



Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας  
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας  
Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής

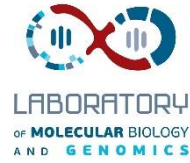
Ιωάννα Ζουροπούλου

Διερεύνηση γονιδίων-στόχων για τη δημιουργία RNAi-  
βασισμένων εντομοκτόνων για τη μύγα της  
Μεσογείου, *Ceratitis capitata*

Searching for target genes for the creation of RNAi-  
based insecticides for the Mediterranean fruit  
fly *Ceratitis capitata*



Λάρισα, 2023



Η παρούσα διπλωματική εργασία διεξήχθη στο Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής, του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, στη Λάρισα, από τον Φεβρουάριο του 2022 έως τον Δεκέμβριο του 2022 και με επιβλέποντα τον Καθηγητή Ματθιόπουλο Κωνσταντίνο.

### Τριμελής επιτροπή

**Ματθιόπουλος Κωνσταντίνος**, Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας

**Παπαδοπούλου Καλλιόπη**, Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών

**Δαλακούρας Αθανάσιος**, Ερευνητής Μοριακής Γενετικής και Αναπαραγωγής Φυτών

# Περιεχόμενα

Ευχαριστίες .....	4
Περίληψη .....	5
Abstract .....	6
Εισαγωγή.....	7
Μηχανισμός RNAi .....	7
Εξωγενής ενεργοποίηση siRNA μονοπατιού.....	9
Σίγηση γονιδίων επαγόμενη από τον ξενιστή (host-induced gene silencing, HIGS).....	10
Σίγηση γονιδίων επαγόμενη από ψεκασμό (spray-induced gene silencing, SIGS).....	11
Έγχυση στον κορμό (Trunk injection) .....	12
Πρόσληψη μορίων dsRNA.....	12
Παράγοντες που επηρεάζουν την πρόσληψη μορίων dsRNA .....	13
Μύγα της Μεσογείου, <i>Ceratitidis capitata</i> .....	15
Επιλογή γονιδίων-στόχων.....	17
Σκοπός .....	21
Υλικά και Μέθοδοι .....	22
Αλληλουχίες εκκινητών .....	22
Ποσοτικοποίηση νουκλεϊκών οξέων (DNA, RNA) .....	23
Απομόνωση ολικού RNA και παραγωγή cDNA.....	23
Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.....	25
Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης .....	27
Ανάκτηση DNA από πήκτωμα αγαρόζης.....	27
Σύνθεση δίκλωνων μορίων RNA-T7 μεταγραφής .....	28
Χορήγηση dsRNA μέσω εμφάνισης.....	29
Ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (qPCR).....	30
Εκτροφή εργαστηριακού πληθυσμού <i>Ceratitidis capitata</i> .....	32
Αποτελέσματα .....	33
Σχεδιασμός εκκινητών.....	33
Έκφραση γονιδίων-στόχων .....	34
Ενίσχυση προϊόντων PCR .....	35
Παραγωγή δίκλωνων μορίων RNA.....	36
Σχετική κανονικοποιημένη έκφραση γονιδίων .....	36
Συζήτηση .....	40
Βιβλιογραφία.....	43

## Ευχαριστίες

Για την επιτυχή διεξαγωγή της παρούσας διπλωματικής εργασίας, θα ήθελα αρχικά να ευχαριστήσω τον επιβλέποντά μου, καθηγητή κ. Κωνσταντίνο Ματθιόπουλο για τη συνεχή στήριξη και τη διαπαιδαγώγησή του. Θεωρώ ότι έβαλε το πρώτο λιθαράκι για την καλλιέργεια της επιστημονικής μου σκέψης και της επιμονής μου στην επίλυση προβλημάτων. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω και τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς επιτροπής μου, την καθηγήτρια κ. Καλλιόπη Παπαδοπούλου και τον ερευνητή κ. Αθανάσιο Δαλακούρα που ήταν παρόντες, όταν τους χρειάστηκα. Οφείλω ένα τεράστιο ευχαριστώ στην υποψήφια Διδάκτορα Αντωνία Σπανομήτρου, που με εκπαίδευσε και με βοήθησε καθ' όλη τη διάρκεια της διπλωματικής μου. Ευχαριστώ και τους υπόλοιπους υποψήφιους διδάκτορες του εργαστηρίου, Δημήτρη, Λευκή, Ελένη, και Μυρτώ που ήταν διαθέσιμοι να αφιερώσουν τον χρόνο τους για τις απορίες μου. Μαζί με αυτούς είμαι ευγνώμων που γνωρίστηκα και συνεργάστηκα με υπέροχους ανθρώπους, που δίχως αυτούς δε θα ήταν τίποτα το ίδιο-Βασιλική, Κλεοπάτρα, Κωστάκης, Μαριλένα, Ξένια, Χρήστος, Ηρακλής, Άντζελα, Βαρβάρα. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου για τη συνεχή στήριξή τους-Νάντια και Μίλτος.

## Περίληψη

Η παρεμβολή RNA (RNA interference, RNAi) αποτελεί έναν μηχανισμό ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης, μέσω της ενζυματικής υδρόλυσης μεταγράφων, με βάση τη συμπληρωματικότητα μικρών μορίων RNA με αυτά. Γνωστός τριάντα και πλέον χρόνια, διαθέτει ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών σε διάφορους τομείς συμπεριλαμβανομένου αυτού της αγροδιατροφής. Η ειδοειδικότητα που μπορεί να προσφέρει λόγω του, μοριακής βάσης, μηχανισμού δράσης του, τον καθιστά ιδανικό για την καταπολέμηση παρασίτων, τόσο παθογόνων μικροοργανισμών όσο και εντόμων. Τα μόρια RNA μπορούν να χορηγούνται στα έντομα που προκαλούν απώλειες σε οικονομικής και διατροφικής σημασίας καλλιέργειες με διάφορους τρόπους. Μερικοί από αυτούς είναι: η γενετική τροποποίηση των καλλιεργήσιμων φυτών ή των μικροοργανισμών που συμβιώνουν με αυτά, ο ψεκάσμος, και η δημιουργία σπών σε κορμούς δέντρων και η έγχυση υγρού που τα περιέχει μέσα σε αυτές. Η επιλογή της μεθόδου, εξαρτάται από τον κύκλο ζωής και τις διατροφικές συνήθειες του εντόμου-παρασίτου, ούτως ώστε να έρχεται σε άμεση επαφή με το RNA εντομοκτόνο. Στην περίπτωση των φρουτόμυγων της οικογένειας Tephritidae, στην οποία ανήκει και η μύγα της Μεσογείου *Ceratitis capitata*, είναι επιθυμητή η αναστολή της ανάπτυξης των προνυμφών που προκύπτουν από τα αυγά που ωοαποθέτει η θηλυκή μύγα στο σαρκώδες τμήμα των καρπών των δέντρων, που σε φυσιολογικές συνθήκες, καταναλώνοντάς το, οι καρποί καταστρέφονται και προκαλούνται στο δέντρο δευτερογενείς μολύνσεις λόγω του τρυπήματος από τον ωοαποθέτη. Για να πραγματοποιηθεί αυτό, χρειάζεται να βρεθούν αρχικά γονίδια-στόχοι των νεαρών προνυμφών που θα προσδίδουν τον επιθυμητό φαινότυπο, ύστερα από αποσιώπηση των μεταγράφων τους. Στην παρούσα διπλωματική εργασία, επιλέχθηκαν επτά γονίδια στόχοι (RPL19, CHM4B, CHS, V-ATPase, UAP, ETH, ETH-RA), και στοχεύθηκαν τέσσερα από αυτά (RPL19, CHM4B, ETH-RA, V-ATPase) για να διαπιστωθεί η μείωση της έκφρασής τους μέσω της μεθόδου της εμβάπτισης. Η μέθοδος αυτή επιτρέπει τη χορήγηση μορίων RNA μέσω του πεπτικού σωλήνα στις προνύμφες του εντόμου και με ορισμένη συγκέντρωση. Τα αποτελέσματα έδειξαν αποτελεσματική μείωση της έκφρασης για τα τρία από τα τέσσερα γονίδια-στόχους (CHM4B, ETH-RA, V-ATPase), και συνεπώς αποτελεσματική απορρόφηση δίκλωνων μορίων RNA από τα κύτταρα του εντέρου της *Ceratitis capitata* και συστημική μεταφορά τους στους υπόλοιπους ιστούς του. Εφόσον επιτευχθεί η εμφάνιση του επιθυμητού φαινοτύπου μέσω σίγησης των επιλεγθέντων γονιδίων στόχων, μπορεί να ακολουθήσει εισαγωγή, από σπές στους κορμούς των δέντρων, μικρών ειδοειδικών RNA με μία ή δύο δομές φουρκέτας και με τη βοήθεια ειδικών νανομεταφορέων που εφόσον φτάσουν επιτυχώς στους καρπούς, θα μπορούν να προκαλέσουν αναστολή της ανάπτυξης των προνυμφών, και προστασία των καλλιεργειών.

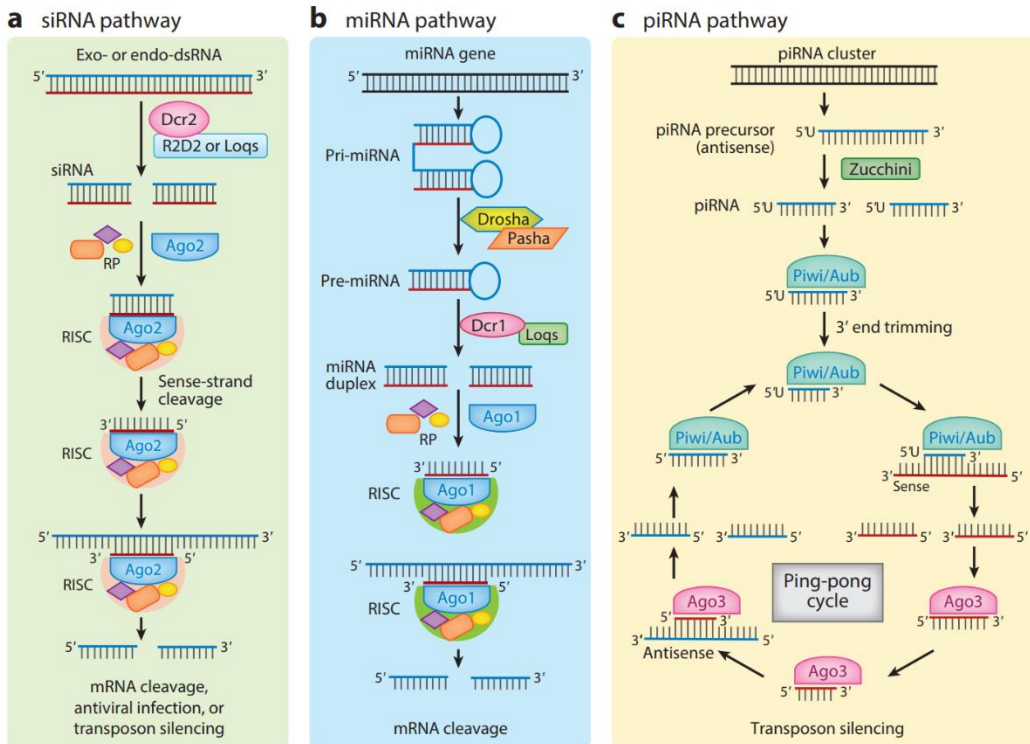
## Abstract

RNA interference (RNAi) is a mechanism that regulates the expression of genes via enzymatic hydrolysis of their transcripts, based on the complementarity of small RNA molecules to them. As it has been identified for at least three decades, this mechanism has a wide range of applications, in many different fields, including agronutrition. The species-specificity that it provides, due to the molecular basis of its action, makes it quite appropriate for pest management, either of pathogens or of insect pests. RNA molecules can be applied to insects that cause losses to economically and dietary important cultivates, in many ways. Some of them are: genetic modification of cultivated plants or plants' symbionts, spraying, and trunk injection on trees. Which one is going to be selected depends on the life cycle of the insect pest and its dietary habits, aiming to be in contact with the RNA insecticide. In the case of Tephritidae fruit flies, in which *Ceratitis capitata* is included, the aim is the inhibition of larval growth that come from the eggs that the adult female fly oviposits in the flesh of the fruits. Feeding habits of the young larvae and infections that occur in the site of oviposition are the main causes of fruit damages from Tephritid infestations. In order to achieve this, there is a need of finding candidate target genes in larvae, whose silencing will provide the desirable phenotype. In the present thesis, seven genes were chosen as candidate targets (RPL19, CHM4B, CHS, V-ATPase, UAP, ETH, ETH-RA), and four of them were experimentally targeted (RPL19, CHM4B, ETH-RA, V-ATPase) to monitor if their expression is decreasing via soaking with dsRNA against them. This treatment allows the oral administration of specific concentrations of RNA molecules in larvae. The results indicated that dsRNA against the three of the four target genes (CHM4B, ETH-RA, V-ATPase) reduced their expression levels, which means that double strand RNA molecules are effectively absorbed by the midgut cells of *Ceratitis capitata*, and their systemic spread in other tissues is successfully accomplished. Provided that the desired phenotype results through silencing of the conclusive target genes, trunk injection of small, species specific RNAs, with one or two stem-loop structures, delivered by nanotransporters, may be able to interrupt in larval growth, and protect the cultivates, as long as they reach the fruit.

# Εισαγωγή

## Μηχανισμός RNAi

Ο μηχανισμός της παρεμβολής RNA (RNA interference ή RNAi) αποτελεί έναν μηχανισμό ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης [1]. Η δράση του παρατηρήθηκε για πρώτη φορά το 1990 στα άνθη του φυτού της πετούνιας [2], ενώ οκτώ χρόνια αργότερα περιγράφηκε στον νηματώδη *Ceanorhabditis elegans* [3]. Το φαινόμενο της συγκαταστολής, όπως είχε ονομαστεί αρχικά, είχε παρατηρηθεί νωρίς και στη μύγα *Drosophila melanogaster* [4], και περιγράφηκε αναλυτικά από τους Bhadra και τους συνεργάτες τους το 2002 [5]. Έκτοτε, έχει βρεθεί ότι ο μηχανισμός RNAi είναι λειτουργικός και ιδιαίτερα συντηρημένος στα περισσότερα ευκαρυωτικά κύτταρα [6]. Η λειτουργία του αφορά την αποσίπηση της έκφρασης γονιδίων-στόχων, με βάση τη συμπληρωματικότητα μικρών μορίων RNA με τα μετάγραφα αυτών των γονιδίων [3]. Στα έντομα, τα μικρά αυτά μόρια RNA χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες: τα microRNA (miRNAs), τα small interfering RNA (siRNAs) και τα P-element induced wimpy testis (Piwi)-interacting RNA (piRNAs) [Εικόνα 1] [7].

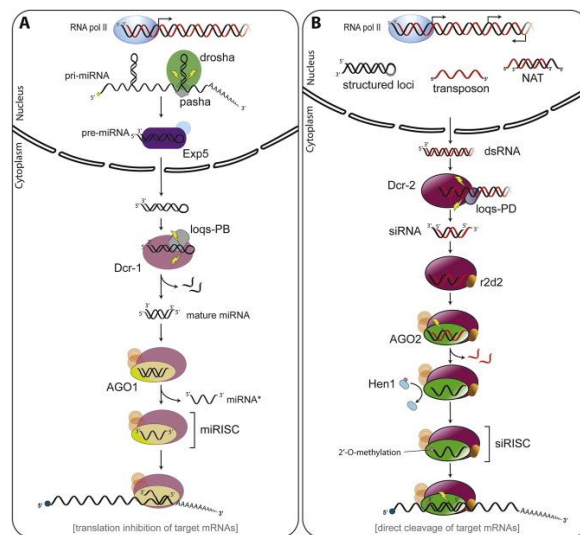


Εικόνα 1: Μηχανισμός RNAi στα έντομα. A) siRNA μονοπάτι, B) miRNA μονοπάτι, C) piRNA μονοπάτι [7].

Τα piwiRNAs, ανακαλύφθηκαν σε κύτταρα γαμετικής σειράς στη μύγα *Drosophila melanogaster* [8] και υπάρχουν μόνο στα ζώα [9]. Αποτελούν ξεχωριστή κατηγορία, αρχικά διότι τα πρόδρομα μετάγραφα τους προκύπτουν από συστοιχίες piRNA στο γονιδίωμα (piRNA clusters), και επιπλέον γιατί το σήμα ενισχύεται μέσω του κύκλου ping-pong [Εικόνα 1C]. Οι πρόδρομες συστοιχίες piRNAs κόβονται από την ενδονουκλεάση Zucchini σε piRNAs μήκους 23-36 νουκλεοτιδίων [7] τα οποία στη συνέχεια φορτώνονται στις πρωτεΐνες Piwi/Aub οδηγώντας στην υδρόλυση του συμπληρωματικού RNA στόχου. Η ενίσχυση του σήματος πραγματοποιείται από τους ίδιους τους στόχους που κόπηκαν σε μικρότερα τμήματα, και οι οποίοι φορτωμένοι στην πρωτεΐνη Ago3 υδρολύουν τα αντινοσηματικά

μετάγραφα των RNA στόχων, από τα οποία προκύπτουν ξανά τα αρχικά piRNAs, που θα συνεχίσουν την ίδια πορεία [Εικόνα 1C]. Οι πρωτεΐνες Piwi εντοπίζονται κυρίως σε αναπαραγωγικές κυτταρικές σειρές, όπου το μονοπάτι δρα έχοντας ως βασική λειτουργία τη σίγηση των μεταθετών στοιχείων, εξασφαλίζοντας έτσι την ακεραιότητα του DNA στα κύτταρα αυτά [10], [11].

Τα άλλα δύο μονοπάτια, διαφέρουν από αυτό των piRNAs, αλλά εμφανίζουν πολλά κοινά χαρακτηριστικά μεταξύ τους [Εικόνα 1A,B]. Και στα δύο, όπως διακρίνεται και στην εικόνα, γίνεται επεξεργασία από ίδιου τύπου ένζυμα, όπως είναι η ενδοριβονουκλεάση Dicer, το πολύ-πρωτεϊνικό σύμπλοκο σίγησης επαγόμενο από RNA ή σύμπλοκο RISC (RNAi induced silencing complex) και η πρωτεΐνη αργοναύτης, μια ριβονουκλεάση βασικό μέλος του RISC. Στα έντομα, όπως και σε πολλές άλλες ομοταξίες, το μονόκλωνο RNA που προκύπτει (siRNA ή miRNA) είναι συμπληρωματικό και αντιπαράλληλο με το mRNA στόχο, και οδηγεί είτε σε μείωση της έκφρασής του μεταμεταγραφικά μέσω αποικοδόμησης ή μέσω μπλοκαρίσματος της μετάφρασης [12], [13], είτε στην παρεμπόδιση της μεταγραφής του μέσω αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης στη θέση του γονιδιώματος στην οποία βρίσκεται το γονίδιο που κωδικοποιεί για αυτό [14], [15]. Η διαφορά των δύο μονοπατιών έγκειται στην αρχική μορφή του δίκλωνου RNA, την αρχική πηγή του καθώς και στις διαφορετικές ισομορφές των ενζύμων που συμμετέχουν στα διάφορα στάδια του μονοπατιού.



Εικόνα 2: Μονοπάτια miRNA & siRNA στη μύγα *Drosophila melanogaster*

πολυκιστρονικά [18], [19]. Από την άλλη, τα πρόδρομα siRNA δε σχηματίζουν δομές φουρκέτας, αλλά προκύπτουν από τη μετάγραφή και των δύο αντιπαράλληλων κλώνων ενός γονιδίου (NATs: natural antisense transcripts), μέσω της RNA πολυμεράσης II σχηματίζοντας πλήρως συμπληρωματικά, δίκλινα RNA [20]. Επίσης, μπορεί να προέρχονται είτε από cis γενετικά στοιχεία, που εμφανίζουν συμπληρωματικότητα στο 3' άκρο τους [21] είτε από μετάγραφα trans γενετικών στοιχείων που υβριδίζουν κατά το μήκος τους, παραδείγματος χάριν ένα γονίδιο με το αντίστοιχό του ψευδογονίδιο [22]. Στη μύγα *Drosophila melanogaster* έχει βρεθεί ότι το μεγαλύτερο ποσοστό των ενδογενώς παραγόμενων siRNA, είναι προϊόντα μετάγραφης μεταθετών στοιχείων, εξασφαλίζοντας την ακεραιότητα του γονιδιώματος και στα σωματικά κύτταρα [23]. Όσον αφορά τις δομές φουρκέτας των πρόδρομων miRNA (Pri-miRNAs), πραγματοποιείται η επεξεργασία τους στον πυρήνα από το ένζυμο Drosha [Εικόνες 1&2], μια ριβονουκλεάση η οποία αφαιρεί τα προεξέχοντα μονόκλινα άκρα [24]. Έτσι προκύπτουν τα Pre-miRNAs, τα οποία έτοιμα πλέον εξέρχονται από τον πυρήνα με την

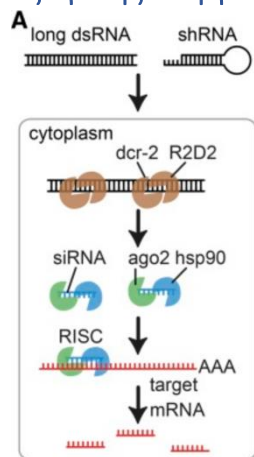
Τα miRNA μεταγράφονται ενδογενώς από το γονιδίωμα από την RNA πολυμεράση II, και παράγουν μόρια RNA που έχουν συμπληρωματικότητα στα άκρα τους, δημιουργώντας έτσι δομές φουρκέτας. Αυτό συμβαίνει γιατί τα γονίδια που κωδικοποιούν για αυτά περιέχουν ανάστροφες επαναλήψεις [16] [Εικόνα 2 [17]]. Τα miRNA μετάγραφα μπορούν να παράγονται ανεξάρτητα, από δικούς τους υποκινητές, ή να βρίσκονται στην αλληλουχία των ιντρονίων άλλων γονιδίων, όπου μεταγράφονται μαζί με αυτά, ενώ στη περίπτωση της *Drosophila melanogaster* σχεδόν το μισό πλήθος των miRNA γονιδίων μεταγράφεται



βοήθεια των εξορτινών για να συνεχιστεί το μονοπάτι [25]. Τόσο τα Pre-miRNA όσο και τα siRNA επεξεργάζονται από την ενδοριβονουκλεάση Dicer (Dcr1 και Dcr2 αντίστοιχα) και τελικά προκύπτουν μικρά δίκλινα μόρια RNA μήκους 19-24 νουκλεοτιδίων [7]. Τα μόρια αυτά παραλαμβάνονται από τις πρωτεΐνες αργοναύτες (Ago) του συμπλόκου RISC όπου επιλέγεται η αλυσίδα οδηγός η οποία θα προσδεθεί στο συμπληρωματική αλληλουχία του mRNA που στοχεύεται για σίγηση [26] [Εικόνα 1Α,Β]. Τα miRNAs φορτώνονται στην πρωτεΐνη Ago1, και υβριδίζει συνήθως μόνο ένα τμήμα τους με τα mRNA στόχους τους, οδηγώντας σε διακοπή της μετάφρασης [16]. Από την άλλη τα siRNAs τα παραλαμβάνει η Ago2, είναι πλήρως συμπληρωματικά με τους στόχους τους και προκαλούν την αποικοδόμησή τους, μέσω ενζυματικής υδρόλυσης [20].

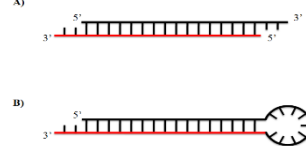
Οι φυσιολογικές λειτουργίες του μηχανισμού RNAi στα έντομα, είναι η ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων που ελέγχουν την ανάπτυξη και την κυτταρική διαφοροποίηση, η προστασία από τον πολλαπλασιασμό των μεταθετών στοιχείων και των ιικών γονιδιωμάτων, και η τροποποίηση της δομής της χρωματίνης [27]–[31].

### Εξωγενής ενεργοποίηση siRNA μονοπατιού



Εικόνα 3: Εξωγενής ενεργοποίηση siRNA μονοπατιού [34].

