



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

**ΑΠΟΣΙΩΠΗΣΗ ΑΡΡΕΝΟ-ΕΙΔΙΚΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΟΥ
ΔΑΚΟΥ ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ ΜΕΣΩ ΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ Η
ΠΡΟΟΠΤΙΚΗ ΧΡΗΣΗΣ ΩΣ ΜΕΣΟ ΕΛΕΓΧΟΥ ΤΩΝ
ΕΝΤΟΜΩΝ**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΖΟΡΜΠΑΣ ΕΛΕΥΘΕΡΙΟΣ



ΛΑΡΙΣΑ 2016

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«ΑΠΟΣΙΩΠΗΣΗ ΑΡΡΕΝΟ-ΕΙΔΙΚΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΟΥ ΔΑΚΟΥ ΤΗΣ
ΕΛΙΑΣ ΜΕΣΩ ΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ Η ΠΡΟΟΠΤΙΚΗ ΧΡΗΣΗΣ ΩΣ ΜΕΣΟ
ΕΛΕΓΧΟΥ ΤΩΝ ΕΝΤΟΜΩΝ»**

**“FEEDING – BASED RNA INTERFERENCE OF OLIVE FLY MALE
SPECIFIC GENES AND ITS POTENTIAL FOR PEST CONTROL”**

ΖΟΡΜΠΙΑΣ ΕΛΕΥΘΕΡΙΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κατά την ακαδημαϊκή χρονιά 2015 – 2016 υπό την επίβλεψη και καθοδήγηση του καθηγητή κ. Μαθιόπουλου Κωνσταντίνου.

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Μαθιόπουλος Κωνσταντίνος

Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Καρπούζας Δημήτριος

Αναπληρωτής καθηγητής
Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και
Βιοτεχνολογίας
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Τσουμάνη Κωνσταντίνα

Διδάσκουσα Π.Δ. 407

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Μετά το πέρας της διπλωματικής μου εργασίας θα ήθελα, πρώτα, να ευχαριστήσω τον κ. Ματθιόπουλο Κωνσταντίνο ο οποίος με εμπιστεύθηκε και μου ανέθεσε το συγκεκριμένο θέμα για την διπλωματική μου εργασία καθώς επίσης και για την αμέριστη βοήθεια του, την άριστη συνεργασία μας και την πολύτιμη καθοδήγησή του κατά τη διάρκεια της εκπόνησης αυτής.

Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Καρούζα Δημήτριο και την κα Τσουμάνη Κωνσταντίνα οι οποίοι αποτελούν μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής μου.

Τέλος θέλω να ευχαριστήσω την κα Σαγρή Ευθυμία, Διδάκτορα του εργαστηρίου, για την υπομονή που έδειξε, για την άριστη συνεργασία μας, την πολύτιμη καθοδήγησή της, τις υποδείξεις και διορθώσεις της σε όλες τις φάσεις διεκπεραίωσης της συγκεκριμένης εργασίας. Την ευχαριστώ θερμά για την καθημερινή επίβλεψη, τον χρόνο που μου αφιέρωσε και την αμέριστη συμπαράστασή της όλο αυτό το διάστημα. Χωρίς τη βοήθειά της η εκπόνηση αυτής της εργασίας δε θα ήταν δυνατή.



Την εργασία αυτή, την αφιερώνω στον πατέρα μου ο οποίος, καθ' όλη τη διάρκεια της, μου μετέδιδε απλόχερα την επιστημονική του γνώση και εμπειρία και αποτελεί για εμένα φωτεινό παράδειγμα προς μίμηση.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

