sexually sterile *Anopheles quadrimaculatus* males. *Mosquito News*, 24(1), pp.6-14.
57. Patterson, R.S., Weidhaas, D.E., Ford, H.R. and Lofgren, C.S., 1970. Suppression and elimination of an island population of *Culex pipiens quinquefasciatus* with sterile males. *Science*, 168(3937), pp.1368-1369
58. YASUNO, M., Macdonald, W.W., Curtis, C.F., Grover, K.K., Rajagopalan, P.K., SHARWA, L., Sharma, V.P., Singh, D., Singh, K.R.P., Agarwal, H.V. and Kazmi, S.J., 1978. A control experiment with chemosterilized male *Culex pipiens fatigans* Wied. in a village near Delhi surrounded by a breeding-free zone. *Medical Entomology and Zoology*, 29(4), pp.325-343.
59. Oliva, C.F., Jacquet, M., Gilles, J., Lemperiere, G., Maquart, P.O., Quilici, S., Schooneman, F., Vreysen, M.J. and Boyer, S., 2012. The sterile insect technique for controlling populations of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) on Reunion Island: mating vigour of sterilized males. *PloS one*, 7(11), p.e49414.
60. Διπλωματική εργασία, Πίτης Τασσόγλου, Ανάλυση πεπτιδόματος των αναπαραγωγικών αδένων του θηλυκού δάκου της ελιάς, 2016, σελ 7
61. Zervas, G.A. and Economopoulos, A.P., 1982. Mating frequency in caged populations of wild and artificially reared (normal or  $\gamma$ -sterilized) olive fruit flies. *Environmental Entomology*, 11(1), pp.17-20.
62. Economopoulos, A.P., 2002. The olive fruit fly, *Bactrocera (Dacus) oleae* (Gmelin)(Diptera: Tephritidae): its importance and control; previous SIT research and pilot testing. *Report to International Atomic Energy Agency (IAEA), Vienna, Austria*, p.44.
63. Estes, A.M., Nestel, D., Belcari, A., Jessup, A., Rempoulakis, P. and Economopoulos, A.P., 2012. A basis for the renewal of sterile insect technique for the olive fly, *Bactrocera oleae* (Rossi). *Journal of Applied Entomology*, 136(1-2), pp.1-16.
64. Alphey, L., 2002. Re-engineering the sterile insect technique. *Insect biochemistry and molecular biology*, 32(10), pp.1243-1247.
65. Alphey, L.S., 2007. Engineering insects for the sterile insect technique. *Area-Wide Control of Insect Pests*, pp.51-60.
66. Wimmer, E.A., 2003. Applications of insect transgenesis. *Nature reviews genetics*, 4(3), pp.225-232.

67. Wimmer, E.A., 2005. Insect transgenesis by site-specific recombination. *Nature methods*, 2(8), pp.580-614.
68. Galizi, R., Hammond, A., Kyrou, K., Taxiarchi, C., Bernardini, F., O'Loughlin, S.M., Papathanos, P.A., Nolan, T., Windbichler, N. and Crisanti, A., 2016. A CRISPR-Cas9 sex-ratio distortion system for genetic control. *Scientific Reports*, 6.
69. Catteruccia, F., Crisanti, A. and Wimmer, E.A., 2009. Transgenic technologies to induce sterility. *Malaria Journal*, 8(2), p.57.
70. Horn, C. and Wimmer, E.A., 2003. A transgene-based, embryo-specific lethality system for insect pest management. *Nature biotechnology*, 21(1), pp.64-70.
71. Alphey, L., Nimmo, D., O'Connell, S. and Alphey, N., 2008. 8 INSECT POPULATION SUPPRESSION USING ENGINEERED INSECTS. *Advances in experimental medicine and biology*, 627, p.93.
72. Black, W.C., Alphey, L. and James, A.A., 2011. Why RIDL is not SIT. *Trends in parasitology*, 27(8), pp.362-370.
73. Leftwich, P.T., Bolton, M. and Chapman, T., 2016. Evolutionary biology and genetic techniques for insect control. *Evolutionary applications*, 9(1), pp.212-230.