Η ενεργοποίηση του siRNA μονοπατιού στα έντομα μπορεί να πραγματοποιηθεί και από εξωγενή μόρια RNA [Εικόνα 3] [32]. Αυτά μπορεί να είναι είτε ικής προέλευσης είτε να χορηγούνται πειραματικά, με μεθόδους όπως η ένεση ή η λήψη μέσω τροφής [33]. Τα μόρια αυτά μπορεί να έχουν μορφή δίκλωνου μορίου RNA (dsRNA) ή δίκλωνου μικρού αποσιωπητικού RNA (siRNA) με φουρκέτα ή χωρίς [Εικόνα 3]. Τα dsRNAs που χορηγούνται έχουν συνήθως μέγεθος μερικών εκατοντάδων ζευγών βάσεων (200-520bp [35]), από τις οποίες προκύπτει μια πληθώρα μορίων siRNAs ύστερα από υδρόλυσή τους από την ενδονουκλεάση Dicer [36]. Τα μικρά RNA από την άλλη, σχεδιάζονται με μήκος που ποικίλει ανάλογα με τον οργανισμό. Για παράδειγμα, σε πειράματα που έχουν γίνει σε λύση κυττάρων της μύγα *Drosophila melanogaster*, έχει φανεί ότι προκαλούν αποτελεσματική σίγηση, τα δίκλινα siRNA μήκους 21



Εικόνα 4: Τύποι μορίων siRNA, με φουρκέτα ή χωρίς [39].

νουκλεοτιδίων, ενώ η αποτελεσματικότητα αυξάνεται όταν διαθέτουν 2 νουκλεοτιδία στο 3' άκρο να προεξέχουν [37], [38]. Όπως διακρίνεται και στην εικόνα 4, τα δίκλινα siRNA που σχεδιάζονται και που λειτουργούν βέλτιστα, διαθέτουν 3' μονόκλινα άκρα [39].

## Σίγηση γονιδίων επαγόμενη από τον ξενιστή (host-induced gene silencing, HIGS)

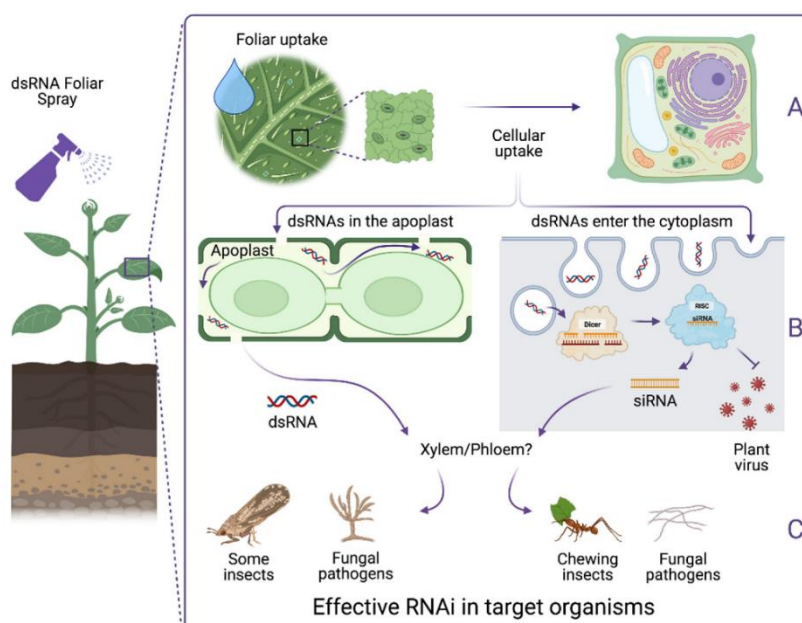
Η εξωγενής ενεργοποίηση του RNAi μηχανισμού, έχει οδηγήσει σε μια πληθώρα εφαρμογών σε διάφορους τομείς, συμπεριλαμβανομένου του αγροδιατροφικού. Σε αυτόν περιλαμβάνονται η δημιουργία σειρών φυτών, ανθεκτικών σε ιούς που τα προσβάλλουν [40], ή σε έντομα που παρασιτούν σε αυτά [41], αλλά και η βελτίωση της θρεπτικής αξίας και της ποιότητας εδώδιμων καρπών εμπορικής σημασίας [42]. Όσον αφορά τη δημιουργία φυτών, ανθεκτικών σε προσβολές από έντομα, υπάρχουν διάφορες προσεγγίσεις, μια εκ των οποίων σχετίζεται με τη δημιουργία διαγονιδιακών φυτών. Το 2007 δημοσιεύτηκαν δύο άρθρα που αφορούσαν τη παραγωγή dsRNA από φυτά, και τα οποία στόχευαν γονίδια εντόμων που τα προσβάλλουν. Από τη μία, ο Mao και οι συνεργάτες του ασχολήθηκαν με το λεπιδόπτερο *Helicoverpa armigera* ή σκώληκα του βαμβακιού [43]. Η προνύμφη του εντόμου αυτού προκαλεί καταστροφές σε μια πληθώρα καλλιεργειών όπως είναι το βαμβάκι και η ντομάτα, καθώς τρέφεται με τα φύλλα των φυτών αυτών. Το χαρακτηριστικό που αξιοποίησαν οι ερευνητές όσον αφορά την αλληλεπίδραση του κολεόπτερου αυτού με το βαμβάκι, ήταν η ανθεκτικότητα του στην γκοσσυπόλη, μια φαινόλη που παράγει το βαμβάκι, και η οποία είναι τοξική για τους περισσότερους οργανισμούς. Αφού παρατήρησαν ότι το φαινόμενο αυτό οφείλεται στην υπερέκφραση της μονοοξυγενάσης P450 στο μεσέντερο του εντόμου, σκέφτηκαν να δημιουργήσουν διαγονιδιακά βαμβάκια τα οποία θα εξέφραζαν δίκλωνο RNA έναντι της συγκεκριμένης μονοοξυγενάσης του εντόμου, έτσι ώστε να μειωθεί η έκφρασή της, και η γκοσσυπόλη να είναι πλέον τοξική για αυτό. Πράγματι, με τη χορήγηση του dsRNA, μέσω λήψης τροφής από τα διαγονιδιακά φύλλα του βαμβακιού που το εξέφραζαν, παρατηρήθηκε τόσο μείωση των επιπέδων του mRNA στόχου και της πρωτεΐνης, που αυτό κωδικοποιεί, στο έντερο, αλλά και καθυστέρηση της ανάπτυξης των προνυμφών, σε σχέση με τον μάρτυρα του πειράματος. Από την άλλη ο Baum και οι συνεργάτες του, ασχολήθηκαν με το κολεόπτερο *Diabrotica virgifera virgifera* ή σκώληκα του αραβόσιτου [44]. Η προνύμφη του εντόμου αυτού τρέφεται με τις ρίζες του καλαμποκιού, προκαλώντας μεγάλες ζημιές οικονομικής σημασίας. Έτσι, με παρόμοια λογική οι ερευνητές δημιούργησαν διαγονιδιακές σειρές καλαμποκιού που εξέφραζαν δίκλωνο RNA έναντι της υπομονάδας A της V-ATPases του συγκεκριμένου κολεόπτερου, παρατηρώντας τελικά σημαντική ανθεκτικότητα των ριζών του φυτού σε σχέση με τα φυτά αγρίου τύπου. Αντίστοιχες εργασίες δημοσιεύτηκαν τα επόμενα χρόνια για διάφορα κολεόπτερα, ημίπτερα και λεπιδόπτερα, και τα φυτά που προσβάλλουν [45], ωστόσο δεν έχει υπάρξει κάποια αντίστοιχη μελέτη που να αφορά τα δίπτερα.

Αξίζει να σημειωθεί ότι στις συγκεκριμένες εφαρμογές, εξαιτίας του γεγονότος ότι το dsRNA κωδικοποιείται από γονίδιο το οποίο βρίσκεται στον πυρήνα των φυτικών κυττάρων, αυτό θα επεξεργαστεί σε ένα μεγάλο ποσοστό από τα ένζυμα τύπου Dicer του κυτταροπλάσματος του φυτού. Γι' αυτό δημοσιεύτηκε μια έρευνα το 2015, στην οποία το γονίδιο ενσωματώθηκε στο γονιδίωμα του χλωροπλάστη, επομένως το dsRNA συσσωρευόταν εκεί και η αποτελεσματικότητά του ως εντομοκτόνο ήταν μεγαλύτερη [46].

Ωστόσο, όσον αφορά την εφαρμογή τους στον αγρό, οι γενετικά τροποποιημένες καλλιέργειες εμφανίζουν ορισμένους περιορισμούς. Αρχικά, η παραγωγή τους σε μεγάλη κλίμακα και η εμπορευματοποίησή τους θα είχε ιδιαίτερα υψηλό κόστος [47]. Επιπλέον, πολλές χώρες δεν είναι έτοιμες να αποδεχτούν τις γενετικά τροποποιημένες καλλιέργειες [48]. Τέλος υπάρχουν περιορισμένες γνώσεις όσον αφορά τη γενετική τροποποίηση διαφόρων φυτών-ξενιστών[49].

## Σίγηση γονιδίων επαγόμενη από ψεκάσμο (spray-induced gene silencing, SIGS)

Μια προσέγγιση που δεν περιλαμβάνει γενετική τροποποίηση φυτών, είναι ο ψεκάσμος του dsRNA στον αγρό γνωστό και ως Spray-Induced Gene Silencing (SIGS). Μετά το 2020 δημοσιεύτηκαν κάποιες έρευνες που περιέγραφαν τέτοιες εφαρμογές, σε συνθήκες εργαστηρίου, σε κολεόπτερα, ημίπτερα και λεπιδόπτερα [50]. Στις συγκεκριμένες έρευνες το dsRNA ψεκάστηκε στα φύλλα των φυτών-ξενιστών, οδηγώντας σε υψηλά ποσοστά θνησιμότητας τα έντομα που τρέφονταν από τους εξωτερικούς ιστούς των φυτών αυτών (π.χ. φύλλα) [51]. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 5, μέσω του ψεκάσμου το dsRNA εισέρχεται στους αποπλάστες από τα στόματα των φύλλων [52], και είτε θα παραμείνει εκεί, είτε θα εισέλθει στο κυτταρόπλασμα, όπου θα επεξεργαστούν τα ένζυμα τύπου Dicer του φυτού, υδρολύοντάς το σε siRNAs μήκους 21-24nt [53]. Από τι εξαρτάται αυτό δεν είναι γνωστό, ωστόσο έχουν υπάρξει αναφορές που στηρίζουν την μη επεξεργασία του dsRNA, και την παραμονή του στους αποπλάστες [54], [55]. Η επεξεργασία του dsRNA στο κυτταρόπλασμα των φυτικών κυττάρων ωφελεί άλλες εφαρμογές που σχετίζονται με την καταπολέμηση ιών και άλλων παθογόνων μικροοργανισμών που προσβάλλουν τα φυτά [53]. Ο περιορισμός αυτής της μεθόδου όσον αφορά τα έντομα, είναι ότι αναφέρεται κυρίως σε εκείνα που τρέφονται από ιστούς της επιφάνειας των φυτών, καθώς δεν υπάρχουν ακόμα αρκετές πληροφορίες για τη μεταφορά του dsRNA στα αγωγά συστήματα του φυτού.



Εικόνα 3: Ψεκάσμος dsRNA στον αγρό και τρόποι απορρόφησής του από τα φυτικά κύτταρα [53].

Από την άλλη, το dsRNA μπορεί να διεισδύσει κατευθείαν στον εξωσκελετό των εντόμων που κατοικούν πάνω στα φυτά αν ψεκαστεί με πίεση. Αυτό πραγματοποιήθηκε με επιτυχία στο Λεπιδόπτερο *Ostrinia furnacalis* και στα Ημίπτερα *Acyrtosiphon pisum* and *Diaphorina citri* [56]–[58]. Ωστόσο, η επιτυχία αυτής της εφαρμογής εξαρτάται από το πάχος του εξωσκελετού, όπου στην περίπτωση των Κολεόπτερων είναι αδύνατη η διείσδυση του dsRNA στο έντομο μέσω αυτού [59].

Κάποιοι περιορισμοί αυτής της μεθόδου αν εφαρμοστεί στον αγρό θα είναι ενδεχομένως η ευαισθησία του RNA και η μείωση του χρόνου ημιζωής του, λόγω της υπερϊώδους ακτινοβολίας, αλλά και η απομάκρυνσή του σε περίπτωση βροχής [53].

## Έγχυση στον κορμό (Trunk injection)



Εικόνα 4: Μηχανισμός trunk injection [60].

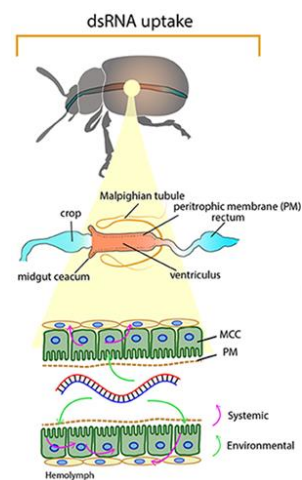
Μια τελευταία προσέγγιση αφορά τη χορήγηση του dsRNA στον κορμό των δέντρων από οπές [Εικόνα 6][60]. Στη συγκεκριμένη μέθοδο, εκμεταλλευόμαστε το γεγονός ότι το dsRNA που εισέρχεται στο ξήλωμα, μετακινείται στους αποπλάστες του φυτού και δεν εισέρχεται στο κυτταρόπλασμα των φυτικών κυττάρων ώστε να υποστεί επεξεργασία από τα ένζυμα τύπου Dicer του φυτού [61]. Αυτή μπορεί να αποτελέσει μια καλή εναλλακτική στην περίπτωση που δεν είναι επιθυμητή αυτή η επεξεργασία, τόσο γιατί μειώνεται η απόδοση του συστήματος, αλλά κυρίως λόγω της μεγάλης πιθανότητας τα siRNA που παράγει το φυτό να μην ενεργοποιούν το μονοπάτι στο έντομο, παραδείγματος χάριν λόγω μήκους.

Από μια δημοσίευση του 2012, είχε ήδη φανεί ότι dsRNA που χορηγήθηκε με τη μέθοδο αυτή σε κίτρα ήταν ανιχνεύσιμο στα ανώτερα μέρη του φυτού για χρονικό διάστημα 2 μηνών [62]. Στην ίδια έρευνα, το dsRNA ήταν ικανό να προκαλέσει σίγηση τόσο σε γονίδια εντόμων που τρέφονταν από το φλοιώμα όσο και από το ξήλωμα των κίτρων, στην περίπτωση που το dsRNA χορηγούνταν στο δέντρο μέσω ποτίσματος των ριζών, με διάλυμα που το περιείχε. Παρομοίως το dsRNA ανιχνευόταν σε μηλιές για 70 ημέρες [60] και το shRNA για 10 μέρες σε φύλλα αμπελιού και μηλιάς [61] όταν χορηγήθηκε στα δέντρα μέσω οπών.

Η μέθοδος αυτή έχει το πλεονέκτημα της προστασίας του dsRNA από συνθήκες του περιβάλλοντος που μπορούν να το καταστρέψουν (π.χ. υπεριώδης ακτινοβολία από τον ήλιο) γεγονός που το διατηρεί ακέραιο στα δέντρα για μεγάλο χρονικό διάστημα [60]

## Πρόσληψη μορίων dsRNA

Για την επιτυχή σίγηση των γονιδίων-στόχων, όταν το dsRNA προσλαμβάνεται από τον πεπτικό σωλήνα του εντόμου, πρέπει να είναι εξασφαλισμένη η απορρόφησή του από τα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου και η συστηματική μεταφορά του, δηλαδή η επέκταση του σήματος μέσω της μεταφοράς του από κύτταρο σε κύτταρο, ώστε να φτάσει στο στόχο του (παραδείγματος χάριν εκεί που συντίθεται η χιτίνη, αν στόχος είναι ένα ένζυμο απαραίτητο για τη βιοσύνθεσή της) [Εικόνα 7] [63]. Οι περισσότεροι ευκαρυωτικοί οργανισμοί εξασφαλίζουν την απορρόφηση του dsRNA από τα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου τους, μέσω των διαμεμβρανικών υποδοχέων SID-2, και τη συστηματική του μεταφορά μέσω των SID-1 (SID: systemic RNA interference defective) [64]. Στα περισσότερα έντομα, συμπεριλαμβανομένων των δίπτερων, η πρωτεΐνη αυτές δεν υπάρχουν και η απορρόφηση του dsRNA πραγματοποιείται κυρίως μέσω ενδοκυττάρωσης επαγόμενης από κλαθρίνη [65]. Η ενδοκυττάρωση αυτή σε



Εικόνα 5: Απορρόφηση dsRNA από τα εντερικά κύτταρα των εντόμων [63].

κύτταρα *Drosophila melanogaster* είναι γνωστό ότι επάγεται από τους υποδοχείς SR-CI (Scavenger Receptor) and Eater, μειώνοντας την απορρόφηση του dsRNA κατά 90% όταν αποσιωπείται η έκφρασή τους ταυτόχρονα [63]. Στα Tephritidae η απορρόφηση του dsRNA φαίνεται να πραγματοποιείται με παρόμοιο τρόπο με αυτόν των Drosophilidae, καθώς έχουν εντοπιστεί και ορθόλογα των γονιδίων SR (Scavenger receptors) [66]

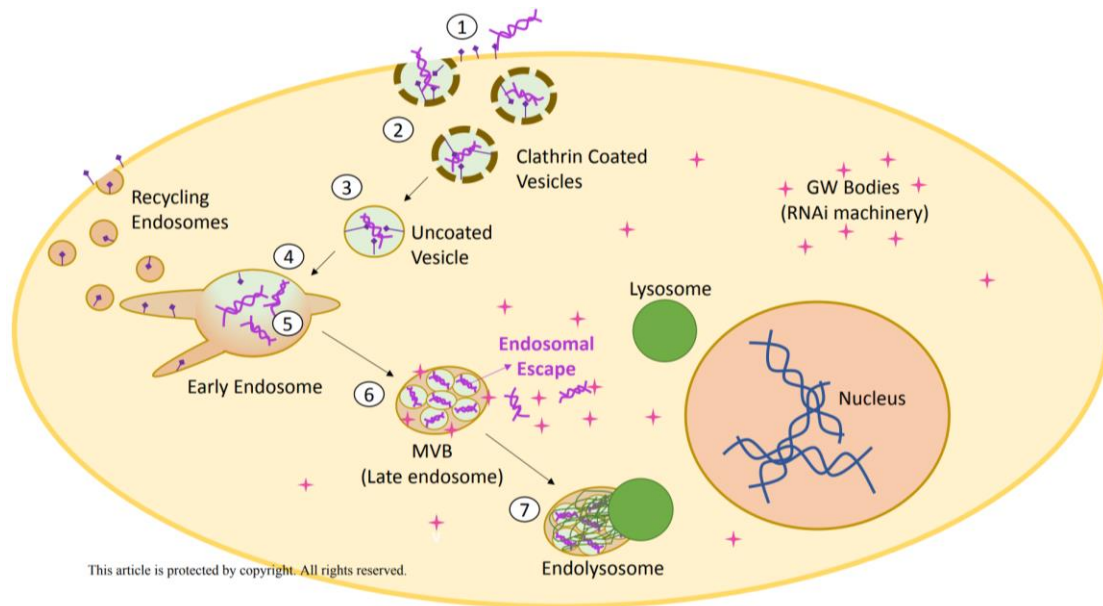
Σε άλλες τάξεις εντόμων έχουν βρεθεί ομόλογα γονίδια Sid (Sid-like genes), αλλά και άλλες ενδεχόμενες μεθόδοι απορρόφησης του dsRNA, παραδείγματος χάριν η πινοκυττάρωση [67]. Όσον αφορά τη διακυτταρική μεταφορά, στη μύγα *Drosophila melanogaster* έχουν βρεθεί κάποιες δομές μικροσωλήνων και εξωσωμάτων, οι οποίες φαίνεται να συμμετέχουν σε αυτή [68], [69].

Αναφορικά με τις διάφορες τάξεις των εντόμων, πιο δεκτικά στην εξωγενή χορήγηση του dsRNA μέσω τροφής θεωρούνται τα Κολεόπτερα [70], [71], ακολουθούν τα Δίπτερα και τα Υμενόπτερα, ενώ τα Λεπιδόπτερα και τα Ημίπτερα είναι τα λιγότερο δεκτικά [72]. Όσον αφορά τα Δίπτερα, τα κύτταρα του μεσεντέρου της μύγας *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae), δεν προσλαμβάνουν το dsRNA όταν αυτό χορηγείται γυμνό μέσω τροφής [73], ενώ στην περίπτωση της μύγας *Bactrocera dorsalis* και της *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae), η πρόσληψη αυτή είναι επιτυχημένη [74], [75]

### Παράγοντες που επηρεάζουν την πρόσληψη μορίων dsRNA

Η αδυναμία ενεργοποίησης του μηχανισμού RNAi, όταν το dsRNA χορηγείται μέσω τροφής, μπορεί να επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες. Ένας από τους βασικότερους, είναι η δράση νουκλεασών που υδρολύουν τα δίκλινα μόρια RNA (ριβονουκλεάσες, dsRNAases) και εκκρίνονται από τα κύτταρα του μεσεντέρου των εντόμων [76]. Στη μύγα *Bactrocera tryoni* (Diptera:Tephritidae), η σίγηση γονιδίων στόχων μέσω κατάποσης του dsRNA ήταν επιτυχής μόνο ύστερα από την ταυτόχρονη αποσιώπηση 2 μεταγράφων νουκλεασών στον αυλό του εντέρου [77]. Αντίστοιχο φαινόμενο ωστόσο παρατηρείται και στην αιμολέμφο, καθιστώντας αδύνατη την ενεργοποίηση του μηχανισμού RNAi ακόμη και όταν το dsRNA χορηγείται ενέσιμα σε ορισμένα είδη εντόμων [78]

Ένας άλλος παράγοντας που επηρεάζει τη δράση του dsRNA είναι ο εγκλωβισμός του στα ενδοσώματα των εντεροκυττάρων και η αδυναμία απελευθέρωσης του στο κυτταρόπλασμα, φαινόμενο που παρατηρήθηκε στα λεπιδόπτερα *Heliothis virescens* [79] και *Spodoptera frugiperda* [80]. Όπως φαίνεται στην Εικόνα [33], αρχικά το dsRNA προσδένεται σε ειδικούς υποδοχείς (μωβ χρώμα) (SR, scavenger receptors) και πραγματοποιείται ενδοκυττάρωση επαγόμενη από κλαθρίνη. Από τα κυστίδια στη συνέχεια αφαιρείται η κλαθρίνη, και συντήκονται με τα ενδοσώματα σχηματίζοντας τα πρώιμα ενδοσώματα και έπειτα τα πολυκυστιδιακά σωματίδια (ώριμα ενδοσώματα) από τα οποία το dsRNA πρέπει να δραπετεύσει για να απελευθερωθεί στο κυτταρόπλασμα και να δράσει. Αν δεν γίνει αυτό, θα συντηχθεί με το λυσόσωμα και θα καταστραφεί [Εικόνα 8] [33].



Εικόνα 6: Μηχανισμός ενδοκυττάρωσης μέσω κλαθρίνης, μορίων dsRNA και σύντηξη των κυστιδίων με τα λυσοσώματα [33].

Σημαντική είναι επίσης η εξασφάλιση της σταθερότητας και ακεραιότητας του dsRNA. Αυτή επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες. Ένας από αυτούς είναι του pH του εντέρου, του στόματος όπου παράγουν εκκρίσεις οι σιελογόνοι αδένες αλλά και της αιμολέμφου [33]. Η σταθερότητα του dsRNA σχετίζεται και με τη δομή του, με αυτή της φουρκέτας να έχει αποδειχθεί αποτελεσματικότερη από τη γραμμική [81], [82]. Μια έρευνα του 2020 που αφορούσε το κουνούπι *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) εισήγαγε μια νέα αποτελεσματική δομή RNA, που ονομάζεται «paperclip» RNA (pcRNA), που πρόκειται για ένα μικρό δίκλωνο siRNA με τη δομή «συνδετήρα», έχοντας της λαδή φουρκέτα και ατης δύο πλευρές [83].