Σελίδα

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	4
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	7
ABSTRACT.....	8
<u>1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ</u>	
1. Ο δάκος της ελιάς.....	10
1. Μορφολογία.....	11
2. Βιολογικός κύκλος.....	11
3. Προκαλούμενη ζημία στις καλλιέργειες της ελιάς.....	12
2. Καταπολέμηση - πληθυσμιακός έλεγχος του δάκου.....	13
1. Χημική καταπολέμηση.....	13
1.Οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα.....	13
2.Πυρεθροειδή εντομοκτόνα.....	14
3.Άλλοι τύποι εντομοκτόνων.....	14
2. Βιολογική καταπολέμηση.....	16
1.Συστήματα παγίδευσης – Μαζική παγίδευση (Mass trapping).....	17
2.Ωφέλιμα έντομα.....	17
3.Τεχνική του Στείρου Εντόμου (Sterile Insect Technique, SIT).....	17
1. Μέσω ακτινοβολίας.....	19
2. Μέσω χημειωστικών.....	20
3. Μέσω γενετικής τροποποίησης.....	20
3. Η τεχνολογία της παρεμβολής RNA (RNA interference, RNAi).....	22
1. Μηχανισμός RNAi.....	22
2. Εφαρμογή μέσω μικροένεσης.....	23
3. Εφαρμογή μέσω διαποτισμού.....	23
4. Εφαρμογή μέσω τροφής.....	24
4. Growth arrest specific 8 (Gas8): γονίδιο – στόχος.....	24
5. Σκοπός εργασίας.....	27
<u>2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</u>	
1. Πλασμιδιακή κλωνοποίηση.....	29
1. Βακτηριακά στελέχη <i>Escherichia coli</i>	29
1. XL1 Blue.....	29
2. HT115A DE3.....	29
2. Πλασμιδιακός φορέας.....	30
1. Απομόνωση.....	31
2. Πέψη.....	32
3. Ηλεκτροφόρηση και εκχύλιση DNA από πήκτωμα αγαρόζης.....	33
3. Ένθεμα.....	33

1. Απομόνωση Χρωμοσωμικού DNA.....	34
2. Ενίσχυση με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	35
4. Σχηματισμός ανασυνδυασμένου φορέα (αντίδραση λιγάσης).....	36
5. Μετασχηματισμός βακτηρίων.....	37
1. Δημιουργία κυττάρων για μετασχηματισμό.....	38
2. Μετασχηματισμός.....	38
6. Επιλογή κλώνων.....	39
1. <i>In Situ</i> υβριδοποίηση αποικιών.....	39
1. Διαλύματα.....	41
2. Κατασκευή – έλεγχος λειτουργικότητας ανιχνευτή.....	43
3. Μεταφορά αποικιών στη μεμβράνη – Προϋβριδοποίηση.....	44
4. Υβριδοποίηση.....	45
5. Εμφάνιση.....	45
2. Colony PCR.....	46
3. Πέψη DNA.....	47
4. Αλληλούχηση ανασυνδυασμένου πλασμιδίου.....	47
7. Ανάπτυξη και αποθήκευση επιθυμητού κλώνου.....	49
2. Έκφραση dsRNA.....	49
1. Καλλιέργεια βακτηρίων.....	49
2. Απομόνωση – καθαρισμός dsRNA.....	50
1. Καθαρισμός φαινόλης/χλωροφορμίου.....	51
3. RNA σίγηση μέσω τροφής.....	52
1. Καλλιέργεια και χρώση βακτηρίων.....	52
2. Διατροφή εντόμων.....	53
1. Διατροφή με βακτήρια συμπυκνωμένα κατά 125×.....	53
2. Διατροφή με βακτήρια συμπυκνωμένα κατά 30×.....	54
4. Ανάλυση RNA σίγησης.....	54
1. Απομόνωση RNA.....	55
2. Απομόνωση DNA.....	56
3. Σύνθεση cDNA.....	56
4. Real - Time PCR.....	58
5. Έλεγχος του φύλου των εντόμων μέσω PCR.....	59
5. Control GFP.....	60
<u>3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</u>	
1. Ενίσχυση και απομόνωση γονιδίου – στόχου.....	62
2. Απομόνωση και προετοιμασία πλασμιδιακού φορέα L4440.....	62
3. Δημιουργία ανασυνδυασμένου φορέα – αντίδραση λιγάσης.....	62
4. Μετασχηματισμός βακτηρίων HT115(DE3).....	63
5. Έλεγχος αποικιών μέσω Colony PCR.....	64
6. Επιβεβαίωση της παρουσίας του ενθέματος μετά από πέψη με ένζυμα περιορισμού.....	64
7. Έκφραση του dsRNA από τα βακτηριακά κύτταρα.....	65
8. Καλλιέργεια και χρώση βακτηρίων.....	66

9. Διατροφή και επιλογή εντόμων.....	67
10. Λειτουργική ανάλυση RNA σίγησης.....	68
<u>4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ</u>	70
<u>5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</u>	75