74. Alphey, L. and Andreasen, M., 2002. Dominant lethality and insect population control. *Molecular and biochemical parasitology*, 121(2), pp.173-178.
75. Dillon, R.J. and Dillon, V.M., 2004. The gut bacteria of insects: nonpathogenic interactions. *Annual Reviews in Entomology*, 49(1), pp.71-92.
76. Peloquin, J.J., Thibault, S.T., Staten, R. and Miller, T.A., 2000. Germ-line transformation of pink bollworm (Lepidoptera: Gelechiidae) mediated by the piggyBac transposable element. *Insect molecular biology*, 9(3), pp.323-333.
77. Catteruccia, F., Benton, J.P. and Crisanti, A., 2005. An Anopheles transgenic sexing strain for vector control. *Nature biotechnology*, 23(11), pp.1414-1417
78. Allen, M.L., Berkebile, D.R. and Skoda, S.R., 2004. Postlarval fitness of transgenic strains of *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae). *Journal of economic entomology*, 97(3), pp.1181-1185.
79. Moreira, L.A., Wang, J., Collins, F.H. and Jacobs-Lorena, M., 2004. Fitness of anopheline mosquitoes expressing transgenes that inhibit Plasmodium development. *Genetics*, 166(3), pp.1337-1341.
80. Marec, F., Neven, L.G., Robinson, A.S., Vreysen, M., Goldsmith, M.R., Nagaraju, J. and Franz, G., 2005. Development of genetic sexing strains in Lepidoptera: from traditional to transgenic approaches. *Journal of economic entomology*, 98(2), pp.248-259.
81. Franz, G., Kerremans, P., Rendon, P. and Hendrichs, J., 1996. Development and application of genetic sexing systems for the Mediterranean fruit fly based on a temperature sensitive lethal. *Fruit fly pests: a world assessment of their biology and management*. St. Lucie Press, Delray Beach, FL, pp.185-191.
82. Whitten, M.J., 1969. Automated sexing of pupae and its usefulness in control by sterile insects. *Journal of Economic Entomology*, 62(1).
83. Franz, G., Gencheva, E. and Kerremans, P., 1994. Improved stability of genetic sex-separation strains for the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*. *Genome*, 37(1), pp.72-82.
84. 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(5462), pp.2474-2476.

85. Windbichler, N., Papathanos, P.A., Catteruccia, F., Ranson, H., Burt, A. and Crisanti, A., 2007. Homing endonuclease mediated gene targeting in *Anopheles gambiae* cells and embryos. *Nucleic acids research*, 35(17), pp.5922-5933.
86. Windbichler, N., Papathanos, P.A. and Crisanti, A., 2008. Targeting the X chromosome during spermatogenesis induces Y chromosome transmission ratio distortion and early dominant embryo lethality in *Anopheles gambiae*. *PLoS Genet*, 4(12), p.e1000291.
87. Galizi, R., Doyle, L.A., Menichelli, M., Bernardini, F., Deredec, A., Burt, A., Stoddard, B.L., Windbichler, N. and Crisanti, A., 2014. A synthetic sex ratio distortion system for the control of the human malaria mosquito. *Nature communications*, 5.
88. Galizi, R., Hammond, A., Kyrou, K., Taxiarchi, C., Bernardini, F., O'Loughlin, S.M., Papathanos, P.A., Nolan, T., Windbichler, N. and Crisanti, A., 2016. A CRISPR-Cas9 sex-ratio distortion system for genetic control. *Scientific Reports*, 6.
89. Schliekelman, P. and Gould, F., 2000. Pest control by the release of insects carrying a female-killing allele on multiple loci. *Journal of Economic Entomology*, 93(6), pp.1566-1579.
90. Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A. and Charpentier, E., 2012. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 337(6096), pp.816-821.
91. Gantz, V.M. and Bier, E., 2015. The mutagenic chain reaction: a method for converting heterozygous to homozygous mutations. *Science*, 348(6233), pp.442-444.
92. Esvelt, K.M., Smidler, A.L., Catteruccia, F. and Church, G.M., 2014. Concerning RNA-guided gene drives for the alteration of wild populations. *Elife*, 3, p.e03401.