Όπως συνοψίζεται σε μια έρευνα του 2021, σχεδόν όλες οι μέχρι τώρα δημοσιευμένες μελέτες αφορούν την εισαγωγή δίκλωνων μορίων RNA μήκους 200-500 ζεύγη βάσεων [84]. Σε ορισμένες δημοσιεύσεις έχει συσχετιστεί η αποτελεσματική πρόσληψη του dsRNA και ικανότητα αποσιώπησης του στόχου του, σε σχέση με το μήκος του. Ένα παράδειγμα αποτελεί η μελέτη που βασίστηκε στο κολεόπτερο *Diabrotica virgifera*, η οποία αναφέρει πως dsRNA 240 ζευγών βάσεων που περιέχει μόνο ένα μοναδικό τμήμα 21 ζευγών βάσεων το οποίο στοχεύει τμήμα του mRNA του γονιδίου DvSnf7, είναι ικανό να προκαλέσει σίγηση, σε αντίθεση με την εισαγωγή του δίκλωνου siRNA 21 ζευγών βάσεων, χωρίς επιπλέον αλληλουχίες [41]. Σε μια άλλη δημοσίευση που αφορά το ίδιο έντομο, παρατηρήθηκε ότι τα κύτταρα του εντέρου του αδυνατούν να απορροφήσουν dsRNAs μικρότερα από 50 ζεύγη βάσεων [85].

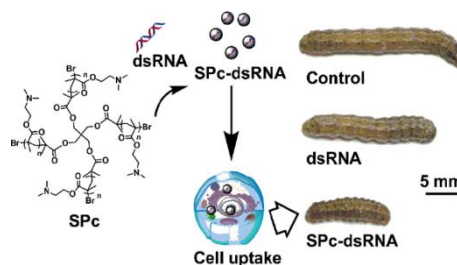
Η απόδοση του μηχανισμού RNAi έχει φανεί ότι αυξάνεται, όταν αυτό μεταφέρεται μέσω νανομεταφορέων, αντί να είναι γυμνό [86]. Μια κατηγορία των μεταφορέων αυτών είναι τα κατιονικά λιποσώματα [87]. Η μέθοδος αυτή φαίνεται πως αυξάνει το φαινόμενο της σίγησης σε μύγες του γένους *Drosophila* [88], [89] αλλά και στην *Bactrocera tryoni* (Diptera: Tephritidae) [77], συγκριτικά με τη χορήγηση γυμνού dsRNA. Μια διαφορετική προσέγγιση χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά στην προνύμφη του κουνουπιού *Anopheles gambiae*, το οποίο αδυνατούσε να ενεργοποιήσει τον μηχανισμό RNAi μέσω λήψης γυμνού dsRNA στην τροφή. Έτσι δοκιμάστηκε η εγκόλπωση των dsRNAs σε νανοσωματίδια χιτίνης, και ο μηχανισμός ενεργοποιήθηκε [90]. Αυτό, σύμφωνα με τη συγκεκριμένη μελέτη, πιθανό

να οφείλεται στην αυξημένη σταθερότητα το dsRNA, αλλά και στην καλύτερη απορρόφηση των μορίων από τα κύτταρα του εντέρου εντόμου.



Εικόνα 8: Τεχνητοί χώροι ωοαπόθεσης *Bactrocera dorsalis* [91].

Το 2021 δημοσιεύτηκε μια μελέτη από τον Shaokun Guo και τους συνεργάτες τους, που περιγράφουν μια εφαρμογή στο θερμοκήπιο, χορήγησης dsRNA μέσω τροφής για τη μύγα *Bactrocera dorsalis* η οποία ανήκει στην οικογένεια Tephritidae [91]. Όπως φαίνεται στην εικόνα 10, οι ερευνητές δημιούργησαν τεχνητούς χώρους ωοαπόθεσης για τις θηλυκές μύγες, οι οποίοι αποτελούν ταυτόχρονα και τεχνητά περιβάλλοντα στα οποία μεγαλώνουν και τρέφονται οι εκκολαπτόμενες προνύμφες των αβγών που ωοαποτίθενται. Ορισμένα λοιπόν από τα τεχνητά διατροφικά περιβάλλοντα περιείχαν μόρια dsRNA έναντι ενός γονιδίου υπεύθυνου για την ομαλή ανάπτυξη των φτερών της μύγας (γονίδιο Wingless, Wg), και άλλα περιείχαν θετικούς μάρτυρες (νερό ή dsRNA έναντι του GFP). Επίσης το χαρακτηριστικό αυτών των dsRNA ήταν ότι δεν ήταν γυμνά, αλλά χορηγούνταν με τη βοήθεια μεταφορέων οι οποίοι ονομάζονται Star Polycations (SPs), δηλαδή πολυ-κατιόντα σε σχήμα αστεριού, και οι οποίοι προτάθηκαν το 2019 για χρήση στην καταπολέμηση εντόμων [Εικόνα] [92]. Τα αποτελέσματα κατέδειξαν τόσο τη μείωση της έκφρασης του γονιδίου στόχου Wingless, όσο και φαινοτυπικές διαφορές στη μορφολογία των φτερών και στην επιβίωση του πληθυσμού.



Εικόνα 7: Μεταφορά dsRNA με πολυκατιόντα και φαινότυπος στην *Bactrocera dorsalis* [91].

Μια άλλη περίπτωση, είναι το dsRNA να εκφράζεται μέσα σε κάποιον μικροοργανισμό. Ένα παράδειγμα αποτελεί η γενετική τροποποίηση μιας ζύμης η οποία υπάρχει φυσιολογικά τόσο στο έντερο της *Drosophila suzukii* όσο και στους καρπούς στους οποίους ωοαποθέτει τα αβγά της. Η προσθήκη πλασμιδιακού φορέα που συνθέτει dsRNA έναντι ενός γονιδίου της μύγας, στη ζύμη, και η ανάμιξη της με την τροφή των προνυμφών, οδήγησε σε σημαντική μείωση της επιβίωσης τους λόγω της αποτελεσματικής σίγησης που προκλήθηκε [93].

### Μύγα της Μεσογείου, *Ceratitis capitata*

Η μύγα της Μεσογείου (Mediterranean fruit fly), *Ceratitis capitata* (Wiedemann, 1824), ανήκει στην τάξη των δίπτερων (Diptera), και στην οικογένεια Tephritidae [Εικόνα 11]. Οι μύγες της οικογένειας αυτής συχνά αναφέρονται ως φρουτόμυγες (fruit flies), καθώς οι προνύμφες τρέφονται από το σαρκώδες τμήμα του περικαρπίου των φρούτων και των λαχανικών, οδηγώντας τα στο να σαπίζουν, τόσο λόγω της ανάπτυξης των προνυμφών, όσο και λόγω δευτερογενών μολύνσεων που ακολουθούν μετά το τρύπημα της ωοαπόθεσης [94]. Περίπου 250 είδη Tephritidae θεωρούνται οικονομικής σημασίας [95], [96]. Η μύγα της Μεσογείου κατέχει την πρώτη θέση, καθώς είναι υπεύθυνη για την απώλεια εκατομμυρίων δολαρίων στον τομέα της γεωργίας, τόσο λόγω της μείωσης της συγκομιδής



Εικόνα 9: Μύγα της Μεσογείου, *Ceratitis capitata* (Φωτογράφος: Scott Bauer, USDA) [94].



Εικόνα 10: Στάδια ανάπτυξης *Ceratitidis capitata* (Φωτογραφία από USDA) [94].

ανάπτυξή της, ανήκει στην κατηγορία των ολομετάβολων εντόμων, δηλαδή περνά από 4 διακριτά στάδια έως ότου οδηγηθεί στην τελικό στάδιο της μεταμόρφωσης. Τα στάδια αυτά είναι τα εξής: αβγό, προνύμφη (1<sup>ου</sup>, 2<sup>ου</sup>, 3<sup>ου</sup> σταδίου), νύμφη, και μύγα [Εικόνα 12]. Ο βιολογικός κύκλος του άγριου πληθυσμού στη φύση, περιλαμβάνει: την ωοαπόθεση των αβγών από τη θηλυκή ενήλικη μύγα στη σάρκα των φρούτων, κοντά στο στρώμα της φλούδας, την εκκόλαψη των αβγών και την ανάπτυξη των προνυμφών (larvae) στο εσωτερικό του φρούτου καταναλώνοντάς το [Εικόνα 13] την ρίψη των προνυμφών 3<sup>ου</sup> σταδίου στο έδαφος (χώμα) όπου βομβυκιώνονται και μετατρέπονται σε νύμφες (pupae) και τέλος την εκκόλαψή τους, από όπου θα προκύψουν ενήλικα αρσενικά και θηλυκά έντομα τα οποία θα ζευγαρώσουν και ο κύκλος θα επαναληφθεί [94]. Στα μέρη που διαβιώνει, προσβάλλει τους καρπούς πάνω από 250 ειδών φυτών, μεταξύ των οποίων εσπεριδοειδή και πυρηνόκαρπα [99].



Εικόνα 11: Προνύμφες στο εσωτερικό φρούτου (Φωτογραφία από: Division of Plant Industry) [94].

Έως τώρα έχουν χρησιμοποιηθεί διάφοροι μέθοδοι για την καταπολέμησή της, μέσω της μείωσης των πληθυσμών της και της αναπαραγωγικής τους ικανότητας σε επίπεδο αγρού. Ο κύριος τρόπος αντιμετώπισης της μύγας της Μεσογείου είναι τα χημικά εντομοκτόνα όπως είναι τα οργανοφωσφορικά, πολλά εκ των οποίων έχουν απαγορευτεί σε πολλές χώρες λόγω της τοξικότητάς τους για τον άνθρωπο και το περιβάλλον [100]. Ωστόσο, η έρευνα έχει στραφεί σε πιο βιολογικές πηγές εντομοκτόνων, όπως είναι τα αιθέρια έλαια, που φαίνεται να περιέχουν ουσίες τοξικές για την μύγα της Μεσογείου [101]. Ένα κύριο μειονέκτημα της αποκλειστικής χρήσης τέτοιου είδους εντομοκτόνων-χημικών, συνθετικών ή βιολογικών-είναι η ανθεκτικότητα που αποκτούν τα έντομα σε αυτά [102], [103]. Ένα παράδειγμα είναι η ανθεκτικότητα ενός πληθυσμού της *Ceratitidis capitata* στο Μαλαθείο, που αποτελεί ένα από τα πιο κοινά εντομοκτόνα για την καταπολέμηση των Tephritidae [104]. Μια άλλη κατηγορία αποτελούν τα ελκυστικά, δηλαδή παγίδες που προσελκύουν τις μύγες και είτε τις σκοτώνουν είτε τις παγιδεύουν [105]. Το κύριο μειονέκτημα αυτών των παγίδων είναι ότι συγκεντρώνουν και άλλα έντομα, χάνοντας την ειδικότητα που απαιτείται να έχουν οι νέοι οικολογικοί τρόποι αντιμετώπισης [106]. Μια εναλλακτική μέθοδος, είναι ο βιολογικός έλεγχος που περιλαμβάνει την απελευθέρωση παρασίτων, θηρευτών ή μικροοργανισμών που βλάπτουν τα έντομα. Ένα παράδειγμα είναι οι σφήκες-ενδοπαράσιτα, της οικογένειας Broconidae. Τα παρασιτοειδή αυτά γενούν τα αβγά τους μέσα στο σώμα των προνυμφών και νυμφών της μύγας *Ceratitidis capitata*, με αποτέλεσμα να τις οδηγούν στο θάνατο [107]. Η μέθοδος αυτή, παρότι έχει ενθαρρυντικά αποτελέσματα, είναι απαραίτητο να συνδυαστεί και με άλλες, καθώς τα ποσοστά επιτυχίας της δεν είναι πολύ υψηλά [108].

Μία άλλη μέθοδος είναι η Τεχνική Στείρων Εντόμων (Sterile Insect Technique, SIT). Αρχή της μεθόδου αυτής είναι η απελευθέρωση στείρων αρσενικών εντόμων, τα οποία ανταγωνίζονται με τα αγρίου τύπου αρσενικά ως προς το ζευγάρωμα με τα θηλυκά, και όταν ζευγαρώνουν με αυτά, λόγω της στειρότητάς τους δε θα παράγονται απόγονοι. Αυτό έχει ως



αποτέλεσμα τη μείωση του πληθυσμού. Η μέθοδος αυτή, έχει εφαρμοστεί επιτυχώς σε περιοχές της Αμερικής (Χιλή, Αργεντινή κ.α.) αλλά και σε άλλα μέρη του κόσμου όπως η Κροατία, και η Ισπανία [109]–[112]. Μια βασική δυσκολία αυτής της μεθόδου, είναι ο διαχωρισμός των φύλων, εφόσον είναι επιθυμητή η απελευθέρωση μόνο στείρων αρσενικών εντόμων, καθώς αν απελευθερωθούν και τα δύο φύλα, τα θηλυκά παρόλο που θα είναι στείρα δε θα αποφύγουν να ωοαποθέσουν στους καρπούς. Το πρόβλημα αυτό έχει λυθεί για τη μύγα της Μεσογείου ήδη από το 1994, με τη δημιουργία στελεχών γενετικού διαχωρισμού φύλου (Genetic Sexing Strains, GSS) με βάση το γονίδιο *ts/* (temperature sensitive lethal) [113]. Το γονίδιο αυτό, όπως δηλώνει και το όνομά του, όταν είναι υπολειπόμενο προκαλεί τη θανάτωση του ατόμου που το φέρει, όταν αυτό διατηρείται σε μια συγκεκριμένη θερμοκρασία για ορισμένο χρονικό διάστημα. Έτσι το επικρατές αλληλόμορφο που εμποδίζει τον συγκεκριμένο φαινότυπο, μεταφέρθηκε στο χρωμόσωμα Y, ενώ το υπολειπόμενο στο X, με στόχο τη διατήρηση μόνο των αρσενικών ατόμων, στην επιτρεπτή θερμοκρασία.

Ήδη από το 1972 ο Edward Knipling εισήγαγε τον όρο: «Ολοκληρωμένη Διαχείριση Παρασίτων (Integrated Pest Management, IPM)», μια οικολογική διαχείριση, που έχει ως στόχο την προστασία των ανθρώπων, του περιβάλλοντος, της οικονομίας και των καλλιεργειών [114]. Η μέθοδος αυτή καταπολέμησης των εντόμων-παρασίτων περιλαμβάνει τον συνδυασμό των παραπάνω τεχνικών, αλλά και άλλων καλλιεργητικών παρεμβάσεων όπως η καταστροφή των φρούτων που σαπίζουν ή πέφτουν από τα δέντρα και το κάλυμμα των φρούτων ώστε να αποφευχθεί η ωοαπόθεση. Βασικός στόχος είναι πάντοτε η αποτελεσματικότητα των μεθόδων αυτών, σε συνδυασμό με τη μείωση του κόστους για τον καλλιεργητή, αλλά και η προστασία της υγείας του ανθρώπου, της βιοποικιλότητας και του περιβάλλοντος συνολικά.

### Επιλογή γονιδίων-στόχων

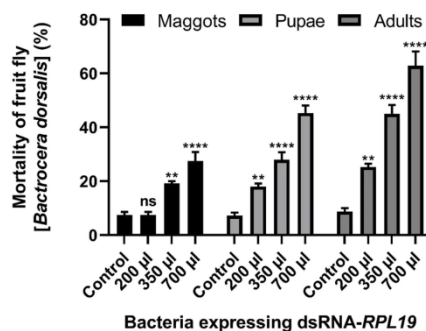
Τα υποψήφια γονίδια στόχοι, για τον σχεδιασμό RNAi ενομοκτόνων, επιλέχθηκαν με βάση την υπάρχουσα βιβλιογραφία. Μπορούν να χωριστούν σε δύο ομάδες:

- Γονίδια απαραίτητα για την επιβίωση του εντόμου (RPL19, CHM4B, V-ATPase)
- Γονίδια απαραίτητα για την ανάπτυξη του ανήλικου εντόμου, δηλαδή για την ομαλή μετάβαση του στα επόμενα αναπτυξιακά του στάδια (ETH, ETH-RA, UAP, CHS)

### **60S ribosomal protein L19 (RPL19) (XM\_004524105.2)**

Το ριβόσωμα των ευκαρυωτικών οργανισμών αποτελείται από δύο υπομονάδες: την 40S και την 60S. Μια από τις πρωτεΐνες της 60S υπομονάδας είναι η L19, που κωδικοποιείται από το αντίστοιχο γονίδιο. Στη μύγα της Μεσογείου, έχει χαρακτηριστεί ως το πιο αποδοτικό ιδιοσυστατο γονίδιο [115], με σταθερά υψηλή έκφραση.

Το γονίδιο αυτό επιλέχθηκε να στοχευθεί στη μύγα *Bactrocera dorsalis*, που ανήκει στην ίδια οικογένεια με τη μύγα της Μεσογείου (Diptera: Tephritidae). Η χορήγησή του έγινε μέσω κατάποσης βακτηρίων *Escherichia coli* που παρήγαγαν το dsRNA μέσω πλασμιδίου με T7 υποκινητές εκατέρωθεν του τμήματος που το συνθέτει. Στο διάγραμμα διακρίνεται η αύξηση της θνησιμότητας, σε αυξανόμενους όγκους βακτηρίων που εκφράζουν το dsRNA έναντι του RPL19, σε τρία αναπτυξιακά στάδια (προνύμφες, νύμφες, ενήλικα) [Εικόνα 14].



Εικόνα 12: Ποσοστά θνησιμότητας dsRNA-BdRPL19 [126].

### **Charged multivesicular body protein 4B (CHM4B) (XM\_004535717.3)**

Η πρωτεΐνη αυτή αποτελεί συστατικό του ESCRT-III complex (Endosomal Sorting Complex Required for Transport) ένα σύστημα του κυττάρου με κύρια λειτουργία την εγκόλπωση ουβικιτινιωμένων διαμεμβρανικών υποδοχέων, ώστε να οδηγηθούν στην αποικοδόμηση. Το ορθόλογο του γονιδίου αυτού, στοχεύθηκε στο κολεόπτερο *Diabrotica virgifera* (DvSnf7) και προκάλεσε σημαντική μείωση της ανάπτυξης, όπως φαίνεται και στην εικόνα. Ο εν λόγω φαινότυπος αφορά τη συνεχόμενη λήψη γυμνού dsRNA έναντι του DvSnf7 για 5 ημέρες και με συγκέντρωση 1 µg dsRNA/mL τροφής [Εικόνα 15].

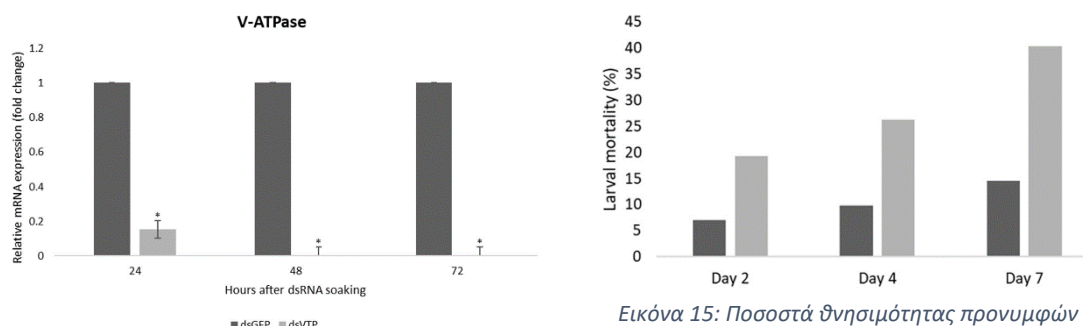


Εικόνα 13: Φαινότυπος προνυμφών dsRNA-DvSnf7 [41].

### **Vacuolar type ATPase proteolipid subunit (V-ATPase) (XM\_004534494.3)**

Η Vacuolar type ATPase είναι μια αντλία πρωτονίων που χρησιμοποιεί την ενέργεια από την υδρόλυση του ATP ώστε να δημιουργεί όξινες συνθήκες σε διάφορα ενδοκυτταρικά διαμερίσματα. Είναι απαραίτητη για την ομαλή λειτουργία των κυττάρων, έχοντας διάφορους ρόλους, όπως για παράδειγμα η ρύθμιση του φυσιολογικό pH τους [116].

Το ορθόλογο γονίδιο στοχεύθηκε στην μύγα *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) με τη μέθοδο του εμβάπσιματος (soaking) για 30 λεπτά και με συγκέντρωση 500ng/µl. Όπως φαίνεται στα διάγραμμα, ήδη από τις πρώτες 24 ώρες η έκφραση της V-ATPases μειώνεται, ενώ σημαντική είναι και η αύξηση της θνησιμότητας [Εικόνες 16, 17].

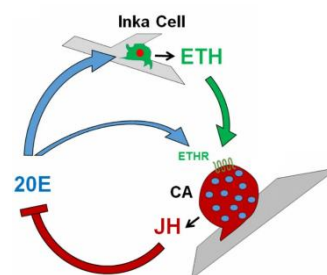


Εικόνα 14: Έκφραση AfVTP [75].

Εικόνα 15: Ποσοστά θνησιμότητας προνυμφών dsRNA-AfVTP [75].

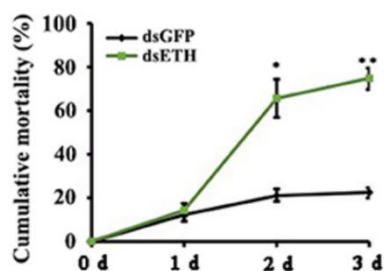
### Ecdysis triggering hormone (ETH) (XM\_012306023.2) & Ecdysis triggering hormone receptor A (ETH-R-A) (XM\_020860683.1)

Η ομαλή μετάβαση στα επόμενα αναπτυξιακά στάδια των εντόμων, ρυθμίζεται κυρίως από την έκκριση 2 ορμονών: της εκδυσόνης (20E) και της νεανικής ορμόνης (juvenile hormone, JH). Η νεανική ορμόνη καθορίζει το αποτέλεσμα της έκδυσης: σε υψηλές συγκεντρώσεις, η έκδυση που προκαλείται από την εκδυσόνη οδηγεί σε ένα ακόμη προνυμφικό στάδιο διότι η νεανική ορμόνη καταστέλλει τη μεταμόρφωση. Όταν μειωθούν τα επίπεδα της, στην επόμενη έκδυση που θα προκληθεί από αυτή, σχηματίζεται νύμφη. Όπως φαίνεται στην εικόνα, η μείωση της έκφρασης των ETH και ETH-RA, θα οδηγήσει σε αδυναμία έκκρισης της νεανικής ορμόνης από τα αλλαντοειδή σωματίδια (corpus allatum, CA) έχοντας ως αποτέλεσμα την πρόωρη μεταμόρφωση [Εικόνα18].



Εικόνα 16: Μονοπάτι ρύθμισης έκκρισης εκδυσόνης και νεανικής ορμόνης [127].

Στόχευση των δύο αυτών μεταγράφων στη μύγα *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae) οδήγησε σε αυξημένα ποσοστά θνησιμότητας προνυμφών, με δια του στόματος χορήγηση των dsRNAs.





Ενδεικτικά, στο διπλανό διάγραμμα φαίνεται η αύξηση της θνησιμότητας των προνυμφών 1<sup>ου</sup> σταδίου στη διάρκεια τριών ημερών, με συνεχή ανανέωση του dsRNA έναντι του γονιδίου ETH κάθε 24 ώρες και με χορήγηση μέσω τροφής 2μg/μl και όγκου 20μl. Παρόμοια αποτελέσματα εμφάνισε και η σίγηση του γονιδίου ETH-RA [Εικόνα19].

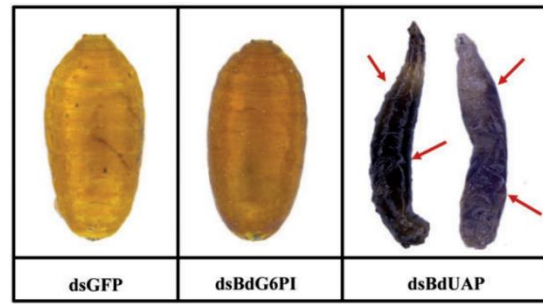
Εικόνα 17: Ποσοστά θνησιμότητας dsRNA-BdETH [128].

