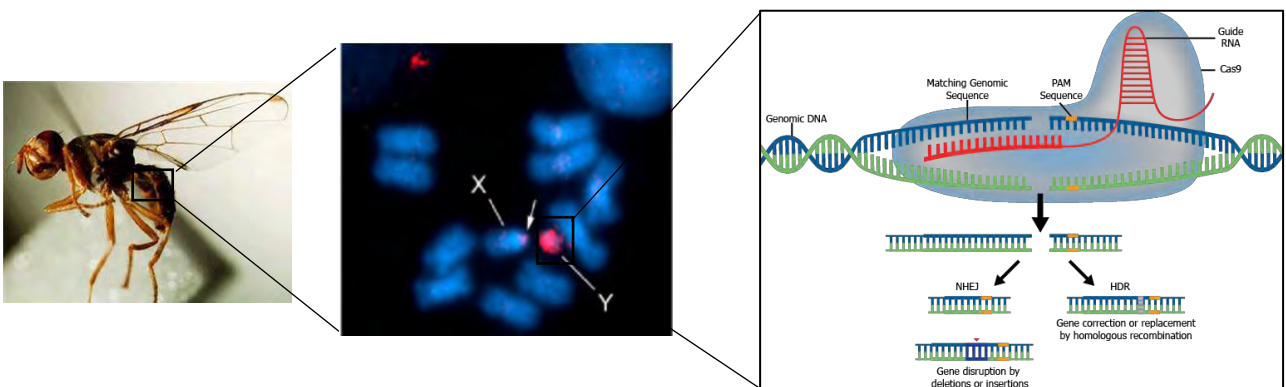




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ
ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΗΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

“ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ
ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΓΙΑ ΕΙΔΙΚΗ ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΗ
ΘΕΣΗ ΕΝΘΕΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΜΕΣΩ
CRISPR/CAS ΣΤΟ ΧΡΩΜΟΣΩΜΑ Υ ΤΟΥ
BACTROCERA OLEAE”



Ντάσιου Χριστίνα

Λάρισα 2020

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Σχεδιασμός και κατασκευή συστήματος για ειδική ως προς τη θέση ένθεση γονιδίων μέσω CRISPR/Cas στο χρωμόσωμα Y του *Bactrocera oleae*»

«Design and construction of system for site-specific knock-in using CRISPR/Cas on the Y chromosome of *Bactrocera oleae* »

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας το εαρινό εξάμηνο της ακαδημαϊκής χρονιάς 2019-2020, υπό την επίβλεψη και καθοδήγηση του καθηγητή κ. Μαθιόπουλου Κωνσταντίνου και της μεταδιδακτορικής ερευνήτριας κα Τσουμάνη Κωνσταντίνας.

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Μαθιόπουλος Κωνσταντίνος: Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Γιακουντής Αντώνιος: Επίκουρος Καθηγητής Γονιδιωματικής, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Παπαδοπούλου Καλλιόπη: Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Περίληψη

Ο δάκος της ελιάς, *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae), αποτελεί ένα από τα πιο σημαντικά παράσιτα των ελαιόδεντρων παγκοσμίως. Η διαχείρισή του στηρίζεται αυτή τη στιγμή στη χρήση χημικών εντομοκτόνων. Μια εναλλακτική μέθοδος αντιμετώπισης είναι η τεχνική στείρου εντόμου (Sterile Insect Technique, SIT), η οποία προϋποθέτει δυνητικά την παραγωγή και απελευθέρωση μόνο αρσενικών εντόμων. Ωστόσο, προηγούμενες προσπάθειες εφαρμογής της στο δάκο της ελιάς είχαν απογοητευτικά αποτελέσματα. Αυτό ήταν κυρίως αποτέλεσμα της κακής ποιότητας των εργαστηριακά παραχθέντων εντόμων αλλά και της αδυναμίας διαχωρισμού αρσενικών από θηλυκά άτομα και, κατά συνέπεια, της ταυτόχρονης απελευθέρωσης τόσο αρσενικών όσο και θηλυκών ατόμων. Η δημιουργία ενός στελέχους *B. oleae*, το οποίο θα επιτρέπει τον εύκολο και λιγότερο δαπανηρό διαχωρισμό των φύλων, ενώ ταυτόχρονα παραμένει νομοθετικά αποδεκτό (μη γενετικά τροποποιημένο) θα ήταν πολύ ωφέλιμο στην εφαρμογή της SIT για τον έλεγχο του πληθυσμού του εντόμου. Το σύστημα CRISPR/Cas9 θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως εναλλακτική προσέγγιση δημιουργίας στοχευμένων μεταλλάξεων, για τη δημιουργία φυλο-γενετικών στελεχών (Genetic Sexing Strains, GSS).

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν ο σχεδιασμός και η κατασκευή ενός συστήματος, το οποίο θα οδηγεί σε ειδική ως προς τη θέση ένθεση γονιδίων στο χρωμόσωμα Y του *B. oleae*. Για τον έλεγχο της μεταγραφικής ενεργότητας της περιοχής του χρωμοσώματος Y που στοχεύθηκε, επιλέχθηκε η χρήση ενός γονιδίου δείκτη. Για την επακόλουθη ένθεση, ο σχεδιασμός βασίστηκε στη δυνατότητα του ομόλογου ανασυνδυασμού που πραγματοποιείται μετά από ρήξη που προκαλεί το CRISPR/Cas9, με την παροχή του κατάλληλου υποστρώματος.

Συγκεκριμένα, στην παρούσα εργασία σχεδιάστηκε ένα σύστημα ένθεσης, που περιελάμβανε το γονίδιο δείκτη (eGFP), το οποίο ελέγχεται από τον καθολικό υποκινητή της πολυουβικουϊτίνης (Pub) και παράλληλα πλαισιώνεται από ομόλογα άκρα (homology arms). Η τελική γενετική κατασκευή κλωνοποιημένη σε κατάλληλο φορέα θα αποτελέσει το υπόστρωμα για ομόλογο ανασυνδυασμό. Επιπλέον, εντοπίστηκαν πιθανές περιοχές στόχευσης του Y χρωμοσώματος από την Cas9 και σχεδιάστηκαν και παράχθηκαν τα κατάλληλα sgRNAs.

Σε επόμενη φάση, τα επιμέρους τμήματα της γενετικής κατασκευής που απομονώθηκαν στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας, θα κλωνοποιηθούν σε κατάλληλο φορέα και θα εντεθούν σε έμβρυα μέσω μικροενέσεων. Ακολούθως η παρατήρηση των εντόμων κάτω από κατάλληλο φίλτρο για το eGFP, θα δείξει αν και ποια έντομα κατάφεραν να τροποποιηθούν γενετικά επιτυχώς, με την παρουσία φθορισμού σε ικανοποιητική ένταση να υποδηλώνει τη μεταγραφική ενεργότητα της περιοχής.

Abstract

The olive fruit fly, *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae), is one of the most important pests of olive trees worldwide. Its management is currently based on the use of chemical insecticides. An alternative method is the sterile Insect Technique (SIT), which potentially requires the production and release of only male insects. However, previous attempts to apply it to the olive fruit fly had disappointing results. This was mainly due to the low quality of the laboratory reared flies and to the inability to separate the two sexes, which resulted in mixed sex releases. The creation of a *B. oleae* strain, which will allow easy and inexpensive sex sorting, while remaining legally acceptable (not genetically modified) would be beneficial in implementing the SIT to control the insect population. The CRISPR/Cas9 system could be used as an alternative approach to generate targeted mutations, for the creation of genetic sexing strains (GSS).

The aim of the present study was to design and construct a system that would lead to site-specific insertion of genes on the Y chromosome of *B. oleae*. The use of a marker gene was chosen to control the transcriptional activity of the targeted Y chromosome region. For subsequent insertion, the design was based on the ability of homologous recombination that occurs after a double strand break caused by CRISPR / Cas9, provided that an appropriate template is introduced.

Specifically, in the present work, an insertion system was designed, which included the marker gene (eGFP), which is controlled by the universal promoter of polyubiquitin (Pub) and at the same time is framed by homology arms. The final genetic construct cloned into a suitable vector will be the template for homologous recombination. In addition, potential Y chromosome targeting sites for Cas9 were identified and the appropriate sgRNAs were designed and produced.

In the next phase, the individual parts of the genetic construct isolated in the present work, will be cloned into a suitable vector and inserted into embryos by microinjection. The following observation of the insects under a suitable filter for eGFP, will show if and which insects managed to be genetically modified, with the presence of fluorescence at a sufficient intensity, indicating the transcriptional activity of the area.

Περιεχόμενα

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	5
1.1 Ο δάκος της ελιάς και η σημασία του	5
1.2 Διαχείριση – Καταπολέμηση του δάκου	6
1.3 Κλασσική μέθοδος SIT, προβλήματα και πρόταση βελτίωσης	7
1.4 Διαχωρισμός φύλου – Sex sorting	9
1.4.1 Φυσικές τεχνικές διαχωρισμού του φύλου	9
1.4.2 Γενετικές τεχνικές διαχωρισμού του φύλου	10
1.4.3 Διαγονιδιακές τεχνικές διαχωρισμού του φύλου	11
1.4.4 Το σύστημα CRISPR-Cas έναντι των υπαρχόντων τεχνικών διαχωρισμού του φύλου.....	12
1.5 Το Y χρωμόσωμα ως στόχος γονιδιακής τροποποίησης	12
1.6 Το σύστημα CRISPR/Cas	14
2. ΣΚΟΠΟΣ	17
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	18
3.1 Τεχνικές χειρισμού νουκλεϊκών οξέων	18
3.1.1 Απομόνωση DNA (DNA extraction) από το <i>Bactrocera oleae</i>	18
3.1.2 Ποσοτικοποίηση DNA – Quawell UV Spectrophotometer	19
3.1.3 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης	21
3.1.4 Ανάκτηση μορίων DNA από πήκτωμα αγαρόζης (Gel extraction)	22
3.2 Μέθοδοι Ενίσχυσης νουκλεϊκών οξέων	23
3.2.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	23
3.2.2 Σχεδιασμός εκκινητών με PrimerQuest Tool, OligoAnalyzer Tool και Primer-BLAST.....	25
3.3 Μέθοδοι παραγωγής single guide RNA (sgRNA)	26
3.3.1 Σχεδιασμός sgRNA μέσω του προγράμματος CHOPCHOP	26
3.3.2 Σύνθεση sgRNA	27
3.3.2.1 Παραγωγή μήτρας οδηγού για τα sgRNAs.....	28
3.3.2.2 Μεταγραφή in vitro – παραγωγή sgRNA	29
3.3.2.3 Καθαρισμός και ανάκτηση sgRNA	30
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	32
4.1 Πειραματικός σχεδιασμός – Ροή εργασιών	32
4.2 Πειραματικά αποτελέσματα	33
4.2.1 Εύρεση αλληλουχιών-στόχων sgRNAs	33
4.2.2 Σχεδιασμός εκκινητών	34
4.2.3 Βελτιστοποίηση της PCR	37
4.2.4 Απομόνωση επιθυμητών τμημάτων DNA	39
4.2.5 Σύνθεση sgRNA	39
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	42
6. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	45
7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	46

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ο δάκος της ελιάς και η σημασία του

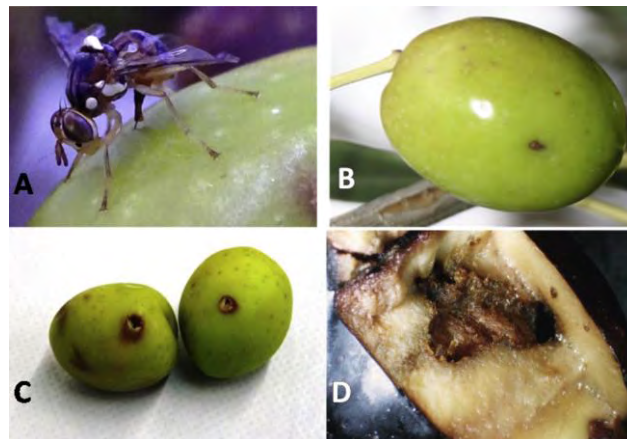
Ο δάκος της ελιάς, *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae), αποτελεί ένα από τα πιο σημαντικά παράσιτα των ελαιόδεντρων, *Olea europaea*, παγκοσμίως. Ενδημεί στις περισσότερες περιοχές όπου καλλιεργούνται ελιές για εμπορικούς σκοπούς, δηλαδή κυρίως στις μεσογειακές χώρες, όπου καλλιεργείται το 98% των εκτιμώμενων παγκοσμίως 9,8 εκατομμυρίων εκταρίων ελαιόδεντρων (Ponti, Cossu, & Gutierrez, 2009). Είναι ωστόσο παρών και στη Νότιο Αφρική, στα Κανάρια νησιά, στη Μέση Ανατολή, στην Κίνα, στην Καλιφόρνια, στο Μεξικό, στην Κεντρική Αμερική και στην Αυστραλία (Daane and Johnson, 2010; Ekesi et al., 2006; Nardi et al., 2005; Rice et al., 2003) (Εικόνα 1.1).



Εικόνα 1.1 Χάρτης παγκόσμιας κατανομής του δάκου της ελιάς, *Bactrocera oleae*

Ο δάκος της ελιάς είναι μονοφάγο είδος, το οποίο τρέφεται αποκλειστικά με τους καρπούς της ελιάς (Daane and Johnson, 2010). Τα ενήλικα θηλυκά αποθέτουν συνήθως ένα αυγό ανά καρπό (Burrack et al., 2008) τόσο σε άγρια όσο και σε καλλιεργήσιμα ελαιόδεντρα, μέσω του ωοαποθέτη. Στη φύση ένα θηλυκό μπορεί να αποθέσει περίπου 12 αυγά την ημέρα και 200-250 κατά τη διάρκεια της ζωής της (Sharaf, 1980). Η εκκολαπτόμενη προνύμφη τρέφεται από το σαρκώδες μεσοκάρπιο ((Neuenschwander and Michelakis, 1981). Η οικονομική ζημία προκύπτει από την επίδραση τόσο στην ποιότητα όσο και στην ποσότητα της παραγωγής (Michelakis and Neuenschwander, 1983; Manousis and Moore, 1987; Economopoulos, 2002), οδηγώντας σε περίπτωση έντονης προσβολής από το έντομο σε μείωση της αξίας του ελαιολάδου έως και 80%

και απόρριψη ολόκληρων συγκομιδών επιτραπέζιας ελιάς (Tzanakakis, 2006) (Εικόνα 1.2). Εκτιμάται ότι ο δάκος καταστρέφει περίπου το 5% της συνολικής παραγωγής ελιάς, με αποτέλεσμα οικονομικές απώλειες περίπου \$800 εκατομμυρίων ετησίως (Montiel and Jones, 2002).



Εικόνα 1.2 Επίδραση του δάκου στις ελιές: A) Ωοαπόθεση του δάκου, B) Θέση ωοαπόθεσης C) Οπές εξόδου σε ελιές προκαλούμενες από προνύμφες D) Καταστροφή προκαλούμενη στον καρπό από τις προνύμφες του δάκου

1.2 Διαχείριση – Καταπολέμηση του δάκου

Η διαχείριση του δάκου της ελιάς στηρίζεται αυτήν την στιγμή στη χρήση χημικών εντομοκτόνων (Haniotakis, 2005). Για περισσότερο από σαράντα χρόνια τα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα (dimethoate και fenthion), έχουν χρησιμοποιηθεί εκτενώς. Τα πυρεθροειδή και η λακτόνη spinosad εισήχθησαν αργότερα και χρησιμοποιούνται πιο συχνά την τελευταία δεκαετία (Mazomenos et al., 2002; Bret et al., 1997). Η εφαρμογή των εντομοκτόνων και πιο συγκεκριμένα των πυρεθροειδών (όπως alpha-cypermethrin and deltamethrin) γίνεται μέσω δολωμάτων (στρατηγική ελέγχου σε εθνικό επίπεδο), αλλά και σε πολλές περιπτώσεις μέσω σπρέι ψεκασμού (μεμονωμένοι αγρότες) (Kambouraki et al., 2018). Αν και η ανάπτυξη ανθεκτικότητας στο δάκο δεν είναι τόσο γρήγορη όσο σε άλλα έντομα, πιθανόν λόγω της υψηλής κινητικότητας και της τάσης για ευρεία διασπορά στο χώρο (Georghiou and Taylor, 1976), πρόσφατα αναφέρθηκαν ενδείξεις ότι η εξελικτική πίεση της επιλογής οδήγησε σε ανάπτυξη ανθεκτικότητας, δυσχεραίνοντας τον επιτυχημένο έλεγχο του εντόμου (Vontas et. al, 2011). Η ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα έχει αποδοθεί σε μεταλλάξεις στα έντομα-στόχους, η οποία μειώνει την ευαισθησία στην τοξική ουσία, ή σε αυξημένα επίπεδα αποτοξικοποίησης της ουσίας, το οποίο επηρεάζει την αποτελεσματική δοσολογία του εντομοκτόνου που φτάνει στο έντομο-στόχο (Vontas

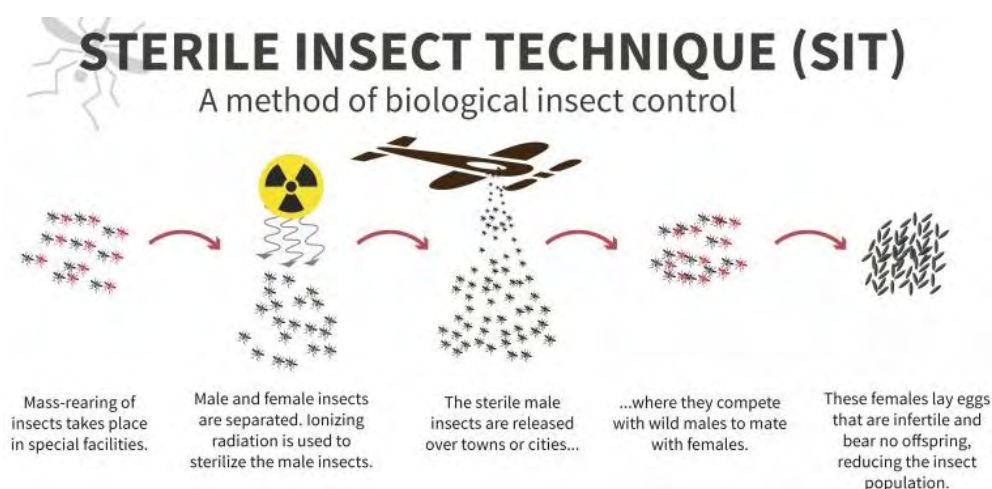
et. al, 2011). Έτσι, έχουν καταγραφεί περιπτώσεις ανάπτυξης μέτριας έως και υψηλής ανθεκτικότητας στα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα (Vontas et. al, 2012), μέτρια επίπεδα ανθεκτικότητας στα πυρεθροειδή (Roditakis et al., 2015) και χαμηλά επίπεδα ανθεκτικότητας στο spinosad (Sagri et al, 2014). Η εμφάνιση ανθεκτικών στα εντομοκτόνα πληθυσμών, σε συνδυασμό με το υψηλό οικονομικό και περιβαλλοντικό κόστος, τη μόλυνση των ελαιολάδων από κατάλοιπα εντομοκτόνων (Amvrizi and Albanis, 2009) και την ταυτόχρονη καταστροφή ευεργετικών εντόμων (Broumas 1985; Broumas et al., 2002), υποδεικνύουν την ανάγκη για βελτιωμένες μεθόδους ελέγχου (Ant et al, 2012).

Μη χημικές προσεγγίσεις ελέγχου περιλαμβάνουν τη μαζική παγίδευση (mass trapping) (Petacchi et al., 2003), την εισαγωγή ωφέλιμων εντόμων (Hepdurgun et al., 2009; Hoelmer et al., 2011) και την τεχνική στείρου εντόμου (Sterile Insect Technique, SIT) (Dyck et al., 2005). Ωστόσο, στην πρώτη περίπτωση, πολλοί παράγοντες επηρεάζουν την επιτυχία της μεθόδου, κάτι που οδηγεί σε αμφισβήτηση της βιωσιμότητάς της για έλεγχο του εντόμου σε μεγάλη κλίμακα (Montiel and Jones, 2002). Επίσης αποδείχθηκε μη συμφέρουσα οικονομικά και επιβλαβής για τους πληθυσμούς των φυσικών εχθρών του εντόμου (Economopoulos, 1979; 1980). Στην δεύτερη περίπτωση, εισαγόμενοι ή τοπικοί φυσικοί εχθροί συνήθως δεν παρέχουν αξιόπιστο έλεγχο του δάκου της ελιάς (Manousis and Moore, 1987; Tzanakakis, 2006). Η τεχνική του στείρου εντόμου είναι μια εναλλακτική, φιλική προς το περιβάλλον, ειδική ως προς το είδος μέθοδος ελέγχου πληθυσμού, κατά την οποία δεν εισάγεται νέο γενετικό υλικό στην περιοχή, έχει μια καλή αναλογία κέρδους-κόστους, είναι πολιτικά αποδεκτή και θεωρείται ως κάτι θετικό από την κοινωνία (Dyck et al., 2005). Αν και έχει χρησιμοποιηθεί επιτυχώς έναντι άλλων εντόμων (Handler and O'Brochta, 2012), προηγούμενες προσπάθειες εφαρμογής της στον δάκο της ελιάς είχαν απογοητευτικά αποτελέσματα (Economopoulos, 1972), όπως θα αναλυθούν παρακάτω.

1.3 Κλασσική μέθοδος SIT, προβλήματα και πρόταση βελτίωσης

Η τεχνική στείρου εντόμου είναι μια διαδικασία που εφαρμόζεται σε μια περιοχή, κατά την οποία αναπαραγωγικά στείρα αρσενικά απελευθερώνονται με μεγάλη διαφορά αναλογίας, σε έναν άγριο πληθυσμό του ίδιου είδους (Knippling, 1955). Η μέθοδος βασίζεται συνήθως στη χρήση ακτινοβολίας για την πρόκληση επικρατών θνησιγόνων μεταλλάξεων και αναδιατάξεων των χρωμοσωμάτων στο αρσενικό

σπέρμα, με αποτέλεσμα το μη παραγωγικό ζευγάρι με θηλυκά του άγριου πληθυσμού στο πεδίο (Knippling, 1955) και τελικά τη μείωση του πληθυσμού (Εικόνα 1.3).