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο δάκος της ελιάς, *Bactrocera oleae*, είναι ο κυριότερος εχθρός των ελαιοκαλλιεργειών. Η έως τώρα καταπολέμηση του γίνεται είτε με χημικές μεθόδους είτε με μεθόδους βιολογικού ελέγχου του εντόμου που βασίζονται στην απελευθέρωση στο περιβάλλον στείρων εντόμων (Sterile Insect Technique, SIT). Τα τελευταία χρόνια, στον τομέα της μοριακής βιολογίας, γίνεται ανάπτυξη νέων τεχνολογιών συμπεριλαμβανομένης και της τεχνολογίας της παρεμβολής RNA (RNA interference, RNAi). Η RNAi δίνει την δυνατότητα να πραγματοποιήσουμε στοχευόμενη σίγηση γονιδίων, με τη χορήγηση δίκλωνου RNA (double stranded RNA, dsRNA), επηρεάζοντας τα φαινοτυπικά τους χαρακτηριστικά. Μέχρι στιγμής εφαρμόζεται σε διάφορες περιπτώσεις, κυρίως, μέσω ένεσης στον οργανισμό στόχο. Αυτή η διαδικασία όμως είναι επίπονη και χρονοβόρος εάν θέλουμε, μέσω αυτής, να δημιουργήσουμε στείρα έντομα σε μεγάλη κλίμακα.

Σκοπός της παρούσης διπλωματικής εργασίας είναι η ανάπτυξη ενός εναλλακτικού τρόπου εφαρμογής της τεχνολογίας RNAi μέσω τροφής στο δάκο της ελιάς. Αυτό σημαίνει ότι αντί να πραγματοποιούμε ενέσεις στα έντομα τα ταΐζουμε είτε βακτήρια που παράγουν το dsRNA είτε τους παρέχουμε το dsRNA αυτούσιο στην τροφή τους. Μέχρι στιγμής η εφαρμογή μέσω τροφής έχει δοκιμασθεί σε κουνούπια και άλλα είδη του γένους *Bactrocera* όχι όμως στον δάκο.

Η εργασία περιλαμβάνει τη δημιουργία του βακτηριακού στελέχους και του dsRNA με το οποίο θα γίνεται σίγηση του γονιδίου *Growth arrest specific 8 (Gas8)*. Το γονίδιο αυτό φέρεται να εμπλέκεται στην κινητικότητα του σπέρματος. Στη συνέχεια το στέλεχος χορηγείται με την τροφή στα έντομα μέχρι το στάδιο της νύμφης. Τα αποτελέσματα της RNA παρεμβολής μετά τη χορήγηση τα παρατηρήσαμε στα στάδια της προνύμφης και της νύμφης μέσω RT real-time PCR.

Η εργασία αυτή στέφθηκε με επιτυχία όσον αφορά το πρώτο της σκέλος που ήταν η δημιουργία του κατάλληλου βακτηριακού κλώνου ο οποίος επιτυχώς θα παρήγαγε το dsRNA. Αντίθετα, τα αποτελέσματα της σίγησης δεν ήταν τα αναμενόμενα. Όμως, μας οδήγησαν σε ορισμένα θετικά συμπεράσματα όσον αφορά τις συγκεντρώσεις και τη διάρκεια χορήγησης του dsRNA στον δάκο της ελιάς. Αυτές οι πληροφορίες είναι χρήσιμες και απαραίτητες για τις μετέπειτα μελέτες με σκοπό τη βελτιστοποίηση της μεθόδου.

ABSTRACT

The olive fruit fly, *Bactrocera oleae*, is the main enemy of olive cultivation. Currently the effort to control the insect population is focused either in chemical methods or biological methods of pest control. The latest are based on the release of sterile insects to the environment (Sterile Insect Technique, SIT). The RNA interference technology (RNAi), a new technique developed in recent years by molecular biologists, gives the opportunity to perform targeted gene silencing, by administering double-stranded RNA (dsRNA) and thus affecting the phenotypic characteristics of the organisms. Up to day this technique is applicable mainly by injection into the target organism. But this process is tedious and time consuming for large scale applications.

The purpose of this work is to develop an alternative method of RNAi technology implementation through feeding for the olive fruit fly. In this technique we feed the insects either bacteria producing the dsRNA, or deliver the dsRNA itself in their food. So far the application through feeding has been tested in mosquitoes and other *Bactrocera* species, but not in the olive fruit fly.

This work includes the development of the bacterial strain producing the dsRNA for silencing the *Growth arrest specific 8 (Gas8)* gene. This gene has a crucial role in the sperm motility apparatus. Then we administered the bacterial strain to the insects with their food until the pupal stage. The results of the RNA interference were observed at the larval and pupal stage by RT real-time PCR after the administration.