### Chitin synthase (CHS) (XM\_012306564.2) & UDP-N-acetylhexosamine pyrophosphorylase (UAP) (XM\_004519248.3)

Τα δύο αυτά ένζυμα, συμμετέχουν στο μονοπάτι βιοσύνθεσης της χιτίνης. Η χιτίνη αποτελεί συστατικό του εξωσκελετού των εντόμων, της τραχείας και της περιτροφικής τους μεμβράνης (διαχωρίζει την προς πέψη τροφή από τους διάφορους τύπους κυττάρων) και σε κάθε στάδιο έκδυσης ανανεώνεται. Σίγηση μέσω RNAi των ενζύμων αυτών στην μύγα *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae) οδήγησε σε αυξημένη θνησιμότητα λόγω μη φυσιολογικής ανάπτυξης των προνυμφών, και εγκλωβισμό τους στον παλιό εξωσκελετό [Εικόνες 20, 21].

dsRNA	GFP	CHS1
Treated at the third-instar		
Rate (%)	98%	50%

Εικόνα 19: Φαινότυπος *dsRNA-BdCHS* [129].



Εικόνα 18: Φαινότυπος *dsRNA-BdUAP* [130].

## Σκοπός

Η χρήση εντομοκτόνων που αφορά γεωργικής σημασίας έντομα-παράσιτα έχει ως στόχο να μειώσει τον πληθυσμό τους σε επίπεδο αγρού, αναστέλλονται της ομαλή ανάπτυξή τους, και την ομαλή διεξαγωγή του κύκλου ζωής τους. Μέσω του μηχανισμού RNAi είναι δυνατή η επιλεκτική μείωση της ποσότητας μεταγράφων που φυσιολογικά υπάρχουν στο κυτταρόπλασμα και μεταφράζονται σε μια πρωτεΐνη που εξυπηρετεί μια ή περισσότερες λειτουργίες. Σκοπός της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας ήταν η διερεύνηση ορισμένων γονιδίων, ως υποψήφια για στόχευση μέσω παρεμβολής RNA στη μύγα της μεσογείου *Ceratitis capitata*, που με τη μείωση της έκφρασής τους θα προκαλέσουν προβλήματα στην επιβίωση και ανάπτυξη του εντόμου. Ταυτόχρονα θέλαμε να δούμε την ικανότητα πρόσληψης από τη μύγα της Μεσογείου γυμνού dsRNA από το περιβάλλον της μέσω λήψης του από τον πεπτικό σωλήνα, τα ποσοστά μείωσης της έκφρασης των γονιδίων στόχων, και τη διαφοροποίηση αυτών σε σχέση με παράγοντες όπως η συγκέντρωση του dsRNA, ο χρόνος έκθεσης σε αυτό και το σημείο του σώματος στο οποίο βρίσκεται και παράγεται φυσιολογικά το mRNA στόχος.

Με τη συγκεκριμένη πειραματική προσέγγιση, ήταν επιθυμητός ο αποκλεισμός ορισμένων γονιδίων υποψήφιων για στόχευση και η επιλογή κάποιων άλλων, ώστε μελλοντικά να σχεδιαστούν πιο αποτελεσματικές δομές dsRNA, που να χορηγούνται με πιο αποδοτικά συστήματα, και να είναι πιο οικολογικές.

## Υλικά και Μέθοδοι

### Αλληλουχίες εκκινητών

Για τη δημιουργία dsRNA με βάση τις αλληλουχίες των γονιδίων-στόχων, και την ακόλουθη ποσοτικοποίηση των μεταγράφων τους, μετά την κατεργασία με το dsRNA, σχεδιάστηκαν ζεύγη εκκινητών, των οποίων οι αλληλουχίες αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα. Περιλαμβάνονται οι εκκινητές για την ενίσχυση αλληλουχίας του GFP που θα χρησιμοποιηθεί ως μάρτυρας του πειράματος (control-calibrator).

Με κόκκινο χρώμα είναι η αλληλουχία αναγνώρισης της T7 πολυμεράσης:

Γονίδιο στόχος		Αλληλουχία εκκινητή
RPL19	prF PCR	TAATACGACTCACTATAGGGAGACCGGAAATTGATTAAGGATGG
	prR PCR	TAATACGACTCACTATAGGGAGATGGTACAAGTGACGATCAATT
	prF qPCR	ACATAAAGTACGTGAGGCCAG
	prR qPCR	GCCGCTACCTCATCTTCTTTAG
CHM4B	prF PCR	TAATACGACTCACTATAGGGAGAGCTAGGAAAAATGCATCGAAA
	prR PCR	TAATACGACTCACTATAGGGAGAAATCCATCATATCATGCACATT
	prF qPCR	GCTGACCTAGATGATGAGGAC
	prR qPCR	CGTACTTCAGGCAATGTAAC
ETH-RA	prF PCR	TAATACGACTCACTATAGGGAGACTCATCTCCAGTAATGGTCC
	prR PCR	TAATACGACTCACTATAGGGAGATAAGTAGAACATAATGCGACA
	prF qPCR	AATTCGGGCATAAATCCAATT
	prR qPCR	AGCACCATGCCATGTATTCA
V-ATPase	prF PCR	TAATACGACTCACTATAGGGAGAGCACAGAGCGATAACCCAAT
	prR PCR	TAATACGACTCACTATAGGGAGACGGCACCCAAATGAATGAAAC
	prF qPCR	GTCGGTAGGTTTCTCTGGTTTAG
	prR qPCR	TGTTGTGCTGTACCTCTTACAC
ETH	prF PCR	TAATACGACTCACTATAGGGAGATTATTGTCAGTGTAACGACAG
	prR PCR	TAATACGACTCACTATAGGGAGAGTTGCACCAAATGTATTTCG
	prF qPCR	CTACAAATGGATACCGAGCTG
	prR qPCR	GTGTAAATACGCCACCTGTC
UAP	prF PCR	TAATACGACTCACTATAGGGAGAAATGGTGGACTGTATCGGG
	prR PCR	TAATACGACTCACTATAGGGAGAAACCACTTGATTCTTACCATC
	prF1 qPCR	GCGAAAACCGCTGAAATG
	prR1 qPCR	AAGGCGGCAGTGAAAAAG
	prF2 qPCR	CCTCGGAACACACAATACAACC
	prR2 qPCR	CGAAACATGGCAATGAACCC
CHS	prF PCR	TAATACGACTCACTATAGGGAGAGCTGGATGAAAAATTATGTGA
	prR PCR	TAATACGACTCACTATAGGGAGAACCAACGCTTTTTGTGCTG
	prF1 qPCR	TGCAAAAGGCCACAGAAC
	prR1 qPCR	CACTATTCTCCATAAGGGCAC
	prF2 qPCR	TCCTGATTATTTGAGCCTAACTGG
	prR2 qPCR	ATTGGGATAACCACCATAACGG
GFP	prF PCR	TAATACGACTCACTATAGGGCCGCCAGTGTGCTGGAA
	prR PCR	TAATACGACTCACTATAGGGGATATCTGCAGAAATTCGCC

Πίνακας 1: Αλληλουχίες εκκινητών για PCR & qPCR για τα 7 γονίδια-στόχοι.

## Ποσοτικοποίηση νουκλεϊκών οξέων (DNA, RNA)

Η ποσοτικοποίηση των νουκλεϊκών οξέων πραγματοποιήθηκε φασματοφωτομετρικά με χρήση του μηχανήματος Quawell Q3000. Το συγκεκριμένο μηχανήμα δίνει τη δυνατότητα μέτρησης συγκέντρωσης σε δείγματα νουκλεϊκών οξέων ή πρωτεϊνών. Η λειτουργία του βασίζεται στη φωτομέτρηση μικρής ποσότητας δείγματος (1,5-2,5μl). Οι πουρίνες και οι πυριμιδίνες των νουκλεϊκών οξέων απορροφούν στα 260nm και με βάση την απορρόφηση αυτή το μηχανήμα πραγματοποιεί την ποσοτικοποίηση (Νόμος Beer-Lambert). Επίσης, μέσω φωτομέτρησης στα 280nm που είναι το φάσμα απορρόφησης των πρωτεϊνών, το μηχανήμα επιστρέφει έναν λόγο  $A_{260}/A_{280}$  ο οποίος είναι ανάλογος της καθαρότητας του δείγματος νουκλεϊκών οξέων. Ο λόγος αυτός για δίκλωνο DNA θα πρέπει να είναι 1,7 (1,6-1,8), ενώ για μονόκλωνο RNA 1,9 (1,8-2,0). Για τη μέτρηση δίκλωνου RNA, πραγματοποιούνται δύο μετρήσεις, και ως dsDNA και ως ssRNA και υπολογίζεται ο μέσος όρος.

## Απομόνωση ολικού RNA και παραγωγή cDNA

Για την απομόνωση του ολικού RNA από άτομα *Ceratitidis capitata* του εργαστηριακού πληθυσμού, χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο Extrazol (BLIRT) το οποίο εξασφαλίζει την ακεραιότητα του RNA, και ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο που συστήνεται από τον κατασκευαστή του, για την ομογενοποίηση του δείγματος και τον διαχωρισμό του RNA από τα υπόλοιπα συστατικά των ιστών του εντόμου (πρωτεΐνες, λιπίδια κ.α.). Ακολούθησε επώαση με DNase I (Thermo Fisher Scientific) για την απομάκρυνση μέσω υδρόλυσης, τμημάτων DNA που έχουν απομείνει και τέλος μετατροπή των mRNA σε cDNA, με εκκινητές oligo(dT) και την αντίστροφη μεταγραφάση MMLV Reverse Transcriptase (Invitrogen). Και οι δύο επώσεις πραγματοποιήθηκαν παρουσία του αναστολέα RNασών, RNase out (Invitrogen).

Ακολουθεί αναλυτικά η διαδικασία:

Αρχικά τα δείγματα (αβγά, προνύμφες 1<sup>ου</sup>, 2<sup>ου</sup>, 3<sup>ου</sup> σταδίου, ενήλικα) συλλέγονται και τοποθετούνται σε διάλυμα Extrazol (BLIRT) για να διατηρηθεί το RNA. Ο όγκος του Extrazol προσαρμόζεται ώστε να καλύπτει πλήρως το δείγμα (τουλάχιστον 20μl). Στο σημείο αυτό τα δείγματα μπορούν να αποθηκευτούν στους -80°C. Για την εξαγωγή του ολικού RNA ακολουθούνται τα παρακάτω βήματα:

1. Ομογενοποίηση του δείγματος με χρήση pestle
2. Ξέπλυμα pestle και προσθήκη Extrazol μέχρι τα 200μl
3. Καλό Vortex
4. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5'
5. Φυγοκέντρηση 4°C, 14.000rpm, 10'
6. Λήψη υπερκείμενου σε καινούριο tube
7. Προσθήκη 0,1X BCP (1-Bromo-3-chloropropane) και καλό ανακάτεμα για 15''
8. Επώαση σε RT για 10'
9. Φυγοκέντρηση στους 4°C, 14.000rpm, 15'
10. Μεταφορά υπερκείμενου σε νέο tube
11. Προσθήκη 0,5X ισοπροπανόλη + 2μl γλυκογόνο 10 mg/ml
12. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 10'
13. Φυγοκέντρηση 4°C, 14.000rpm, 30'
14. Αφαίρεση υπερκείμενου και πλύση με 200μl EtOH 70%

15. Φυγοκέντρηση 4°C, 14.000rpm, 10'
16. Αφαίρεση EtOH και στέγνωμα μέχρι την πλήρη εξάτμιση της αιθανόλης
17. Αναδιάλυση σε 23μl H<sub>2</sub>O

Ακολουθεί η κατεργασία με DNase I (Thermo Fisher Scientific) προκειμένου να υδρολυθούν τα κομμάτια DNA που υπάρχουν στο δείγμα, ώστε να αυξηθεί η καθαρότητα του RNA. Απαραίτητη είναι η χρήση αναστολέα του ενζύμου RNase, προκειμένου να προστατευθεί το RNA από αποικοδόμηση. Η διαδικασία έχει ως εξής:

1. Κάθε αντίδραση DNase I περιέχει τα συστατικά που αναγράφονται στον ακόλουθο πίνακα. Όσον αφορά την ποσότητα του RNA, δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 7-8 μg συνολικά ενώ η συγκέντρωσή του μετριέται φασματομετρικά στο Quawell Q3000. Ο τελικός όγκος της αντίδρασης είναι 30μl.

Συστατικά	Ποσότητες
Reaction Buffer 10X	3μl
1U/μl DNase I	1μl
40U/μl RNase out	0,5μl
RNA	8μg
ddH <sub>2</sub> O	Συμπλήρωση μέχρι τα 30μl

Πίνακας 2: Προετοιμασία 30μl αντίδρασης DNase I

2. Αφού ετοιμαστεί η αντίδραση, πραγματοποιείται vortex για 3" και μια πολύ σύντομη φυγοκέντρηση (spin) (λόγω του ότι περιέχουν γλυκερόλη μέσα, να αναμιχθεί με το νερό). Μετά τα δείγματα τοποθετούνται απευθείας στο υδατόλουτρο στους 37°C για 1 ώρα
3. Μετά το υδατόλουτρο προστίθενται 135 μl Ammonium Acetate 7,5M και 235 μl ddH<sub>2</sub>O
4. Προστίθεται 1V όγκος φαινόλη/χλωροφόρμιο, σε κάθε δείγμα και πραγματοποιείται vortex για 30"-1'. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 14.000 rpm, 5 λεπτά στους 4°C. Ανάλογα με τη συγκέντρωση και την καθαρότητα του δείγματος μπορεί να μειωθεί ο όγκος της αντίδρασης. Το ίδιο με V χλωροφόρμιο
5. Αφαίρεση V (υδατική φάση) με πολύ προσοχή από το υπερκείμενο για να μην διαταράξω την μεσόφαση και το βάζω σε άδειο tube
6. Προστίθενται 2,5V κρύα αιθανόλη 100% (absolute) + 2μl γλυκογόνο 10 mg/ml, το μείγμα ανακινείται 4-5 φορές και τοποθετείται στους -80°C τουλάχιστον για 1 ώρα
7. Ακολουθεί φυγοκέντρηση των δειγμάτων για 30 λεπτά, 14.000 rpm, 4°C. Αφαιρείται με πολύ προσοχή όλο το υπερκείμενο χωρίς να διαταραχθεί η πελέτα.
8. Προστίθεται 2,5/2V κρύα αιθανόλη 70% και έπεται φυγοκέντρηση στις 14.000 rpm, 10 λεπτά, 4°C.
9. Αφαιρείται με πολλή προσοχή το υπερκείμενο αναποδογυρίζοντας το tube χωρίς να διαταραχθεί η πελέτα, αφαιρείται η περίσσεια αιθανόλη και τα δείγματα αφήνονται με ανοικτό το καπάκι πλάγια στον πάγκο να στεγνώσουν για τουλάχιστον 10 λεπτά
10. Έπειτα επαναδιαλύονται οι πελέτες στα 11μl ddH<sub>2</sub>O και τα δείγματα τοποθετούνται στους 55°C για 5' για να διαλυθούν πλήρως οι πελέτες. Τέλος τα δείγματα αποθηκεύονται -80°C.

Τελευταίο βήμα αποτελεί η κατεργασία με αντίστροφη μεταγραφάση MMLV-Reverse Transcriptase (Invitrogen), για να συντεθεί το συμπληρωματικό DNA (cDNA) των μεταγράφων RNA. Χρησιμοποιούνται ως εκκινήτες, ολιγονουκλεοτιδικές αλληλουχίες θυμίνης (oligo dTs),



οι οποίες προσδένονται στις πολυαδενυλιωμένες ουρές των ώριμων μεταγράφων. Τα συστατικά της αντίδρασης αναγράφονται στον ακόλουθο πίνακα:

Αρχικές συγκεντρώσεις συστατικών	Ποσότητες	Τελικές συγκεντρώσεις συστατικών
50mM oligo dTs	1μl	2,5mM
10mM dNTPs	1μl	0,5mM
Buffer 5x	4μl	1X
100mM DTT	2μl	10mM
40U/μl RNase out	0,5μl	20U
200U/μl MMLV-RT	1μl	200U
ddH <sub>2</sub> O	0,5μl	-
RNA	1000ng σε 10μl dH <sub>2</sub> O	50ng/μl

Πίνακας 3: Προετοιμασία 20μl αντίδρασης παραγωγής cDNA

1. Αρχικά αφού έχει υπολογιστεί η συγκέντρωση του RNA στο Quawell, 1000ng αραιώνονται σε 10μl ddH<sub>2</sub>O
2. Προστίθενται τα oligo dTs και τα dNTPs, και τα δείγματα τοποθετούνται στους 65°C για 5' και απευθείας στον πάγο για 10'
3. Αφού προστεθούν τα υπόλοιπα συστατικά της αντίδρασης με τελικό όγκο 20μl, ακολουθεί επώαση για 2 ώρες στους 37°C ώστε να δράσει η αντίστροφη μεταγραφή
4. Τέλος προστίθενται 380μl ddH<sub>2</sub>O, και τα δείγματα cDNA με συγκέντρωση 2,5ng/μl αποθηκεύονται στους -20°C
5. Για κάθε αντίδραση qPCR, προστίθενται 4μl, δηλαδή 10ng cDNA

### Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης ή PCR (polymerase chain reaction) επιτρέπει την επιλεκτική ενίσχυση, in vitro, αλληλουχιών DNA από μικρή αρχική ποσότητα δείγματος. Για την πραγματοποίησή της, χρησιμοποιείται ένα ζεύγος ολιγονουκλεοτιδικών εκκινήτων, οι οποίοι σχεδιάζονται ώστε να βρίσκονται εκατέρωθεν του επιθυμητού τμήματος DNA. Οι εκκινήτες αυτοί υβριδίζουν με το συμπληρωματικό τους τμήμα, και τη δίκλωνη αυτή διαμόρφωση εντοπίζει η DNA πολυμεράση που προστίθεται στην αντίδραση. Το ένζυμο αυτό λειτουργώντας φυσιολογικά για να αντιγράψει το DNA, προσθέτει νουκλεοτίδια στο 3' άκρο, δημιουργώντας δίκλωνο DNA, και τα συνδέει με τα προηγούμενα με 5'-3' φωσφοδιεστερικό δεσμό. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε η Taq DNA πολυμεράση (απομονωμένη από το βακτήριο *Thermus aquaticus*), η οποία είναι ανθεκτική σε υψηλές θερμοκρασίες (έως 95°C) που είναι απαραίτητες για την αρχική αποδιάταξη του DNA.

Η αντίδραση πραγματοποιείται σε κύκλους, για να επιτευχθεί η εκθετική αύξηση της ποσότητας του αρχικού προϊόντος. Πρώτο στάδιο αποτελεί η αποδιάταξη του ολικού DNA στους 95°C, ώστε να γίνει από δίκλωνο μονόκλωνο και να μπορέσουν οι εκκινήτες να εντοπίσουν στους στόχους τους. Ακολουθεί επώαση στη θερμοκρασία υβριδοποίησης των εκκινήτων ( $T_{\text{melting}}-5^{\circ}\text{C}$ ) και επιμήκυνση από την Taq DNA πολυμεράση στους 72°C με σκοπό να συντεθεί το DNA. Τα στάδια επαναλαμβάνονται η φορές (κύκλοι), και η αλληλουχία στο τέλος θα έχει πολλαπλασιαστεί  $2^n$  φορές.

Ακολουθούν πίνακες με τις ποσότητες των συστατικών και τις συνθήκες της αντίδρασης που χρησιμοποιήθηκαν.

Συστατικά-Αρχικές συγκεντρώσεις	Τελικός όγκος	Τελικές συγκεντρώσεις
10X KAPA Taq Buffer	2μL	1X
10mM dNTP Mix	0,4μL	0,2mM
10μM Forward Primer	0,8μL	0,4mM
10μM Reverse Primer	0,8μL	0,4mM
5U/μL KAPA Taq DNA Polymerase	0,1μL	0,5U
2,5ng/μl cDNA of <i>Ceratitidis capitata</i>	4μL	0,5ng/μl (10ng)
ddH <sub>2</sub> O	11,9μL	-

Πίνακας 4: Προετοιμασία 20μl αντίδρασης PCR

Βήμα	Θερμοκρασία	Διάρκεια	Κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη	95°C	3 min	1
Αποδιάταξη	95°C	30 sec	35
Υβριδοποίηση	T <sub>a</sub> °C	30 sec	35
Επιμήκυνση	72°C	20 sec	35
Τελική επιμήκυνση	72°C	20 sec	1
Διατήρηση	4°C	∞	1

Πίνακας 5: Συνθήκες αντίδρασης PCR

Η Θερμοκρασία επιμήκυνσης εξαρτάται από το μέγεθος του προϊόντος και υπολογίζεται ως εξής: για την ενίσχυση 1000 βάσεων απαιτείται χρόνος 1 λεπτού. Στην προκειμένη περίπτωση τα προϊόντα έχουν μήκος περίπου 300 βάσεις οπότε χρειάζονται τουλάχιστον 18 δευτερόλεπτα. Χρησιμοποιήθηκαν 30 δευτερόλεπτα για να είναι εξασφαλισμένη η επιμήκυνση.

Η Θερμοκρασία υβριδοποίησης (annealing temperature, T<sub>a</sub>) διαφέρει για κάθε ζεύγος εκκινητή, και υπολογίζεται από την μέση θερμοκρασία τήξης των εκκινητών (melting temperature, T<sub>m</sub>) πλην 5°C. Σε περίπτωση που εμφανιστούν παραπροϊόντα, δοκιμάζονται υψηλότερες θερμοκρασίες. Οι θερμοκρασίες που χρησιμοποιήθηκαν αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα:

Γονίδιο που ενισχύεται	Θερμοκρασία υβριδοποίησης εκκινητών (T <sub>annealing</sub> , T <sub>a</sub> )
RPL19	52°C
CHM4B	52°C
V-ATPase	57°C

ETH	52°C
ETH-RA	52°C
CHS	58°C
UAP	53°C
GFP	55°C

Πίνακας 6: Θερμοκρασίες υβριδοποίησης εκκινητών PCR

## Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Σκοπός της μεθόδου είναι η οπτικοποίηση των προϊόντων της PCR και ο διαχωρισμός τους με βάση το μοριακό τους βάρος. Η μέθοδος βασίζεται στην κατασκευή ενός πηκτώματος αγαρόζης μέσω της διαλυτοποίησής της με θερμότητα σε κάποιο μέσο (πχ TBE, TAE). Η αγαρόζη είναι ένα πολυμερές, το οποίο δημιουργεί πόρους από τους οποίους διέρχεται το DNA. Όσο μικρότερο είναι το τμήμα DNA, τόσο πιο γρήγορα διαπερνά τους πόρους της αγαρόζης. Το πήκτωμα αυτό αφού πήξει σε θερμοκρασία δωματίου, τοποθετείται σε μια συσκευή ηλεκτροφόρησης. Η συσκευή αυτή έχει δύο πόλους (θετικό και αρνητικό) και με την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου το DNA που έχει τοποθετηθεί στο πήκτωμα κινείται προς τον θετικό πόλο, λόγω του αρνητικού του φορτίου. Σε μία από τις θέσεις του πηκτώματος, τοποθετείται ένα μάρτυρας μοριακού βάρους (ladder), που αποτελείται από τμήματα DNA γνωστού μήκους, ώστε να βοηθήσει στον χαρακτηρισμό των άγνωστων τμημάτων DNA. Για την οπτικοποίηση του DNA προστίθεται στην πηκτή που κατασκευάζεται, ποσότητα βρωμιούχου αιθιδίου. Το συστατικό αυτό έχει την ικανότητα να συγκεντρώνεται μεταξύ της διπλής έλικας του DNA ή του RNA, και να τα καθιστά ορατά κάτω από υπεριώδη ακτινοβολία.