Εικόνα 1.3 Συνοπτική παρουσίαση της τεχνικής στείρου εντόμου (SIT)

Αν και πολύ αποτελεσματική, η ακτινοβόληση των αρσενικών έχει ως αποτέλεσμα τη μειωμένη αρμοστικότητα και ανταγωνιστικότητα στο ζευγάρι, καθιστώντας απαραίτητη την απελευθέρωση 100 φορές ή περισσότερο αναλογία στείρων αρσενικών σε σχέση με τα αρσενικά στο πεδίο (Handler and Schetelig, 2014). Ένα ακόμα πρόβλημα κατά την εφαρμογή της μεθόδου είναι η απελευθέρωση μαζί με τα στείρωμένα αρσενικά, και θηλυκών εντόμων. Τα τελευταία ανταγωνίζονται τα θηλυκά αγρίου τύπου, μειώνοντας την πιθανότητα ζευγαρώματος των στείρων αρσενικών με τα θηλυκά έντομα στο πεδίο, καθώς επίσης η απελευθέρωση στείρων θηλυκών μπορεί να οδηγήσει σε καταστροφή των καρπών μέσω της ωοαπόθεσης, ακόμα και αν τα αυγά δεν αναπτυχθούν λόγω της στείρωσης (Caceres, 2002).

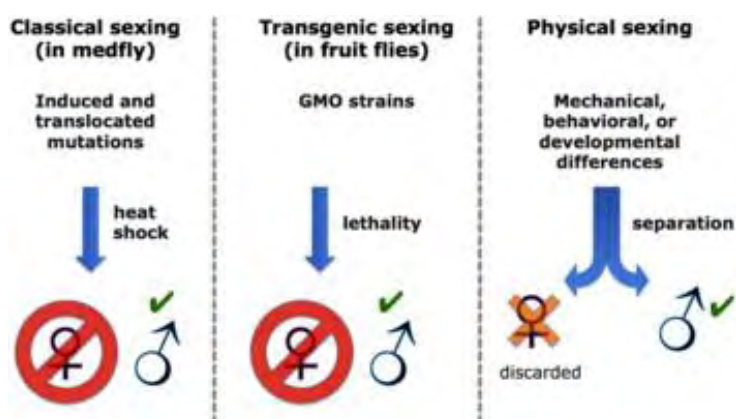
Στην περίπτωση της εφαρμογής της μεθόδου για τον δάκο τη δεκαετία του '70, προέκυψαν και κάποια επιπλέον προβλήματα, καθιστώντας την προσπάθεια ανεπιτυχή. Αυτά περιλάμβαναν διαταραγμένη φάση ωραρίου ζευγαρώματος των εντόμων του εργαστηρίου, με αποτέλεσμα απουσία ζευγαρώματος ανάμεσα στον άγριο και τον εκτρεφόμενο πληθυσμό, και χαμηλή ανταγωνιστικότητα των στείρων, μαζικά εκτρεφόμενων εντόμων (Economopoulos, 1972). Επομένως, η παραγωγή ανταγωνιστικών ομάδων αποτελούμενων μόνο από αρσενικά θεωρείται ένα απαραίτητο προαπαιτούμενο για την επιτυχημένη εφαρμογή της μεθόδου για τον δάκο της ελιάς.

Τα παραπάνω οδηγούν σε μείωση της αποτελεσματικότητας της μεθόδου και υψηλό απαιτούμενο κόστος (Caceres, 2002). Για τη βελτίωση της μεθόδου έχει

προταθεί η παραγωγή και απελευθέρωση μόνο αρσενικών ατόμων, μια διαδικασία που ονομάζεται *διαχωρισμός του φύλου* (sex sorting / sexing) (Rendón et al., 2004).

1.4 Διαχωρισμός φύλου – Sex sorting

Σε τέτοιες εφαρμογές, ο διαχωρισμός του φύλου αναφέρεται στη διαλογή αρσενικών από τα θηλυκά, και πιο συγκεκριμένα στην απομάκρυνση των θηλυκών. Μπορεί να βασιστεί στη μηχανική διαλογή των φύλων, με βάση φυσικούς ή τεχνητούς φυλετικούς διμορφισμούς ή μπορούν να χρησιμοποιηθούν πιο περίπλοκες τεχνολογίες για την τροποποίηση της γονιδιακής έκφρασης (Lutrat et al, 2019). Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες μέθοδοι για το διαχωρισμό του φύλου είναι φυσικές, γενετικές και διαγονιδιακές τεχνικές (Schetelig & Handler, 2013) (Εικόνα 1.3).



Εικόνα 1.4 Μέθοδοι διαχωρισμού του φύλου (Gilles et al., 2014)

1.4.1 Φυσικές τεχνικές διαχωρισμού του φύλου

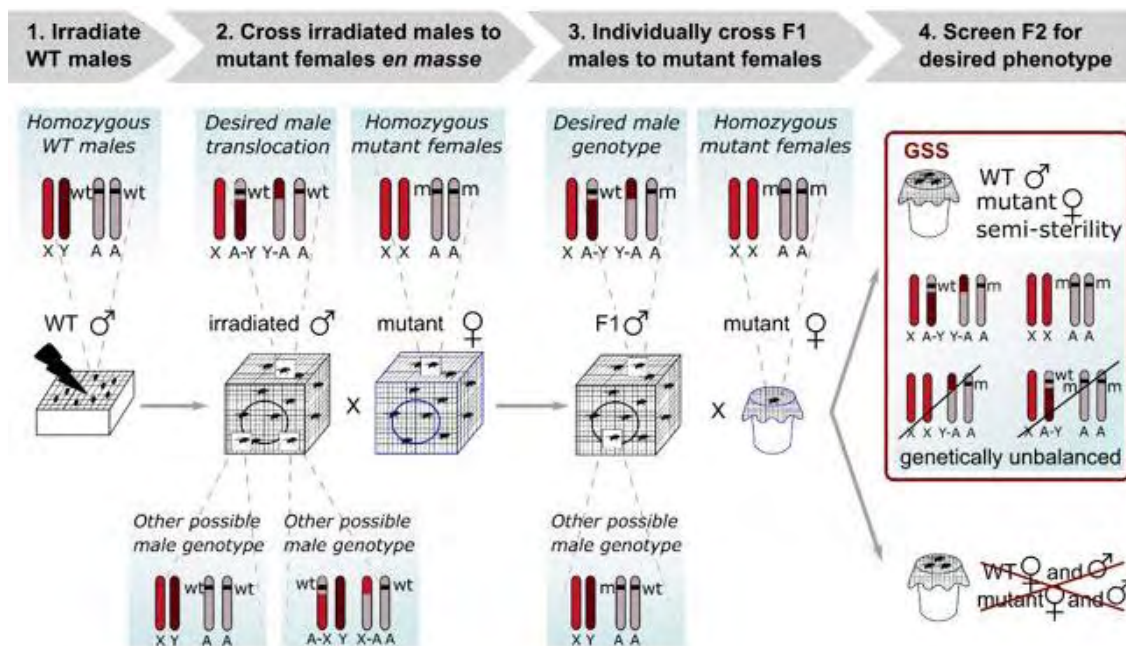
Ο φυσικός διαχωρισμός του φύλου περιλαμβάνει χειρωνακτική διαλογή, με τη χρήση εξωτερικών μορφολογικών διαφορών ή αυτοματοποιημένο μηχάνημα διαλογής, βασιζόμενο στο ειδικό για το φύλο μέγεθος ή στη διαφορά ως προς το χρώμα. Ο χειρωνακτικός διαχωρισμός μπορεί να είναι εργαστηριακά επίπονος, αλλά έχει χρησιμοποιηθεί για το διαχωρισμό του φύλου της μύγας τσε τσε, *Glossina austeni* (Feldmann and Hendrichs, 2002). Όλες οι τεχνικές φυσικού διαχωρισμού έχουν το μειονέκτημα ότι και τα δύο φύλα πρέπει να εκτρέφονται τουλάχιστον μέχρι το στάδιο της προνύμφης (και συνήθως το στάδιο της νύμφης), το οποίο αυξάνει το κόστος παραγωγής στη μαζική εκτροφή (Bouyer et al., 2014). Ωστόσο, αυτή η μέθοδος

διαχωρισμού δεν μπορεί να εφαρμοστεί στο δάκο της ελιάς, καθώς δεν υπάρχουν διμορφισμοί που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για το σκοπό αυτό.

1.4.2 Γενετικές τεχνικές διαχωρισμού του φύλου

Μια άλλη επιλογή για τον διαχωρισμό του φύλου είναι η δημιουργία *φυλο-γενετικών στελεχών* (genetic sexing strains – GSS), μέσω κλασσικών γενετικών χειρισμών (Franz, 2005). Στη μεσογειακή μύγα των φρούτων, *Ceratitis capitata*, υπήρξε ένα GSS που αναπτύχθηκε και βελτιώθηκε τα τελευταία 20 χρόνια. Η πρώτη γενιά GSS της μεσογειακής μύγας των φρούτων κατασκευάστηκε με προσέγγιση μεταλλαξιγένεσης μέσω κλασσικής γενετικής, κατά την οποία το αλληλόμορφο αγρίου τύπου για το άσπρο χρώμα της νύμφης (*white pupae* gene) συνδέθηκε με την περιοχή που καθορίζει τα αρσενικά μέσω μετατόπισης μεταξύ ενός αυτοσωμικού και του Y χρωμοσώματος (Robinson and Van Heemert, 1982). Αυτό επέτρεψε το διαχωρισμό των θηλυκών νυμφών με άσπρο χρώμα από τις αρσενικές καφέ νύμφες μέσω οπτικών μηχανικών μέσων, επομένως κατέστησε δυνατή την απελευθέρωση μόνο αρσενικών εντόμων. Ωστόσο, το κόστος εκτροφής και των δυο φύλων έως το στάδιο της προνύμφης παρέμεινε σχετικά υψηλό, καθώς ο διαχωρισμός των φύλων γινόταν στο στάδιο της νύμφης. Ακόμα, ο διαχωρισμός θηλυκών και αρσενικών νυμφών δεν ήταν 100% ακριβής και συχνά προκαλούσε καταστροφή στις αρσενικές νύμφες (Ozaki, and Kobayashi, 1982). Επομένως, ένα σύστημα διαχωρισμού, το οποίο θα μπορούσε να διαχωρίσει τα φύλα σε προηγούμενο στάδιο ανάπτυξης, π.χ. στην εμβρυογένεση, θα μπορούσε να είναι πιο αποτελεσματικό οικονομικά.

Ένα τέτοιο σύστημα διαχωρισμού πραγματοποιήθηκε και βασίζεται σε μία θνησιγόνο θερμοευαίσθητη μετάλλαξη (*tsl*) (Franz, et al., 1994). Τα θηλυκά ήταν ομόζυγα για τη μετάλλαξη και επομένως ευαίσθητα σε αυξημένες θερμοκρασίες. Έκθεση των αυγών στους 34°C για 12 ώρες είχε ως αποτέλεσμα την εξάλειψη όλων των θηλυκών στο στάδιο του εμβρύου (Franz, 2005) και επομένως η εκτροφή τους μπορεί να αποφευχθεί. Τα αρσενικά επιβιώνουν λόγω της παρουσίας του άγριου τύπου αλληλόμορφου (*tsl+*) στο χρωμόσωμα Y, λόγω μιας χρωμοσωμικής μετατόπισης (Εικόνα 1.4). Το στέλεχος αυτό της μεσογειακής μύγας των φρούτων χρησιμοποιείται επί του παρόντος στη μαζική εκτροφή για να παράγει έως και 4 δισεκατομμύρια μύγες ανά εβδομάδα (Schetelig & Handler, 2013).



Εικόνα 1.5 Δημιουργία φυλο-γενετικών στελεχών (GSS) (Robinson, 2002)

1.4.3 Διαγονιδιακές τεχνικές διαχωρισμού του φύλου

Η μεταφορά της συγκεκριμένης τεχνολογίας δημιουργίας στελεχών GSS σε νέα είδη εντόμων, ωστόσο, είναι δύσκολη και χρονοβόρα, καθώς η κλαστική μεταλλαξιγένεση έχει ως αποτέλεσμα τυχαίες μεταλλάξεις (Bose, 2016). Επομένως, οι μεταλλάξεις που είναι υπεύθυνες για το αποτέλεσμα συχνά δεν ταυτοποιούνται (Busch-Petersen, 1990; Rössler, 1979). Ως εναλλακτική, αναπτύχθηκαν διαγονιδιακά συστήματα διαχωρισμού, τα οποία βασίζονται στην έκφραση θνησιγόνων γονιδίων στα θηλυκά έμβρυα (Schetelig and Handler, 2012) ή στη συσσώρευση τοξικών προϊόντων αργότερα στην ανάπτυξη (Fu et al., 2007). Αν και αυτά τα διαγονιδιακά συστήματα γρήγορα προσαρμόστηκαν σε έναν αριθμό διάφορων ειδών εντόμων μέσα σε λίγα χρόνια (Ant et al., 2012; Concha et al., 2016; Li et al., 2014; Ogaugwu et al., 2013; Schetelig and Handler, 2012; Schetelig et al., 2016; Yan and Scott, 2015), έως σήμερα η απελευθέρωση διαγονιδιακών οργανισμών είναι αυστηρά νομοθετημένη ή ακόμα απαγορευμένη σε πολλές χώρες, σε αντίθεση με τα στελέχη που δημιουργούνται μέσω κλασικής μεταλλαξιγένεσης. Επομένως, ένα εργαλείο το οποίο θα μπορούσε να δημιουργήσει ασφαλή συστήματα διαχωρισμού του φύλου, που θα προσομοιάζουν την κλασική μεταλλαξιγένεση και επομένως θα είναι αποδεκτά προς απελευθέρωση, θα ήταν πολύ επικοινωνιακό.

1.4.4 Το σύστημα CRISPR-Cas έναντι των υπαρχόντων τεχνικών διαχωρισμού του φύλου

Το σύστημα CRISPR-Cas [Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats (CRISPR)/CRISPR Associated Protein (Cas)] θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως εναλλακτική προσέγγιση δημιουργίας στοχευμένων μεταλλάξεων. Όπως θα περιγραφεί και αναλυτικότερα παρακάτω, το σύστημα επιτρέπει την επεξεργασία γονιδίων με δύο τρόπους μετά την πρόκληση μιας διπλής ρήξης (Double-Strand Break - DSB) (Doudna and Charpentier, 2014; Ran et al., 2013; Zetsche et al., 2015). Πιο συγκεκριμένα, το DSB επιδιορθώνεται είτε μέσω του μονοπατιού της μη ομόλογης σύνδεσης των άκρων (Non-Homologous End Joining, NHEJ), ή μέσω του μονοπατιού του ομόλογου ανασυνδυασμού (Homology-Directed Repair, HDR). Ενώ το μονοπάτι μη ομόλογης σύνδεσης των άκρων είναι πιο «επιρρεπές σε λάθη», καθώς προκαλεί τυχαίες ενθέσεις ή διαγραφές νουκλεοτιδίων, το μονοπάτι του ομόλογου ανασυνδυασμού μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον ακριβή χειρισμό της αλληλουχίας στόχου, παρέχοντας ένα κατάλληλο υπόστρωμα (template) επιδιόρθωσης του DNA, το οποίο θα περιέχει την επιθυμητή αλλαγή (Kim and Kim, 2014). Αυτό επιτρέπει την εισαγωγή ειδικών αλλαγών στην αλληλουχία, χωρίς να παραμένει ωστόσο εξωγενές DNA στην αλληλουχία του γονιδιώματος. Επομένως, το μονοπάτι ομόλογου ανασυνδυασμού του συστήματος CRISPR-Cas, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για να ξεπεραστούν τα μειονεκτήματα των υπαρχόντων μεθόδων, καθώς από την μία στην κλασσική μεταλλαξιγένεση πραγματοποιούνται άγνωστες αλλαγές στο γονιδίωμα, ενώ από την άλλη στη διαγονιδιακή μέθοδο εισάγεται εξωγενές γενετικό υλικό, γεγονός που επιφέρει νομοθετικούς περιορισμούς.

1.5 Το Y χρωμόσωμα ως στόχος γονιδιακής τροποποίησης

Το Y χρωμόσωμα είναι σημαντικό, τόσο όσον αφορά την εξέλιξη, αλλά και τον καθορισμό του φύλου. Η ικανότητα επεξεργασίας του σε διάφορα έντομα θα μπορούσε να αξιοποιηθεί σε διάφορες εφαρμογές. Ένα σημασμένο Y χρωμόσωμα θα επέτρεπε μελέτες μεταξύ διαφορετικών ειδών, παρέχοντας πληροφορίες για την εξέλιξη και λειτουργία του (Sackton et al., 2011; Araripe et al., 2016; Bernardini et al., 2017). Ακόμα, η ικανότητα έκφρασης διαγονιδίων απευθείας από το Y χρωμόσωμα θα ήταν χρήσιμη σε διάφορες εφαρμογές. Πιθανά θα μπορούσε να συμβάλει στην ανάπτυξη

μηχανισμών γενετικού ελέγχου των εντόμων, παρέχοντας μια λύση σε σημαντικά υγειονομικά και αγροτικά προβλήματα (Sinkins & Gould, 2006; Esvelt et al., 2014; Champer et al., 2016). Για παράδειγμα, η μεταβολή της αναλογίας φύλου υπέρ των αρσενικών μπορεί να οδηγήσει σε σταδιακή μείωση του πληθυσμού και ενδεχόμενη εξάλειψη του πληθυσμού-στόχου (Hickey & Craig, 1966; Hamilton, 1967; Gould & Schliekelman, 2004; Papathanos et al., 2014).

Κυτταρογενετικές μελέτες στο δάκο της ελιάς αποκάλυψαν την ύπαρξη έξι ζευγών χρωμοσωμάτων, συμπεριλαμβανομένου ενός ζεύγους φυλετικών χρωμοσωμάτων, με το αρσενικό να φέρει δυο διακριτά φυλετικά χρωμοσώματα (Εικόνα 1.6) (Mavragani-Tsipidou, 1992).



Εικόνα 1.6 Απεικόνιση χρωμοσωμάτων αρσενικής προνύμφης (Mavragani-Tsipidou, 1992)

Τα φυλετικά χρωμοσώματα, που αναγνωρίζονται εύκολα ως το ετερομορφικό ζεύγος χρωμοσωμάτων XX / XY, είναι τα μικρότερα χρωμοσώματα. Το χρωμόσωμα Y είναι ένα πολύ μικρό, σαν κουκκίδα χρωμόσωμα (dot chromosome), με αναλογία μήκους χρωμοσώματος Y/X 0.2. Αξίζει να σημειωθεί ότι το X χρωμόσωμα είναι μικρότερο από τα αυτοσωμικά χρωμοσώματα και έχει περίπου το μισό μέγεθος του μικρότερου αυτοσωμικού χρωμοσώματος (Mavragani-Tsipidou, 2002). Με κατάλληλη τεχνική χρώσης των χρωμοσωμάτων (C-banding) βρέθηκε ότι το χρωμόσωμα Y είναι υψηλά ετεροχρωματινικό (Mavragani-Tsipidou et al., 1992). Ακόμα, έχει αποδειχθεί ότι περιέχει μεγάλη ποσότητα επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών DNA, οι περισσότερες από τις οποίες εντοπίζονται και στις περικεντρικές περιοχές των αυτοσωμάτων. Ωστόσο, το χρωμόσωμα Y έχει συγκεντρώσει επιπλέον μικρούς και μεγάλους επαναλαμβανόμενους ενδοχρωμοσωμικούς διπλασιασμούς (Gabrieli et al., 2011).

Οι παραπάνω παράγοντες καθιστούν τον ακριβή χειρισμό του χρωμοσώματος Y αρκετά δύσκολο. Οι μόνες επιτυχημένες προσπάθειες εισαγωγής διαγονιδίων στο Y χρωμόσωμα σε έντομα, έχουν βασιστεί σε τυχαία (και σπάνια) γεγονότα, όπως

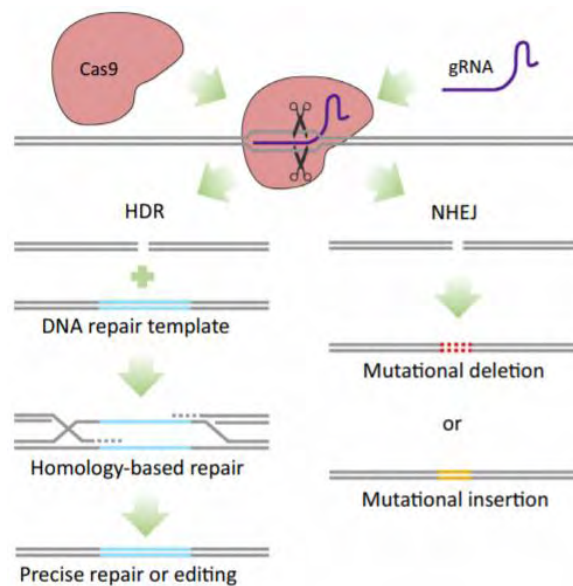
χρωμοσωμικές αναδιατάξεις (Zhang & Spradling, 1994; Zhang & Stankiewicz, 1998; Starz-Gaiano et al., 2001; Szabad et al., 2012; Bernardini et al., 2017).

Για να ξεπεραστεί αυτό το τεχνολογικό έλλειμμα, θα μπορούσε να αναπτυχθεί μια τεχνική, η οποία θα βασίζεται στο σύστημα CRISPR/Cas, για την ειδική ως προς τη θέση επεξεργασία του Y χρωμοσώματος (Buchman and Akbari, 2018).

1.6 Το σύστημα CRISPR/Cas

Το σύστημα γενετικής τροποποίησης CRISPR/Cas, έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως τα τελευταία χρόνια για τη στόχευση ειδικών περιοχών του γονιδιώματος και την πραγματοποίηση αλλαγών με ακρίβεια σε διάφορους οργανισμούς. Το σύστημα έχει δύο συστατικά μέρη, ένα συνθετικό RNA-οδηγό (synthetic guide RNA - sgRNA), το οποίο κατευθύνει την σχετιζόμενη με το CRISPR ενδονουκλεάση Cas9 σε συγκεκριμένο γενετικό τόπο, ώστε να κόψει το γονιδιωματικό DNA (Barrangou et al., 2007). Κατά κανόνα η Cas9 κόβει στο γονιδιακό τόπο ο οποίος καθορίζεται από την αλληλουχία μήκους 20 νουκλεοτιδίων που εμπεριέχεται στο RNA οδηγό. Η μόνη προϋπόθεση για την επιλογή των περιοχών στόχων από την Cas9 είναι η παρουσία της αλληλουχίας PAM (Protospacer Adjacent Motif). Η αλληλουχία αυτή αποτελείται από τρία ζεύγη βάσεων, τα NGG, απευθείας προς το 3' άκρο της αλληλουχίας στόχου. Επιπρόσθετα, μια μεγάλη ποικιλία ενδονουκλεασών, οι οποίες καθοδηγούνται από RNA-οδηγούς, που ανακαλύφθηκε πρόσφατα, με διακριτές ιδιότητες από την Cas9 (για παράδειγμα η Cpf1), διευρύνουν τις δυνατότητες του εργαλείου αυτού (Cebrian-Serrano and Davies, 2017).