This work was successful in regard to the creation of the appropriate bacterial clone which could successfully produce the dsRNA. In contrast, the effects of silencing were not the expected. Nevertheless this led us to some positive conclusions on estimating of the dsRNA concentrations and the duration of its administration in the olive fruit fly. These information are useful and necessary for subsequent studies to optimize the above method.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Ο δάκος της ελιάς

Ο δάκος της ελιάς, *Bactrocera (Dacus) oleae* (Rossi), είναι το σοβαρότερο παράσιτο των ελαιόδεντρων, *Olea europaea*, στις μεσογειακές χώρες. Τα προνυμφικά στάδια του δάκου της ελιάς τρέφονται αποκλειστικά με τους καρπούς της ελιάς. Αυτό συνεπάγεται ότι η επιβίωση του εντόμου σχετίζεται άμεσα με την κατάσταση και τη διαθεσιμότητα των καρπών της ελιάς (Daane and Johnson, 2010). Συναντάται σχεδόν οπουδήποτε υπάρχουν καλλιεργούμενες ή άγριες ελιές. Ο δάκος της ελιάς, εκτός από τη λεκάνη της Μεσογείου, ενδημεί και στην Νότιο Αφρική, στα Κανάρια νησιά, στη Μέση Ανατολή, στην Κίνα, στην Καλιφόρνια, στο Μεξικό, στην Κεντρική Αμερική και στην Αυστραλία (Daane and Johnson, 2010; Ekesi et al., 2006; Nardi et al., 2005; Rice et al., 2003) (Εικόνα 1.1). Η πτήση των ενήλικων ατόμων και η μεταφορά των μολυσμένων καρπών είναι τα σημαντικότερα μέσα της μετακίνησης και της διασποράς σε νέες, προηγουμένως, μη μολυσμένες περιοχές (Fletcher, 1989).



Εικόνα 1.1 Περιοχές όπου ενδημεί ο δάκος της ελιάς, *Bactrocera oleae*.

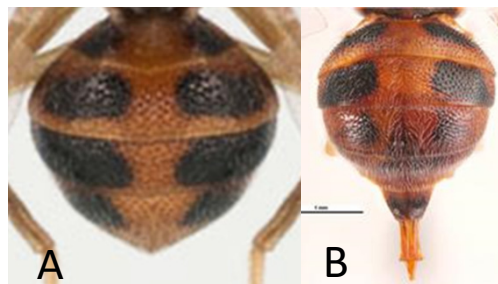
Τα θηλυκά γεννούν τα αυγά στο μεσοκάρπιο του καρπού της ελιάς και η προνύμφη τρέφεται από το εσωτερικό του καρπού (Neuenschwander and Michelakis, 1981). Τα ενήλικα άτομα τρέφονται τόσο από οργανικές πηγές, όπως η γύρη των φυτών και οι εκκρίσεις των καρπών, όσο και από πηγές όπως τα περιττώματα των πτηνών, τα βακτήρια και οι ζύμες (Tsiropoulos, 1984).

Οι οικονομικές απώλειες λόγω του συγκεκριμένου παρασίτου έχουν υπολογιστεί ότι φθάνουν μέχρι και το 15% της συγκομιδής, παρά τη χρήση εντομοκτόνων για τον έλεγχο του πληθυσμού του το γεγονός ότι, εντομοκτόνα εφαρμόζονται κάθε χρόνο για να ελέγξουν τον πληθυσμό του (Mazomenos et al., 2002). Στις επιτραπέζιες ελιές η οικονομική απώλεια ξεκινά με την οπή που ανοίγει το θηλυκό για να ωοαποθέσει. Επιπλέον η προνύμφη που τρέφεται από τον καρπό οδηγεί σε μείωση της οικονομικής αξίας και της ποιότητας του ελαιόλαδου (Neuenschwander and Michelakis, 1978; Neuenschwander et al., 1981). Οι συνολικές