Οι πηκτές αγαρόζης που κατασκευάστηκαν για τα προϊόντα της PCR, είχαν περιεκτικότητα 1,5% w/v, καθώς το αναμενόμενο μήκος των προϊόντων αυτών ήταν 286, 332 και 540 ζεύγη βάσεων, ενώ για την εμφάνιση των dsRNA οι πηκτές είχαν περιεκτικότητα 2% w/v για μεγαλύτερη ευκρίνεια. Τα συστατικά που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα εξής:

- ✓ Ρυθμιστικό διάλυμα TBE 0,5X (Παρασκευάζεται πυκνό διάλυμα TBE 5X από: Tris, EDTA 0,5M pH=8 και Boric acid)
- ✓ Αγαρόζη σε σκόνη
- ✓ Βρωμιούχο αιθίδιο
- ✓ Μάρτυρας μοριακού βάρους 100bp (EnzyQuest)
- ✓ Χρωστική φόρτωσης (Loading dye) 6X

## Ανάκτηση DNA από πήκτωμα αγαρόζης

Σκοπός της μεθόδου, είναι η απομόνωση ενός προϊόντος DNA επιθυμητού μεγέθους, προκειμένου να χρησιμοποιηθεί στη συνέχεια σε αντιδράσεις όπως αλληλούχιση, πέψη από περιοριστικά ένζυμα κ.α. Το kit που χρησιμοποιήθηκε είναι αυτό της MACHEREY-NAGEL και ονομάζεται: NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up. Το πήκτωμα αγαρόζης στο οποίο έχουν ηλεκτροφορηθεί τα PCR προϊόντα με την εφαρμογή του ηλεκτρικού πεδίου, τοποθετείται αρχικά σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV), ώστε να είναι ορατές οι ζώνες, και με ένα αποστειρωμένο κοπίδι αποκόπτεται και αφαιρείται η επιθυμητή ζώνη. Στη προκειμένη

περίπτωση η επιθυμητή ζώνη ήταν είτε στο 286bp είτε στα 332bp (V-ATPase) είτε στα 540bp (GFP). Αν το τζελ είναι <2% περιεκτικότητα σε αгарόζη, προστίθενται όγκος 200μl Binding Buffer NT1 για κάθε μάζα 100mg τζελ αгарόζης. Για τζελ >2% διπλασιάζεται ο όγκος του NT1. Το δείγμα επωάζεται, σε υδατόλουτρο, στους 50°C για 10 λεπτά με ενδιάμεσα vortex ώστε να λιώσει το τζελ και να απελευθερωθεί το DNA στο διάλυμα. Στη συνέχεια το δείγμα τοποθετείται με μια στήλη που περιέχει σφαιρίδια πυριτίου, και με φυγοκέντρηση 11.000g για 30sec το δείγμα κατακρατείται στη στήλη. Ακολουθούν 2 διαδοχικές πλύσεις με το Washing Buffer NT3, με φυγοκεντρήσεις 11.000g για 1 και 5min αναντίστοιχα ώστε να αυξηθεί η καθαρότητα του τελικού δείγματος. Σημαντικό ύστερα από αυτό το βήμα είναι η πλήρης απομάκρυνση της αιθανόλης που περιέχει το Buffet NT3, η οποία αν παραμείνει, θα αποτελέσει αναστολέα ενζυμικών αντιδράσεων. Έτσι πραγματοποιείται μια 5min επώαση της στήλης στους 70°C, ώστε να εξατμιστεί πλήρως. Σαν τελικό βήμα, γίνεται η έκλυση του DNA σε νέο tube με την προσθήκη 15-30μl του Elution Buffer NE και φυγοκέντρηση για 1 min στις 11.000g στροφές. Η συγκέντρωση του DNA, μετρήθηκε στο Quawell Q3000.

Η ανάκτηση των συγκεκριμένων τμημάτων DNA πραγματοποιήθηκε με σκοπό την σύνθεση δίκλωνων μορίων RNA, με υπόστρωμα το DNA που ανακτήθηκε.

### Σύνθεση δίκλωνων μορίων RNA-T7 μεταγραφή

Κάθε ζεύγος εκκινητών με το οποία συντέθηκε το DNA υπόστρωμα, διαθέτει αλληλουχίες αναγνώρισης της T7 πολυμεράσης και στα δύο άκρα του, έτσι ώστε παρουσία του ενζύμου αυτού να συντεθεί δίκλωνο RNA. Για τη σύνθεση αυτή χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο της Thermo Fisher Scientific.

Παρακάτω αναγράφονται αναλυτικά τα συστατικά της αντίδρασης:

Συστατικά	Όγκος	Τελικές συγκεντρώσεις
Buffer 5x	4μL	1X
NTPs (10mM)	4μL	2mM
DNA	400ng	20ng/μl
40U/μl RNase out	0,5μL	20U
20U/μl T7 polymerase	0,6μL	12U
ddH <sub>2</sub> O	Συμπλήρωση μέχρι τα 20μL	-

Πίνακας 7: Προετοιμασία αντίδρασης 20μl σύνθεσης δίκλωνου RNA

Τα δείγματα επωάζονται για 2 ώρες στους 37 °C για να δράση η πολυμεράση. Στη συνέχεια προστίθενται 0,8μl 1U/μl DNase I σε κάθε δείγμα, και ακολουθεί επώαση για 15 λεπτά στους 37 °C ώστε να δράσει το ένζυμο. Τέλος προστίθεται 0,8μl EDTA 0,5mM pH=8 και τα δείγματα επωάζονται για 10 λεπτά στους 65°C, προκειμένου να παύσει η λειτουργία των ενζύμων.

Για τον καθαρισμό των δειγμάτων, ώστε να ληφθεί στο τέλος όσο πιο καθαρό dsRNA ακολουθεί απομόνωση του dsRNA με φαινόλη-χλωροφόρμιο. Κατά την προσθήκη φαινόλης χλωροφορμίου ή σκέτου χλωροφορμίου, η υδατική φάση του περιέχει το dsRNA

διαχωρίζεται και ανεβαίνει προς τα πάνω λόγω της μικρότερης πυκνότητας της σε σχέση με την οργανική φάση. Έτσι, τα λιπίδια συσσωρεύονται στην οργανική φάση της φαινόλης, οι πρωτεΐνες στη μεσόφαση, και η επάνω φάση που παραλαμβάνεται, περιέχει τα νουκλεϊκά οξέα (dsRNA στην προκειμένη περίπτωση).

Τα βήματα έχουν ως εξής:

- ✓ Προστίθεται στα δείγματα νερό μέχρι να φτάσει ο όγκος 200μL
- ✓ Προστίθεται ίσος όγκος φαινόλης-χλωροφορμίου (200μL)
- ✓ Ακολουθεί ανακίνηση με vortex
- ✓ Έπειτα φυγοκέντρηση 10 λεπτά 14.000g
- ✓ Παραλαβή της πάνω φάσης→υδατική (dsRNA) και μεταφορά της σε καινούριο tube
- ✓ Προσθήκη ίσου όγκου χλωροφόρμιο
- ✓ Ανακίνηση με vortex
- ✓ Φυγοκέντρηση 10min 14.000g
- ✓ Παραλαβή ξανά της πάνω φάσης→υδατική (dsRNA) μεταφορά σε καινούριο tube

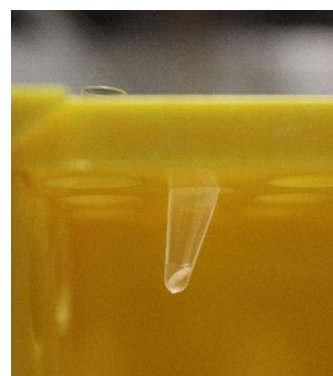
Ακολουθεί καταβύθιση με αιθανόλη, τόσο για τον πλήρη καθαρισμό των δειγμάτων από τις φαινόλες, όσο και για τη συμπύκνωση του dsRNA. Η διαδικασία έχει ως εξής:

- ✓ Προσθήκη 2V κρύα αιθανόλη 100% + 0,1V CH<sub>3</sub>COONa + 2μL γλυκογόνο 10 mg/ml
- ✓ Παραμονή στους -80°C για 1 ώρα τουλάχιστον
- ✓ Φυγοκέντρηση στους 4°C για 25 λεπτά, 14.000rpm
- ✓ Αφαίρεση υπερκείμενου, διατήρηση πελέτας
- ✓ Προσθήκη 1V υπερκείμενου κρύα αιθανόλη 70%
- ✓ Φυγοκέντρηση στους 4°C για 15 λεπτά, 14.000rpm
- ✓ Προσεκτική αφαίρεση υπερκείμενου, ώστε να μη διαταραχθεί η πελέτα
- ✓ Επώαση των tube στους 37°C για 10 λεπτά ώστε να εξατμιστεί πλήρως η αιθανόλη
- ✓ Επαναδιάλυση σε 30μl ddH<sub>2</sub>O

Τέλος το dsRNA μετريέται στο Quawell για να γίνει γνωστή η συγκέντρωσή του. Ακόμη, ποσότητα από αυτό φορτώνεται σε πήκτωμα αγαρόζης 2%, μαζί με μάρτυρα μοριακού βάρους για να βεβαιωθεί η επιτυχημένη σύνθεσή του και το αναμενόμενο μοριακό του βάρος.

### Χορήγηση dsRNA μέσω εμβάπτισης

Για την χορήγηση του dsRNA, πραγματοποιήθηκε η μέθοδος της εμβάπτισης (soaking). Προνύμφες δευτέρου σταδίου (5<sup>η</sup> μέρα μετά τη συλλογή αβγών) αφού παραμείνουν σε συνθήκες έλλειψης τροφής για περίπου 1 ώρα, βυθίζονται για 30 λεπτά σε υδατικό διάλυμα dsRNA συγκεκριμένης συγκέντρωσης και όγκου 15μl, όπως φαίνεται στην εικόνα. Ύστερα επιστρέφουν σε τροφή και πραγματοποιείται δειγματοληψία για παρατήρηση της έκφρασης των γονιδίων στόχων με qPCR(24,48,72 ώρες), όπως έγινε και στην περίπτωση της *Anastrepha fraterculus* [75]. Για κάθε χρονική στιγμή, χρησιμοποιήθηκαν δύο βιολογικές επαναλήψεις, και τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -80°C παρουσία Extrazol. Οι



Εικόνα 20: Εμβάπτιση προνύμφης σε 15μl dsRNA

συγκεντρώσεις dsRNA που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε γονίδιο αναγράφονται στον ακόλουθο πίνακα:

dsRNA	Συγκέντρωση
dsGFP	0,5μg/μl
dsRPL19	0,5μg/μl
dsCHM4B	0,5μg/μl
dsETH-RA	1μg/μl
dsV-ATPase	2μg/μl
dsCHS	2μg/μl

Πίνακας 8: Συγκεντρώσεις δίκλωνων RNA για εμβάπτιση προνυμφών

### Ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (qPCR)

Για τη μελέτη της έκφρασης των γονιδίων στόχων σε προνύμφες 2<sup>ου</sup> σταδίου, αλλά και την σύγκριση της έκφρασης τους σε προνύμφες που είχαν δεχτεί κατεργασία με dsRNA έναντι των γονιδίων αυτών σε σχέση με αυτές που δέχτηκαν κατεργασία με dsRNA με την αλληλουχία του GFP (control), χρησιμοποιήθηκε η ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (qPCR). Όπως φαίνεται και από το όνομά της, η PCR αυτή δίνει δεδομένα για την αρχική ποσότητα του στόχου στο δείγμα, εκπέμποντας σήμα το οποίο ανιχνεύεται. Αυτό στη συγκεκριμένη περίπτωση πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια της χρωστικής KAPA SYBR Green, μιας χημικής ένωσης που εκπέμπει όταν συμπλεχθεί με τη διπλή έλικα του DNA. Η εκπομπή αυτή αυξάνεται όσο με το πέρασμα των κύκλων της PCR, πολλαπλασιάζονται εκθετικά τα προϊόντα που ενισχύονται. Έτσι το μηχάνημα της qPCR (Bio-Rad Laboratories) καταγράφει αυτή την εκπομπή κατά τη διάρκεια του χρόνου, και η πληροφορία που χρησιμοποιείται είναι ο κύκλος στον οποίο η εκπομπή έχει ανοδική πορεία. Ορίζεται αυτόματα ένα κατώφλι απορρόφησης, δηλαδή μια χαμηλή τιμή την οποία όταν περάσει κάθε προϊόν που ενισχύεται, εκείνη θα είναι και η τιμή του κύκλου τις PCR που θα αντιπροσωπεύει την αρχική του ποσότητα. Μόλις ολοκληρωθούν οι προγραμματισμένοι κύκλοι, ακολουθεί ένα σταδιακό ανέβασμα της θερμοκρασίας, από τη θερμοκρασία υβριδοποίησης των εκκινητών μέχρι τους 95°C, και συλλέγονται δεδομένα από τη μείωση της απορρόφησης, εφόσον η SYBR Green σιγά σιγά αποδεσμεύεται και σταματά να εκπέμπει. Η θερμοκρασία που θα έχουν γίνει μονόκλωνα τα τμήματα DNA που ενισχύθηκαν μεταφράζεται στο μηχάνημα ως θερμοκρασία τήξης, και μας δίνει δεδομένα για το μέγεθος του επιθυμητού προϊόντος και ιδανικά τη μοναδικότητά του.

Όσον αφορά τη μελέτη της μείωσης της έκφρασης μέσω RNAi, τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με τη μέθοδο των Kenneth J. Livak και Thomas D. Schmittgen [118] Η μέθοδος αυτή, γνωστή και ως μέθοδος  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , χρησιμοποιείται για την ανάλυση της σχετικής έκφρασης γονιδίων και αποτελείται από δύο βήματα: αρχικά η τιμή Ct, Cycle threshold (ο συγκεκριμένος κύκλος στον οποίο ενισχύεται το προϊόν, και ανιχνεύεται η χρωστική στο κατώφλι που έχει οριστεί) της ενίσχυσης του γονιδίου στόχου, κανονικοποιείται σε σχέση με την έκφραση ιδιοσυστατων γονιδίων στο ίδιο δείγμα. Αυτό συμβαίνει ώστε να μην επηρεάζουν το αποτέλεσμα τυχόν διαφορές στις αρχικές ποσότητες, εξαιτίας κάποιου τεχνικού λάθους. Για τις προνύμφες δευτέρου σταδίου χρησιμοποιήθηκε ως ιδιοσυστατο, το γονίδιο της υπομονάδα B1 της RNA πολυμεράσης II, RPB1, που έχει φανεί σε παλαιότερη δημοσίευση του εργαστηρίου ότι λειτουργεί αποτελεσματικά για το στάδιο της προνύμφης [115] Το δεύτερο βήμα, αφορά τον

υπολογισμό της σχετικής έκφρασης του γονιδίου στόχου στα δείγματα που αναμένεται να έχει πραγματοποιηθεί η σίγηση, σε σχέση με την έκφραση του στη συνθήκη-μάρτυρα του πειράματος. Στην συγκεκριμένη περίπτωση η συνθήκη του μάρτυρα αυτού, είναι η κατεργασία κάποιων δειγμάτων με δίκλωνο RNA με την αλληλουχία του GFP, που δεν εμφανίζει ομολογία με το γονιδίωμα της *Ceratitidis capitata*. Η έκφραση του γονιδίου στόχου στη συνθήκη του GFP ορίζεται ως 100%, και σε σχέση με αυτή υπολογίζεται η αντίστοιχη, στη συνθήκη που έχει εφαρμοσθεί δίκλωνο RNA έναντι κάποιου γονιδίου-στόχου. Για να έχει πετύχει η σίγηση, η έκφραση αυτή θα πρέπει να είναι μικρότερη.

Ακολουθούν πίνακες με τις συνθήκες της αντίδρασης που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε ζεύγος εκκινητών:

Συστατικά	Τελικές συγκεντρώσεις	Όγκοι για 1 αντίδραση
2X KAPA SYBR Mix	1X	7,5 μl
10μM Forward Primer	100nM	0,2 μl
10μM Reverse Primer	100nM	0,2 μl
2,5ng/μl cDNA of <i>Ceratitidis capitata</i>	2,5ng/μl	4 μl
ddH <sub>2</sub> O	-	3,2 μl

Πίνακας 9: Προετοιμασία αντίδρασης qPCR με τελικό όγκο 15μl

Βήμα	Θερμοκρασία	Διάρκεια	Κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη	95°C	3 min	1
Αποδιάταξη	95°C	10 sec	39
Υβριδοποίηση	T <sub>a</sub> °C	30 sec	39
Επιμήκυνση	72°C	30 sec	39

Δημιουργία καμπύλης τήξης, μέσω σταδιακής αύξησης της θερμοκρασία (0,5°C ανά 5 δευτερόλεπτα) από την θερμοκρασία υβριδοποίησης έως τους 95°C

Πίνακας 10: Συνθήκες και στάδια αντίδρασης qPCR

Γονίδιο που ενισχύεται	Θερμοκρασία υβριδοποίησης εκκινητών (T <sub>annealing</sub> , T <sub>a</sub> )
RPL19	55°C
CHM4B	55°C
V-ATPase	55°C
ETH	55°C
ETH-RA	55°C
CHS	-*
UAP	55°C**

Πίνακας 11: Θερμοκρασίες υβριδοποίησης εκκινητών qPCR

\*Οι εκκινητές για το γονίδιο CHS δε δούλεψαν σε καμία θερμοκρασία υβριδοποίησής τους, καθώς έδιναν παραπροϊόντα σε διαφορετικές θερμοκρασίες τήξης, από την αναμενόμενη του γονιδίου στόχου.

\*\*Η θερμοκρασία αφορά το δεύτερο ζευγάρι εκκινητών (F2,R2) καθώς το πρώτο έδινε παραπροϊόντα σε διάφορες θερμοκρασίες υβριδοποίησής του.

### Εκτροφή εργαστηριακού πληθυσμού *Ceratitis capitata*

Στο εντομοτροφίο του εργαστηρίου Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής, εκτρέφεται το στέλεχος Egypt II της *Ceratitis capitata*. Οι συνθήκες εντομοτροφίου είναι  $65\pm 5\%$  υγρασία,  $23\pm 2^\circ\text{C}$  με φωτοπερίοδο 14:10 (φως: σκοτάδι). Για τη διατήρηση του πληθυσμού, στην περίοδο ενηλικίωσης των εντόμων που είναι αναπαραγωγικά ώριμα, συλλέγονται αβγά και τοποθετούνταν σε τροφή προνυμφών. Τα αυγά αρχίζουν να εκκολάπτονται 2 μέρες μετά την συλλογή τους και ύστερα από περίπου μία εβδομάδα, οι προνύμφες φτάνουν στο 3<sup>ο</sup> στάδιο ανάπτυξής τους. Έπειτα, μεταφέρονται σε άμμο όπου θα μεταβούν στο στάδιο της νύμφης, μιμούμενες το φυσικό τους περιβάλλον. Εντός των επόμενων ημερών, πραγματοποιείται η μεταφορά των νυμφών σε κλουβί συντήρησης ενηλίκων, όπου θα γίνει το τελικό στάδιο της μεταμόρφωσης. Εκεί οι μύγες τρέφονται με τροφή ενηλίκων.

Συστατικά	Ποσότητα για 500ml τροφής
Νερό βρύσης	450ml
Μαγιά	30g
Ζάχαρη	30g
Χαρτοβάμβακα	30g
Διάλυμα χοληστερόλης (25g χοληστερόλη, 350ml dH <sub>2</sub> O, 125ml 95% αιθανόλη)	10ml
Διάλυμα HCl (97,5ml 25% HCl, 352,5ml dH <sub>2</sub> O)	10ml
Διάλυμα Βενζοϊκού Νατρίου (25g Βενζοϊκό Νάτριο, 75ml dH <sub>2</sub> O, 150ml 95% αιθανόλη)	10ml

Πίνακας 12: Προετοιμασία 500ml τροφής προνυμφών

Συστατικά	Ποσότητα για 20g τροφής
Υδρολυμένη μαγιά	4g
Κρυσταλλική ζάχαρη	12g

Πίνακας 13: Προετοιμασία 20g τροφής ενηλίκων

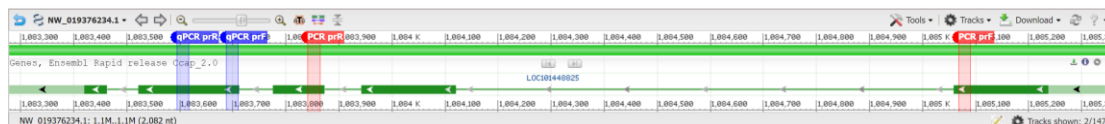


## Αποτελέσματα

### Σχεδιασμός εκκινητών

Για την ενίσχυση γονιδίων στόχων στη μύγα της Μεσογείου και την ακόλουθη σύνθεση του dsRNA σχεδιάστηκε ένα ζεύγος εκκινητών για το καθένα από αυτά. Επειδή είναι γνωστό ότι το μήκος του dsRNA επηρεάζει την απορρόφησή του από τα κύτταρα του εντόμου [117], και άρα και την απόδοση της σίγησης, τα dsRNAs άρα και τα προϊόντα των PCR, επιλέχθηκε να έχουν ίδιο μέγεθος, ώστε να μην αποτελέσει παράγοντα για τις συγκρίσεις των μειώσεων της έκφρασης μεταξύ των γονιδίων-στόχων. Έτσι όλοι οι εκκινητές σχεδιάστηκαν έτσι ώστε να ενισχύουν τμήμα μήκους 240 ζευγών βάσεων, με εξαίρεση το ζεύγος εκκινητών του γονιδίου V-ATPase, που ενισχύουν τμήμα 286 ζευγών βάσεων. Οι εκκινητές είναι όλοι σχεδιασμένοι πάνω σε εξόνια, εφόσον τα dsRNA που θα παραχθούν, θα στοχεύσουν μέσω των siRNA που θα παράγουν, ώριμα μεταγράφα mRNA που βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων-στόχων. Κάθε εκκινητής διαθέτει στο 5' άκρο του την αλληλουχία πρόσδεσης της T7 RNA πολυμεράσης, δηλαδή την αλληλουχία του υποκινητή που αυτή αναγνωρίζει (5'-TAATACGACTCACTATAGGGAGA-3'), για την μετέπειτα σύνθεση του dsRNA.

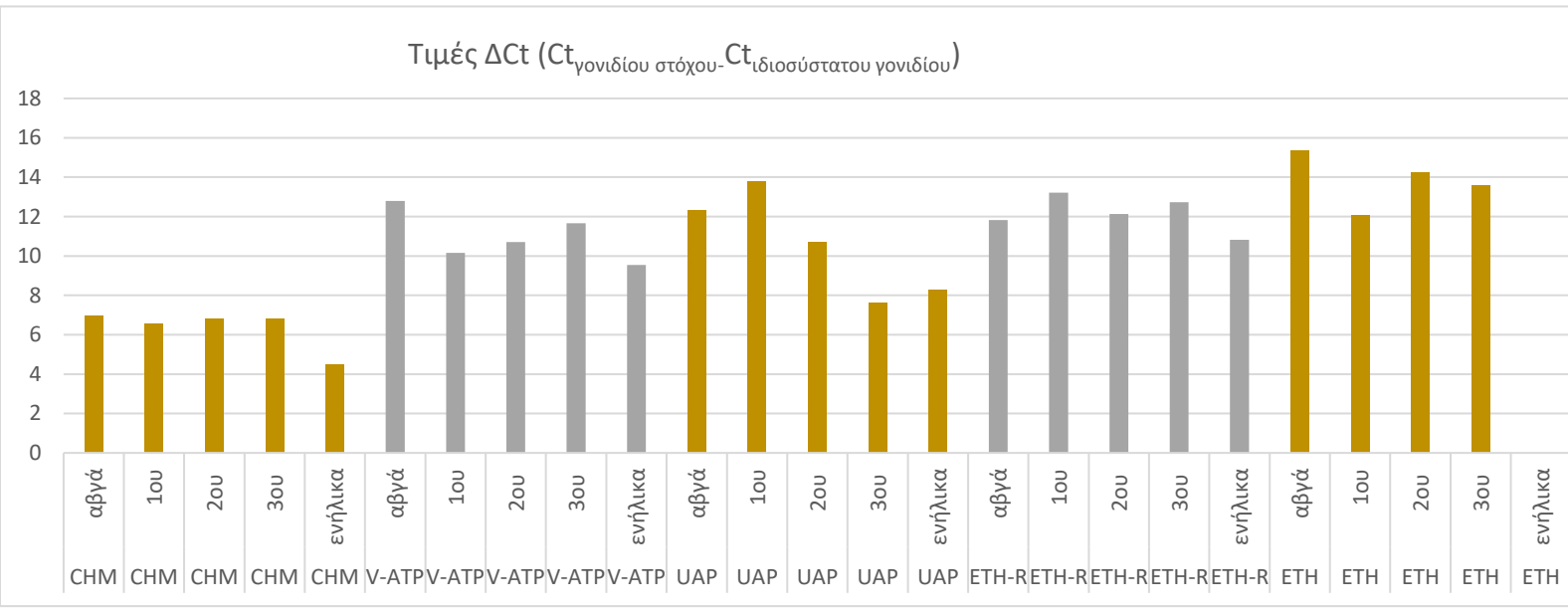
Για τον έλεγχο και τη σχετική ποσοτικοποίηση της έκφρασης των 7 γονιδίων στα διάφορα αναπτυξιακά στάδια του εντόμου, αλλά και την εκτίμηση της αποτελεσματικότητας της σίγησης, σχεδιάστηκαν επιπλέον εκκινητές για ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (real time-qPCR). Βασική προϋπόθεση για τον σχεδιασμό τους, ήταν να μην ενισχύουν τμήμα της αλληλουχίας του dsRNA, ώστε μετά τη χορήγηση του στα έντομα, να μην υπάρχει κάποιο ψευδώς θετικό αποτέλεσμα. Ενδεικτικά φαίνονται παρακάτω οι εκκινητές για την PCR (κόκκινο χρώμα) και για την qPCR (μπλε χρώμα) για το γονίδιο CHM4B, όπου διακρίνεται πως τα τμήματα των εξονίων του γονιδίου που ενισχύουν δεν επικαλύπτονται.