Όπως αναφέρθηκε, η επιδιόρθωση της ρήξης ακολουθεί είτε το μονοπάτι του ομόλογου ανασυνδυασμού, είτε το μονοπάτι της μη ομόλογης σύνδεσης των άκρων.



Εικόνα 1.7 Σχηματική αναπαράσταση του τρόπου λειτουργίας του συστήματος CRISPR-Cas9 ως εργαλείο γενετικής τροποποίησης (McFarlane et al., 2018)

Τα δύο μονοπάτια επιδιόρθωσης δρουν ανταγωνιστικά σε ένα κύτταρο. Η ισορροπία μεταξύ των δύο μονοπατιών διαφέρει ανάμεσα στα είδη, σε διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους του ίδιου είδους, όπως και σε διαφορετικές φάσεις του κυτταρικού κύκλου του ίδιου κυττάρου (Shrivastav et al., 2008). Η βελτίωση της αποτελεσματικότητας του ομόλογου ανασυνδυασμού διερευνήθηκε με την αναστολή ενζύμων του μονοπατιού της μη ομόλογης σύνδεσης των άκρων, όπως η λιγάση του DNA IV, μέσω του αναστολέα Scr7 (Hu et al., 2018; Maruyama et al., 2015), ή με την ελεγχόμενη διαβίβαση της Cas9, σύμφωνα με τη δυναμική του κυτταρικού κύκλου (Gutschner et al., 2016; Lin et al., 2014). Άλλη σημαντική πτυχή για τον ακριβή ομόλογο ανασυνδυασμό είναι η αποτροπή της εκ νέου επεξεργασίας του ήδη τροποποιημένου τόπου στο κύτταρο. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με την εισαγωγή, για παράδειγμα, μεταλλάξεων στην αλληλουχία PAM ή στην περιοχή στόχο του gRNA της αλληλουχίας που θα χρησιμοποιηθεί ως μήτρα για τον ανασυνδυασμό (Kwart et al., 2017; Paquet et al., 2016).

Η τεχνολογία CRISPR έχει αναπτυχθεί ευρέως στα έντομα (Reid and O'Brochta, 2016). Εκτός από τα έντομα οργανισμούς μοντέλα, όπως η *Drosophila melanogaster* (Basset and Liu, 2014; Huanget al., 2016) και το *Tribolium castaneum* (Gilles et al., 2015), έχει αποδειχθεί ότι προσαρμόζεται και σε άλλους οργανισμούς (Li et al., 2015; Hiruta et al., 2018; Dermauw et al., 2020). Όσον αφορά τα είδη της

οικογένειας Tephritidae, η μεσογειακή μύγα των φρούτων, *Ceratitis capitata*, αποτέλεσε ένα από τα πρώτα είδη όπου εφαρμόστηκε η τεχνολογία CRISPR με επιτυχία (Meccariello et al., 2017; Aumann et al., 2018). Στον πίνακα 1.1 αναφέρονται επιπλέον εφαρμογές του συστήματος σε άλλα είδη της οικογένειας Tephritidae. Αξίζει να σημειωθεί ότι έχει αναφερθεί η πρώτη επιτυχημένη εφαρμογή του εργαλείου γονιδιακής επεξεργασίας CRISPR/Cas9 και στον δάκο, *B. oleae*, στοχεύοντας τα γονίδια *white-eye* (Meccariello et al., 2020) και *scarlet* (Koidou et al., 2020).

Πίνακας 1.1 Λίστα εφαρμογών του CRISPR/Cas9 σε Tephritidae (Meccariello et al., 2020)

Έντομο	Γονίδιο	Μετάλλαξη	Παραπομπή
<i>Bactrocera oleae</i>	<i>white</i> <i>scarlet</i>	Knock-out (απαλοιφή)	Meccariello et al. (2020) Koidou et al. (2020)
<i>Bactrocera tryoni</i>	<i>white</i>	Knock-out	Choo, Crisp, Saint, O'Keefe, and Baxter (2018)
<i>Bactrocera dorsalis</i>	<i>Bdmew</i> <i>white</i> <i>transformer</i>	Knock-out	Zheng, Li, Sun, Ali, and Zhang (2019) Bai et al. (2019); Sim, Kauwe, Ruano, Rendon, and Geib (2019) Zhao et al. (2019)
<i>Ceratitis capitata</i>	<i>white, paired MoY</i>	Knock-out	Meccariello et al. (2017, 2019)
<i>Anastrepha ludens</i>	<i>white</i>	Knock-out	Sim et al. (2019)
<i>Anastrepha suspensa</i>	<i>transformer - 2</i>	Knock-out	Li and Handler (2019)

2. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας αποτελεί ο σχεδιασμός και η κατασκευή ενός συστήματος, το οποίο θα οδηγεί σε ειδική ως προς την θέση ένθεση γονιδίων στο χρωμόσωμα Υ του *B. oleae*. Με τη χρήση ενός γονιδίου δείκτη, ως το γονίδιο προς ένθεση, θα μπορεί να ελεγχθεί η μεταγραφική ενεργότητα της περιοχής του χρωμοσώματος Υ που στοχεύεται. Η επακόλουθη ένθεση σχεδιάστηκε με βάση τη δυνατότητα του ομόλογου ανασυνδυασμού, που πραγματοποιείται μετά από ρήξη που προκαλεί το σύστημα CRISPR/Cas9. Προαπαιτούμενο για τον ομόλογο ανασυνδυασμό είναι η παροχή του κατάλληλου υποστρώματος, το οποίο εν προκειμένω θα αποτελέσει μια γενετική κατασκευή, που θα περιλαμβάνει το γονίδιο δείκτη, πλαισιωμένο με τα κατάλληλα ομόλογα άκρα.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Τεχνικές χειρισμού νουκλεϊκών οξέων

3.1.1 Απομόνωση DNA (DNA extraction) από το *Bactrocera oleae*

Η απομόνωση DNA από ενήλικα αρσενικά άτομα του εργαστηριακού πληθυσμού του εντόμου *Bactrocera oleae* πραγματοποιείται ώστε να δημιουργηθεί ένα απόθεμα γενετικού υλικού του εντόμου, το οποίο στη συνέχεια θα χρησιμοποιηθεί ως μήτρα για αντιδράσεις PCR (όπως αναφέρεται στην υποενότητα 3.2.2), οι οποίες τελικά θα οδηγήσουν σε ενίσχυση των επιθυμητών τμημάτων DNA από το σύνολο του γονιδιώματος του *B.oleae*. Η διαδικασία περιλαμβάνει τα εξής:

ΥΛΙΚΑ

- Έντομα *Bactrocera oleae*
- CTAB (Cetyltrimethyl ammonium bromide) 10%
- NaCl 5M
- EDTA (Ethylenediamine tetraacetic acid) 0,5M, pH 8.0
- Tris-HCL 1M, pH 8.0
- PVP (Polyvinylpyrrolidone), μοριακό βάρος 40kDa
- ddH₂O (Double distilled water)
- RNase A (4ng/ml)
- Πρωτεΐνάση K (1mg/ml)
- Χλωροφόρμιο
- Οξικό Νάτριο (CH₃COONa) 3M, pH=3,4
- Γλυκογόνο
- Αιθανόλη 100%

ΜΕΘΟΔΟΣ

1. Αρχικά παρασκευάζεται το ρυθμιστικό διάλυμα απομόνωσης (CTAB extraction buffer):

Πίνακας 3.1 Συνταγή παραγωγής CTAB extraction buffer

Αντιδραστήριο	Ποσότητα
CTAB 10%	3ml
NaCl 5M	2,8ml
EDTA 0,5M, pH 8.0	0,4ml
Tris-HCl 1M, pH 8.0	1ml
PVP, 40kDa	0,39gr
ddH ₂ O	2,5ml
Τελικός όγκος	10ml

Σημειώνεται ότι το PVP προστίθεται τελευταίο, ακολουθεί ανάδευση και επώαση στο υδατόλουτρο (37° C).

2. Σε σωληνάκι τύπου erpendorf (tube) 1,5ml όπου βρίσκονται τα έντομα προστίθενται σταδιακά 200μl CTAB buffer. Ανάμεσα στις προσθήκες του

- buffer, γίνεται ομογενοποίηση των εντόμων με χρήση πλαστικού εμβόλου (pestle).
3. Φυγοκέντρηση στις 12.000 rpm για 3 λεπτά και μεταφορά της άνω φάσης σε νέο tube.
 4. Προσθήκη 10μl RNase A, επώαση 30 λεπτά στο υδατόλουτρο στους 37°C.
 5. Προσθήκη 0,4μl Πρωτεΐνης K, ανάδευση (vortex) και επώαση στο υδατόλουτρο στους 55°C για 2 ώρες.
 6. Προσθήκη CTAB Buffer ως τα 400μl, χλωρόφορμιο σε ίσο όγκο και ανάδευση..
 7. Φυγοκέντρηση στις 14.000 rpm για 5 λεπτά στους 4°C και μεταφορά της άνω φάσης σε νέο tube 1,5ml.
 8. Προσθήκη 1/10 του όγκου οξικό νάτριο 3M, pH 3.4, στη συνέχεια προστίθεται 1ml ψυχρή αιθανόλη 100% και 5μl γλυκογόνο, ανακίνηση και επώαση στους -80°C για 1 ώρα.
 9. Φυγοκέντρηση στις 14.000 rpm για 30 λεπτά στους 4°C, απόρριψη του υπερκειμένου με προσοχή, ώστε να μην ξεκολλήσει το ίζημα και προσθήκη 500μl ψυχρής αιθανόλης 70%.
 10. Φυγοκέντρηση στις 14.000 rpm για 10 λεπτά στους 4°C, απόρριψη του υπερκειμένου, spin down και αφαίρεση αιθανόλης.
 11. Επώαση 10-15 λεπτά στον απαγωγό για να απομακρυνθούν τυχόν υπολείμματα αιθανόλης.
 12. Προσθήκη 50μl προ θερμασμένου ddH₂O, επώαση στο υδατόλουτρο στους 60°C για 5 λεπτά και ανάδευση, ώστε να αναδιαλυθεί το ίζημα και αποθήκευση για μελλοντική χρήση στους -20°C.

3.1.2 Ποσοτικοποίηση DNA – Quawell UV Spectrophotometer

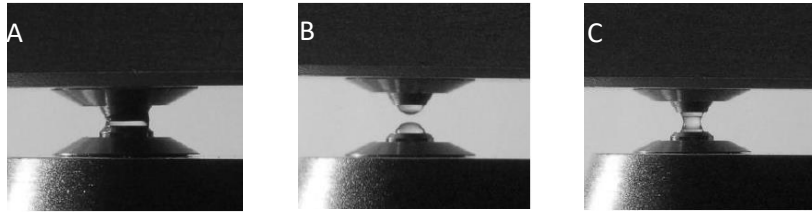
Η συγκέντρωση του DNA που θα χρησιμοποιηθεί στις αντιδράσεις PCR θα πρέπει να είναι γνωστή και σταθερή, ώστε κάθε αντίδραση να περιλαμβάνει την ίδια ποσότητα μήτρας DNA, εξασφαλίζοντας την ακρίβεια στο τελικό αποτέλεσμα. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε το Q3000 UV Spectrophotometer (Quawell), το οποίο υπολογίζει την συγκέντρωση του DNA στο εκάστοτε δείγμα.

ΥΛΙΚΑ

- Δείγμα DNA προς μέτρηση
- ddH₂O

ΜΕΘΟΔΟΣ

Το Quawell Q3000 είναι ένα μικρών όγκων φασματοφωτόμετρο υπεριώδους ακτινοβολίας, ειδικά σχεδιασμένο για τη μέτρηση νουκλεϊκών οξέων και καθαρών πρωτεϊνών. Χρησιμοποιώντας μια μοναδική τεχνολογία που συγκρατεί δείγματα 1,5-2,5μl μεταξύ των άνω και κάτω οπτικών επιφανειών, το Q3000 έχει τη δυνατότητα να μετρήσει τη συγκέντρωση ενός δείγματος σε λιγότερο από 2 δευτερόλεπτα με υψηλό βαθμό ακρίβειας και επαναληψιμότητας (Εικόνα 3.1).



Εικόνα 3.1 Α) Αρχικά το δείγμα φορτώνεται και κατεβαίνει ο άνω βραχίονας Β) Ο άνω βραχίονας ανυψώνεται και λόγω μοριακών επιδράσεων, το δείγμα χωρίζεται σε δύο ξεχωριστά μέρη, το ένα μέρος συνδέεται στην κάτω επιφάνεια και το άλλο μέρος συνδέεται στην άνω επιφάνεια C) Αφού φτάσει στην αρχική του θέση, ο άνω βραχίονας κατεβαίνει. Μια υγρή στήλη σχηματίζεται όταν ο άνω βραχίονας κατεβαίνει στη θέση όπου αγγίζουν τα δύο σταγονίδια. Στη συνέχεια, η μέτρηση πραγματοποιείται σε αυτήν τη θέση χωρίς να μετακινηθεί ξανά ο άνω βραχίονας προς τα πάνω

Τα βήματα για να πραγματοποιηθεί η μέτρηση είναι τα εξής:

1. Ανασήκωση του άνω βραχίονα.
2. Με μια πιπέτα, τοποθέτηση 1-2μl νερού στην κάτω επιφάνεια.
3. Ο άνω βραχίονας κατεβαίνει.
4. Επιλογή με κλικ στο κουμπί "Blank" για μέτρηση του «τυφλού» δείγματος.
5. Ανασήκωση του άνω βραχίονα και σκούπισμα του νερού από τις δύο, επάνω και κάτω, επιφάνειες μέτρησης.
6. Με πιπέτα, τοποθέτηση 1-2μl δείγματος στην κάτω επιφάνεια.
7. Επαναφορά του άνω βραχίονα στη θέση μέτρησης.
8. Κλικ στο κουμπί "Μέτρηση" και το Q3000 εμφανίζει τα δεδομένα.

Όταν το φασματοφωτόμετρο Q3000 «μηδενίζεται», λαμβάνεται ένα φάσμα από ένα υλικό αναφοράς (blank) και αποθηκεύεται στη μνήμη. Όταν λαμβάνεται μέτρηση δείγματος, καταγράφεται η ένταση του φωτός που έχει μεταδοθεί μέσω του δείγματος. Οι εντάσεις του δείγματος μαζί με τις εντάσεις του τυφλού δείγματος χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό της απορρόφησης του δείγματος σύμφωνα με την ακόλουθη εξίσωση:

$$Abs = -\log\left(\frac{I_{sample}}{I_{blank}}\right)$$

Έτσι, η μετρούμενη ένταση φωτός τόσο του δείγματος όσο και του τυφλού είναι απαραίτητη για τον υπολογισμό της απορρόφησης σε ένα δεδομένο μήκος κύματος.

Η εξίσωση Beer-Lambert χρησιμοποιείται για να συσχετίσει την υπολογισμένη απορρόφηση με τη συγκέντρωση:

$$A = \epsilon * b * c,$$

όπου το A είναι η απορρόφηση, το ϵ είναι η σταθερά μοριακής απορρόφησης, b είναι το μήκος διαδρομής σε cm και c η συγκέντρωση της διαλυμένης ουσίας (σε mole/l).

3.1.3 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση είναι μια μέθοδος διαχωρισμού και ανάλυσης μορίων DNA, RNA και πρωτεϊνών σύμφωνα με το μέγεθος, το φορτίο και τη διαμόρφωσή τους. Τα νουκλεϊκά οξέα έχουν συνολικό αρνητικό φορτίο λόγω της παρουσίας του φωσφορικού σκελετού. Επομένως, με την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου, ξεκινούν να μεταναστεύουν διερχόμενα από τους πόρους του πηκτώματος και κινούνται από τον αρνητικό πόλο (κάθοδο) προς τον θετικό πόλο (άνοδο). Η ταχύτητα με την οποία μετακινούνται εξαρτάται αποκλειστικά από το μέγεθός τους, με τα μικρότερα μόρια να διέρχονται ευκολότερα από τους πόρους του πηκτώματος και κατά συνέπεια να μετακινούνται ταχύτερα από τα μεγαλύτερα μόρια. Τα τμήματα DNA με μέγεθος από 100 βάσεις έως και αρκετές χιλιάδες ζεύγη βάσεων είναι δυνατόν να διαχωριστούν ικανοποιητικά σε ένα πήκτωμα αγαρόζης με συγκέντρωση 1%.

ΥΛΙΚΑ

- Αγαρόζη (1% του όγκου του πηκτώματος)
- Ρυθμιστικό διάλυμα TBE 5x (1L: 54g Tris-base, 20ml EDTA 0,5M (pH 8.0), 27.5g Boric acid και συμπλήρωση μέχρι τα 1000ml με H₂O)
- Διάλυμα φόρτωσης (Loading Buffer)
- Βρωμιούχο αιθίδιο (3% του όγκου του πηκτώματος)
- Μάρτυρας μοριακού μεγέθους (DNA ladder)
- Δείγματα DNA

ΜΕΘΟΔΟΣ

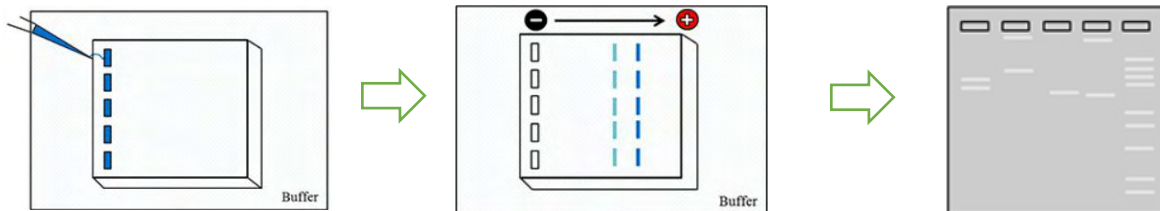
Για την παρασκευή 100 ml πηκτώματος συγκέντρωσης 1%, ακολουθείται η εξής διαδικασία:

1. Προσθήκη 1gr αγαρόζης και 100ml TBE 0,5x σε κωνική φιάλη.
2. Θέρμανση (σε φούρνο μικροκυμάτων) και ανάδευση ανά τακτά χρονικά διαστήματα της φιάλης, μέχρις ότου να διαλυθεί πλήρως η αγαρόζη.
3. Το διάλυμα ψύχεται με κρύο τρεχούμενο νερό ώστε η θερμοκρασία του να μειωθεί στους 40°C - 50°C.
4. Προσθήκη 3μl EtBr (παρεμβάλλεται στη μεγάλη αύλακα του DNA/RNA καθιστώντας το νουκλεϊκό οξύ ορατό κάτω από υπεριώδες φως) και ανακίνηση.
5. Σε κατάλληλη μήτρα τοποθετείται το διάλυμα αγαρόζης, στην οποία έχουν προηγουμένως τοποθετηθεί «χτενάκια», τα οποία θα δημιουργήσουν μικρές εσοχές, που αναφέρονται ως πηγαδάκια, και στις οποίες θα τοποθετηθούν τα δείγματα.
6. Το διάλυμα στερεοποιείται σε θερμοκρασία δωματίου σε διάστημα περίπου 30 λεπτών, αφαιρούνται τα χτενάκια και το πήκτωμα είναι έτοιμο για χρήση.

Για την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων (Εικόνα 3.4):

1. Το πήκτωμα τοποθετείται σε συσκευή ηλεκτροφόρησης και πληρώνεται με ρυθμιστικό διάλυμα TBE 0,5x.
2. Προσθήκη διαλύματος φόρτωσης στα δείγματα προς ηλεκτροφόρηση. Με αυτόν τον τρόπο τα δείγματα είναι πιο εύκολα ορατά, καθιστώντας την τοποθέτησή τους στα πηγαδάκια πιο εύκολη, καθώς επίσης γίνονται και

- βαρύτερα, ώστε να καθιζάνουν στις θέσεις φόρτωσης τους. Επιπρόσθετα, διευκολύνεται η παρακολούθηση του μετώπου της ηλεκτροφόρησης.
3. Τοποθέτηση των δειγμάτων και του ladder στα πηγαδάκια με τη χρήση πιπέτας.
 4. Σύνδεση ηλεκτροδίων με κατάλληλη τροφοδοτική συσκευή, ρύθμιση της τάσης (90-100V) και εφαρμογή για ~40 λεπτά.
 5. Το πήκτωμα μεταφέρεται σε συσκευή εκπομπής υπεριώδους ακτινοβολίας (UV) όπου μπορούν να παρατηρηθούν οι ζώνες του DNA, λόγω της παρουσίας βρωμιούχου αιθιδίου.



Εικόνα 3.4 Σχηματική απεικόνιση σταδίων ηλεκτροφόρησης (Merck. Nucleic Acid Electrophoresis Protocols & Introduction. Sigma-Aldrich)

3.1.4 Ανάκτηση μορίων DNA από πήκτωμα αγαρόζης (Gel extraction)

Για την ανάκτηση μιας αλληλουχίας DNA γνωστού μεγέθους από ένα πήκτωμα ηλεκτροφόρησης χρησιμοποιήθηκε το NucleoSpin Gel and PCR clean-up kit (Macherey-Nagel).

ΥΛΙΚΑ

- Ρυθμιστικό διάλυμα NT1
- Ρυθμιστικό διάλυμα NT3 (στο οποίο έχει προστεθεί 96-100% αιθανόλη)
- ddH₂O

ΜΕΘΟΔΟΣ

Για την απομόνωση ενός επιθυμητού τμήματος DNA από πήκτωμα αγαρόζης, πραγματοποιούνται τα εξής βήματα (Εικόνα 3.5):

1. Από το πήκτωμα αγαρόζης κόβονται με νυστέρι οι ζώνες που περιέχουν τα επιθυμητά τμήματα DNA και τοποθετούνται σε σωληνάκι τύπου eppendorf 1,5ml.
2. Ζυγίζεται το κομμάτι του πηκτώματος, αφότου η ζυγαριά μηδενιστεί με ένα άδειο eppendorf 1,5ml.
3. *Διαλυτοποίηση κομματιού του πηκτώματος*
Προστίθενται 200μl διαλύματος NT1 για κάθε 100mg πηκτώματος και το δείγμα επωάζεται για 5-10 λεπτά στο υδατόλουτρο στους 50°C, πραγματοποιώντας κατά το διάστημα αυτό ανάδευση με τη χρήση vortex, μέχρις ότου η αγαρόζη να διαλυθεί εντελώς.
4. *Σύνδεση του DNA*
Τοποθέτηση της στήλης σε σωληνάκι συλλογής eppendorf 2ml και προσθήκη σε αυτήν του δείγματος, σε ποσότητα έως 700μl. Φυγοκέντρωση στα 11.000rpm για 1 λεπτό, απόρριψη του διηθήματος και επανατοποθέτηση της στήλης στο

σωληνάριο συλλογής. Επανάληψη του βήματος αν έχει περισσέψει ποσότητα δείγματος.