93. Dafa'alla, T.H., Condon, G.C., Condon, K.C., Phillips, C.E., Morrison, N.I., Jin, L., Epton, M.J., Fu, G. and Alphey, L., 2006. Transposon-free insertions for insect genetic engineering. *Nature biotechnology*, 24(7), pp.820-821.
94. Devos, Y., Maeselele, P., Reheul, D., Van Speybroeck, L., & De Waele, D. (2008). Ethics in the societal debate on genetically modified organisms: A (re) quest for sense and sensibility. *Journal of Agricultural and Environmental Ethics*, 21(1), 29-61
95. Ogaugwu, C.E., Schetelig, M.F. and Wimmer, E.A., 2013. Transgenic sexing system for *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) based on female-specific embryonic lethality. *Insect biochemistry and molecular biology*, 43(1), pp.1-8.
96. Schetelig, M.F., Caceres, C., Zacharopoulou, A., Franz, G. and Wimmer, E.A., 2009. Conditional embryonic lethality to improve the sterile insect technique in *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *BMC biology*, 7(1), p.4
97. Schetelig, M.F. and Handler, A.M., 2012. A transgenic embryonic sexing system for *Anastrepha suspensa* (Diptera: Tephritidae). *Insect biochemistry and molecular biology*, 42(10), pp.790-795.
98. Tan, A., Fu, G., Jin, L., Guo, Q., Li, Z., Niu, B., Meng, Z., Morrison, N.I., Alphey, L. and Huang, Y., 2013. Transgene-based, female-specific lethality system for genetic sexing of the silkworm, *Bombyx mori*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(17), pp.6766-6770.
99. Schetelig, M.F., Targovska, A., Meza, J.S., Bourtzis, K. and Handler, A.M., 2016. Tetracycline-suppressible female lethality and sterility in the Mexican fruit fly, *Anastrepha ludens*. *Insect molecular biology*, 25(4), pp.500-508
100. Ant, T., Koukidou, M., Rempoulakis, P., Gong, H.F., Economopoulos, A., Vontas, J. and Alphey, L., 2012. Control of the olive fruit fly using genetics-enhanced sterile insect technique. *BMC biology*, 10(1), p.51

101. Abbott, M.K. and Lengyel, J.A., 1991. Embryonic head involution and rotation of male terminalia require the *Drosophila* locus head involution defective. *Genetics*, 129(3), pp.783-789.
102. White, K., Grether, M.E., Abrams, J.M., Young, L., Farrell, K. and Steller, H., 1994. Genetic control of programmed cell death in *Drosophila*. *Science*, 264(5159), pp.677-684.
103. Grether, M.E., Abrams, J.M., Agapite, J., White, K. and Steller, H., 1995. The head involution defective gene of *Drosophila melanogaster* functions in programmed cell death. *Genes & development*, 9(14), pp.1694-1708.
104. Chen, P., Nordstrom, W., Gish, B. and Abrams, J.M., 1996. grim, a novel cell death gene in *Drosophila*. *Genes & development*, 10(14), pp.1773-1782.
105. Srinivasula, S.M., Datta, P., Kobayashi, M., Wu, J.W., Fujioka, M., Hegde, R., Zhang, Z., Mukattash, R., Fernandes-Alnemri, T., Shi, Y. and Jaynes, J.B., 2002. sickle, a novel *Drosophila* death gene in the reaper/hid/grim region, encodes an IAP-inhibitory protein. *Current biology*, 12(2), pp.125-130.
106. Zhou, L., Schnitzler, A., Agapite, J., Schwartz, L.M., Steller, H. and Nambu, J.R., 1997. Cooperative functions of the reaper and head involution defective genes in the programmed cell death of *Drosophila* central nervous system midline cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(10), pp.5131-5136.
107. Vucic, D., Kaiser, W.J. and Miller, L.K., 1998. Inhibitor of apoptosis proteins physically interact with and block apoptosis induced by *Drosophila* proteins HID and GRIM. *Molecular and cellular biology*, 18(6), pp.3300-3309.