Εικόνα 21: Θέση εκκινητών PCR & qPCR στο γονίδιο CcCHM4B (πηγή: NCBI)

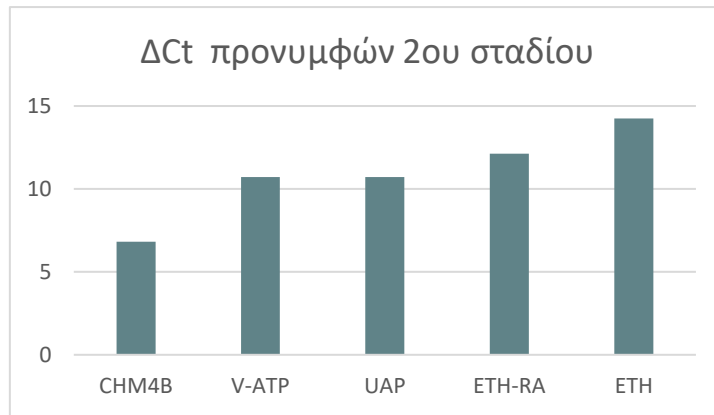
## Έκφραση γονιδίων-στόχων

Αρχικά, έπρεπε να καθορισθεί το προφίλ έκφρασης των επτά υποψηφίων γονιδίων-στόχων της σίγησης. Έτσι πραγματοποιήθηκε qPCR από πολλά δείγματα (pooled samples) και η έκφραση των εν λόγω γονιδίων απεικονίζεται στο παρακάτω γράφημα. Ένα από τα γονίδια στόχοι, είναι το RLP19, το οποίο εμφάνισε υψηλή έκφραση σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια, εφόσον πρόκειται για ιδιοσυστατο γονίδιο (ενίσχυση σε 19-22 κύκλους, δε φαίνεται στο γράφημα). Η έκφραση των υπόλοιπων γονιδίων-στόχων κανονικοποιήθηκε με βάση την έκφραση του RPL19. Στο γράφημα διακρίνονται οι τιμές  $\Delta Ct$  δηλαδή η τιμή του κύκλου που ενισχύθηκε το γονίδιο στόχος πλην την τιμή που ενισχύθηκε το ιδιοσυστατο RPL19 του ίδιου δείγματος. Όσο πιο χαμηλή είναι η τιμή του  $\Delta Ct$ , τόσο υψηλότερη είναι η έκφραση, επειδή είναι χαμηλότερη η τιμή του κύκλου (Ct).



Πίνακας 14: Κανονικοποιημένη έκφραση 5 γονιδίων στόχων (CHM4B, V-ATPase, UAP, ETH-RA, ETH), σε αβγά, προνύμφες 1ου, 2ου και 3ου σταδίου και σε ενήλικα έντομα. Όσο μικρότερη η τιμή  $\Delta Ct$  που διακρίνεται στο διάγραμμα, τόσο υψηλότερη η έκφραση του γονιδίου στο αντίστοιχο αναπτυξιακό στάδιο.

Παρατηρούμε ότι όλα τα γονίδια εκφράζονται σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια, εκτός από το ETH στα ενήλικα άτομα. Επειδή σκοπός του πειράματος είναι η μείωση της έκφρασης στα πρώτα αναπτυξιακά στάδια του εντόμου, παρακάτω φαίνεται η έκφραση των γονιδίων σε προνύμφες 2<sup>ου</sup> σταδίου που είναι αυτές που κατεργάστηκαν με dsRNA, επειδή είναι ευκολότερη ο χειρισμός τους, σε σχέση με αυτές 1<sup>ου</sup> σταδίου, αλλά και με τα αβγά. Υψηλότερη έκφραση-ύστερα από το RPL19, φαίνεται να έχει το γονίδιο CHM4B, και ακολουθούν με τη σειρά τα: V-ATPase, UAP, ETH-RA, ETH.

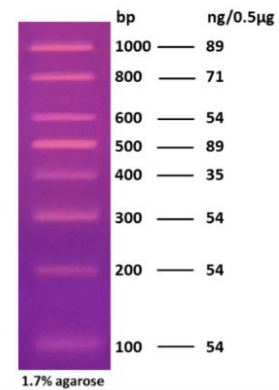


Πίνακας 15: Έκφραση 5 γονιδίων-στόχων σε προτύμους 2ου σταδίου

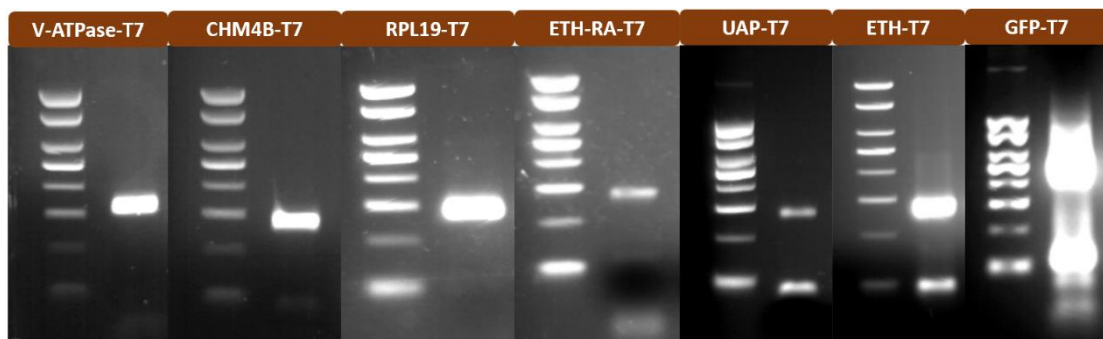
Όσον αφορά το γονίδιο CHS που δεν περιλαμβάνεται στα παραπάνω γραφήματα, κανένα ζεύγος εκκινητών δεν ήταν αποτελεσματικό ώστε να δίνει ένα μόνο προϊόν, οπότε δε συμπεριλαμβάνεται στη συνέχεια των αποτελεσμάτων.

### Ενίσχυση προϊόντων PCR

Έχοντας ως υπόστρωμα cDNA από τα διάφορα αναπτυξιακά στάδια του εντόμου, πραγματοποιήθηκαν PCR, η οποίες ηλεκτροφορήθηκαν και τα αποτελέσματα για κάθε γονίδιο φαίνονται παρακάτω. Οι αναμενόμενες ζώνες είναι 286bp για όλα τα γονίδια εκτός από το V-ATPase που είναι 332bp. Ο ladder που χρησιμοποιήθηκε φαίνεται στη διπλανή εικόνα. Οι ζώνες αυτές απομονώθηκαν, και τα τμήματα των γονιδίων με τα T7 άκρα χρησιμοποιήθηκαν για τη σύνθεση των dsRNA. Για την ενίσχυση του GFP χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα ανακτημένο DNA από προηγούμενη PCR (προϊόν gel extraction), και το επιθυμητό προϊόν που χρησιμοποιήθηκε στη συνέχεια βρίσκεται στις 540bp.



Εικόνα 22: Ladder 100bp

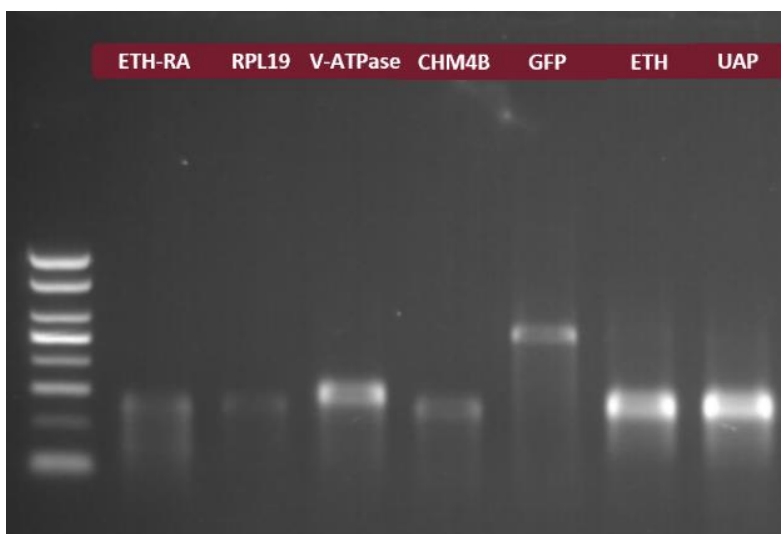


Εικόνα 23: Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης των προϊόντων PCR

Οι επιθυμητές ζώνες αφαιρέθηκαν με κοπίδι, ώστε να ανακτηθεί το DNA από αυτές για την ακόλουθη σύνθεση δίκλωνων μορίων RNA.

## Παραγωγή δίκλωνων μορίων RNA

Η ακόλουθη φωτογραφία επιβεβαιώνει την επιτυχημένη σύνθεση των δίκλωνων μορίων RNA, μέσω της εμφάνισής τους σε πήκτωμα αγαρόζης. Όλα τα τμήματα έχουν μήκος 286bp, εκτός από του γονιδίου της V-ATPase που έχει 332bp και του GFP που έχει 540bp.



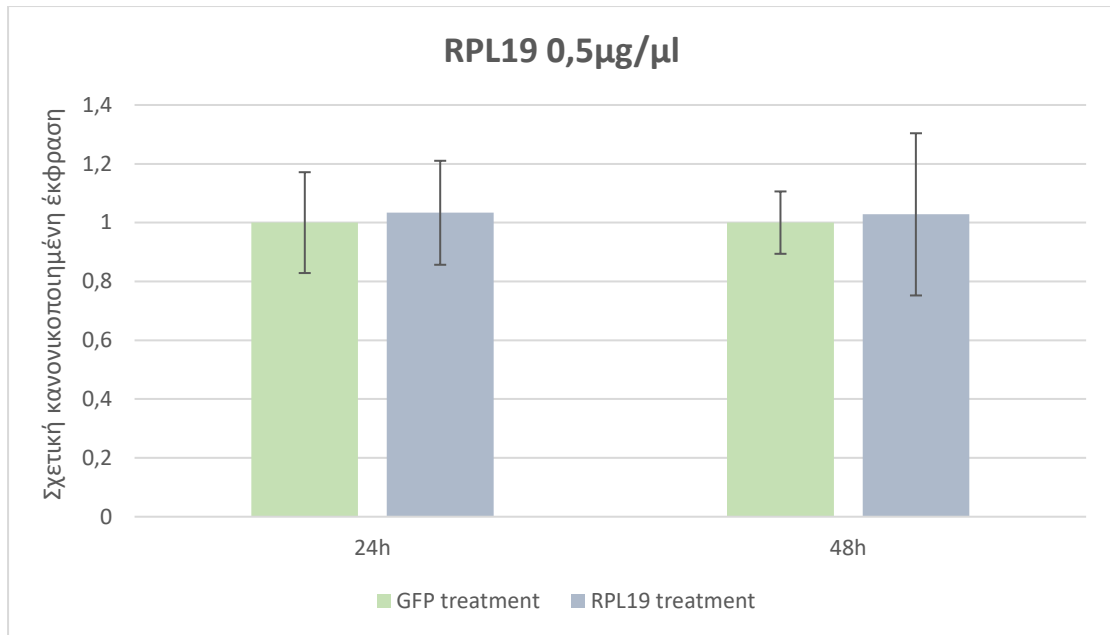
Εικόνα 24: Απεικόνιση dsRNAs σε πήκτωμα αγαρόζης

## Σχετική κανονικοποιημένη έκφραση γονιδίων

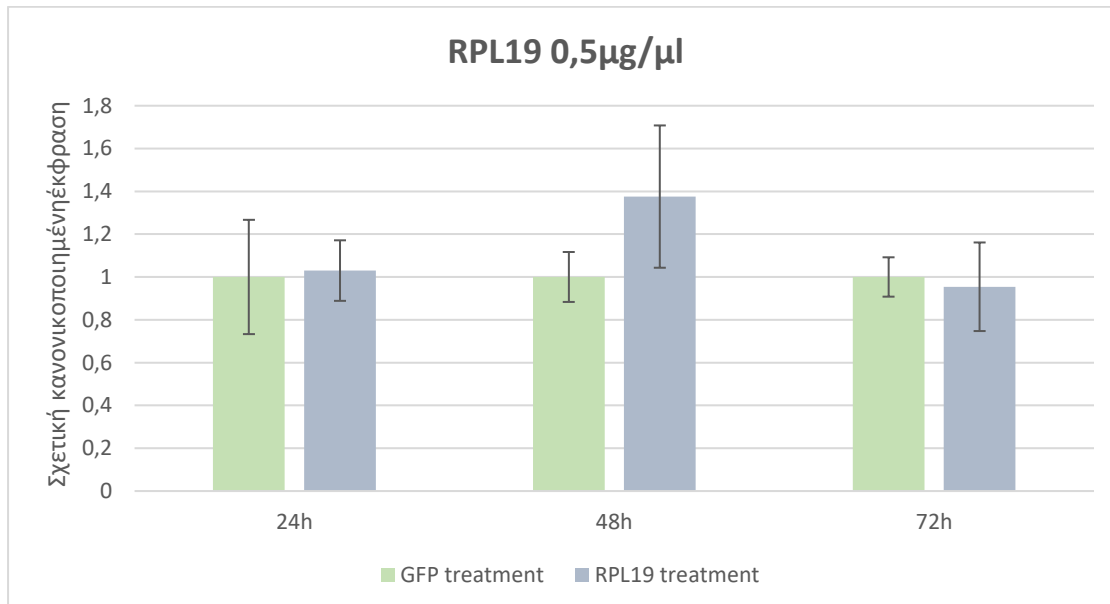
Κατά τη διάρκεια της παρούσας διπλωματικής εργασίας, πραγματοποιήθηκε κατεργασία με dsRNA για τα 4 από τα υποψήφια γονίδια: RPL19, CHM4B, ETH-RA και V-ATPase.

Σε καθεμία από τις παρακάτω συνθήκες, χρησιμοποιήθηκαν προνύμφες 2<sup>ου</sup> σταδίου (5<sup>η</sup> ημέρα από τη συλλογή αυγών), οι οποίες εμβαπτίστηκαν, καθεμία ξεχωριστά για μισή ώρα σε όγκο 15μl, που περιείχε dsRNA ορισμένης συγκέντρωσης. Για κάθε χρονική στιγμή, στην οποία πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία για τον έλεγχο μείωσης της έκφρασης λόγω RNAi, λήφθηκαν δύο βιολογικές επαναλήψεις, από τις οποίες υπολογίστηκαν οι αντίστοιχες γραμμές σφάλματος. Ακόμη, όλες οι παρακάτω κανονικοποιημένες τιμές έκφρασης, υπολογίστηκαν με βάση το ιδιοσυστάτο γονίδιο RPB1.

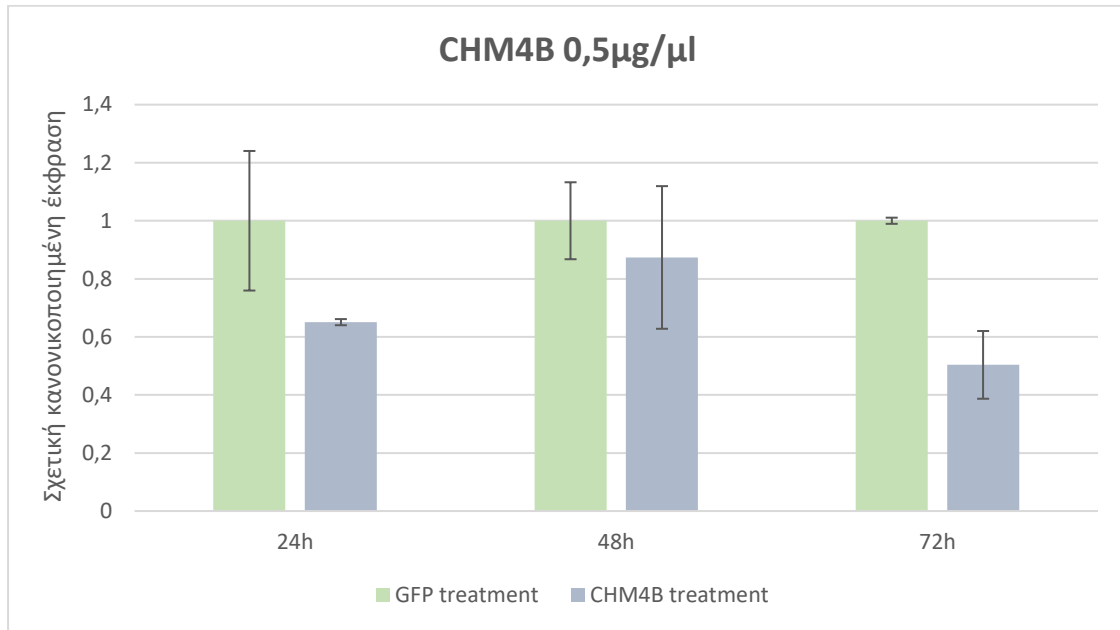
Αρχικά, επιλέχθηκε να στοχευθεί το γονίδιο RPL19 με συγκέντρωση dsRNA 0,5μg/μl. Πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία 24 και 48 ώρες μετά την κατεργασία, και δεν παρατηρείται κάποια μείωση της έκφρασης σε σχέση με τον μάρτυρα (dsRNA έναντι του GFP).



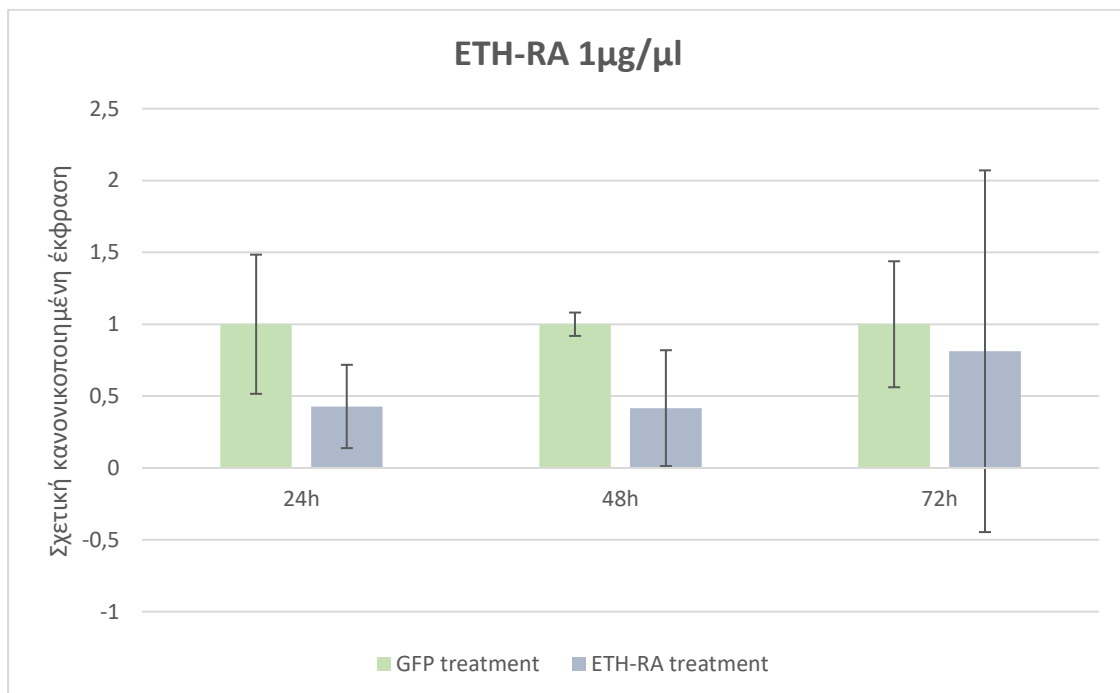
Το παραπάνω πείραμα επαναλήφθηκε, τόσο για να ελεγχθεί η επαναληψιμότητά του, όσο και για να προστεθεί και τρίτη χρονική στιγμή δειγματοληψίας (72 ώρες). Και σε αυτή την περίπτωση η έκφραση του RPL19 φαίνεται να μην μειώνεται.



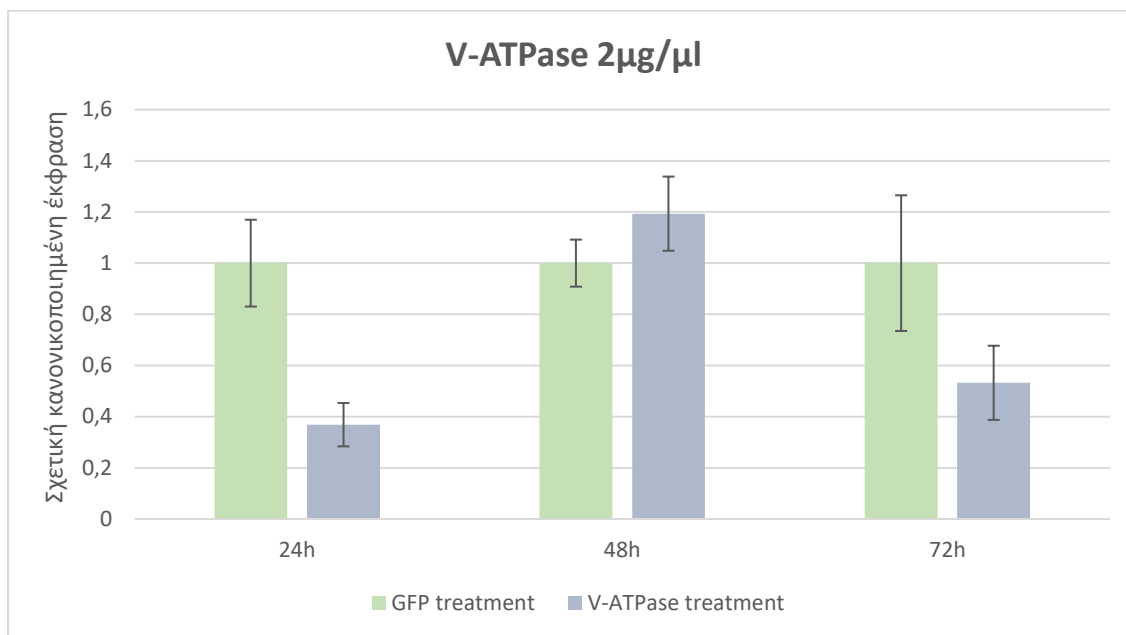
Το επόμενο γονίδιο που επιλέχθηκε να στοχευθεί, με την ίδια συγκέντρωση dsRNA (0,5μg/μl) είναι το CHM4B. Μετά την qPCR των δειγμάτων που συλλέχθηκαν 24, 48 και 72 ώρες μετά το εμφάνισμα και την κατεργασία με dsRNA έναντι του γονιδίου αυτού, προέκυψε το ακόλουθο γράφημα. Εδώ φαίνεται να υπάρχει ένδειξη για μείωση της έκφρασης, 35% στις 24 ώρες, 13% στις 48 ώρες και 50% στις 72 ώρες, σε σχέση πάντοτε με το control (GFP).