5. Πλύση της στήλης

Προσθήκη 700μl διαλύματος NT3 στη στήλη και φυγοκέντρηση στα 11.000rpm για 1 λεπτό. Απόρριψη του διηθήματος και εκ νέου τοποθέτηση της στήλης στο σωληνάκι συλλογής. Επανάληψη του βήματος πλύσης για ελαχιστοποίηση του χαοτροπικού άλατος.

6. Στέγνωμα της στήλης

Φυγοκέντρηση στα 11.000rpm για 1 λεπτό, ώστε να απομακρυνθεί εντελώς το διάλυμα NT3. Υπολείμματα αιθανόλης από το διάλυμα NT3 ίσως αναστείλουν ενζυμικές αντιδράσεις. Για την πλήρη απομάκρυνση της αιθανόλης η στήλη επωάζεται για 5 λεπτά στους 70°C.

7. Έκλυση του DNA

Τοποθέτηση της στήλης σε νέο σωληνάκι συλλογής eppendorf 1,5ml. Προσθήκη 25μl νερού, που προηγουμένως έχει θερμανθεί, στο κέντρο της στήλης και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 3 λεπτά. Φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στα 11.000rpm. Επανάληψη του βήματος στο ίδιο σωληνάριο eppendorf.



Εικόνα 3.5 Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας απομόνωσης τμήματος DNA από πήκτωμα αгарόζης (Bioneer Pacific-Print. Bioneer.com.au.)

3.2 Μέθοδοι Ενίσχυσης νουκλεϊκών οξέων

3.2.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) είναι μια τεχνική της μοριακής βιολογίας που επιτρέπει την παραγωγή *in vitro* από κάποιο μείγμα DNA, ενός εξαιρετικά μεγάλου αριθμού αντιγράφων μια συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA. Η τεχνική στηρίζεται σε επαναλαμβανόμενους κύκλους πολλαπλασιασμού, οι οποίοι έχουν ως αποτέλεσμα τον εκθετικό πολλαπλασιασμό της αλληλουχίας-στόχου. Πιο αναλυτικά, κάθε κύκλος πολλαπλασιασμού περιλαμβάνει τα εξής βήματα (Εικόνα 3.6):

1. Αποδιάταξη του δίκλωνου DNA

Αρχικά, αποδιατάσσεται με θέρμανση στους 94-95°C το δίκλωνο μόριο DNA το οποίο φέρει την αλληλουχία στόχο

2. Πρόσδεση των ολιγονουκλεοτιδίων που λειτουργούν ως εκκινητές

Στο στάδιο αυτό, η θερμοκρασία μειώνεται και οι εκκινητές προσδένονται στο αποδιαταγμένο DNA. Οι εκκινητές είναι σχεδιασμένοι έτσι ώστε, να προσδένονται, στην κατάλληλη θερμοκρασία, με υψηλή εξειδίκευση στην εκάστοτε αλυσίδα του DNA που χρησιμοποιείται ως μήτρα. Η τιμή της

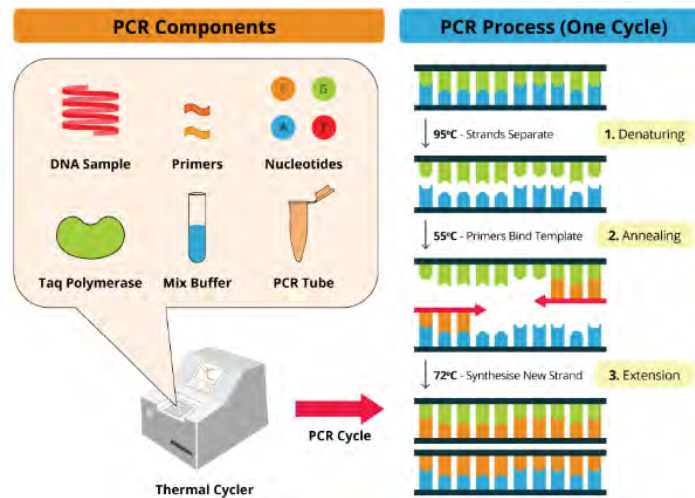
θερμοκρασίας υβριδοποίησης ($T_a = T_m - 5^\circ\text{C}$) καθορίζεται από την αλληλουχία των ίδιων των εκκινητών (συνήθως στους $37^\circ\text{C} - 65^\circ\text{C}$).

3. *Επέκταση των εκκινητών από την πολυμεράση του DNA*

Το μείγμα θερμαίνεται στους $70-75^\circ\text{C}$ και οι εκκινητές επιμηκύνονται από μια θερμοανθεκτική πολυμεράση του DNA, όπως η *Taq* πολυμεράση του DNA.

Σημειώνεται ότι πριν τον πρώτο κύκλο πολλαπλασιασμού, προηγείται θέρμανση του δείγματος DNA στους 95°C για λίγα λεπτά, έτσι ώστε να αποδιαταχθεί το δίκλωνο DNA. Επίσης, μετά το πέρας των κύκλων αντιγραφής, ακολουθεί ένα βήμα τελικής επέκτασης, ώστε να ολοκληρωθεί η επιμήκυνση των νεοσυντηθέμενων τμημάτων DNA. Το τελικό προϊόν αποθηκεύεται στους 4°C .

Καθώς κάθε βήμα στους κύκλους αντιγραφής απαιτεί διαφορετική θερμοκρασία, η PCR πραγματοποιείται σε ειδικές συσκευές που ονομάζονται θερμοκοιτιές. Οι θερμοκοιτιές προγραμματίζονται να αυξομειώνουν τη θερμοκρασία κατά τα διάφορα στάδια της PCR, ώστε να επωάζουν την αντίδραση στις κατάλληλες θερμοκρασίες και για τα κατάλληλα χρονικά διαστήματα.



Εικόνα 3.6 Σχηματική αναπαράσταση ενός κύκλου αντιγραφής της PCR

Για μια τυπική αντίδραση PCR χρησιμοποιώντας την *Taq* πολυμεράση του DNA (KAPA Biosystems) χρειάζονται:

ΥΛΙΚΑ

- Μήτρα DNA (template)
- Ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμου (buffer)
- Εκκινητές (Primers: Forward and Reverse)
- Τριφωσφορικά Δεοξυροβονουκλεοτίδια (dNTPs)
- *Taq* πολυμεράση του DNA
- ddH₂O
- MgCl₂ (προαιρετικά)

ΜΕΘΟΔΟΣ

Για μια αντίδραση PCR με τελικό όγκο 20μl στα ειδικά σωληνάκια για PCR προστίθενται:

Πίνακας 3.2 Προετοιμασία δειγμάτων για αντίδραση PCR

Αντιδραστήριο	Αρχική συγκέντρωση	Τελική συγκέντρωση	Ποσότητα
Template			50-100ng
KAPA <i>Taq</i> Buffer	10x	1x	2μl
dNTPs	10mM	0,2mM έκαστο	0,4μl
Primer F	10μM	0,3μM	0,6μl
Primer R	10μM	0,3μM	0,6μl
<i>Taq</i> DNA Polymerase	5u/μl	0,5u	0,1μl
ddH ₂ O	-	-	Συμπλήρωση όγκου
Τελικός όγκος			20μl

Έπειτα τα σωληνάκια τοποθετούνται στο θερμοκυκλοποιητή και ρυθμίζεται το κατάλληλο πρόγραμμα. Ένα τυπικό πρόγραμμα PCR για την παραπάνω αντίδραση είναι:

Πίνακας 3.3 Τυπικό πρόγραμμα μιας αντίδρασης PCR

Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρονική διάρκεια	Κύκλοι
Αρχική Αποδιάταξη	95° C	3-5 λεπτά	1
Αποδιάταξη	95° C	30 δευτερόλεπτα	30
Υβριδοποίηση εκκινητών	T _{annealing}	30 δευτερόλεπτα	
Επέκταση εκκινητών	72° C	1 λεπτό/kb	
Τελική επέκταση	72° C	1 λεπτό/kb	1
Διατήρηση	12° C	-	-

Κατά τη διάρκεια των εργαστηριακών πειραμάτων, εκτός από την KAPA *Taq* DNA Polymerase, χρησιμοποιήθηκαν και το ένζυμο Q5 High-Fidelity DNA Polymerase. Σε κάθε περίπτωση, οι ποσότητες που έπρεπε να προστεθούν, καθώς και το πρόγραμμα της PCR, προσαρμόστηκαν σύμφωνα με τα πρωτόκολλα των εταιρειών.

3.2.2 Σχεδιασμός εκκινητών με PrimerQuest Tool, OligoAnalyzer Tool και Primer-BLAST

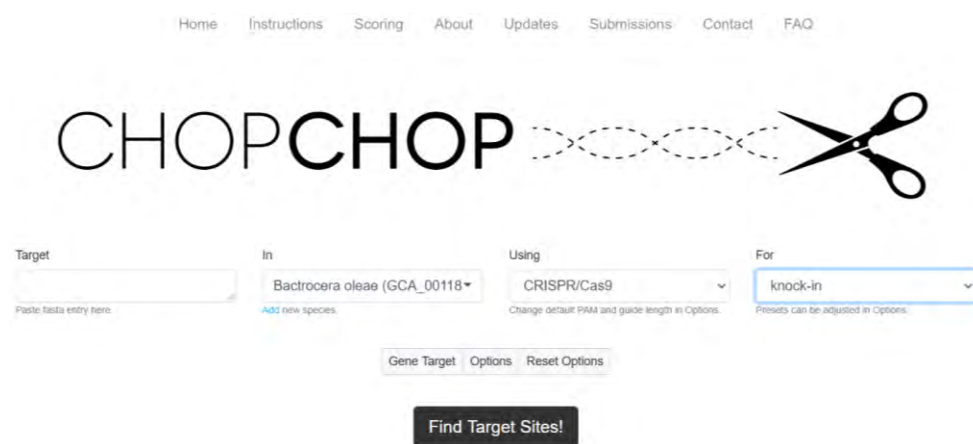
Για το σχεδιασμό των εκκινητών χρησιμοποιήθηκε το εργαλείο PrimerQuest της ιστοσελίδας IDT (Integrated DNA Technologies). Με την εισαγωγή της περιοχής προς ενίσχυση και τον προαιρετικό καθορισμό παραμέτρων, εμφανίζονται πιθανά ζεύγη εκκινητών. Κατά το σχεδιασμό των εκκινητών λαμβάνονται υπόψιν παράμετροι, όπως τα θερμοδυναμικά τους χαρακτηριστικά και η εξειδίκευσή τους. Πιο συγκεκριμένα, όσον αφορά τα θερμοδυναμικά χαρακτηριστικά των εκκινητών, ελέγχονται η θερμοκρασία αποδιάταξης ($T_m > 50^\circ\text{C}$), η τιμή της ελεύθερης ενέργειας των δευτεροταγών δομών θηλιάς (hairpin), καθώς και των ομο- και ετεροδιμερών που

σηματίζει κάθε ζεύγος εκκινητών ($\Delta G > -10$). Τα παραπάνω πραγματοποιούνται με την χρήση του εργαλείου OligoAnalyzer στην ιστοσελίδα IDT. Η εξειδίκευση των εκκινητών εξασφαλίζει ότι δεν θα παραχθούν παραπροϊόντα, δηλαδή ότι δεν θα ενισχυθούν άλλες αλληλουχίες πέρα από την αλληλουχία-στόχο. Το παραπάνω ελέγχεται με τη χρήση του εργαλείου Primer-BLAST στην ιστοσελίδα NCBI (National Center for Biotechnology Information).

3.3 Μέθοδοι παραγωγής single guide RNA (sgRNA)

3.3.1 Σχεδιασμός sgRNA μέσω του προγράμματος CHOPCHOP

Τα πιθανά sgRNA σχεδιάστηκαν με τη χρήση του εργαλείου CHOPCHOP (<https://chopchop.cbu.uib.no/>). Το συγκεκριμένο εργαλείο χρησιμοποιήθηκε για την επιλογή περιοχών στόχων για την εφαρμογή του συστήματος CRISPR/Cas9. Πιο αναλυτικά, στο CHOPCHOP εισάγεται μία ευρεία περιοχή-στόχος του γονιδιώματος του προς μελέτη οργανισμού (*Bactrocera oleae*), επιλέγεται στο αντίστοιχο πεδίο το όνομα του οργανισμού, το σύστημα που θα χρησιμοποιηθεί για τη μεταλλαξιγένεση (στην προκειμένη περίπτωση CRISPR/Cas9) και το σκοπό της πρόκλησης της ρήξης (στην προκειμένη περίπτωση σκοπός είναι η ένθεση - knock in) (Εικόνα 3.7).



Εικόνα 3.7 Γραφικό περιβάλλον του εργαλείου CHOPCHOP

Ως αποτέλεσμα, το CHOPCHOP καταγράφει τις πιθανές αλληλουχίες-στόχους (συμπεριλαμβανόμενης της αλληλουχίας PAM), τη γονιδιωματική τοποθεσία του στόχου, την αλυσίδα (- ή +), την περιεκτικότητα σε GC του gRNA και τα off-targets, δηλαδή αλληλουχίες που στοχεύει το σύστημα ταυτόχρονα με την επιθυμητή αλληλουχία-στόχο. Ακόμα, εμφανίζεται η εκτιμώμενη απόδοση κάθε gRNA (Efficiency) (Εικόνα 3.8).

Cas9-sgRNA. Η PCR εκτελείται με τους δύο εκκινητές αλλά χωρίς παρουσία DNA ως μήτρα (Εικόνα 3.10).



Εικόνα 3.10 Το βασισμένο σε PCR σύστημα για την παραγωγή του sgRNA (Basset et al., 2014)

3.3.2.1 Παραγωγή μήτρας οδηγού για τα sgRNAs

Για την παραγωγή της μήτρας οδηγού για τα sgRNAs, που θα χρησιμοποιηθεί αργότερα στη μεταγραφή *in vitro*, απαιτούνται:

ΥΛΙΚΑ

- Q5 Reaction Buffer 10x
- Εκκινητής CRISPR_F 10μM
- Εκκινητής CRISPR_R 10μM
- dNTPs 10mM
- ddH₂O
- Q5 High Fidelity DNA Polymerase (NEB)

ΜΕΘΟΔΟΣ

Σε ένα ειδικό για PCR σωληνάκι προστίθενται τα παρακάτω:

Πίνακας 3.4 Προετοιμασία δειγμάτων αντίδρασης PCR για παραγωγή μήτρας DNA

Αντιδραστήριο	Αρχική συγκέντρωση	Τελική συγκέντρωση	Ποσότητα
Q5 Reaction Buffer	10x	1x	10μl
Εκκινητής CRISPR_F	10μM	0,5 μM	2,5 μl
Εκκινητής CRISPR_R	10μM	0,5 μM	2,5 μl
dNTPs	10mM	0,2 mM	1μl
Q5 High Fidelity DNA Polymerase	1 U/μl	0,02 U/μl	1μl
ddH ₂ O			33 μl
Τελικός όγκος			50μl

Το σωληνάκι τοποθετείται στο θερμοκυκλοποιητή, για την πραγματοποίηση της αντίδρασης στις εξής συνθήκες:

Πίνακας 3.5 Πρόγραμμα παραγωγής μήτρας DNA για τα sgRNA

Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρονική διάρκεια	Κύκλοι
Αρχική Αποδιάταξη	98° C	1:15 λεπτά	1
Αποδιάταξη	98° C	20 δευτερόλεπτα	35
Υβριδοποίηση εκκινητών	58° C	10 δευτερόλεπτα	
Επιμήκυνση εκκινητών	72° C	10 δευτερόλεπτα	
Τελική επιμήκυνση	72° C	7 λεπτά	1
Διατήρηση	12° C	-	-

Ακολουθεί καθαρισμός της μήτρας PCR που παρήχθη με τη χρήση του NucleoSpin Gel and PCR clean-up kit (Macherey-Nagel). Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η ίδια με τη διαδικασία απομόνωσης DNA από πήκτωμα αγαρόζης (υποενότητα 3.1.4), με τη διαφορά ότι ως αρχικό δείγμα χρησιμοποιείται το προϊόν της PCR και όχι ένα κομμάτι από το πήκτωμα.

3.3.2.2 Μεταγραφή *in vitro* – παραγωγή sgRNA

Ακολουθεί η μεταγραφή *in vitro* με τη χρήση του MEGASCRIP T7 Transcription Kit (Ambion), ώστε να παραχθεί το sgRNA. Η διαδικασία περιλαμβάνει τα εξής:

ΥΛΙΚΑ

- ddH₂O
- μήτρα οδηγός (guide template, προϊόν PCR)
- Ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμου 10x (T7 Buffer)
- Τριφωσφορικά ριβονουκλεοτίδια (rNTPs: rATP, rCTP, rUTP, rGTP)
- T7 Megascript mix ενζύμου

ΜΕΘΟΔΟΣ

Σε σωληνάκι τύπου erpendorf 1,5ml συντίθεται το mix:

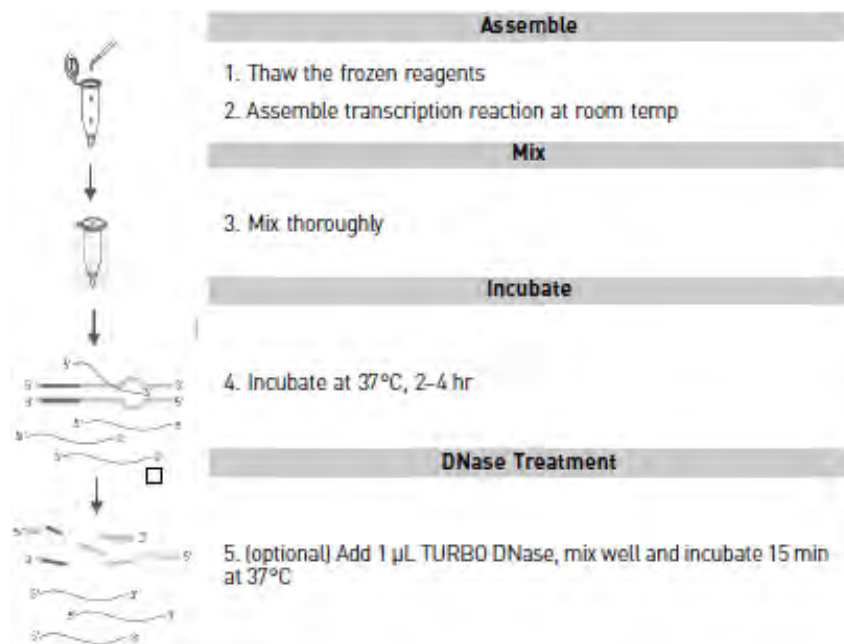
Πίνακας 3.6 Παραγωγή mix για την *in vitro* μεταγραφή

Αντιδραστήριο	Αρχική συγκέντρωση	Ποσότητα
ddH ₂ O		Συμπλήρωση του όγκου
guide template		Εξαρτάται από την συγκέντρωση (1μg)
rATP	75mM	4μl
rCTP	75mM	4μl
rUTP	75mM	4μl
rGTP	75mM	4μl
T7 Buffer	10x	4μl

T7 Megascript enzyme cocktail	4μl
Τελικός όγκος	40μl

Το μίγμα των αντιδραστηρίων (mix) παρασκευάζεται σε θερμοκρασία δωματίου, διότι το ρυθμιστικό διάλυμα του ενζύμου στον πάγο μπορεί να οδηγήσει σε ταυτόχρονη κατακρήμνιση της μήτρας DNA. Ακόμα, το ρυθμιστικό διάλυμα του ενζύμου προστίθεται στο mix, αφού έχουν ήδη προστεθεί το νερό και τα ριβονουκλεοτίδια. Ακολουθεί επώαση στο υδατόλουτρο στους 37°C για 4 ώρες.

Μετά τη σύνθεση του RNA, η μήτρα DNA απομακρύνεται με επώαση του δείγματος με 2μl Turbo DNase (2 u/μl) για 15 λεπτά στο υδατόλουτρο στους 37°C (DNase treatment) (Εικόνα 3.11).



Εικόνα 3.11 Σχηματική αναπαράσταση διαδικασίας in vitro μεταγραφής για την παραγωγή του sgRNA

3.3.2.3 Καθαρισμός και ανάκτηση sgRNA

Από το παραγόμενο RNA πρέπει ακολούθως να απομακρυνθούν τα ελεύθερα νουκλεοτίδια, μικρά ολιγονουκλεοτίδια και το ένζυμο. Το RNA που θα ανακτηθεί, μπορεί να χρησιμοποιηθεί τελικά σε εφαρμογές που απαιτούν υψηλή καθαρότητα, όπως η σύνθεση των RNP συμπλόκων που προορίζονται για μικροενέσεις. Η διαδικασία περιλαμβάνει:

ΥΛΙΚΑ

- ddH₂O
- Ammonium acetate STOP solution
- Αιθανόλη 100%

ΜΕΘΟΔΟΣ

1. Προσθήκη 230μl ddH₂O και 30μl Ammonium acetate STOP solution και καλή ανάδευση.
2. Προσθήκη 680μl αιθανόλης 100% και ολονύκτια επώαση στους -20°C.
3. Φυγοκέντρηση στα 14.000 rpm για 15 λεπτά στους 4°C. Μετά το πέρας του βήματος αυτού παρατηρείται ο σχηματισμός ιζήματος RNA (pellet).
4. Πλύση του ιζήματος με 500μl αιθανόλης 75% και φυγοκέντρηση στις 14.000rpm για 15 λεπτά στους 4°C, 4 φορές.
5. Απομάκρυνση αιθανόλης με προσοχή ώστε να μην αναταραχθεί το ίζημα. Αφαίρεση υπολειμμάτων της, με επώαση του δείγματος με ανοιχτό καπάκι για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, μετά από σύντομη φυγοκέντρηση (spin down).
6. Αναδιάλυση με 20μl προθερμασμένο ddH₂O και επώαση στους 60°C στο υδατόλουτρο για 15 λεπτά. Στο διάστημα των 15 λεπτών πραγματοποιείται ανάδευση με τη χρήση vortex δύο φορές έως ότου αναδιαλυθεί το ίζημα.

Το δείγμα αποθηκεύεται για μελλοντική χρήση στους -20°C.