108. Bergmann, A., Agapite, J., McCall, K. and Steller, H., 1998. The *Drosophila* gene hid is a direct molecular target of Ras-dependent survival signaling. *Cell*, 95(3), pp.331-341.
109. Kurada, P. and White, K., 1998. Ras promotes cell survival in *Drosophila* by downregulating hid expression. *Cell*, 95(3), pp.319-329.
110. Wang, S.L., Hawkins, C.J., Yoo, S.J., Müller, H.A.J. and Hay, B.A., 1999. The *Drosophila* caspase inhibitor DIAP1 is essential for cell survival and is negatively regulated by HID. *Cell*, 98(4), pp.453-463.
111. Haining, W.N., Carboy-Newcomb, C., Wei, C.L. and Steller, H., 1999. The proapoptotic function of *Drosophila* Hid is conserved in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(9), pp.4936-4941.
112. Bangs, P., Franc, N. and White, K., 2000. Molecular mechanisms of cell death and phagocytosis in *Drosophila*. *Cell death and differentiation*, 7(11), p.1027.
113. Goyal, L., McCall, K., Agapite, J., Hartweg, E. and Steller, H., 2000. Induction of apoptosis by *Drosophila* reaper, hid and grim through inhibition of IAP function. *The EMBO journal*, 19(4), pp.589-597.
114. Hawkins, C.J., Yoo, S.J., Peterson, E.P., Wang, S.L., Vernooy, S.Y. and Hay, B.A., 2000. The *Drosophila* caspase DRONC cleaves following glutamate or aspartate and is regulated by DIAP1, HID, and GRIM. *Journal of Biological Chemistry*, 275(35), pp.27084-27093.
115. Cheng-Yu, L.E.E. and Baehrecke, E.H., 2000. Genetic regulation of programmed cell death in *Drosophila*. *Cell research*, 10(3), pp.193-204.
116. Lisi, S., Mazzon, I. and White, K., 2000. Diverse domains of THREAD/DIAP1 are required to inhibit apoptosis induced by REAPER and HID in *Drosophila*. *Genetics*, 154(2), pp.669-678
117. Yoo, S.J., Huh, J.R., Muro, I., Yu, H., Wang, L., Wang, S.L., Feldman, R.R., Clem, R.J., Müller, H.A.J. and Hay, B.A., 2002. Hid, Rpr and Grim negatively regulate DIAP1 levels through distinct mechanisms. *Nature cell biology*, 4(6), pp.416-424.
118. Bergmann, A., Yang, A.Y.P. and Srivastava, M., 2003. Regulators of IAP function: coming to grips with the grim reaper. *Current opinion in cell biology*, 15(6), pp.717-724.

119. Chai, J., Yan, N., Huh, J.R., Wu, J.W., Li, W., Hay, B.A. and Shi, Y., 2003. Molecular mechanism of Reaper-Grim-Hid-mediated suppression of DIAP1-dependent Dronc ubiquitination. *Nature Structural & Molecular Biology*, 10(11), pp.892-898.
120. Zachariou, A., Tenev, T., Goyal, L., Agapite, J., Steller, H. and Meier, P., 2003. IAP-antagonists exhibit non-redundant modes of action through differential DIAP1 binding. *The EMBO journal*, 22(24), pp.6642-6652.
121. Yan, N., Wu, J.W., Chai, J., Li, W. and Shi, Y., 2004. Molecular mechanisms of DrICE inhibition by DIAP1 and removal of inhibition by Reaper, Hid and Grim. *Nature structural & molecular biology*, 11(5), pp.420-428.
122. Bilak, A. and Su, T.T., 2009. Regulation of *Drosophilamelanogaster* pro-apoptotic gene hid. *Apoptosis*, 14(8), pp.943-949.
123. Sandu, C., Ryoo, H.D. and Steller, H., 2010. *Drosophila* IAP antagonists form multimeric complexes to promote cell death. *The Journal of cell biology*, 190(6), pp.1039-1052.
124. Fraser, A.G., McCarthy, N.J. and Evan, G.I., 1997. drICE is an essential caspase required for apoptotic activity in *Drosophila* cells. *The EMBO journal*, 16(20), pp.6192-6199.