Ακολούθησε η ίδια διαδικασία, με στόχο τώρα το γονίδιο ETH-RA, και με αύξηση της συγκέντρωσης στο 1μg/μl. Εδώ υπολογίζεται η μείωση της έκφρασης να είναι 60% χαμηλότερη σε σχέση με το control τόσο μετά από 24 ώρες, όσο και μετά από 48, ενώ στις 72 ώρες είναι μειωμένη κατά 20%. Ωστόσο οι γραμμές σφάλματος είναι αυξημένες, γεγονός που δεν επιτρέπει τη λήψη ξεκάθαρων αποτελεσμάτων.



Το τελευταίο γονίδιο που στοχεύθηκε είναι η V-ATPase, με συγκέντρωση dsRNA 2μg/μl. Και εδώ είναι εμφανής η μείωση της παραγωγής των μεταγράφων του γονιδίου V-ATPase, με 64% μειωμένη έκφραση στις 24 ώρες και 47% στις 72 ώρες. Ωστόσο δεν παρατηρείται κάποια μείωση στις 48 ώρες, γεγονός που μπορεί να σημαίνει ότι η μείωση στις 72 ώρες εμφανίζεται λόγω σφάλματος, και χρειάζονται περισσότερες βιολογικές επαναλήψεις.



Στη συνέχεια, το τελευταίο γονίδιο επιλέχθηκε να είναι ο στόχος για να επαναληφθεί το πείραμα με 3 βιολογικές επαναλήψεις και με συγκέντρωση dsRNA 5μg/μl. Παρόλο που διεξήχθη επιτυχώς, μια επιμόλυνση στην qPCR (ενδεχομένως με γονιδιωματικό DNA), δεν επέτρεψε την ανάλυση των αποτελεσμάτων, επομένως αυτά δεν μπορούν να παρουσιαστούν.

## Συζήτηση

Η παρούσα διπλωματική εργασία, παρέχει ενδείξεις τόσο για την αποτελεσματικότητα της σίγησης γονιδίων (απομακρυσμένων από τον πεπτικό σωλήνα ή μη) μέσω εμφύσησης, όσο και για ενδεχόμενους στόχους για τον σχεδιασμό RNAi εντομοκτόνων για την μύγα της Μεσογείου *Ceratitis capitata*. Η μέθοδος της εμφύσησης, φαίνεται να είναι αποτελεσματική, καθιστώντας όμως φανερό το γεγονός ότι με την αύξηση της συγκέντρωσης του dsRNA αυξάνεται και η μείωση της έκφρασης. Η ανεπιτυχής μείωση της έκφρασης του RPL19 μπορεί να οφείλεται στη χαμηλή συγκέντρωση του dsRNA (0,5μg/μl) εφόσον πρόκειται και για ένα γονίδιο με αρκετά υψηλή έκφραση. Ωστόσο είναι απαραίτητη η επανάληψη του πειράματος με περισσότερες βιολογικές επαναλήψεις για να είναι τα αποτελέσματα πιο σαφή.

Στη συγκεκριμένη πειραματική προσέγγιση, χρησιμοποιήθηκαν προνύμφες 2<sup>ου</sup> σταδίου, γιατί αυτές είναι που προκαλούν καταστροφές στους καρπούς, τρώγοντάς τους. Για την ενίσχυση της μεθόδου, θα μπορούσαν εκτός από την αύξηση της συγκέντρωσης του dsRNA, να αυξηθεί και ο χρόνος που η προνύμφη είναι εκτεθειμένη σε αυτό. Για παράδειγμα μπορούν να πραγματοποιηθούν παραπάνω διαδοχικές εμφύσεις ή διάλυμα του dsRNA μετά την εμφύσηση να προστίθεται στην τροφή των προνυμφών. Εξάλλου, αυτή η προσέγγιση είναι πιο ρεαλιστική, εφόσον οι προνύμφες του άγριου πληθυσμού τρέφονται συνεχόμενα από το περιεχόμενο του καρπού όταν βρίσκονται στη φύση.

Ένας άλλος τρόπος για να αυξηθεί η αποδοτικότητα του συστήματος, είναι να χρησιμοποιηθεί κάποιος νανομεταφορέας που θα προστατεύει το RNA από την πιθανή υδρόλυση στον αυλό του εντέρου, και θα βελτιώσει την απορρόφησή του. Η μείωση της αποτελεσματικότητας της σίγησης μέσω RNAi, έχει φανεί ότι οφείλεται σε υδρόλυση του dsRNA από ριβονουκλεάσες του εντέρου σε πολλά Tephritidae: *Anastrepha suspensa* [125], *Anastrepha fraterculus* [75], *Bactrocera dorsalis* [77].

Το αξιοσημείωτο της εφαρμογής των RNAi εντομοκτόνων, είναι η ακρίβεια που μπορεί να προσφέρει, μέσω της ειδοειδικότητας των αλληλουχιών που μπορούν να σχεδιαστούν. Η ειδοειδικότητα επιτυγχάνεται μέσω της στόχευσης πολύ συγκεκριμένων αλληλουχιών, είτε μέσω siRNA είτε μέσω μεγαλύτερων dsRNAs που θα διαθέτουν μοναδικά τμήματα siRNAs και θα περιβάλλονται από επιπλέον τυχαίες αλληλουχίες. Η χρήση των dsRNA που σχεδιάζονται ολόκληρα από τμήμα DNA του γονιδίου στόχου, και μεν μπορεί να έχουν υψηλότερη αποτελεσματικότητα λόγω της πληθώρας των siRNA που παράγονται, αλλά εμπεριέχουν κίνδυνο ορισμένα από αυτά τα siRNAs να στοχεύουν και γονίδια άλλων οργανισμών, συγγενικών ή μη. Ένα παράδειγμα αποτελεί μια έρευνα του 2015, στην οποία οι ερευνητές χορήγησαν μέσω ένεσης, dsRNA σχεδιασμένο να στοχεύει το μετάγραφο του γονιδίου RPL19 της *Bactrocera dorsalis*, σε μια μύγα του ίδιου γένους (*Bactrocera minax*), στην *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) καθώς και σε μια σφήκα-παράσιτο της μύγας (Hymenoptera: Braconidae). Το dsRNA προκάλεσε σίγηση τόσο στη συγγενική μύγα όσο και στην σφήκα-παράσιτο [119]. Είναι ανεπιθύμητο να στοχεύονται ορθόλογα γονίδια τόσο παρασίτων που βοηθούν στην καταπολέμηση των εντόμων όσο και ωφέλιμων εντόμων επικονιαστών.

Παρότι λοιπόν τα siRNAs φαίνεται να είναι ασφαλέστερα για χρήση, πολύ συχνά δε μπορούν να προκαλέσουν σίγηση, πιθανότητα λόγω της γρήγορης αποικοδόμησής τους. Έχει φανεί ότι η προσθήκη μία ή δύο δομών φουρκέτας αυξάνει κατακόρυφα την αποδοτικότητα του συστήματος [83], [84]. Ακόμη το σημείο του mRNA που στοχεύεται, φαίνεται να επηρεάζει την αποτελεσματικότητα της σίγησης. Παραδείγματος χάριν στο κουνούπι *Aedes aegypti*



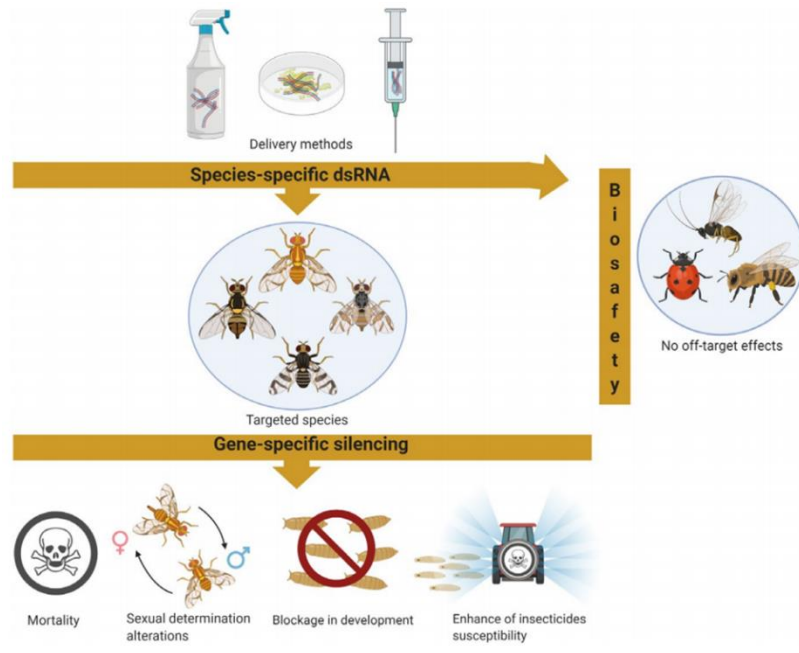
μεγαλύτερη θνησιμότητα επιτεύχθηκε όταν στοχεύθηκε η 3' αμετάφραστη περιοχή, σε σχέση με την 5' και την κωδική [120]. Στο δικό μας πείραμα όλα τα siRNA που προέκυπταν από τα dsRNAs υβριδίζουν σε κωδικές περιοχές.

Η μύγα της Μεσογείου σύμφωνα με τη βιβλιογραφία έχει αποδοτικό μηχανισμό RNAi [122]. Ωστόσο δεν υπάρχουν αναφορές για την ενεργοποίηση του μηχανισμού μέσω του πεπτικού σωλήνα παρά μόνο μέσω ένεσης. Στην παρούσα διπλωματική άσκηση επιλέχθηκε να ελεγχθεί αυτό μέσω της εμφάνισης, καθώς προσομοιάζει αρκετά τις συνθήκες στις οποίες αναπτύσσονται οι ανήλικες προνύμφες στο εσωτερικό εσπεριδοειδών, που είναι εξαιρετικά υδαρές. Η μέθοδος αυτή έχει φανεί να έχει επιτυχία: σε αποχωριωμένα έμβρυα *Drosophila melanogaster* [123], σε προνύμφες *Drosophila suzukii* [93], σε προνύμφες *Anastrepha fraterculus* [75], σε αβγά *Ostrinia furnalis* [51] αλλά και σε προνύμφες κουνουπιών [124]. Σε εκκολαπτόμενες προνύμφες δροσόφιλας, το εμφάνισμα ήταν επιτυχημένο μόνο ύστερα από προσθήκη λιποσωμάτων για την εγκόλπωση των dsRNA σε αυτά.

Η επιτυχημένη σίγηση μέσω μεθόδων όπως είναι το εμφάνισμα, εξαρτάται και από το που βρίσκονται τα κύτταρα στα οποία εκφράζεται το γονίδιο που επιθυμούμε κάθε φορά να στοχευθεί. Για παράδειγμα χορήγηση dsRNA μέσω τροφής μειώνει την έκφραση γονιδίων στα κύτταρα του εντέρου, αλλά όχι στο σκελετό της *Drosophila melanogaster* [88]. Από τα υποψήφια γονίδια που επιλέχθηκαν να στοχευθούν, κάποια εκφράζονταν σε πολλούς τύπους κυττάρων (RPL19, V-ATPase, CHM4B) ενώ άλλα σε συγκεκριμένους ιστούς (ETH, ETH-RA, CHS, UAP). Για όσα πραγματοποιήθηκε το πείραμα, εκτός από το RPL19, φαίνεται να έφτασε το dsRNA επιτυχώς στα κύτταρα που τα παρήγαγαν.

Όσον αφορά την εφαρμογή των RNAi εντομοκτόνων για τη μύγα της Μεσογείου στο αγρό, μια προτεινόμενη μέθοδος είναι η χορήγηση του dsRNA μέσω της έγχυσης του στον κορμό των δέντρων που προσβάλλουν οι προνύμφες (Trunk injection), ώστε να σταματήσει την ανάπτυξη τους και να μειωθεί ο πληθυσμός. Όπως έχει φανεί μέχρι τώρα, τα dsRNA ή τα shRNAs που χορηγούνται κατά αυτόν τον τρόπο σε μηλιά, αμπέλι και κίτρο, παραμένουν για αρκετό καιρό και δεν επεξεργάζονται από τις Dicer-like του δέντρου. Αυτό που μένει να ελεγχθεί είναι αν το dsRNA φτάνει στο μεσοκάρπιο των φρούτων, που ωοαποθέτει η μύγα της Μεσογείου τα αβγά της, καθώς και η ποσότητα και η μορφή που χρειάζονται ενδεχομένως για να επιτευχθεί τόσο η μεταφορά, όσο και ο επιθυμητός φαινότυπος. Η μέθοδος αυτή, εκτός από την προστασία του dsRNA προσφέρει και μεγαλύτερη προστασία του οικοσυστήματος στο οποίο βρίσκονται τα δέντρα, αφού το dsRNA θα βρίσκεται μέσα σε αυτά και δε θα έρχεται σε άμεση επαφή με το περιβάλλον, μειώνοντας κατά πολύ το ενδεχόμενο μη ειδοειδικής στόχευσης.

Η καταπολέμηση των εντόμων οικονομικής σημασίας που προκαλούν τεράστιες ζημιές και απώλειες στις καλλιέργειες, είναι και θα είναι πάντα υψηλής προτεραιότητας στις αγροτοδιατροφικές δραστηριότητες των ανθρώπων. Τα ολοκληρωμένα συστήματα διαχείρισης παρασίτων αποτελούν πλέον την κατευθυντήρια γραμμή των σύγχρονων ερευνών, εξασφαλίζοντας όσο το δυνατόν περισσότερο, την οικονομική προσιτότητα των μεθόδων που χρησιμοποιούνται, την προστασία την υγείας των καταναλωτών και των υπόλοιπων οργανισμών του οικοσυστήματος, και τη μείωση της τοξικότητάς τους για το περιβάλλον. Τα RNAi εντομοκτόνα, αποτελούν μια πολλά υποσχόμενη προσέγγιση, που εξασφαλίζει τα παραπάνω και σε συνδυασμό με άλλες μεθόδους μπορεί να επιφέρει ισχυρή εντομοκτόνο δράση [Εικόνα 25].



Εικόνα 25: Ειδικότητα RNAi εντομοκτόνων στα Terphritidae [131].

## Βιβλιογραφία

- [1] R. Almeida and R. C. Allshire, "RNA silencing and genome regulation," *Trends in Cell Biology*, vol. 15, no. 5. Elsevier Ltd, pp. 251–258, 2005. doi: 10.1016/j.tcb.2005.03.006.
- [2] C. Napoli, C. Lemieux, and R. Jorgensen, "Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans.," *Plant Cell*, 1990, doi: 10.1105/tpc.2.4.279.
- [3] A. Fire, S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver, and C. C. Mello, "Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in caenorhabditis elegans," *Nature*, vol. 391, no. 6669, 1998, doi: 10.1038/35888.
- [4] M. Pal-Bhadra, U. Bhadra, and J. A. Birchler, "Cosuppression in Drosophila: Gene silencing of Alcohol dehydrogenase by white-Adh transgenes is Polycomb dependent," *Cell*, vol. 90, no. 3, 1997, doi: 10.1016/S0092-8674(00)80508-5.
- [5] M. Pal-Bhadra, U. Bhadra, and J. A. Birchler, "RNAi related mechanisms affect both transcriptional and posttranscriptional transgene silencing in Drosophila," *Mol Cell*, vol. 9, no. 2, 2002, doi: 10.1016/S1097-2765(02)00440-9.
- [6] N. Agrawal, P. V. N. Dasaradhi, A. Mohammed, P. Malhotra, R. K. Bhatnagar, and S. K. Mukherjee, "RNA Interference: Biology, Mechanism, and Applications," *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, vol. 67, no. 4, 2003, doi: 10.1128/mmbr.67.4.657-685.2003.
- [7] K. Yan Zhu and S. Reddy Palli, "Annual Review of Entomology Mechanisms, Applications, and Challenges of Insect RNA Interference," 2020, doi: 10.1146/annurev-ento-011019.
- [8] A. A. Aravin, N. M. Naumova, A. v. Tulin, V. v. Vagin, Y. M. Rozovsky, and V. A. Gvozdev, "Double-stranded RNA-mediated silencing of genomic tandem repeats and transposable elements in the D. melanogaster germline," *Current Biology*, vol. 11, no. 13, 2001, doi: 10.1016/S0960-9822(01)00299-8.
- [9] D. M. Ozata, I. Gainetdinov, A. Zoch, D. O'Carroll, and P. D. Zamore, "PIWI-interacting RNAs: small RNAs with big functions," *Nature Reviews Genetics*, vol. 20, no. 2. 2019. doi: 10.1038/s41576-018-0073-3.
- [10] A. Girard, R. Sachidanandam, G. J. Hannon, and M. A. Carmell, "A germline-specific class of small RNAs binds mammalian Piwi proteins," *Nature*, vol. 442, no. 7099, 2006, doi: 10.1038/nature04917.
- [11] Y. W. Iwasaki, M. C. Siomi, and H. Siomi, "PIWI-interacting RNA: Its biogenesis and functions," *Annu Rev Biochem*, vol. 84, 2015, doi: 10.1146/annurev-biochem-060614-034258.
- [12] M. A. Ashfaq *et al.*, "Post-transcriptional gene silencing: Basic concepts and applications," *Journal of Biosciences*, vol. 45, no. 1. 2020. doi: 10.1007/s12038-020-00098-3.

- [13] S. M. Hammond, E. Bernstein, D. Beach, and G. J. Hannon, "An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells," *Nature*, vol. 404, no. 6775, 2000, doi: 10.1038/35005107.
- [14] F. M. Cernilogar *et al.*, "Chromatin-associated RNA interference components contribute to transcriptional regulation in *Drosophila*," *Nature*, vol. 480, no. 7377, 2011, doi: 10.1038/nature10492.
- [15] H. P. Cam, "Roles of RNAi in chromatin regulation and epigenetic inheritance," *Epigenomics*, vol. 2, no. 5. 2010. doi: 10.2217/epi.10.46.
- [16] J. O'Brien, H. Hayder, Y. Zayed, and C. Peng, "Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation," *Frontiers in Endocrinology*, vol. 9, no. AUG. 2018. doi: 10.3389/fendo.2018.00402.
- [17] Z. G. Soares, A. N. A. Gonçalves, K. P. V. de Oliveira, and J. T. Marques, "Viral RNA recognition by the *Drosophila* small interfering RNA pathway," *Microbes Infect*, vol. 16, no. 12, 2014, doi: 10.1016/j.micinf.2014.09.001.
- [18] D. P. Bartel, "MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function," *Cell*, vol. 116, no. 2. 2004. doi: 10.1016/S0092-8674(04)00045-5.
- [19] A. A. Aravin *et al.*, "The small RNA profile during *Drosophila melanogaster* development," *Dev Cell*, vol. 5, no. 2, 2003, doi: 10.1016/S1534-5807(03)00228-4.
- [20] H. Dana *et al.*, "Molecular Mechanisms and Biological Functions of siRNA.," *Int J Biomed Sci*, vol. 13, no. 2, 2017.
- [21] R. P. van Rij and E. Berezikov, "Small RNAs and the control of transposons and viruses in *Drosophila*," *Trends in Microbiology*, vol. 17, no. 4. 2009. doi: 10.1016/j.tim.2009.01.003.
- [22] M. Ghildiyal and P. D. Zamore, "Small silencing RNAs: An expanding universe," *Nature Reviews Genetics*, vol. 10, no. 2. 2009. doi: 10.1038/nrg2504.
- [23] M. Ghildiyal *et al.*, "Endogenous siRNAs derived from transposons and mRNAs in *Drosophila* somatic cells," *Science (1979)*, vol. 320, no. 5879, 2008, doi: 10.1126/science.1157396.
- [24] J. Han, Y. Lee, K. H. Yeom, Y. K. Kim, H. Jin, and V. N. Kim, "The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing," *Genes Dev*, vol. 18, no. 24, 2004, doi: 10.1101/gad.1262504.
- [25] R. Yi, Y. Qin, I. G. Macara, and B. R. Cullen, "Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs," *Genes Dev*, vol. 17, no. 24, 2003, doi: 10.1101/gad.1158803.
- [26] A. J. Pratt and I. J. MacRae, "The RNA-induced silencing complex: A versatile gene-silencing machine," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 284, no. 27. 2009. doi: 10.1074/jbc.R900012200.
- [27] D. B. Gammon and C. C. Mello, "RNA interference-mediated antiviral defense in insects," *Current Opinion in Insect Science*, vol. 8. 2015. doi: 10.1016/j.cois.2015.01.006.

- [28] G. Chawla and N. S. Sokol, "MicroRNAs in *Drosophila* development," in *International Review of Cell and Molecular Biology*, vol. 286, no. C, 2011. doi: 10.1016/B978-0-12-385859-7.00001-X.
- [29] W. Xie, R. C. Donohue, and J. A. Birchler, "Quantitatively Increased Somatic Transposition of Transposable Elements in *Drosophila* Strains Compromised for RNAi," *PLoS One*, vol. 8, no. 8, 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0072163.
- [30] D. Fagegaltier *et al.*, "The endogenous siRNA pathway is involved in heterochromatin formation in *Drosophila*," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 106, no. 50, 2009, doi: 10.1073/pnas.0809208105.
- [31] M. Leggewie and E. Schnettler, "RNAi-mediated antiviral immunity in insects and their possible application," *Current Opinion in Virology*, vol. 32, 2018. doi: 10.1016/j.coviro.2018.10.004.
- [32] E. P. O'Keefe, "siRNAs and shRNAs: Tools for Protein Knockdown by Gene Silencing," *Materials and Methods*, vol. 3, 2013, doi: 10.13070/mm.en.3.197.
- [33] A. M. W. Cooper, K. Silver, J. Zhang, Y. Park, and K. Y. Zhu, "Molecular mechanisms influencing efficiency of RNA interference in insects," *Pest Management Science*, vol. 75, no. 1, 2019. doi: 10.1002/ps.5126.
- [34] R. Abbasi, D. Heschuk, B. Kim, and S. Whyard, "A novel paperclip double-stranded RNA structure demonstrates clathrin-independent uptake in the mosquito *Aedes aegypti*," *Insect Biochem Mol Biol*, vol. 127, 2020, doi: 10.1016/j.ibmb.2020.103492.
- [35] M. Darrington, T. Dalmay, N. I. Morrison, and T. Chapman, "Implementing the sterile insect technique with RNA interference – a review," *Entomol Exp Appl*, vol. 164, no. 3, 2017, doi: 10.1111/eea.12575.
- [36] N. Shpak *et al.*, "Short versus long double-stranded RNA activation of a post-transcriptional gene knockdown pathway," *RNA Biol*, vol. 14, no. 12, 2017, doi: 10.1080/15476286.2017.1356567.
- [37] S. M. Elbashir, J. Martinez, A. Patkaniowska, W. Lendeckel, and T. Tuschl, "Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate," *EMBO Journal*, vol. 20, no. 23, 2001, doi: 10.1093/emboj/20.23.6877.
- [38] B. Czech *et al.*, "An endogenous small interfering RNA pathway in *Drosophila*," *Nature*, vol. 453, no. 7196, 2008, doi: 10.1038/nature07007.
- [39] J. B. Ma, K. Ye, and D. J. Patel, "Structural basis for overhang-specific small interfering RNA recognition by the PAZ domain," *Nature*, vol. 429, no. 6989, 2004, doi: 10.1038/nature02519.
- [40] R. Jia *et al.*, "Use of RNAi technology to develop a PRSV-resistant transgenic papaya," *Sci Rep*, vol. 7, no. 1, 2017, doi: 10.1038/s41598-017-13049-0.
- [41] R. Bolognesi *et al.*, "Characterizing the Mechanism of Action of Double-Stranded RNA Activity against Western Corn Rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte)," *PLoS One*, vol. 7, no. 10, Oct. 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0047534.