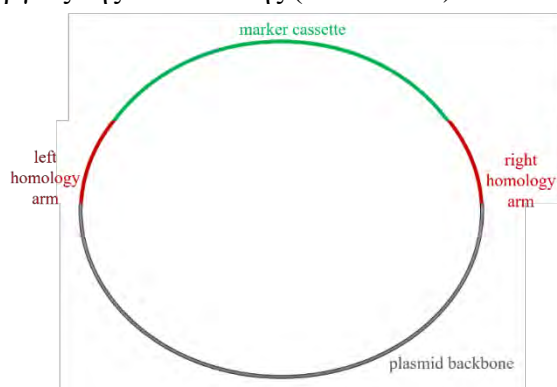
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Πειραματικός σχεδιασμός – Ροή εργασιών

Αρχικό βήμα της πειραματικής διαδικασίας αποτέλεσε η εύρεση της αλληλουχίας στόχου του sgRNA. Η αλληλουχία στόχος ήταν προαπαιτούμενο να βρίσκεται στο χρωμόσωμα Υ. Καθώς όμως τα δεδομένα της αλληλούχησης αφορούν τμήματα που δεν αντιστοιχίζονται σε χρωμοσώματα, αξιοποιήθηκε το γεγονός ότι έχει προσδιοριστεί η θέση του γονιδίου που κωδικοποιεί για τον παράγοντα αρρενοποίησης (MoY). Καθώς ήταν γνωστό ότι το συγκεκριμένο γονίδιο εντοπίζεται στο χρωμόσωμα Υ του *B. olearae*, μας επέτρεψε να περιορίσουμε την αναζήτηση για πιθανές αλληλουχίες στόχους ανοδικά και καθοδικά του εν λόγω γονιδίου. Με τον τρόπο αυτό, εξασφαλίστηκε ότι η γενετική τροποποίηση θα πραγματοποιηθεί στο χρωμόσωμα Υ. Επιπρόσθετα, κατευθύνοντας την ένθεση του γονιδίου που μας ενδιαφέρει πλησίον του γονιδίου MoY, υπήρχε θεωρητικά μεγαλύτερη πιθανότητα να εκφραστεί λόγω της μεταγραφικής ενεργότητας της περιοχής, σε αντίθεση με την κατά κύριο λόγο ετεροχρωματική φύση του χρωμοσώματος Υ.

Μετά την εύρεση θέσεων στόχευσης με τη χρήση του κατάλληλου λογισμικού, σχεδιάστηκαν τα ομόλογα άκρα που θα χρησιμοποιηθούν για τον ομόλογο ανασυνδυασμό και ακολούθως σχεδιάστηκαν και οι κατάλληλοι εκκινητές (primers) για την ενίσχυσή τους από το γονιδίωμα του *B. olearae*. Στη συνέχεια, σχεδιάστηκαν οι κατάλληλοι εκκινητές για την ενίσχυση του γονιδίου-δείκτη από κατάλληλο πλασμίδιο.

Ακολούθησε η χρήση των παραπάνω εκκινητών για την ενίσχυση των αντίστοιχων περιοχών από την εκάστοτε μήτρα DNA. Αρχικά οι εκκινητές ελέγχθηκαν ως προς τις απαιτούμενες συνθήκες ενίσχυσης με *Taq* πολυμεράση, καθώς η μήτρα DNA που χρησιμοποιείται, δηλαδή το γονιδίωμα του δάκου και συγκεκριμένα το Υ χρωμόσωμα, ίσως να εμφάνιζε δυσκολίες λόγω της ετεροχρωματικής του φύσης και της παρουσίας επαναλήψεων. Αφού καθορίστηκαν οι βέλτιστες συνθήκες λειτουργίας των εκκινητών, τα επιθυμητά τμήματα ενισχύθηκαν με μια υψηλής πιστότητας πολυμεράση, για να εξασφαλιστεί η ελάχιστη δυνατή ύπαρξη λαθών στις αλληλουχίες. Ακόμα εξασφαλίστηκε ότι τα τμήματα ενισχύθηκαν είχαν «τυφλά» άκρα, και όχι κάποιες επιπλέον βάσεις αδενίνης, τις οποίες προσθέτει κατά την ενίσχυση η *Taq* πολυμεράση. Έχοντας ανακτήσει τις επιθυμητές αλληλουχίες, σειρά είχε η σύνθεση του sgRNA, όπως περιγράφεται προηγουμένως (υποενότητα 3.2.2). Τελικά, απέμεινε η σύνδεση των κομματιών με κατάλληλη μέθοδο (Gibson assembly) και επιβεβαίωση της επιτυχούς δημιουργίας της κατασκευής (Εικόνα 4.1).

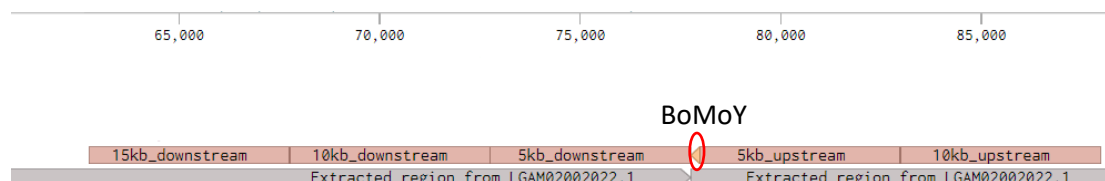


Εικόνα 4.1 Σχηματική αναπαράσταση της κατασκευής για ομόλογο ανασυνδυασμό

4.2 Πειραματικά αποτελέσματα

4.2.1 Εύρεση αλληλουχιών-στόχων sgRNAs

Για την εύρεση των αλληλουχιών στόχων των sgRNAs, η αλληλουχία εκατέρωθεν του γονιδίου MoY ανακτήθηκε από την ιστοσελίδα Apollo και μεταφορτώθηκε σε διαδικτυακό εργαλείο επεξεργασίας και ανάλυσης δεδομένων (Benchling). Για τη διευκόλυνση της μελέτης, το γονιδίωμα χωρίστηκε σε περιοχές εύρους 5kb (Εικόνα 4.2).



Εικόνα 4.2 Απεικόνιση περιοχών εκατέρωθεν του MoY στο γραφικό περιβάλλον του Benchling

Στη συνέχεια, χρησιμοποιήθηκε το εργαλείο CHOPCHOP, εισάγοντας ως περιοχή-στόχο την εκάστοτε περιοχή εύρους 5kb. Με τον τρόπο αυτό προέκυψαν 5 λίστες με πιθανές αλληλουχίες στόχευσης. Συγκρίνοντας την απόδοση (efficiency) μεταξύ των προτεινόμενων sgRNAs, φάνηκε ότι η περιοχή ανοδικά του γονιδίου (0-5kb και 5-10kb upstream) δεν ήταν η καταλληλότερη για να σχεδιαστούν sgRNAs, καθώς η απόδοση των πιθανών sgRNAs ήταν αρκετά χαμηλή (<~65%) και σε αρκετές περιπτώσεις προβλέφθηκαν και πιθανές περιοχές off-targets (Εικόνα 4.3-A,B).

A

Rank	Target sequence	Genomic location	Strand	GC content (%)	Self-complementarity	MM0	MM1	MM2	MM3	Efficiency
1	TTTGTCCGAGAGGGAGCCTGAGG	seq:3457	+	60	3	1	0	0	0	0.63.98
2	TAAGCACTAGCATTCTCAGTAGG	seq:2558	+	40	2	1	0	0	0	0.61.78
3	ATGTCTGCAGTGGAAATAGGTTGG	seq:1945	+	45	0	1	0	0	0	0.59.54
4	TCAGTCCTAACATGTACCAAGG	seq:2782	-	40	0	1	0	0	0	0.59.00
5	CTACCCCTCCATTGCATTGGGAGG	seq:1242	+	55	2	0	0	0	0	0.59.23
6	ACTTAAATGAACGAAGGTGCAGG	seq:554	+	40	0	0	0	0	0	0.57.07
7	AGACGGTCTTCGAAATGAAGAGG	seq:4234	+	50	1	1	0	0	0	0.57.58
8	TTTACCTCCCAATGCAATGGAGG	seq:1246	-	45	2	0	0	0	0	0.57.69
9	CCTTTTGGTGACTAGAATTGCGG	seq:3592	+	40	2	1	0	0	0	0.56.65
10	TCTTGTGGCTACGTGACGTTGG	seq:2201	+	50	3	0	0	0	0	0.55.30
11	GTGTCAATAGATGTCAACGTTAGG	seq:1389	+	40	0	1	0	0	0	0.51.36
12	GATAATAGCTCATTCAAGGCTGG	seq:1519	+	40	2	1	0	0	0	0.52.82
13	TGTTCTACCCCTCCATTGCATTGG	seq:1238	+	45	0	0	0	0	0	0.48.77

B

Rank	Target sequence	Genomic location	Strand	GC content (%)	Self-complementarity	MM0	MM1	MM2	MM3	Efficiency
1	GTTCTCCAAGAGCGTTTCGAAGG	seq:1654	-	50	0	0	0	0	0	0.67.04
2	ACGTACGTCATTACGGCCGACGG	seq:2526	-	55	1	0	0	0	0	0.61.49
3	CAGCAAGCGTTAAGTCCCAATGG	seq:1337	+	50	2	0	0	0	0	0.59.55
4	TATAACCGGTAAGTCTGCCCGG	seq:549	+	50	1	0	0	0	0	0.58.05
5	GACATTGGGGAGACTTTACACGG	seq:1445	-	45	0	0	0	0	0	0.55.93
6	TGCACGGTGACGTACCGCATGG	seq:2156	+	65	4	0	0	0	0	0.55.48
7	TATACCTCGCTCTACTTTCGCGG	seq:530	-	45	0	0	0	0	0	0.49.52
8	TGCGGTGACGTACCGTGCATGG	seq:2153	-	65	3	0	0	0	0	0.47.26
9	GACTACCGGGCAGACCTTACCGG	seq:554	-	60	1	0	0	0	0	0.41.79
10	CCGTGGCTCCCAATTTTTACTGG	seq:1515	+	50	0	1	0	0	0	0.24.12
11	CTTAGTCAACGGGCGATTTTGG	seq:233	-	45	0	0	0	0	0	0.16.03
12	ATCGGTATTGACTAAGTCGGTGG	seq:1079	+	45	1	1	0	0	0	1.60.06
13	AACCTACCTCAAGCTACAACGG	seq:2593	-	40	0	0	0	0	0	1.56.32

Εικόνα 4.3 Ενδεικτική απεικόνιση αποτελεσμάτων του προγράμματος CHOPCHOP, A) για 0-5kb ανοδικά του MoY, B) για 5-10kb ανοδικά του MoY

Επομένως, η εύρεση αλληλουχιών στόχων για τα sgRNAs περιορίστηκε καθοδικά του γονιδίου MoY. Κατά την αναζήτηση, η περιεκτικότητα του sgRNA σε GC ορίστηκε να έχει εύρος από 40-70%, καθώς τα sgRNA που πληρούν την συνθήκη αυτή, θεωρούνται τα πιο αποτελεσματικά (Wang et al. 2014; Tsai et al. 2015). Συγκρίνοντας τις πιθανές αλληλουχίες-στόχους, η τελική επιλογή βασίστηκε αρχικά στην απόδοση (υπόψιν λήφθηκαν οι πιθανές αλληλουχίες στόχοι με απόδοση μεγαλύτερη από 65%), στο μη σχηματισμό εσωτερικών βρόχων (self-complementarity = 0), αλλά και στο να μην υπάρχουν off-targets (MM0, MM1, MM2, MM3 = 0). Στη συνέχεια η επιλογή στηρίχθηκε στα νουκλεοτίδια της αλληλουχίας PAM, πιο συγκεκριμένα, η αλληλουχία PAM προτιμήθηκε να έχει το νουκλεοτίδιο C ή G στη θέση N, καθώς η ύπαρξη αυτών βελτιώνει την απόδοση του sgRNA, όπως υποστηρίζεται από τη βιβλιογραφία (Doench et. al, 2014). Με την παραπάνω διαδικασία καταλήξαμε τελικά σε δυο gRNA, που ονομάστηκαν gRNA1 και gRNA2 (Εικόνα 4.4).

A

Rank	Target sequence	Genomic location	Strand	GC content (%)	Self-complementarity	Off-targets				Efficiency	Benchmarking	
						MM0	MM1	MM2	MM3		Name	Distance from MoY
1	ATATACGCCAGATTGAGCCA CGG	seq:2421	-	45	0	0	0	0	0	72.90	gRNA1	~2500 bp
2	TCTCCGTGTTCTACACAGTGAGG	seq:4837	+	50	1	0	0	0	0	71.32		
3	TTGCATAAGGAATAGGCACAAGG	seq:4582	+	40	1	0	0	0	0	66.97		
4	TAGGCTGAACTAAAACCACTAGG	seq:4701	-	40	1	1	0	0	0	64.02		

B

Rank	Target sequence	Genomic location	Strand	GC content (%)	Self-complementarity	Off-targets				Efficiency	Benchmarking	
						MM0	MM1	MM2	MM3		Name	Distance from MoY
1	TACAATACTGATAACCGACG GGG	seq:3920	-	40	0	0	0	0	0	73.01	gRNA2	~6000bp
2	AGGTTTGTCAGITCCAAACGTGG	seq:3844	-	45	0	0	0	0	0	70.53		
3	GGTTTGTCAGITCCAAACGTGGG	seq:3843	-	45	0	0	0	0	0	68.27		
4	ATGAGCACCATACGGAGTGGGGG	seq:1188	+	55	0	0	0	0	0	65.07		
5	ACGACCGTTTGCCTCGATGTGG	seq:2553	+	60	0	1	0	0	>=0	64.70		
6	GGGAATCTGCTCAAGACTGTGGG	seq:1212	+	50	0	0	0	0	0	60.86		

Εικόνα 4.4 Ενδεικτική απεικόνιση αποτελεσμάτων CHOPCHOP, A) για 0-5kb καθοδικά του MoY, B) για 5-10kb καθοδικά του MoY

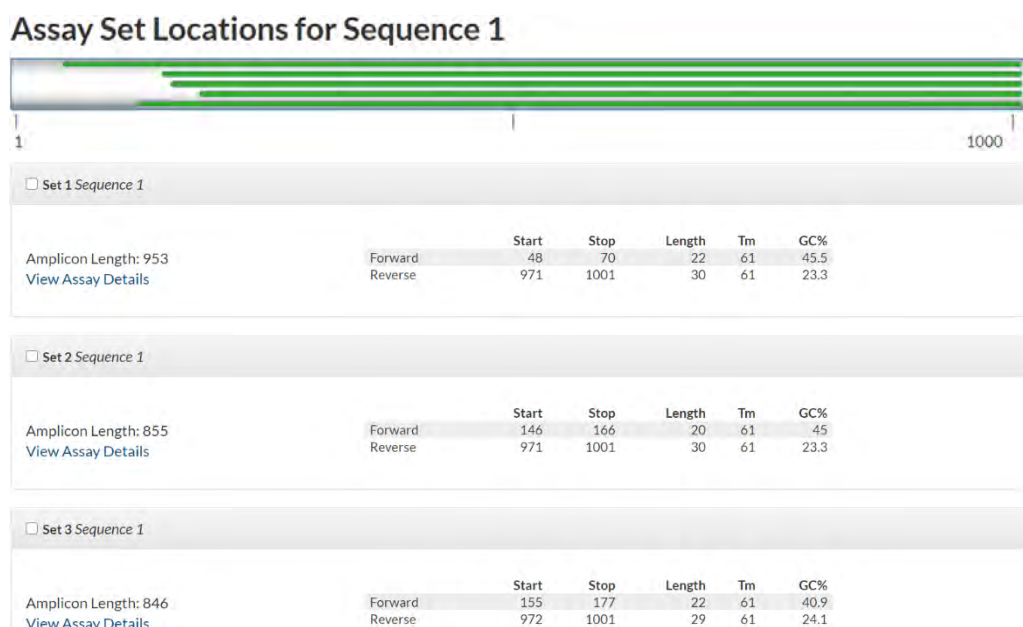
Με πράσινο χρώμα εμφανίζονται οι πιθανές αλληλουχίες-στόχοι που έχουν προβλεπόμενη απόδοση > 65% και δεν σχηματίζουν βρόχους με τον εαυτό τους (self-complementarity = 0) ούτε έχουν off-targets

Με κόκκινο χρώμα χαρακτηρίζονται οι αλληλουχίες PAM οι οποίες και θεωρήθηκαν οι καλύτερες μεταξύ των πιθανών αλληλουχιών στόχων που προέκυψαν από το πρώτο στάδιο επιλογής (πράσινο χρώμα)

4.2.2. Σχεδιασμός εκκινητών

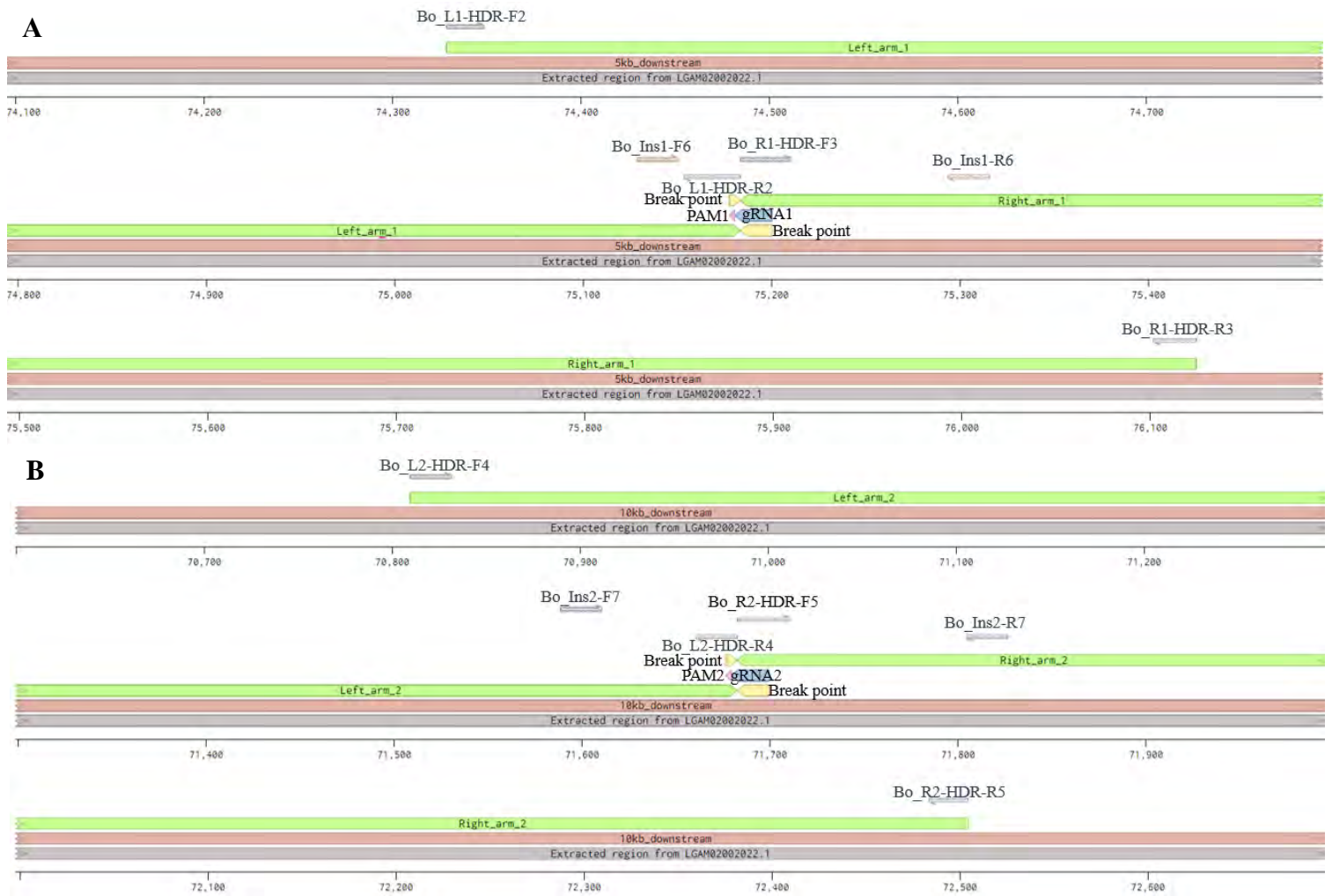
Το επόμενο βήμα ήταν ο προσδιορισμός των ομόλογων άκρων εκατέρωθεν του σημείου κοπής. Με βάση προηγούμενα πειράματα που βασίζονται στον ομόλογο ανασυνδυασμό (Buchman and Akbari, 2018), το εύρος των άκρων θεωρήθηκε βέλτιστο να είναι από 800-1000bp. Ο καθορισμός του μεγέθους των ομόλογων άκρων βασίστηκε

στο σχεδιασμό των εκκινητών, που στη συνέχεια θα χρησιμοποιηθούν για την ενίσχυση των αντίστοιχων τμημάτων DNA από το σύνολο του γονιδιώματος του *B. oleae*. Πιο συγκεκριμένα, για τον προσδιορισμό του αριστερού ομόλογου άκρου, η περιοχή μήκους 1000bp αριστερά του σημείου κοπής εισήχθη στο PrimerQuest Tool στην ιστοσελίδα της IDT, ώστε να εμφανίσει πιθανά ζεύγη εκκινητών. Το ιδιαίτερο χαρακτηριστικό, ωστόσο είναι, ότι ο reverse primer εξαναγκάστηκε να ξεκινάει από τη θέση 1000, δηλαδή ακριβώς αριστερά από το σημείο κοπής. Καθώς τα προτεινόμενα ζεύγη εκκινητών θα ενισχύουν το τμήμα που θα αποτελεί το αριστερό ομόλογο άκρο, αυτό οφείλει να αντιστοιχεί στο τμήμα DNA ακριβώς αριστερά του σημείου κοπής για να πραγματοποιηθεί επιτυχώς ο ανασυνδυασμός. Ακόμα, το μήκος του ενισχυμένου τμήματος ορίστηκε να είναι από 800-1000bp. Το αποτέλεσμα ήταν η εμφάνιση πιθανών ζευγών εκκινητών (Εικόνα 4.5), τα οποία και συγκρίθηκαν ως προς τα χαρακτηριστικά τους με το OligoAnalyzer Tool, καταλήγοντας στο βέλτιστο ζεύγος εκκινητών.