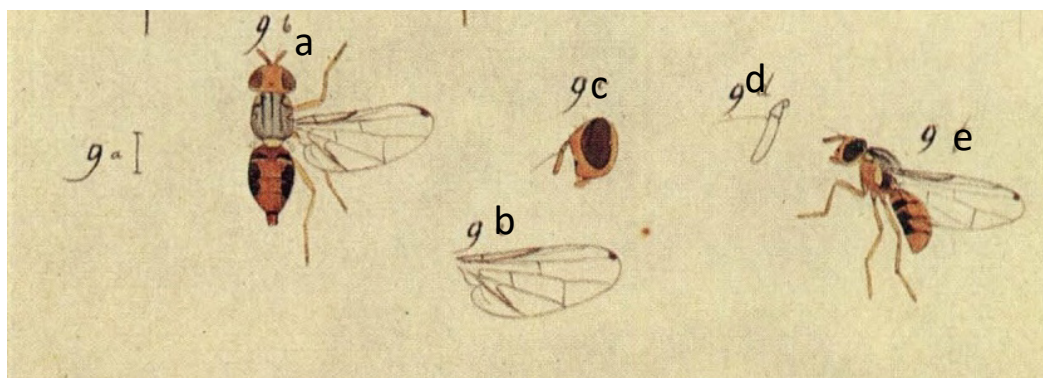
απώλειες, από τον δάκο της ελιάς, ανά τον κόσμο μπορούν να φτάσουν το 80% της οικονομικής αξίας του ελαιόλαδου, ενώ σε μερικές ποικιλίες ελιάς φτάνουν και το 100% (Tzanakakis, 2003).

1.1.1 Μορφολογία

Ο δάκος της ελιάς, *Bactrocera oleae*, ανήκει στην κλάση των εντόμων (Insecta), στην τάξη των δίπτερων (Diptera), στην οικογένεια των Tephritidae και στο γένος *Bactrocera* (White and Hancock, 1997; White et al., 2000). Το αυγό είναι ελλειψοειδές με διάμετρο περίπου 0,7mm. Η προνύμφη είναι ένα κιτρινωπό σκουλήκι με μήκος 6,5 – 7,0mm. Η νύμφη είναι ωσειδές με μήκος 4,0 – 5,0mm και χρώμα που μεταβάλλεται από λευκό σε καφέ με την πάροδο του χρόνου (Kandybina, 1977; Rice, 2000). Τα ενήλικα άτομα έχουν μήκος 4,0 – 5,0mm και είναι καφεκόκκινα στο χρώμα. Το φτερό είναι διάφανο, διαθέτει μια μικρή σκούρα κηλίδα στην κορυφή του και έχει μήκος 4,3 – 5,2mm. Το κεφάλι έχει δύο κεραίες, κάτω από τις οποίες υπάρχει από μια κηλίδα, και μάτια κοκκινωπά. Ο θώρακας έχει 2 – 4 σκούρες διαμήκης λωρίδες. Η κοιλία είναι καφετιά με σκουρότερες τις πλευρικές περιοχές (Εικόνα 1.3). Τα θηλυκά διαθέτουν τον ωοθέτη που προεξέχει της κοιλίας και κατ' αυτόν τον τρόπο διακρίνονται από τα αρσενικά (Rice, 2000) (Εικόνα 1.2).



Εικόνα 1.2 Α) Αρσενικό άτομο, Β) θηλυκό άτομο. Η βασική τους διαφορά έγκειται στην ύπαρξη του ωοθέτη στην κοιλία του θηλυκού.



Εικόνα 1.3 Μορφολογικά χαρακτηριστικά του δάκου της ελιάς, *Bactrocera oleae*. α) κάτοψη θηλυκού, β) κάτοψη φτερού, γ) προφίλ κεφαλής, δ) κεραία και ε) πλαϊνή όψη αρσενικού ατόμου.