- [42] E. Stowe and A. Dhingra, "Development of the Arctic® Apple," in *Plant Breeding Reviews*, 2020. doi: 10.1002/9781119717003.ch8.
- [43] Y. B. Mao *et al.*, "Silencing a cotton bollworm P450 monooxygenase gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol," *Nat Biotechnol*, vol. 25, no. 11, pp. 1307–1313, Nov. 2007, doi: 10.1038/nbt1352.
- [44] J. A. Baum *et al.*, "Control of coleopteran insect pests through RNA interference," *Nat Biotechnol*, vol. 25, no. 11, pp. 1322–1326, Nov. 2007, doi: 10.1038/nbt1359.
- [45] X. Li, X. Liu, W. Lu, X. Yin, and S. An, "Application progress of plant-mediated RNAi in pest control," *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, vol. 10. Frontiers Media S.A., Aug. 08, 2022. doi: 10.3389/fbioe.2022.963026.
- [46] J. Zhang, S. A. Khan, C. Hasse, S. Ruf, D. G. Heckel, and R. Bock, "Full crop protection from an insect pest by expression of long double-stranded RNAs in plastids," *Science (1979)*, vol. 347, no. 6225, 2015, doi: 10.1126/science.1261680.
- [47] C. Rosa, Y. W. Kuo, H. Wuriyangan, and B. W. Falk, "RNA interference mechanisms and applications in plant pathology," *Annual Review of Phytopathology*, vol. 56. 2018. doi: 10.1146/annurev-phyto-080417-050044.
- [48] R. A. Herman, N. P. Storer, J. A. Anderson, F. Amijee, F. Cnudde, and A. Raybould, "Transparency in risk-disproportionate regulation of modern crop-breeding techniques," *GM Crops and Food*, vol. 12, no. 1. Taylor and Francis Ltd., pp. 376–381, 2021. doi: 10.1080/21645698.2021.1934353.
- [49] M. Zotti, E. A. dos Santos, D. Cagliari, O. Christiaens, C. N. T. Taning, and G. Smagghe, "RNA interference technology in crop protection against arthropod pests, pathogens and nematodes," *Pest Management Science*, vol. 74, no. 6. 2018. doi: 10.1002/ps.4813.
- [50] A. P. Rank and A. Koch, "Lab-to-Field Transition of RNA Spray Applications – How Far Are We?," *Frontiers in Plant Science*, vol. 12. Frontiers Media S.A., Oct. 15, 2021. doi: 10.3389/fpls.2021.755203.
- [51] S. G. Mehlhorn, S. Geibel, G. Bucher, and R. Nauen, "Profiling of RNAi sensitivity after foliar dsRNA exposure in different European populations of Colorado potato beetle reveals a robust response with minor variability," *Pestic Biochem Physiol*, vol. 166, 2020, doi: 10.1016/j.pestbp.2020.104569.
- [52] K. v. Kiselev, A. R. Suprun, O. A. Aleynova, Z. v. Ogneva, and A. S. Dubrovina, "Physiological conditions and dsRNA application approaches for exogenously induced RNA interference in *Arabidopsis thaliana*," *Plants*, vol. 10, no. 2, 2021, doi: 10.3390/plants10020264.
- [53] B. T. L. Hoang, S. J. Fletcher, C. A. Brosnan, A. B. Ghodke, N. Manzie, and N. Mitter, "RNAi as a Foliar Spray: Efficiency and Challenges to Field Applications," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 23, no. 12. MDPI, Jun. 01, 2022. doi: 10.3390/ijms23126639.
- [54] A. Dalakouras, M. Wassenegger, E. Dadami, I. Ganopoulos, M. L. Pappas, and K. Papadopoulou, "Genetically modified organism-free RNA interference: Exogenous

- application of RNA molecules in plants1[open],” *Plant Physiol*, vol. 182, no. 1, 2020, doi: 10.1104/pp.19.00570.
- [55] A. Koch *et al.*, “An RNAi-Based Control of *Fusarium graminearum* Infections Through Spraying of Long dsRNAs Involves a Plant Passage and Is Controlled by the Fungal Silencing Machinery,” *PLoS Pathog*, vol. 12, no. 10, 2016, doi: 10.1371/journal.ppat.1005901.
- [56] X. Niu, W. Xie, J. Zhang, and Q. Hu, “Biodiversity of entomopathogenic fungi in the soils of south china,” *Microorganisms*, vol. 7, no. 9, 2019, doi: 10.3390/microorganisms7090311.
- [57] N. Killiny, S. Hajeri, S. Tiwari, S. Gowda, and L. L. Stelinski, “Double-stranded RNA uptake through topical application, mediates silencing of five CYP4 genes and suppresses insecticide resistance in *Diaphorina citri*,” *PLoS One*, vol. 9, no. 10, 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0110536.
- [58] I. El-Shesheny, S. Hajeri, I. El-Hawary, S. Gowda, and N. Killiny, “Silencing Abnormal Wing Disc Gene of the Asian Citrus Psyllid, *Diaphorina citri* Disrupts Adult Wing Development and Increases Nymph Mortality,” *PLoS One*, vol. 8, no. 5, 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0065392.
- [59] V. Balabanidou, L. Grigoraki, and J. Vontas, “Insect cuticle: a critical determinant of insecticide resistance,” *Current Opinion in Insect Science*, vol. 27. 2018. doi: 10.1016/j.cois.2018.03.001.
- [60] J. C. Wise, A. G. Wise, M. Rakotondravelo, C. Vandervoort, C. Seeve, and B. Fabbri, “Trunk injection delivery of dsRNA for RNAi-based pest control in apple trees,” *Pest Manag Sci*, vol. 78, no. 8, pp. 3528–3533, Aug. 2022, doi: 10.1002/ps.6993.
- [61] A. Dalakouras *et al.*, “Delivery of hairpin rnas and small rnas into woody and herbaceous plants by trunk injection and petiole absorption,” *Front Plant Sci*, vol. 9, Aug. 2018, doi: 10.3389/fpls.2018.01253.
- [62] W. B. Hunter, E. Glick, N. Paldi, and B. R. Bextine, “Advances in RNA interference: DsRNA treatment in trees and grapevines for insect pest suppression,” *Southwestern Entomologist*, vol. 37, no. 1, 2012, doi: 10.3958/059.037.0110.
- [63] M. R. Joga, M. J. Zotti, G. Smagghe, and O. Christiaens, “RNAi efficiency, systemic properties, and novel delivery methods for pest insect control: What we know so far,” *Frontiers in Physiology*, vol. 7, no. NOV. 2016. doi: 10.3389/fphys.2016.00553.
- [64] D. L. McEwan, A. S. Weisman, and C. P. Hunter, “Uptake of Extracellular Double-Stranded RNA by SID-2,” *Mol Cell*, vol. 47, no. 5, 2012, doi: 10.1016/j.molcel.2012.07.014.
- [65] M. C. Saleh *et al.*, “The endocytic pathway mediates cell entry of dsRNA to induce RNAi silencing,” *Nat Cell Biol*, vol. 8, no. 8, 2006, doi: 10.1038/ncb1439.
- [66] X. Li, M. Zhang, and H. Zhang, “RNA interference of four genes in adult *Bactrocera dorsalis* by feeding their dsRNAs,” *PLoS One*, vol. 6, no. 3, 2011, doi: 10.1371/journal.pone.0017788.

- [67] K. Cappelle, C. F. R. de Oliveira, B. van Eynde, O. Christiaens, and G. Smagghe, "The involvement of clathrin-mediated endocytosis and two Sid-1-like transmembrane proteins in double-stranded RNA uptake in the Colorado potato beetle midgut," *Insect Mol Biol*, vol. 25, no. 3, 2016, doi: 10.1111/imb.12222.
- [68] M. Karlikow *et al.*, "Drosophila cells use nanotube-like structures to transfer dsRNA and RNAi machinery between cells," *Sci Rep*, vol. 6, 2016, doi: 10.1038/srep27085.
- [69] M. Tassetto, M. Kunitomi, and R. Andino, "Circulating Immune Cells Mediate a Systemic RNAi-Based Adaptive Antiviral Response in Drosophila," *Cell*, vol. 169, no. 2, 2017, doi: 10.1016/j.cell.2017.03.033.
- [70] R. R. Bodemann *et al.*, "Precise RNAi-mediated silencing of metabolically active proteins in the defence secretions of juvenile leaf beetles," *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, vol. 279, no. 1745, 2012, doi: 10.1098/rspb.2012.1342.
- [71] T. B. Rodrigues, L. K. Rieske, J. Duan, K. Mogilicherla, and S. R. Palli, "Development of RNAi method for screening candidate genes to control emerald ash borer, *Agrilus planipennis*," *Sci Rep*, vol. 7, no. 1, 2017, doi: 10.1038/s41598-017-07605-x.
- [72] S. J. Fletcher, P. T. Reeves, B. T. Hoang, and N. Mitter, "A Perspective on RNAi-Based Biopesticides," *Frontiers in Plant Science*, vol. 11. Frontiers Media S.A., Feb. 12, 2020. doi: 10.3389/fpls.2020.00051.
- [73] S. C. Miller, S. J. Brown, and Y. Tomoyasu, "Larval RNAi in Drosophila?," *Dev Genes Evol*, vol. 218, no. 9, 2008, doi: 10.1007/s00427-008-0238-8.
- [74] Y. L. Li *et al.*, "Functional analysis of five trypsin-like protease genes in the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae)," *Pestic Biochem Physiol*, vol. 136, 2017, doi: 10.1016/j.pestbp.2016.08.004.
- [75] N. Dias *et al.*, "The South American fruit fly: An important pest insect with RNAi-Sensitive larval stages," *Front Physiol*, vol. 10, no. JUN, 2019, doi: 10.3389/fphys.2019.00794.
- [76] H. Song *et al.*, "A double-stranded RNA degrading enzyme reduces the efficiency of oral RNA interference in migratory locust," *Insect Biochem Mol Biol*, vol. 86, 2017, doi: 10.1016/j.ibmb.2017.05.008.
- [77] A. Tayler, D. Heschuk, D. Giesbrecht, J. Y. Park, and S. Whyard, "Efficiency of RNA interference is improved by knockdown of dsRNA nucleases in tephritid fruit flies," *Open Biol*, vol. 9, no. 12, 2019, doi: 10.1098/rsob.190198.
- [78] R. B. Guan *et al.*, "A nuclease specific to lepidopteran insects suppresses RNAi," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 293, no. 16, 2018, doi: 10.1074/jbc.RA117.001553.
- [79] J. N. Shukla *et al.*, "Reduced stability and intracellular transport of dsRNA contribute to poor RNAi response in lepidopteran insects," *RNA Biol*, vol. 13, no. 7, 2016, doi: 10.1080/15476286.2016.1191728.
- [80] J. S. Yoon, D. Gurusamy, and S. R. Palli, "Accumulation of dsRNA in endosomes contributes to inefficient RNA interference in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*," *Insect Biochem Mol Biol*, vol. 90, 2017, doi: 10.1016/j.ibmb.2017.09.011.



- [81] J. Q. Ni *et al.*, "A genome-scale shRNA resource for transgenic RNAi in *Drosophila*," *Nat Methods*, vol. 8, no. 5, 2011, doi: 10.1038/nmeth.1592.
- [82] I. J. MacRae, K. Zhou, and J. A. Doudna, "Structural determinants of RNA recognition and cleavage by Dicer," *Nat Struct Mol Biol*, vol. 14, no. 10, 2007, doi: 10.1038/nsmb1293.
- [83] R. Abbasi, D. Heschuk, B. Kim, and S. Whyard, "A novel paperclip double-stranded RNA structure demonstrates clathrin-independent uptake in the mosquito *Aedes aegypti*," *Insect Biochem Mol Biol*, vol. 127, Dec. 2020, doi: 10.1016/j.ibmb.2020.103492.
- [84] J. Laisney, V. Loczenski Rose, K. Watters, K. v. Donohue, and J. M. Unrine, "Delivery of short hairpin RNA in the neotropical brown stink bug, *Euschistus heros*, using a composite nanomaterial," *Pestic Biochem Physiol*, vol. 177, 2021, doi: 10.1016/j.pestbp.2021.104906.
- [85] S. Ivashuta *et al.*, "Environmental RNAi in herbivorous insects," *RNA*, vol. 21, no. 5, 2015, doi: 10.1261/rna.048116.114.
- [86] E. Vogel, D. Santos, L. Mingels, T. W. Verdonckt, and J. vanden Broeck, "RNA interference in insects: Protecting beneficials and controlling pests," *Frontiers in Physiology*, vol. 10, no. JAN. 2019. doi: 10.3389/fphys.2018.01912.
- [87] A. Lechanteur, V. Sanna, A. Duchemin, B. Evrard, D. Mottet, and G. Piel, "Cationic liposomes carrying siRNA: Impact of lipid composition on physicochemical properties, cytotoxicity and endosomal escape," *Nanomaterials*, vol. 8, no. 5, 2018, doi: 10.3390/nano8050270.
- [88] S. Whyard, A. D. Singh, and S. Wong, "Ingested double-stranded RNAs can act as species-specific insecticides," *Insect Biochem Mol Biol*, vol. 39, no. 11, 2009, doi: 10.1016/j.ibmb.2009.09.007.
- [89] C. N. T. Taning, O. Christiaens, N. Berkvens, H. Casteels, M. Maes, and G. Smagghe, "Oral RNAi to control *Drosophila suzukii*: laboratory testing against larval and adult stages," *J Pest Sci (2004)*, vol. 89, no. 3, 2016, doi: 10.1007/s10340-016-0736-9.
- [90] X. Zhang, J. Zhang, and K. Y. Zhu, "Chitosan/double-stranded RNA nanoparticle-mediated RNA interference to silence chitin synthase genes through larval feeding in the African malaria mosquito (*Anopheles gambiae*)," *Insect Mol Biol*, vol. 19, no. 5, 2010, doi: 10.1111/j.1365-2583.2010.01029.x.
- [91] S. Guo *et al.*, "A potential genetic control by suppression of the wing developmental gene *wingless* in a global invasive pest *Bactrocera dorsalis*," *J Pest Sci (2004)*, vol. 94, no. 2, pp. 517–529, Mar. 2021, doi: 10.1007/s10340-020-01263-1.
- [92] J. Li, J. Qian, Y. Xu, S. Yan, J. Shen, and M. Yin, "A Facile-Synthesized Star Polycation Constructed as a Highly Efficient Gene Vector in Pest Management," *ACS Sustain Chem Eng*, vol. 7, no. 6, 2019, doi: 10.1021/acssuschemeng.9b00004.
- [93] K. A. Murphy, C. A. Tabuloc, K. R. Cervantes, and J. C. Chiu, "Ingestion of genetically modified yeast symbiont reduces fitness of an insect pest via RNA interference," *Sci Rep*, vol. 6, 2016, doi: 10.1038/srep22587.

- [94] M. C. Thomas, J. B. Heppner, R. E. Woodruff, H. v. Weems, Jr., G. J. Steck, and T. R. Fasulo, "Mediterranean Fruit Fly, *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Insecta: Diptera: Tephritidae)," *EDIS*, vol. 2004, no. 8, Dec. 1969, doi: 10.32473/edis-in371-2001.
- [95] B. A. Foote, "Handbook of the Fruit Flies (Diptera: Tephritidae) of America North of Mexico," *Ann Entomol Soc Am*, vol. 87, no. 3, 1994, doi: 10.1093/aesa/87.3.400.
- [96] I. M. White and M. M. Elson-Harris, "Fruit flies of economic significance: their identification and bionomics.," *CAB International, Wallingford, Oxon, UK.*, 1992.
- [97] W. Enkerlin and J. Mumford, "Economic Evaluation of Three Alternative Methods for Control of the Mediterranean Fruit Fly (Diptera: Tephritidae) in Israel, Palestinian Territories, and Jordan," *Journal of Economic Entomology*, vol. 90, no. 5. 1997. doi: 10.1093/jee/90.5.1066.
- [98] C. M. Oliveira, A. M. Auad, S. M. Mendes, and M. R. Frizzas, "Economic impact of exotic insect pests in Brazilian agriculture," *Journal of Applied Entomology*, vol. 137, no. 1–2. 2013. doi: 10.1111/jen.12018.
- [99] K. B. Badii, M. K. Billah, K. Afreh Nuamah, D. Obeng Ofori, and G. Nyarko, "Review of the pest status, economic impact and management of fruit-infesting flies (Diptera: Tephritidae) in Africa," *Afr J Agric Res*, vol. 10, no. 12, 2015, doi: 10.5897/ajar2014.9278.
- [100] T. Rahman and S. Broughton, "Suppressing Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) with an attract-and-kill device in pome and stone fruit orchards in Western Australia," *Crop Protection*, vol. 80, 2016, doi: 10.1016/j.cropro.2015.11.005.
- [101] I. Boutjagualt *et al.*, "Chemical composition and insecticidal effects of brown algae (*Fucus spiralis*) essential oil against *Ceratitis capitata* Wiedemann (Diptera: Tephritidae) pupae and adults," *Biocatal Agric Biotechnol*, vol. 40, 2022, doi: 10.1016/j.bcab.2022.102308.
- [102] D. Tsakireli, M. Riga, S. Kounadi, V. Douris, and J. Vontas, "Functional characterization of CYP6A51, a cytochrome P450 associated with pyrethroid resistance in the Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata*," *Pestic Biochem Physiol*, vol. 157, 2019, doi: 10.1016/j.pestbp.2019.03.022.
- [103] A. Guillem-Amat, L. Sánchez, E. López-Errasquín, E. Ureña, P. Hernández-Crespo, and F. Ortego, "Field detection and predicted evolution of spinosad resistance in *Ceratitis capitata*," *Pest Manag Sci*, vol. 76, no. 11, 2020, doi: 10.1002/ps.5919.
- [104] F. Couso-Ferrer *et al.*, "Cross-resistance to insecticides in a malathion-resistant strain of *ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae)," *J Econ Entomol*, vol. 104, no. 4, 2011, doi: 10.1603/EC11082.
- [105] N. A. Kouloussis *et al.*, "Trapping of *Ceratitis capitata* Using the Low-Cost and Non-Toxic Attractant Biodelear," *Agronomy*, vol. 12, no. 2, 2022, doi: 10.3390/agronomy12020525.
- [106] S. Boulahia, I. Trabelsi, and N. Aouadi, "From Chemicals to IPM Against the Mediterranean Fruit Fly *Ceratitis capitata* (Diptera, Tephritidae)," in *Integrated Pest*

- Management and Pest Control - Current and Future Tactics*, 2012. doi: 10.5772/32686.
- [107] L. Suarez *et al.*, "Biological Control of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) in Argentina: Releases of *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae) in Fruit-Producing Semi-Arid Areas of San Juan," *Nat Sci (Irvine)*, vol. 06, no. 09, 2014, doi: 10.4236/ns.2014.69066.
- [108] G. Sánchez *et al.*, "Augmentative releases of *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae) for *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) control in a fruit-growing region of Argentina," *Biological Control*, vol. 103, 2016, doi: 10.1016/j.biocontrol.2016.08.002.
- [109] J. Gonzalez and P. Troncoso, "The fruit fly exclusion programme in Chile," in *Area-Wide Control of Insect Pests: From Research to Field Implementation*, 2007. doi: 10.1007/978-1-4020-6059-5\_59.
- [110] D. Guillén and R. Sánchez, "Expansion of the national fruit fly control programme in Argentina," in *Area-Wide Control of Insect Pests: From Research to Field Implementation*, 2007. doi: 10.1007/978-1-4020-6059-5\_60.
- [111] M. Bjeliš, V. Ljubetić, and N. Novosel, "Control of Medfly by SIT in the Nereva River Valley," in *Fruit Flies of Economic Importance: From Basic to Applied Knowledge Proceedings of the 7th International Symposium on Fruit Flies of Economic Importance*, 2006, no. September.
- [112] M. Juan-Blasco *et al.*, "Estimating SIT-driven population reduction in the mediterranean fruit fly, *ceratitis capitata*, from sterile mating," *Bull Entomol Res*, vol. 104, no. 2, 2014, doi: 10.1017/S0007485313000692.
- [113] G. Franz, E. Gencheva, and P. Kerremans, "Improved stability of genetic sex-separation strains for the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*," *Genome*, vol. 37, no. 1, 1994, doi: 10.1139/g94-009.
- [114] E. F. Knipling, "ENTOMOLOGY AND THE MANAGEMENT OF MAN'S ENVIRONMENT," *Aust J Entomol*, vol. 11, no. 3, 1972, doi: 10.1111/j.1440-6055.1972.tb01618.x.
- [115] E. Sagri, P. Koskinioti, M. E. Gregoriou, K. T. Tsoumani, Y. C. Bassiakos, and K. D. Mathiopoulos, "Housekeeping in Tephritid insects: The best gene choice for expression analyses in the medfly and the olive fly," *Sci Rep*, vol. 7, Apr. 2017, doi: 10.1038/srep45634.
- [116] "V-ATPases," in *Encyclopedic Dictionary of Genetics, Genomics and Proteomics*, 2004. doi: 10.1002/0471684228.egp13274.
- [117] W. He *et al.*, "Length-dependent accumulation of double-stranded RNAs in plastids affects RNA interference efficiency in the Colorado potato beetle," *J Exp Bot*, vol. 71, no. 9, 2020, doi: 10.1093/JXB/ERAA001.
- [118] K. J. Livak and T. D. Schmittgen, "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method," *Methods*, vol. 25, no. 4, 2001, doi: 10.1006/meth.2001.1262.

- [119] A. Chen, W. Zheng, W. Zheng, and H. Zhang, "The effects of RNA interference targeting *Bactrocera dorsalis* ds-Bdrpl19 on the gene expression of rpl19 in non-target insects," *Ecotoxicology*, vol. 24, no. 3, 2015, doi: 10.1007/s10646-014-1407-3.
- [120] J. W. Pridgeon, L. Zhao, J. J. Becnel, D. A. Strickman, G. G. Clark, and K. J. Linthicum, "Topically applied AaeIAP1 double-stranded RNA kills female adults of *Aedes aegypti*," *J Med Entomol*, vol. 45, no. 3, 2008, doi: 10.1603/0022-2585(2008)45[414:TAADRK]2.0.CO;2.
- [121] L. L. Wang, X. P. Lu, G. Smagghe, L. W. Meng, and J. J. Wang, "Functional characterization of BdB1, a well-conserved carboxylesterase among tephritid fruit flies associated with malathion resistance in *Bactrocera dorsalis* (Hendel)," *Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology*, vol. 200, 2017, doi: 10.1016/j.cbpc.2017.07.001.
- [122] G. Saccone *et al.*, "New sexing strains for Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata*: Transforming females into males," in *Area-Wide Control of Insect Pests: From Research to Field Implementation*, 2007. doi: 10.1007/978-1-4020-6059-5\_7.
- [123] B. A. Eaton, R. D. Fetter, and G. W. Davis, "Dynactin is necessary for synapse stabilization," *Neuron*, vol. 34, no. 5, 2002, doi: 10.1016/S0896-6273(02)00721-3.
- [124] F. Arshad, A. Sharma, C. Lu, and M. Gulia-Nuss, "Rnai by soaking aedes aegypti pupae in dsrna," *Insects*, vol. 12, no. 7, 2021, doi: 10.3390/insects12070634.
- [125] I. K. Singh, S. Singh, K. Mogilicherla, J. N. Shukla, and S. R. Palli, "Comparative analysis of double-stranded RNA degradation and processing in insects," *Sci Rep*, vol. 7, no. 1, 2017, doi: 10.1038/s41598-017-17134-2.
- [126] P. Mohanpuria, M. Govindaswamy, G. S. Sidhu, S. Singh, S. Kaur, and P. Chhuneja, "Ingestion of bacteria expressing dsRNA to maggots produces severe mortality and deformities in fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel) (Diptera: Tephritidae)," *Egypt J Biol Pest Control*, vol. 31, no. 1, 2021, doi: 10.1186/s41938-020-00345-7.
- [127] M. Meiselman *et al.*, "Endocrine network essential for reproductive success in *Drosophila melanogaster*," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 114, no. 19, 2017, doi: 10.1073/pnas.1620760114.
- [128] Y. Shi *et al.*, "Ecdysis triggering hormone signaling (ETH/ETHR-A) is required for the larva-larva ecdysis in *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae)," *Front Physiol*, vol. 8, no. AUG, 2017, doi: 10.3389/fphys.2017.00587.
- [129] W. J. Yang, K. K. Xu, L. Cong, and J. J. Wang, "Identification, mRNA expression, and functional analysis of chitin synthase 1 gene and its two alternative splicing variants in oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis*," *Int J Biol Sci*, vol. 9, no. 4, 2013, doi: 10.7150/ijbs.6022.
- [130] W. J. Yang, Y. B. Wu, L. Chen, K. K. Xu, Y. F. Xie, and J. J. Wang, "Two chitin biosynthesis pathway genes in *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae): Molecular characteristics, expression patterns, and roles in larval-pupal transition," *J Econ Entomol*, vol. 108, no. 5, 2015, doi: 10.1093/jee/tov186.