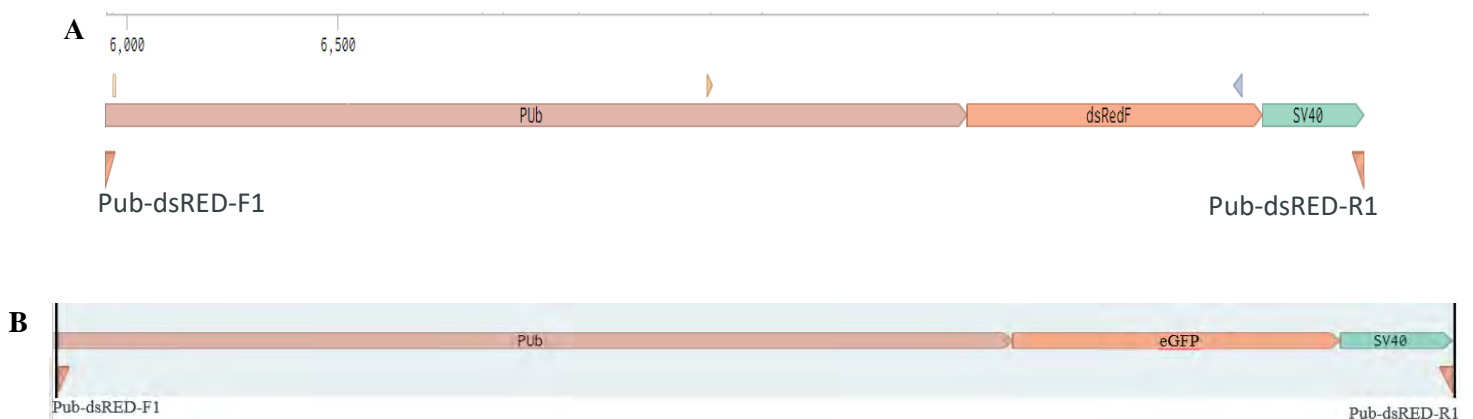
Εικόνα 4.5 Απεικόνιση αποτελεσμάτων του PrimerQuest Tool για το αριστερό ομόλογο άκρο με αλληλουχία οδηγό το gRNA1

Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και για τον προσδιορισμό του δεξιού ομόλογου άκρου, με τη διαφορά ότι, ο forward primer εξαναγκάστηκε να ξεκινάει από την θέση 1, η οποία βρίσκεται ακριβώς δεξιά του σημείου κοπής, ώστε το δεξί ομόλογο άκρο να ξεκινάει ακριβώς δεξιά του σημείου κοπής, διευκολύνοντας τον ομόλογο ανασυνδυασμό. Με αυτόν τον τρόπο, προσδιορίστηκαν τα ομόλογα άκρα και σχεδιάστηκαν οι εκκινητές για την ενίσχυσή τους για κάθε ένα από τα gRNA (gRNA1, gRNA2) (Εικόνα 4.6).



Εικόνα 4.6 Απεικόνιση σημείου κοπής, ομόλογων άκρων και εκκινήτων για τα Α) gRNA1 και Β) gRNA2 στο γραφικό περιβάλλον του Benchling

Εκκινήτες σχεδιάστηκαν και για την ενίσχυση του γονιδίου-δείκτη από κατάλληλο πλασμίδιο (KTT012) (Tsoumani et al., αδημοσίευτα αποτελέσματα), το οποίο είναι το dsRed (2985bp), με τον υποκινητή Pub και την τερματική αλληλουχία SV40 (Εικόνα 4.7). Ωστόσο, οι ίδιοι εκκινήτες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ενίσχυση του γονιδίου-δείκτη eGFP (3190bp) από το πλασμίδιο AH443 (Scolari et al., 2008), καθώς φέρει ταυτόσημες περιοχές υποκινητή και τερματικής αλληλουχίας στις οποίες υβριδίζονται οι εκκινήτες (Εικόνα 4.8).



Εικόνα 4.7 Σχηματική αναπαράσταση κασέτας γονιδίου δείκτη, προς ενίσχυση Α) του dsRed, Β) του eGFP

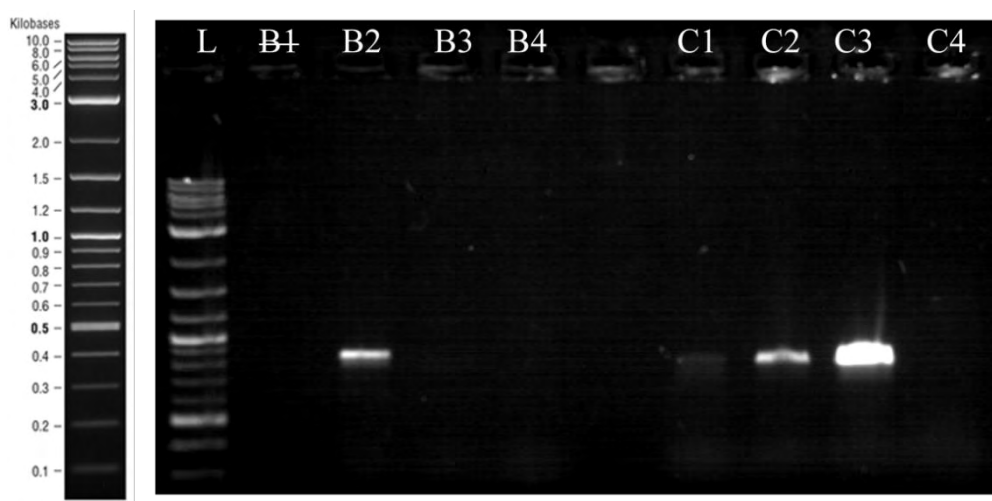
4.2.3 Βελτιστοποίηση της PCR

Αρχικά, έγινε βελτιστοποίηση της PCR ώστε να καθοριστούν οι καταλληλότερες συνθήκες για την ενίσχυση των επιθυμητών τμημάτων, δηλαδή των ομόλογων άκρων για κάθε ένα από τα sgRNA και του γονιδίου δείκτη. Ύστερα από διάφορες εναλλαγές συνθηκών που απεικονίζονται στην εικόνα 4.8, δεν επιτεύχθηκε το επιθυμητό αποτέλεσμα ενίσχυσης για τα ομόλογα άκρα που προκύπτουν με το gRNA1, οπότε στη συνέχεια δοκιμάστηκαν τα ζεύγη εκκινητών για το gRNA2.



Εικόνα 4.8 Ενίσχυση ομόλογων άκρων του gRNA1

Δοκιμάστηκαν τα ζεύγη εκκινητών για την ενίσχυση των ομόλογων άκρων για το gRNA2, με διαβάθμιση θερμοκρασίας για το βήμα της υβριδοποίησης των εκκινητών (Εικόνα 4.9).

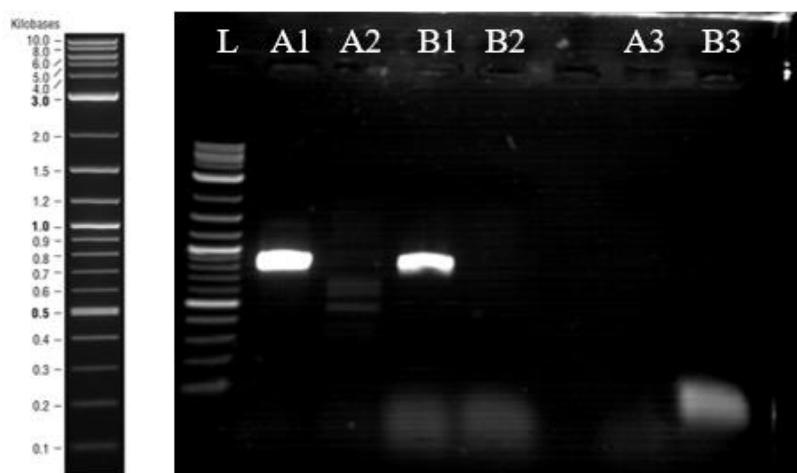


Εικόνα 4.9 Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων ενίσχυσης αριστερού και δεξιού ομόλογου άκρου για το gRNA2 σε διαβάθμιση θερμοκρασίας (1% agarose gel, 3% ethidium bromide, Ladder (L): NEB 1kb Plus ladder). i) Οι θέσεις φόρτωσης B1-B3 αντιστοιχούν στα προϊόντα ενίσχυσης του αριστερού ομόλογου άκρου σε θερμοκρασίες 47°C, 49°C και 52°C, ενώ η B4 στο

αρνητικό δείγμα ελέγχου σε θερμοκρασία 47°C. ii) Οι θέσεις φόρτωσης C1-C3 αντιστοιχούν στα προϊόντα ενίσχυσης του δεξιού ομόλογου άκρου σε θερμοκρασίες 47°C, 49°C και 52°C, ενώ η C4 στο αρνητικό δείγμα ελέγχου σε θερμοκρασία 47°C

Όσον αφορά την ενίσχυση του αριστερού ομόλογου άκρου, λόγω τεχνικού λάθους, τα αποτελέσματα της θέσης φόρτωσης B1 είναι μη αξιοποιήσιμα. Στη θέση B2, ωστόσο, παρατηρείται μια έντονη ζώνη ενίσχυσης, η οποία και αντιστοιχεί στο επιθυμητό προϊόν ενίσχυσης (873bp), όπως γίνεται αντιληπτό μετά από σύγκριση με τις ζώνες του ladder (προϊόν ανάμεσα σε ζώνες 800 και 900bp). Για το δεξί άκρο ενίσχυσης, η επιθυμητή ζώνη ενίσχυσης (822bp), εμφανίζεται και στις τρεις συνθήκες. Ωστόσο, η θέση C3 έχει εμφανώς καλύτερη απόδοση σε σχέση με τις άλλες.

Για αυτό το λόγο, στο επόμενο βήμα ελέγχου της ειδικότητας της αντίδρασης ενίσχυσης ως προς το φύλο, επιλέχθηκαν οι θερμοκρασίες των 49°C για το αριστερό και των 52°C για το δεξί ομόλογο άκρο αντίστοιχα, χρησιμοποιώντας ως μήτρα τόσο DNA αρσενικών όσο και θηλυκών ατόμων (Εικόνα 4.10).



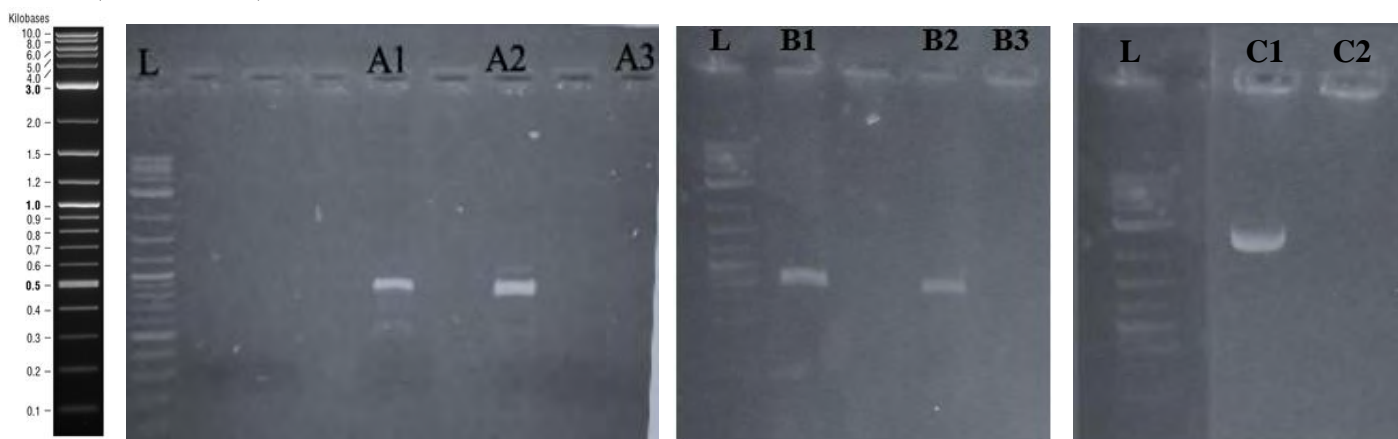
Εικόνα 4.10 Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων ενίσχυσης αριστερού και δεξιού ομόλογου άκρου για το gRNA2 σε διαβάθμιση θερμοκρασίας (1% agarose gel, 3% ethidium bromide, Ladder (L): NEB 1kb Plus ladder). i) Οι θέσεις φόρτωσης A1-A2 αντιστοιχούν στα προϊόντα ενίσχυσης του αριστερού ομόλογου άκρου στους 49°C με υπόστρωμα αρσενικό και θηλυκό δείγμα DNA, αντίστοιχα, ενώ η A3 στο αρνητικό δείγμα ελέγχου σε θερμοκρασία 49°C. ii) Οι θέσεις φόρτωσης B1-B2 αντιστοιχούν στα προϊόντα ενίσχυσης του δεξιού ομόλογου άκρου στους 52°C με υπόστρωμα αρσενικό και θηλυκό δείγμα DNA, αντίστοιχα, ενώ η B3 στο αρνητικό δείγμα ελέγχου σε θερμοκρασία 52°C

Παρατηρούνται έντονες ζώνες ενίσχυσης τόσο στη θέση A1, όσο και στη B1, οι οποίες επιβεβαιώνουν την ενίσχυση του αριστερού και δεξιού ομόλογου άκρου αντίστοιχα με μήτρα DNA αρσενικού ατόμου. Με μήτρα DNA θηλυκού ατόμου, στην αντίδραση A2 παρατηρούνται κάποιες αχνές ζώνες, οι οποίες όμως δεν αντιστοιχούν στο επιθυμητό προϊόν, και στην αντίδραση B2 δεν εμφανίζονται καθόλου ζώνες. Τα παραπάνω πιστοποιούν ότι την ειδικότητα του σχεδιασμού ως προς την Y-ειδική χρωμοσωμική προέλευση των ενισχυόμενων περιοχών, δηλαδή οι συγκεκριμένες περιοχές ανιχνεύονται αποκλειστικά στα αρσενικά άτομα.

Έχοντας επιβεβαιώσει τόσο τη λειτουργικότητα των εκκινητών, όσο και την ειδικότητα τους ως προς το χρωμόσωμα Y, ακολούθησε η απομόνωση των επιθυμητών τμημάτων DNA με υψηλής πιστότητας πολυμεράση.

4.2.4 Απομόνωση επιθυμητών τμημάτων DNA

Για να ενισχυθούν τα επιμέρους τμήματα που απαιτούνται για τη συναρμολόγηση τελικά της γενετικής κατασκευής, η ενίσχυση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της υψηλής πιστότητας πολυμεράσης Q5 High-Fidelity DNA Polymerase, τόσο με, όσο και χωρίς τη χρήση ενισχυτή για μήτρες με υψηλή περιεκτικότητα σε GC (Εικόνα 4.11).



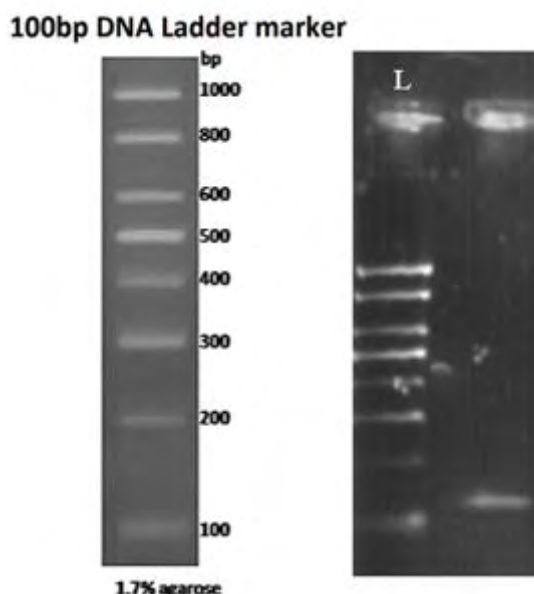
Εικόνα 4.11: Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων ενίσχυσης αριστερού ομόλογου άκρου για το gRNA2 με υψηλής πιστότητας πολυμεράση, Q5 (1% agarose gel, 3% ethidium bromide, Ladder (L): NEB 1kb Plus ladder). i) Οι θέσεις φόρτωσης A1-A2 αντιστοιχούν στα προϊόντα ενίσχυσης του αριστερού ομόλογου άκρου χωρίς και με την χρήση ενισχυτή, αντίστοιχα, ενώ η A3 στο αρνητικό δείγμα ελέγχου ii) Οι θέσεις φόρτωσης B1-B2 αντιστοιχούν στα προϊόντα ενίσχυσης του δεξιού ομόλογου άκρου χωρίς και με την χρήση ενισχυτή, αντίστοιχα, ενώ η B3 στο αρνητικό δείγμα ελέγχου iii) Η θέση φόρτωσης C1 αντιστοιχεί στο προϊόν ενίσχυσης του γονιδίου-δείκτη, ενώ η C2 στο αρνητικό δείγμα ελέγχου

Οι επιθυμητές ζώνες ενίσχυσης (873bp για το αριστερό ομόλογο άκρο, 822bp για το δεξί ομόλογο άκρο και 3190bp για το γονίδιο δείκτη) που προέκυψαν με τη χρήση του ενζύμου Q5 High-Fidelity DNA Polymerase ανακτήθηκαν από το πήκτωμα αγαρόζης και προσδιορίστηκε φασματοφωτομετρικά η τελική συγκέντρωση του απομονωμένου DNA σε 5,5ng/μl για το αριστερό, 6,9 ng/μl για το δεξί ομόλογο άκρο και 4,5 ng/μl για το γονίδιο δείκτη.

4.2.5 Σύνθεση sgRNA

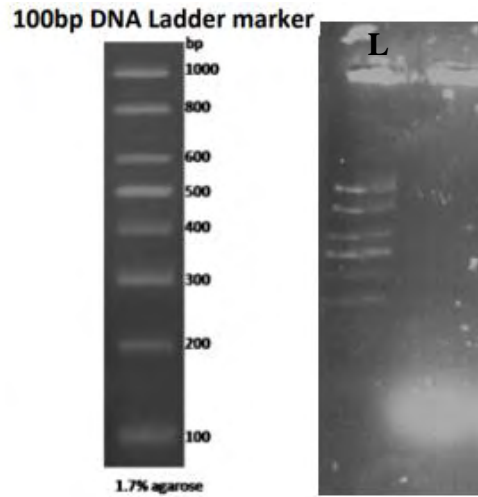
Έχοντας ανακτήσει τα τμήματα που απαιτούνται για τη γενετική κατασκευή, η οποία θα χρησιμοποιηθεί για τον ομόλογο ανασυνδυασμό και την επιδιόρθωση της ρήξης του DNA, απαιτείται η παραγωγή του sgRNA που θα οδηγήσει στη ρήξη αυτή. Αρχικά, έγινε η παραγωγή της μήτρας DNA για την in vitro μεταγραφή. Στο τέλος της αντίδρασης PCR, μετρήθηκε η συγκέντρωση του προϊόντος σε αραιώση 1:10, και η οποία προσδιορίστηκε ίση με 79,6ng/μl, επομένως για το αρχικό προϊόν η

συγκέντρωση είναι ίση με 796 ng/μl. Η παραγωγή του επιθυμητού προϊόντος επιβεβαιώθηκε και με ηλεκτροφόρηση (Εικόνα 4.12), με την εμφάνιση ζώνης κοντά στην ζώνη των 100bp του μάρτυρα.



Εικόνα 4.12 Ηλεκτροφόρηση προϊόντος ενίσχυσης της μήτρας DNA για τη σύνθεση του gRNA (1μl αραιώσης 1:10) (2% agarose gel, 3% ethidium bromide, Ladder (L): 100bp DNA Ladder Minotech)

Ακολούθησε καθαρισμός της μήτρας DNA, με χρήση του NucleoSpin Gel and PCR clean-up kit (Macherey-Nagel). Μετά το πέρας της διαδικασίας μετρήθηκε η συγκέντρωση του καθαρού προϊόντος σε αραιώση 1:20, και η οποία προσδιορίστηκε ίση με 6,3ng/μl, επομένως για το αρχικό προϊόν η συγκέντρωση ήταν ίση με 126ng/μl. Έτσι, υπολογίστηκε η απαιτούμενη ποσότητα (σε μl) που έπρεπε να προστεθεί στην διαδικασία της *in vitro* μεταγραφής, ώστε η μήτρα DNA να είναι 1μg (όπως απαιτείται από το πρωτόκολλο). Αφού πραγματοποιήθηκε η *in vitro* μεταγραφή, έγινε ο καθαρισμός του παραγόμενου RNA. Στο τέλος, έγινε μέτρηση της συγκέντρωσης του προϊόντος (gRNA) σε αραιώση 1:10, και η οποία προσδιορίστηκε ίση με 680ng/μl, επομένως η συγκέντρωση του παραγόμενου gRNA ήταν ίση με 6,8μg/μl. Καθώς όμως το μηχάνημα ποσοτικοποίησης προσέφερε την επιλογή για μέτρηση μόνο μονόκλωνου RNA, η τιμή θεωρήθηκε προσεγγιστική, γι' αυτό και ακολούθησε και ηλεκτροφόρηση 2μl της αραιώσης (Εικόνα 4.12).



Εικόνα 4.12: Ηλεκτροφόρηση προϊόντος gRNA (2μl αραιώσης 1:10) (2% agarose gel, 3% ethidium bromide, Ladder (L): 100bp DNA Ladder Minotech)

Το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης δεν επιβεβαιώνει την ποσότητα που αναμένουμε ότι έχουμε. Πιθανά αίτια για την ύπαρξη της αχνής ζώνης είναι απώλεια μεγάλου μέρους της ποσότητας του προϊόντος στη στήλη καθαρισμού, αλλά και η πιθανή ύπαρξη RNAσης στο διάλυμα ηλεκτροφόρησης, οι οποία και θα αποικοδόμησε πιθανά το προϊόν.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η διαχείριση του δάκου, *Bactrocera oleae*, ενός από τα πιο σημαντικά παράσιτα της ελιάς, πραγματοποιείται σήμερα με μεθόδους, όπως ψεκασμοί με εντομοκτόνα, οι οποίες έχουν αποδειχθεί ανεπαρκείς, ακόμα και επιβλαβείς για το περιβάλλον και τον άνθρωπο. Για το λόγο αυτό είναι επιτακτική η ανάγκη ανάπτυξης μεθόδων ελέγχου του πληθυσμού, που είναι πιο φιλικές ως προς το περιβάλλον και ειδο-ειδικές. Μια τέτοια εναλλακτική μέθοδος αποτελεί η τεχνική στείρου εντόμου (SIT), η οποία έχει εφαρμοστεί με επιτυχία για τον έλεγχο πληθυσμών συγγενικών ειδών του δάκου, όπως η *Ceratits capitata*. Η προσπάθεια εφαρμογής της μεθόδου στο δάκο είχε ωστόσο ανεπαρκή αποτελεσματικότητα και εγκαταλείφθηκε. Έχει εκφραστεί η άποψη ότι, η επιτυχής και έγκαιρη διάκριση μεταξύ αρσενικών και θηλυκών εντόμων, θα μπορούσε πιθανώς να αυξήσει την αποτελεσματικότητα της μεθόδου, καθώς οι απελευθερώσεις εντόμων θα αφορούσαν μόνο αρσενικά άτομα, τα οποία και θα ζευγάρωναν αποκλειστικά με θηλυκά αγρίου τύπου στο πεδίο, και όχι και με στείρα θηλυκά που απελευθερώνονται ταυτόχρονα. Ακόμα, η ελαχιστοποίηση της πιθανότητας ταυτόχρονης απελευθέρωσης στείρων θηλυκών εντόμων, εξασφαλίζει ότι δεν θα προκληθεί περαιτέρω καταστροφή στους καρπούς από θηλυκά έντομα, τα οποία αν και στείρα, θα προσβάλλουν τον καρπό. Επίσης, μειώνεται και το κόστος της μεθόδου, καθώς δεν είναι απαραίτητη και η εκτροφή των θηλυκών εντόμων. Οι υπάρχουσες μέθοδοι διαχωρισμού του φύλου, ωστόσο, είτε δεν μπορούν να εφαρμοστούν στο δάκο της ελιάς (φυσικές, γενετικές) είτε ενέχουν νομοθετικούς περιορισμούς (διαγονιδιακές).

Το σύστημα CRISPR/Cas9 έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς τα τελευταία χρόνια για τον ακριβή χειρισμό γενετικού υλικού και έχει εφαρμοστεί επιτυχώς σε πληθώρα εντόμων, συμπεριλαμβανομένου και του δάκου. Το ιδιαίτερο χαρακτηριστικό του CRISPR/Cas9 είναι η δυνατότητα του να προκαλεί στοχευμένες μεταλλάξεις. Το γεγονός αυτό, μπορεί να αξιοποιηθεί για τη γενετική τροποποίηση εντόμων, που ωστόσο θα προσομοιάζει την κλασική μεταλλαξιγένεση. Πιο συγκεκριμένα, ενώ με την κλασική μεταλλαξιγένεση έχει επιτευχθεί η δημιουργία φυλο-γενετικών στελεχών (GSS) σε συγγενικά έντομα, όπως η *Ceratitits capitata*, κάτι ανάλογο δεν έχει γίνει για τον δάκο. Με το CRISPR/Cas9 υπάρχει η δυνατότητα πρόκλησης μεταλλάξεων, ανάλογων με αυτών της κλασικής μεταλλαξιγένεσης, στοχεύοντας γονίδια που χρησιμοποιούνται για το διαχωρισμό των φύλων, όπως το *white pupae* στη *Ceratitits capitata*. Ακόμα, η δυνατότητα του συστήματος να επιδιορθώνει τις προκαλούμενες δίκλωνες ρήξεις με ομόλογο ανασυνδυασμό (HDR) με την παροχή μιας κατάλληλης μήτρας DNA, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανάπτυξη στελεχών που θα ξεπερνούν τα εμπόδια που προκύπτουν με τις διαγονιδιακές τεχνολογίες διαχωρισμού του φύλου. Πιο συγκεκριμένα, παρέχοντας ως μήτρα επιδιόρθωσης του DNA μια ενδογενή αλληλουχία του εντόμου, ο ομόλογος ανασυνδυασμός θα οδηγήσει σε ένα στέλεχος, που αν και γενετικά τροποποιημένο, θα φέρει μόνο ενδογενείς αλληλουχίες, επομένως δεν θεωρείται διαγονιδιακό και θα μπορεί να εφαρμοστεί στο πεδίο, χωρίς να υπάρχουν νομοθετικοί περιορισμοί.

Το χρωμόσωμα Y αποτελεί μια κατάλληλη θέση για γενετική τροποποίηση, καθώς η ύπαρξη του χαρακτηρίζει τα αρσενικά άτομα. Ωστόσο, η ετεροχρωματική και επαναλαμβανόμενη φύση του, καθιστά δύσκολη τόσο την αλληλούχηση του (λόγω,

εν μέρει, αμφισημειών στην ευθυγράμμιση και συναρμολόγηση της αλληλουχίας) όσο και τον γενετικό χειρισμό του. Πρόσφατα προέκυψαν δεδομένα αλληλούχησης (Bayega et al., 2020) μέσω των οποίων εντοπίστηκαν συγκεκριμένα τμήματα (contigs) που αντιστοιχούν στο χρωμόσωμα Y του *B. oleae*. Ο προσδιορισμός της θέσης του γονιδίου που κωδικοποιεί για τον παράγοντα αρρενοποίησης (MoY), σε συνδυασμό με την ακρίβεια στη λειτουργία του συστήματος CRISPR/Cas9, που με τον κατάλληλο σχεδιασμό μπορεί να στοχεύσει σε συγκεκριμένη και μόνο περιοχή, καθιστούν τη γενετική τροποποίηση στο χρωμόσωμα Y ένα πιθανώς εφικτό σχέδιο. Έτσι, σχεδιάστηκε ένα σύστημα, ειδικής ως προς τη θέση, ένθεσης ενός γονιδίου δείκτη στο χρωμόσωμα Y του *Bactrocera oleae*. Πιο αναλυτικά, η ακρίβεια ως προς τη θέση ένθεσης εξασφαλίζεται με τη χρήση του συστήματος CRISPR/Cas9. Ταυτόχρονα, η θέση ένθεσης τοποθετείται πλησίον του γονιδίου MoY και έτσι εξασφαλίζεται ότι και στοχεύεται το χρωμόσωμα Y, αλλά και είναι αυξημένες οι πιθανότητες για τη μεταγραφική ενεργότητα της κατασκευής προς ένθεση.

Κατά τον σχεδιασμό των sgRNA, η θέση στόχευσης επιλέχθηκε να βρίσκεται κοντά στο γονίδιο MoY, όπως αναφέρθηκε, για την εξασφάλιση της μεταγραφικής ενεργότητας της κατασκευής που πρόκειται να εντεθεί. Αυτό είναι απαραίτητο καθώς το τελικό στέλεχος που θα δημιουργηθεί δεν πρέπει να φέρει εξωγενείς αλληλουχίες. Επομένως, δεν μπορούν να προστεθούν ρυθμιστικά στοιχεία στη σχεδιαζόμενη κατασκευή, όπως οι μονωτές (insulators), τα οποία διευκολύνουν την έκφραση του ενθέματος σε ετεροχρωματινικές περιοχές, όπως το χρωμόσωμα Y. Η βιοπληροφορική μελέτη της περιοχής επιβεβαίωσε την επαναλαμβανόμενη φύση της, καθώς ιδιαίτερα ανοδικά του γονιδίου δεν μπορούσε να εντοπιστεί μια μοναδική περιοχή προς στόχευση με ικανοποιητική απόδοση για το σύστημα CRISPR/Cas9. Καθοδικά του γονιδίου, ωστόσο, βρέθηκαν μοναδικές περιοχές στόχευσης με ικανοποιητική απόδοση, σύμφωνα με την πρόβλεψη της βιοπληροφορικής ανάλυσης.

Δυσκολίες προέκυψαν και κατά τις αντιδράσεις ενίσχυσης των ομόλογων άκρων, για την πρώτη θέση στόχευσης (sgRNA1). Όσες αλλαγές των συνθηκών και αν πραγματοποιήθηκαν, καμία δεν έφερε αποτέλεσμα ενίσχυσης. Οι ίδιες συνθήκες ωστόσο εφαρμόστηκαν και για την ενίσχυση των ομόλογων άκρων της δεύτερης θέσης στόχευσης (sgRNA2), η οποία επέφερε ικανοποιητικά αποτελέσματα. Οπότε, η απουσία ενίσχυσης στην πρώτη περίπτωση πιθανόν να οφείλεται στην ετεροχρωματινική φύση της περιοχής που καθιστούν την ενίσχυση πολύ δύσκολη.

Η παραγωγή των sgRNA παρουσίασε επιπρόσθετα προβλήματα, καθώς η ποσότητα που ανιχνεύθηκε κατά την ηλεκτροφόρηση απέκλινε αρκετά από τη θεωρητικά αναμενόμενη. Πιθανούς λόγους για το αποτέλεσμα αυτό αποτελούν ίσως η απώλεια μεγάλου μέρους της παραγόμενης ποσότητας στη στήλη καθαρισμού, ακόμα όμως και η ύπαρξη RNAάσης στο διάλυμα ηλεκτροφόρησης, το οποίο θα οδηγούσε σε απώλεια του προϊόντος κατά την διάρκεια της ηλεκτροφόρησης, με την τελική εικόνα να μην είναι πιθανά αντιπροσωπευτική της αρχικής ποσότητας που προστίθεται προς ηλεκτροφόρηση. Για το λόγο αυτό, προτείνεται η εκ νέου παραγωγή του sgRNA με την παραγόμενη μήτρα DNA του sgRNA να καθαρίζεται ακολουθώντας το εναλλακτικό πρωτόκολλο καθαρισμού με φαινόλη-χλωροφόρμιο.

Στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας, σχεδιάστηκε η γενετική κατασκευή και απομονώθηκαν επιτυχώς όλες οι απαραίτητες αλληλουχίες που τη συνιστούν. Συγκεκριμένα, απομονώθηκε από το κατάλληλο πλασμίδιο [AH443 (Scolari et al.,

2008] το γονίδιο δείκτης προς ένθεση, δηλαδή το eGFP, με τον υποκινητή Pub και την τερματική αλληλουχία SV40. Αξίζει να σημειωθεί ότι ο εν λόγω υποκινητής είναι καθολικός, επομένως θα επιτρέπει την έκφραση του eGFP σε όλο το σώμα του εντόμου, εφόσον εντεθεί επιτυχώς. Εκατέρωθεν του eGFP στη γενετική κατασκευή που σχεδιάστηκε, βρίσκονται τα ομόλογα άκρα, τα οποία και απομονώθηκαν επιτυχώς από το γονιδίωμα του *B. oleae*. Πρόκειται για τις αλληλουχίες που βρίσκονται εκατέρωθεν της προβλεπόμενης ρήξης που θα δημιουργήσει το sgRNA στο DNA, στις περιοχές του Y χρωμοσώματος που εντοπίστηκαν μετά από βιοπληροφορική ανάλυση. Η παρουσία αυτών των αλληλουχιών αναμένεται να οδηγήσει στην επιδιόρθωση της ρήξης με το μονοπάτι του ομόλογου ανασυνδυασμού, οπότε αναμένεται να εντεθεί και το eGFP.

Μελλοντικές κατευθύνσεις

Σε επόμενη φάση, τα επιμέρους αυτά τμήματα θα κλωνοποιηθούν σε κατάλληλο φορέα, αξιοποιώντας τεχνικές κλωνοποίησης που επιτρέπουν την ένωση τμημάτων DNA με συνεχή τρόπο χωρίς να προσθέτει επιπλέον νουκλεοτιδικές βάσεις, όπως η τεχνική Gibson. Η επιλογή αυτού του τύπου τεχνικής εξασφαλίζει ότι δεν θα προστεθούν και τυχόν επιπλέον βάσεις κατά την ένθεση της κασέτας στο γονιδίωμα του οργανισμού. Η προς-ένθεση κατασκευή αυτή, καθώς το παραχθέν sgRNA, θα χορηγηθούν μέσω μικροένεσης σε έμβρυα *Bactrocera oleae*, μαζί με την Cas9. Παρατήρηση των εντόμων κάτω από κατάλληλο φίλτρο για το γονίδιο δείκτη (eGFP), θα δείξει αν και ποια έντομα κατάφεραν να τροποποιηθούν γενετικά επιτυχώς. Επιπλέον, η σύγκριση της έντασης φθορισμού, με ήδη γνωστά δεδομένα φθορισμού του eGFP υπό τον υποκινητή Pub στο *B. oleae* (Genc et al., 2016), θα είναι ενδεικτική της μεταγραφικής ενεργότητας της περιοχής όπου εντίθεται η κατασκευή.

Η ένταση του φθορισμού του εντόμου θα αντικατοπτρίζει άμεσα τη μεταγραφική ενεργότητα της περιοχής ένθεσης. Αν βρεθεί κατάλληλη περιοχή ένθεσης που να επιτρέπει τη μεταγραφική ενεργότητα της κατασκευής, θα στοχευθεί εκ νέου η ίδια περιοχή χρησιμοποιώντας μεν το σύστημα CRISPR/Cas9, αλλά με διαφορετική γενετική κατασκευή για τον ομόλογο ανασυνδυασμό. Η γενετική κατασκευή θα περιλαμβάνει σε αυτό το δεύτερο στάδιο, το ενδογενές γονίδιο του *B. oleae*, *white pupae*. Απαλοιφή του ενδογενούς αυτοσωμικού γονιδίου και ένθεση ενός λειτουργικού του αντιγράφου που θα λειτουργεί ως γονίδιο διάσωσης του φαινοτύπου (rescue allele) μέσω της γενετικής κατασκευής στο χρωμόσωμα Y, θα οδηγήσει στον άσπρο χρωματισμό των θηλυκών νυμφών, σε αντίθεση με τα αρσενικά που θα εξακολουθούν να φέρουν το τυπικό καφέ χρώμα. Έτσι θα επιτευχθεί ο τελικός στόχος, που είναι η παραγωγή ενός στελέχους που θα επιτρέπει τον εύκολο διαχωρισμό αρσενικών και θηλυκών εντόμων, ενώ δεν είναι διαγονιδιακό, ώστε να χρησιμοποιηθεί για την εφαρμογή της SIT.

6. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πίνακας 6.1 Λίστα και χαρακτηριστικά των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις ενίσχυσης

Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία	Tm(°C)	Μέγεθος προϊόντος PCR(bp)
Pub-dsRED-F1	GATCTCGAGCTCAAGCTTCGA ATT	65 °C	2985
Pub-dsRED-R1	GATACATTGATGAGTTTGGAC AAACCAC	65 °C	
Bo_L1-HDR-F2	AGTTGCCATCGTGATTGTTG	61 °C	855
Bo_L1-HDR-R2	CCACGGAAAAAATATTTGAGA AATATAATTT	61 °C	
Bo_R1-HDR-F3	CTCAATCTGGCGTATATGTAT CATTTC	62 °C	941
Bo_R1-HDR-R3	AGCAAAGTGAATCCACCTGA ATA	62 °C	
Bo_L2-HDR-F4	GGTGATTCTCACACCCAATTT C	62 °C	873
Bo_L2-HDR-R4	ACGGGGATAGACCAACAATT AA	62 °C	
Bo_R2-HDR-F5	CGGTTATCAGTATTGTACATT CTGATAG	62 °C	822
Bo_R2-HDR-R5	TTACACCTCCTCGTGTAAGC	62 °C	

Πίνακας 6.2 Λίστα εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή της μήτρας PCR για τα sgRNA1 και sgRNA2 αντίστοιχα. Η αλληλουχία με υπογράμμιση αντιστοιχεί στην αλληλουχία του T7 υποκινητή για την in vitro μεταγραφή, ενώ η αλληλουχία με κόκκινο χρώμα αντιστοιχεί στην αλληλουχία στόχο. Ο εκκινητής InvR αποτελεί τον ανάστροφο εκκινητή, ο οποίος περιλαμβάνει την αλληλουχία μετά την περιογή-στόχο, οπότε και είναι κοινός και για τα δύο sgRNAs.

sgRNA	Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία
sgRNA1	BoYgRNA-1F	GAAAT <u>T</u> AATACGACTCACTATA ATATACGCCAGATTGAGCCA GTTTTAGAGCTA GAAATAGC
sgRNA2	BoYgRNA-2F	GAAAT <u>T</u> AATACGACTCACTATA TACAATACTGATAACCGACG GTTTTAGAGCTA GAAATAGC
	InvR	AAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAACGGACTAGCCTTATTTTA ACTTGCTATTTCTAGCTCTAAAAC

7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Amvrazi, E. G., Albanis, T. A., (2009), Pesticide residue assessment in different types of olive oil and preliminary exposure assessment of Greek consumers to the pesticide residues detected, *Food Chemistry*, 113(1), 253-261 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.06.073>
- Ant, T., Koukidou, M., Rempoulakis, P., Gong, H.F., Economopoulos, A., Vontas, J., Alphey, L., (2012), Control of the olive fruit fly using genetics-enhanced sterile insect technique, *BMC Biology*, 10, 51 <https://doi.org/10.1186/1741-7007-10-51>
- Araripe, L.O., Tao, Y. and Lemos, B., (2016), Interspecific Y chromosome variation is sufficient to rescue hybrid male sterility and is influenced by the grandparental origin of the chromosomes, *Heredity*, 116(6), 516–522 <https://doi.org/10.1038/hdy.2016.11>
- Aumann, R. A., Schetelig, M. F., Häcker, I., (2018), Highly efficient genome editing by homology-directed repair using Cas9 protein in *Ceratitis capitata*, *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 101, 85–93 <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2018.08.004>
- Bai, X., Zeng, T., Ni, X. Y., Su, H. A., Huang, J., Ye, G. Y., ... Qi, Y. X., (2019), CRISPR/Cas9-mediated knockout of the eye pigmentation gene white leads to alterations in color of head spots in the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* *Insect Molecular Biology*, 28, 837–849 <https://doi.org/10.1111/imb.12592>
- Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., Romero, D.A., Horvath, P., (2007), CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes, *Science*, 315(5819), 1709–1712 <https://doi.org/10.1126/science.1138140>
- Bassett, A. R., Liu, J. L., (2014), CRISPR/Cas9 and genome editing in *Drosophila*, *Journal of genetics and genomics*, 41(1), 7–19 <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2013.12.004>
- Bayega, A., Djambazian, H., Tsoumani, K.T. et al. (2020), De novo assembly of the olive fruit fly (*Bactrocera oleae*) genome with linked-reads and long-read technologies minimizes gaps and provides exceptional Y chromosome assembly. *BMC Genomics*, 21, 259 <https://doi.org/10.1186/s12864-020-6672-3>

- Bernardini, F., Galizi, R., Wunderlich, M., Taxiarchi, C., Kranjc, N., Kyrou, K., et al., (2017), Cross-species Y chromosome function between malaria vectors of the *Anopheles gambiae* species complex, *Genetics*, 207(2), 729–740 <https://doi.org/10.1534/genetics.117.300221>
- Bose, J.L., (2016), Chemical and UV Mutagenesis, *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1373, 111–115 https://doi.org/10.1007/7651_2014_190
- Bouyer, F., Seck, M. T., Dicko, A. H., Sall, B., Lo, M., Vreysen, M. J. B., Chia, E., Bouyer, J., Wane, A., (2014), Ex-ante Benefit-Cost Analysis of the Elimination of a *Glossina palpalis gambiense* Population in the Niayes of Senegal, *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(8), e3112 <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003112>
- Bret, B.L., Larson, L.L., Schoonover, J.R., Sparks, T.C., Thompson, G.D., (1997), Biological Properties of Spinosad, *Down to Earth*, 52, 6-13
- Broumas, T., (1985), Application trials of trapping systems for control of *Dacus oleae*, *Ann. Inst. Phytopathol. Benaki (N.S.)*, 14, 157–66
- Broumas, T., Haniotakis, G., Liaropoulos, C., Tomazou, T., 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, 217-223 <https://doi.org/10.1046/j.1439-0418.2002.00637.x>
- Buchman, A., Akbari, O. S., (2019), Site-specific transgenesis of the *Drosophila melanogaster* Y-chromosome using CRISPR/Cas9, *Insect molecular biology*, 28(1), 65–73 <https://doi.org/10.1111/imb.12528>
- Burrack, H. J., Zalom, F. G., (2008), Olive fruit fly (Diptera: Tephritidae) ovipositional preference and larval performance in several commercial important olive varieties in California, *Journal of Economic Entomology*, 101(3), 750-758 [https://doi.org/10.1603/0022-0493\(2008\)101\[750:offdto\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1603/0022-0493(2008)101[750:offdto]2.0.co;2)
- Busch-Petersen, E., (1990), Temperature Sensitive Lethal Factors and Puparial Colour Sex Separation Mechanisms in the Mediterranean Fruit Fly, *Ceratitis capitata* (Wied), *International Atomic Energy Agency (IAEA)*, Vienna
- Byron, M.A. and Gillett-Kaufman, J.L., (2016), Featured creatures, olive fruit fly, *Bactrocera oleae* (Rossi) (Insecta: Diptera: Tephritidae), University of Florida

- Caceres, C., (2002), Mass Rearing of Temperature Sensitive Genetic Sexing Strains in the Mediterranean Fruit Fly (*Ceratitis Capitata*), *Genetica*, 116, 107–116 <https://doi.org/10.1023/A:1020967810703>
- Cebrian-Serrano, A., Davies, B., (2017), CRISPR-Cas orthologues and variants: Optimizing the repertoire, specificity and delivery of genome engineering tools, *Mammalian Genome*, 28(7-8), 247–261 <https://doi.org/10.1007/s00335-017-9697-4>
- Champer, J., Buchman, A., Akbari, O.S., (2016), Cheating evolution: engineering gene drives to manipulate the fate of wild populations, *Nature Reviews Genetics*, 17(3), 146–159 <https://doi.org/10.1038/nrg.2015.34>
- Choo, A., Crisp, P., Saint, R., O'Keefe, L., Baxter, S., (2018), CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of the white gene in the tephritid pest *Bactrocera tryoni*, *Journal of Applied Entomology*, 142(1-2), 52–58 <https://doi.org/10.1111/jen.12411>
- Concha, C., Palavesam, A., Guerrero, F.D., Sagel, A., Li, F., Osborne, J.A., Hernandez, Y., Pardo, T., Quintero, G., Vasquez, M., Keller, G.P., Phillips, P.L., Welch, J.B., McMillan, W.O., Skoda, S.R., Scott, M.J., (2016), A transgenic male-only strain of the New World screwworm for an improved control program using the sterile insect technique, *BMC Biology*, 14, 72 <https://doi.org/10.1186/s12915-016-0296-8>
- Daane, K. M., Johnson, M. W., (2010), Olive fruit fly: managing an ancient pest in modern times, *Annual Review of Entomology*, 55, 151-169 <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.54.110807.090553>
- Dermauw, W., Jonckheere, W., Riga, M., Livadaras, I., Vontas, J., Van Leeuwen, T., (2020), Targeted mutagenesis using CRISPR-Cas9 in the chelicerate herbivore *Tetranychus urticae*, *Insect biochemistry and molecular biology*, 120, 103347 <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2020.103347>
- Doench, J., Hartenian, E., Graham, D., Graham, D.B., Tothova, Z., Hegde, M., Smith, I., Sullender, M., Ebert, B.L., Xavier, R.J., Root, D.E., (2014), Rational design of highly active sgRNAs for CRISPR-Cas9-mediated gene inactivation, *Nature Biotechnology*, 32, 1262–1267 <https://doi.org/10.1038/nbt.3026>
- Doudna, J. A., Charpentier, E., (2014), Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9, *Science (New York, N.Y.)*, 346(6213), 1258096 <https://doi.org/10.1126/science.1258096>

- Dyck, V.A., Hendrichs, J., Robinson, A.S., (2005), *Sterile Insect Technique: Principles and practice in area-wide integrated pest management*, Dordrecht, Netherlands: Springer <https://doi.org/10.1007/1-4020-4051-2>
- Economopoulos, A.P., (1972), Sexual competitiveness of γ -ray sterilized males of *Dacus oleae*, Mating frequency of artificially reared and wild females, *Environmental Entomology*, 1, 490-497
- Economopoulos, A.P., (1979), Attraction of *Dacus oleae* (Gmelin) (Diptera Tephritidae) to odour and colour traps, *Zeitschrift fur Angewandte Entomologie*, 88, 90-97
- Economopoulos, A.P., (1980), Application of colour traps for *Dacus oleae* control; olive groves with different degrees of isolation, tree size and canopy density. In: *Integrated Control in Agriculture and Forestry*, K.Russ and H.Berger (Eds) *Proceedings of an IOBC/WPRS International Symposium*, Vienna, 8-12 October, 1979. pp 552-559.
- 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, 44 pp
- 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, e03401 <https://doi.org/10.7554/eLife.03401>
- Feldmann, U., Hendrichs, J., (2002), Integrating the Sterile Insect Technique as a Key Component of Areawide Tsetse and Trypanosomosis Intervention, *PAAT Technical and Scientific Series 3*, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy
- Franz, G., (2005), Genetic sexing strains in Mediterranean fruit fly, an example for other species amenable to large-scale rearing for the sterile insect technique, pp. 427-451, In: V.A. Dyck, J. Hendrichs and A.S. Robinson (eds.), *Sterile insect technique, Principles and practice in area-wide integrated pest management*, Springer, Dordrecht, Netherlands
- Franz, G., Gencheva, E., Kerremans, P., (1994), Improved stability of genetic sex-separation strains for the Mediterranean fruit fly, *Ceratitidis capitata*, *Genome*, 37(1), 72–82 <https://doi.org/10.1139/g94-009>

- Fu, G., Condon, K. C., Epton, M. J., Gong, P., Jin, L., Condon, G. C., Morrison, N. I., Dafa'alla, T. H., Alpey, L., (2007), Female-specific insect lethality engineered using alternative splicing, *Nature biotechnology*, 25(3), 353–357 <https://doi.org/10.1038/nbt1283>
- Gabrieli, P., Gomulski, L.M., Bonomi, A., Siciliano, P., Scolari, F., Franz, G., Jessup, A., Malacrida, A.R., Gasperi, G., (2011), Interchromosomal Duplications on the *Bactrocera oleae* Y Chromosome Imply a Distinct Evolutionary Origin of the Sex Chromosomes Compared to *Drosophila*, *PLoS ONE*, 6(3), e17747 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017747>
- Genc, H., Schetelig, M., Xavier, N., Handler, A., (2016), Germline transformation of the olive fruit fly, *Bactrocera oleae* (Rossi) (Diptera: Tephritidae) with a piggyBac transposon vector, *Turkish Journal of Biology*, 40, 845-855 <https://doi.org/10.3906/biy-1510-55>
- Georghiou, P., Taylor E., (1976), Pesticide resistance as an evolutionary phenomenon, *Proceedings of the 15th International Congress of Entomology*, Washington, D.C., pp. 759-785
- Gilles, A.F., Schinko, J.B., Averof, M., (2015), Efficient CRISPR mediated gene targeting and transgene replacement in the beetle *Tribolium castaneum*, *Development*, 142(16), 2832–2839 <https://doi.org/10.1242/dev.125054>
- Gould, F., Schliekelman, P., (2004), Population genetics of autocidal control and strain replacement, *Annual Review of Entomology*, 49, 193–217 <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.49.061802.123344>
- Gutschner, T., Haemmerle, M., Genovese, G., Draetta, G.F., Chin, L., (2016), Post-translational regulation of Cas9 during G1 enhances homology-directed repair, *Cell Reports*, 14,1555–1566 <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.01.019>
- Hamilton, W.D., (1967), Extraordinary sex ratios. A sex-ratio theory for sex linkage and inbreeding has new implications in cytogenetics and entomology, *Science*, 156(3774), 477–488
- Handler, A.M., O'Brochta, D.A., (2012), Transposable elements for insect transformation, In: Gilbert LI, (ed), *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, (pp. 90-133), London, UK: Academic Press
- Handler, A., Schetelig, M., (2014), Tephritid fruit fly transgenesis and applications, In: M.Q. Benedict (Ed.), *Transgenic Insect: Techniques and Applications*, (pp. 117-137). Wallingford, UK: CABI

- Haniotakis, G.E., (2005), Olive Pest Control: Present Status and Prospects, *Proceedings of the IOBC/WPRS Conference on Integrated Protection of Olive Crops*, Chania, 29-31 May 2003
- Hepdurgun, B., Turanli, T. and Zümreoglu, A., (2009), Control of the olive fruit fly, *Bactrocera oleae*, (Diptera: Tephritidae) through mass trapping and mass releases of the parasitoid *Psytalia concolor* (Hymenoptera: Braconidae) reared on irradiated Mediterranean fruit fly, *Biocontrol Science and Technology*, 19(Suppl. 1), 211–224 <https://doi.org/10.1080/09583150903056926>
- Hickey, W.A., Craig Jr, G.B., (1966), Genetic distortion of sex ratio in a mosquito, *Aedes aegypti*, *Genetics*, 53(6), 1177–1196
- Hiruta, C., Kakui, K., Tollefsen, K.E., Iguchi, T., (2018), Targeted gene disruption by use of CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes in the water flea *Daphnia pulex*, *Genes to Cells*, 23(6), 494–502 <https://doi.org/10.1111/gtc.12589>
- Hoelmer, K.A., Kirk, A.A., Pickett, C.H., Daane, K.M. and Johnson, M.W., (2011), Prospects for improving biological control of olive fruit fly, *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae), with introduced parasitoids (Hymenoptera), *Biocontrol Science and Technology*, 21(9), 1005–1025 <https://doi.org/10.1080/09583157.2011.594951>
- Hu, Z., Shi, Z., Guo, X., Jiang, B., Wang, G., Luo, D., Chen, Y., Zhu, Y. S., (2018), Ligase IV inhibitor SCR7 enhances gene editing directed by CRISPR-Cas9 and ssODN in human cancer cells, *Cell & bioscience*, 8, 12 <https://doi.org/10.1186/s13578-018-0200-z>
- Huang, Y., Liu, Z., Rong, Y.S., (2016), Genome editing: from Drosophila to non-model insects and beyond, *Journal of Genetics and Genomics*, 43, 263–272 <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2016.04.007>
- Kampouraki, A., Stavrakaki, M., Karataraki, A., Katsikogiannis, G., Pitika, E., Varikou, K., Vlachaki, A., Chrysargyris, A., Malandraki, E., Sidiropoulos, N., Paraskevopoulos, A., Gkilpathi, D., Roditakis, E., Vontas, J., (2018), Recent evolution and operational impact of insecticide resistance in olive fruit fly *Bactrocera oleae* populations from Greece, *Journal of Pest Science*, 91, 1429–1439 <https://doi.org/10.1007/s10340-018-1007-8>
- Kim, H., & Kim, J. S., (2014), A guide to genome engineering with programmable nucleases, *Nature reviews. Genetics*, 15(5), 321–334 <https://doi.org/10.1038/nrg3686>

- Knipling, E.F., (1955), Possibilities of insect control or eradication through the use of sexually sterile males, *Journal of Economic Entomology*, 48(4), 459–462 <https://doi.org/10.1093/jee/48.4.459>
- Koidou, V., Denecke, S., Ioannidis, P., Vlatakis, I., Livadaras, I., Vontas, J., (2020), Efficient genome editing in the olive fruit fly, *Bactrocera oleae*, *Insect molecular biology*, 29(4), 363–372 <https://doi.org/10.1111/imb.12640>
- Kwart, D., Paquet, D., Teo, S., Tessier-Lavigne, M., (2017), Precise and efficient scarless genome editing in stem cells using CORRECT, *Nature protocols*, 12(2), 329–354 <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.171>
- Li, J., Handler, A.M., (2019), CRISPR/Cas9-mediated gene editing in an exogenous transgene and an endogenous sex determination gene in the Caribbean fruit fly, *Anastrepha suspensa*, *Gene*, 691, 160–166 <https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.12.055>
- Li, F., Wantuch, H.A., Linger, R.J., Belikoff, E.J., Scott, M.J., (2014), Transgenic sexing system for genetic control of the Australian sheep blow fly *Lucilia cuprina*, *Insect biochemistry and molecular biology*, 51, 80–88 <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2014.06.001>
- Li, X., Fan, D., Zhang, W., et al., (2015), Outbred genome sequencing and CRISPR/Cas9 gene editing in butterflies, *Nature Communications*, 6, 8212 <https://doi.org/10.1038/ncomms9212>
- Lin, S., Staahl, B. T., Alla, R. K., Doudna, J. A., (2014), Enhanced homology-directed human genome engineering by controlled timing of CRISPR/Cas9 delivery, *eLife*, 3, e04766 <https://doi.org/10.7554/eLife.04766>
- Manousis, T., Moore, N.F., (1987), Control of *Dacus oleae*, a major pest of olives, *Insect Science and Its Application*, 8, 1–9 <https://doi.org/10.1017/S1742758400006858>
- Maruyama, T., Dougan, S. K., Truttmann, M. C., Bilate, A. M., Ingram, J. R., Ploegh, H. L., (2015), Increasing the efficiency of precise genome editing with CRISPR-Cas9 by inhibition of nonhomologous end joining, *Nature biotechnology*, 33(5), 538–542 <https://doi.org/10.1038/nbt.3190>
- Mavragani-Tsipidou, P., (2002), Genetic and cytogenetic analysis of the olive fruit fly *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae), *Genetica*, 116(1), 45–57 <https://doi.org/10.1023/a:1020907624816>

- Mavragani-Tsipidou, P., Karamanlidou, G., Zacharopoulou, A., Koliais, S., Kastritsis, C.D., (1992), Mitotic and polytene chromosome analysis in *Dacus oleae* (Diptera: Tephritidae), *Genome*, 35, 373–378 <https://doi.org/10.1139/g92-056>
- Mazomenos, B., Pantazi-Mazomenou, A., Stefanou, D., (2002), Attract and kill of the olive fruit fly *Bactrocera oleae* in Greece as a part of an integrated control system, *IOBC/WPRS Bulletin*, 25
- McFarlane, G.R., Whitelaw, C.B.A., Lillico, S.G., (2018), CRISPR-Based Gene Drives for Pest Control, *Trends in Biotechnology*, 36(2), 130-133 <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2017.10.001>
- Meccariello, A., Monti, S. M., Romanelli, A., Colonna, R., Primo, P., Inghilterra, M. G., ... Chiarore, A., (2017), Highly efficient DNA-free gene disruption in the agricultural pest *Ceratitis capitata* by CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein complexes, *Scientific Reports*, 7(1),10061 <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10347-5>
- Meccariello, A., Salvemini, M., Primo, P., Hall, B., Koskinioti, P., Dalíková, M., ... Saccone, G., (2019), Maleness-on-the-Y (MoY) orchestrates male sex determination in major agricultural fruit fly pests, *Science*, 365(6460), 1457–1460 <https://doi.org/10.1126/science.aax1318>
- Meccariello, A., Tsoumani, K.T., Gravina, A., Primo, P., Buonanno, M., Mathiopoulos, K.D., Saccone, G., (2020), Targeted somatic mutagenesis through CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes in the olive fruit fly, *Bactrocera oleae*, *Archives of Insect Biochemecology and Physiology*, 104(2), e21667 <https://doi.org/10.1002/arch.21667>
- Michelakis S.E., Neuenschwander, P., (1983), Estimates of the crop losses caused by *Dacus oleae* (Gmel.) (Diptera: Tephritidae) in Crete, Greece, In: Fruit flies of economic importance, *Proceedings of the CEC/IOBC International Symposium*, Athens, Greece, 16-19 November 1982 [ed. by Cavalloro, R.\Cavalloro, R.]. Rotterdam, Netherlands: A.A. Balkema, 603-611
- Montiel, A.B., Jones, O., (2002), Alternative methods for controlling the olive fly, *Bactrocera oleae*, involving semiochemicals, *Bulletin OILB/SROP* [IOBC/WPRS Working Group 'Use of Pheromones and Other Semiochemicals in Integrated Control'. Pheromones and other biological techniques for insect control in orchards and vineyards. Proceedings of the working group meeting, Samos, Greece, September 25-29, 2000.], 25(9), 147-155

- Nardi, F., Carapelli, A., Dallai, R., Roderick, G.K., Frati, F., (2005), Population structure and colonization history of the olive fly, *Bactrocera oleae* (Diptera, Tephritidae), *Molecular Ecology*, 14(9), 2729-2738 <http://www.blackwell-synergy.com/servlet/useragent?func=showIssues&code=mec>
- Neuenschwander, P., Michelakis, S., (1981), Olive fruit drop caused by *Dacus oleae* (Gmel.) (Dipt. Tephritidae), *Zeitschrift fur Angewandte Entomologie*, 91, 193-205 <https://doi.org/doi:10.1111/j.1439-0418.1981.tb04467.x>
- Ogaugwu, C.E., Schetelig, M.F., Wimmer, E.A., (2013), Transgenic sexing system for *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) based on female-specific embryonic lethality, *Insect biochemistry and molecular biology*, 43, 1–8 <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2012.10.010>
- Ozaki, E.T., Kobayashi, R.M., (1982), Effects of duration and intensity of sifting pupae of various ages on adult eclosion and flight capability of the Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae), *Journal of Economic Entomology*, 75, 773–776
- Paquet, D., Kwart, D., Chen, A., Sproul, A., Jacob, S., Teo, S., Olsen, K.M., Gregg, A., Noggle, S., Tessier-Lavigne, M., (2016), Efficient introduction of specific homozygous and heterozygous mutations using CRISPR/Cas9, *Nature*, 533, 125–129 <https://doi.org/10.1038/nature17664>
- Papathanos, P.A., Windbichler, N., Akbari, O.S. (2014), Sex ratio manipulation for insect population control, In: M.Q. Benedict (Ed.) *Transgenic Insects: Techniques and Applications* (pp. 83–100). Wallingford, UK: CABI
- Petacchi, R., Rizzi, I. and Guidotti, D., (2003), The “lure and kill” technique in *Bactrocera oleae* (Gmel.) control: effectiveness indices and suitability of the technique in area-wide experimental trials, *International Journal of Pest Management*, 49(4), 305–311 <https://doi.org/10.1080/0967087031000155648>
- Ponti, L., Cossu, Q. A., Gutierrez, A. P., (2009), Climate warming effects on the *Olea europaea*-*Bactrocera oleae* system in Mediterranean islands: Sardinia as an example, *Global Change Biology*, 15(12), 2874-2884 <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2009.01938.x>
- Ran, F.A., Hsu, P.D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D.A., Zhang, F., (2013), Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system, *Nature Protocols*, 8, 2281–2308 <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.143>
- Reid, W., O’Brochta, D. A., (2016), Applications of genome editing in insects, *Current Opinion in Insect Science*, 13, 43–54 <https://doi.org/10.1016/j.cois.2015.11.001>

- Rendón, P., McInnis, D., Lance, D., Stewart, J., (2004), Medfly (Diptera: Tephritidae) genetic sexing: large-scale field comparison of males-only and bisexual sterile fly releases in Guatemala, *Journal of Economic Entomology*, 97(5), 1547-1553 <https://doi.org/10.1603/0022-0493-97.5.1547>
- Rice, R.E., Phillips, P.A., Stewart-Leslie, J., Sibbett, G.S., (2003), Olive fruit fly populations measured in Central and Southern California, *California Agriculture*, 57(4), 122-127 <https://doi.org/10.3733/ca.v057n04p122>
- Robinson, A.S., (2002), Mutations and their use in insect control, *Mutation research*, 511(2), 113–132 [https://doi.org/10.1016/s1383-5742\(02\)00006-6](https://doi.org/10.1016/s1383-5742(02)00006-6)
- Robinson, A.S., Van Heemert, C., (1982), *Ceratitis capitata*—a suitable case for genetic sexing, *Genetica*, 58, 229–237 <https://doi.org/10.1007/BF00128017>
- Roditakis, E., Grispuou, M., Staurakaki, M., Roditakis, N.E., Livadaras, G., Vontas, J., Nauen, R., Godley, N., Filippou, E., Manousakis, E., (2015), A Novel approach to evaluate efficacy of baited insecticide applications for the olive fruit fly control, *IOBC/wprs WG Integrated Protection of Olive Crops*, Kalamata, Greece, pp. 65–66
- Rössler, Y., The genetics of the Mediterranean fruit fly: a “white pupae” mutant, (1979), *Annals of the Entomological Society of America*, 72, 583-585
- Sackton, T.B., Montenegro, H., Hartl, D.L. and Lemos, B., (2011), Interspecific Y chromosome introgressions disrupt testis-specific gene expression and male reproductive phenotypes in *Drosophila*, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(41), 17046–17051
- Sagri, E., Reczko, M., Gregoriou, M.E., Tsoumani, K.T., Zygouridis, N.E., Salpea, K.D., Zalom, F.G., Ragoussis, J., Mathiopoulos, K.D., (2014), Olive fly transcriptomics analysis implicates energy metabolism genes in spinosad resistance, *BMC Genomics*, 15, 715–733 <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-714>
- Schetelig, M.F., Handler, A.M. (2012), A transgenic embryonic sexing system for *Anastrepha suspensa* (Diptera: Tephritidae), *Insect biochemistry and molecular biology*, 42(10), 790–795 <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2012.07.007>
- Schetelig, M. F., Handler, A. M., (2013), A Functional Comparison of the 3xP3 Promoter by Recombinase-Mediated Cassette Exchange in *Drosophila* and a Tephritid Fly, *Anastrepha suspensa*, *G3 (Bethesda, Md.)*, 3(4), 687–693 <https://doi.org/10.1534/g3.112.005488>

- Schetelig, M.F., Targovska, A., Meza, J.S., Bourtzis, K., Handler, A.M., (2016), Tetracycline suppressible female lethality and sterility in the Mexican fruit fly, *Anastrepha ludens*, *Insect Molecular Biology*, 25, 500–508 <https://doi.org/10.1111/imb.12238>
- Scolari, F., Schetelig, M. F., Bertin, S., Malacrida, A. R., Gasperi, G., Wimmer, E. A. (2008), Fluorescent sperm marking to improve the fight against the pest insect *Ceratitidis capitata* (Wiedemann; Diptera: Tephritidae), *New Biotechnology*, 25(1), 76–84 <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2008.02.001>
- Sharaf, N.S., (1980), Life history of the olive fruit fly, *Dacus oleae* Gmel. (Diptera: Tephritidae), and its damage to olive fruits in Tripolitania, *Zeitschrift für Angewandte Entomologie*, 89, 390-400 <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.1980.tb03480.x>
- Shrivastav, M., De Haro, L. P., Nickoloff, J. A., (2008), Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice, *Cell research*, 18(1), 134–147 <https://doi.org/10.1038/cr.2007.111>
- Sim, S. B., Kauwe, A., Ruano, R. E., Rendon, P., Geib, S. M., (2019), The ABCs of CRISPR in Tephritidae: Developing methods for inducing heritable mutations in the genera *Anastrepha*, *Bactrocera* and *Ceratitidis*, *Insect Molecular Biology*, 28(2), 277–289 <https://doi.org/10.1111/imb.12550>
- Sinkins, S.P., Gould, F. (2006) Gene drive systems for insect disease vectors, *Nature Reviews. Genetics*, 7(6), 427–435 <https://doi.org/10.1038/nrg1870>
- Starz-Gaiano, M., Cho, N.K., Forbes, A. and Lehmann, R., (2001), Spatially restricted activity of a *Drosophila* lipid phosphatase guides migrating germ cells, *Development*, 128(6), 983–991
- Szabad, J., Bellen, H.J., Venken, K.J.T., (2012), An assay to detect in vivo Y chromosome loss in *Drosophila* wing disc cells, *G3: Genes - Genomes - Genetics*, 2(9), 1095–1102 <https://doi.org/10.1534/g3.112.002899>
- Tsai, S. Q., Zheng, Z., Nguyen, N. T., Liebers, M., Topkar, V. V., Thapar, V., Wyvekens, N., Khayter, C., Iafrate, A. J., Le, L. P., Aryee, M. J., Joung, J. K., (2015), GUIDE-seq enables genome-wide profiling of off-target cleavage by CRISPR-Cas nucleases, *Nature biotechnology*, 33(2), 187–197 <https://doi.org/10.1038/nbt.3117>

- Tzanakakis, M.E., (2006), *Insects and Mites Feeding on Olive: Distribution, Importance, Habits, Seasonal Development and Dormancy*, Leiden: Brill Acad. Publ. 182 pp.
- Vontas, J., Hernández-Crespo, P., Margaritopoulos, J., Ortego, F., Feng, H.T., Mathiopoulos, K., Hsu, J.C., (2011), Insecticide resistance in Tephritid flies, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 100, 199-205
<https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2011.04.004>
- Vontas, J., Kioulos, N., Pavlidi, N., Morou, E., della Torre, A., Ranson, H., (2012), Insecticide resistance in the major dengue vector *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 104, 126–131
<https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2012.05.008>
- Wang, T., Wei, J. J., Sabatini, D. M., Lander, E. S., (2014), Genetic screens in human cells using the CRISPR-Cas9 system, *Science (New York, N.Y.)*, 343(6166), 80–84
<https://doi.org/10.1126/science.1246981>
- Yan, Y., Scott, M.J., (2015), A transgenic embryonic sexing system for the Australian sheep blow fly *Lucilia cuprina*, *Scientific Reports*, 5, 16090
<https://doi.org/10.1038/srep16090>
- Zetsche, B., Gootenberg, J. S., Abudayyeh, O. O., Slaymaker, I. M., Makarova, K. S., Essletzbichler, P., Volz, S. E., Joung, J., van der Oost, J., Regev, A., Koonin, E. V., & Zhang, F., (2015), Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system, *Cell*, 163(3), 759–771
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.09.038>
- Zhang, P., Spradling, A.C., (1994), Insertional mutagenesis of *Drosophila* heterochromatin with single P elements, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(9), 3539–3543
- Zhang, P., Stankiewicz, R.L., (1998), Y-linked male sterile mutations induced by P element in *Drosophila melanogaster*, *Genetics*, 150(2), 735–744
- Zhao, S., Xing, Z., Liu, Z., Liu, Y., Liu, X., Chen, Z., ... Yan, R., (2019), Efficient somatic and germline genome engineering of *Bactrocera dorsalis* by the CRISPR/Cas9 system, *Pest Management Science*, 75(7), 1921–1932
<https://doi.org/10.1002/ps.5305>
- Zheng, W., Li, Q., Sun, H., Ali, M. W., & Zhang, H., (2019), Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/CRISPR-associated 9-mediated mutagenesis of the multiple edematous wings gene induces muscle

weakness and flightlessness in *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae),
Insect Molecular Biology, 28(2), 222–234 <https://doi.org/10.1111/imb.12540>