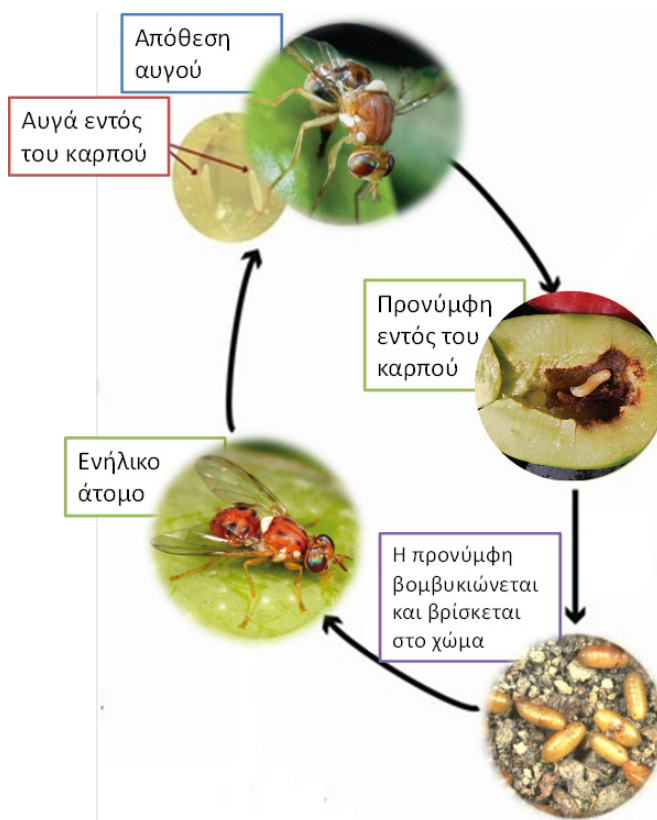
1.1.2 Βιολογικός κύκλος

Στις θερμές περιοχές με αφθονία φυτών ξενιστών ο δάκος της ελιάς μπορεί να φτάσει μέχρι πέντε ή έξι γενεές το χρόνο (Rice, 2000). Γενικά όμως ο δάκος παραγάγει τρεις με τέσσερις γενιές το χρόνο με την κάθε γενιά να περιλαμβάνει όλα τα στάδια της ζωής του (αυγό – egg, προνύμφη – larva, νύμφη – pupa, ενήλικο άτομο – adult) (Εικόνα 1.4). Για την ανάπτυξη του η μέση ημερήσια θερμοκρασία πρέπει να

κυμαίνεται μεταξύ 9 °C και 24°C. Επιπλέον η υψηλή υγρασία βοηθά σημαντικά στη δράση και την ανάπτυξή του.

Το θηλυκό αποθέτει τουλάχιστον 500 αυγά κατά τη διάρκεια της, λιγότερο από έξι μηνών, ζωής του μέσα στον αναπτυσσόμενο ελαιόκαρπο, χρησιμοποιώντας τον οδοντωτό ωοθέτη του για να ανοίξει μια οπή στο δέρμα του καρπού της ελιάς. Τα αυγά εκκολάπτονται σε διάστημα δύο έως τριών ημερών και οι προνύμφες αρχίζουν να τρέφονται με τη σάρκα του καρπού της ελιάς. Το προνυμφικό στάδιο διαρκεί περίπου 20 ημέρες (Rice, 2000; Nardi et al., 2003). Η βομβυκίωση μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε μέσα

στους καρπούς της ελιάς ή στο χώμα (αφού ως νύμφη μπορεί να προκαλέσει την πτώση του καρπού). Η βομβυκίωση στο χώμα είναι πιθανότερο να συμβεί κατά τους χειμερινούς μήνες και μπορεί να διαρκέσει μέχρι έξι μήνες, επιτρέποντας το δάκο να διαχειμάσει. Αντίθετα μέσα στον καρπό της ελιάς διαρκεί περίπου 8-10 ημέρες (Vossen et al., 2006; Mazomenos et al., 2002).

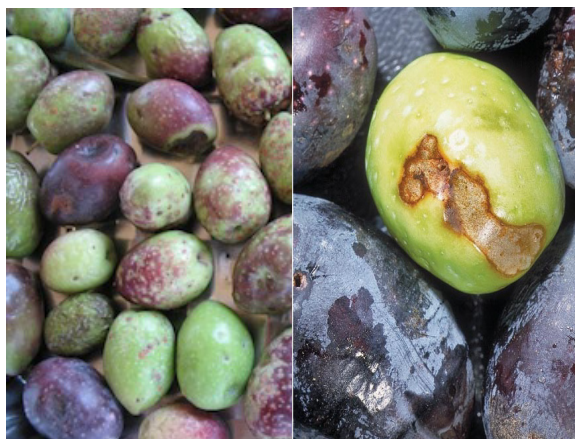


Εικόνα 1.4 Ο κύκλος ζωής του δάκου της ελιάς, *Bactrocera oleae*.

1.1.3 Προκαλούμενη ζημία στις καλλιέργειες της ελιάς

Όταν η Αθηνά, η θεά της ειρήνης και της σοφίας, πρόσφερε μια ελιά στους ανθρώπους της Αττικής για να επιλέξουν το όνομά της για την πόλη τους - και όχι αυτό του Ποσειδώνα, του αδελφού της, ούτε αυτή, ούτε οι άνθρωποι της Αττικής γνώριζαν το «σκουλήκι» που θα μπορούσε να καταστρέψει τους πολύτιμους καρπούς εκείνου του δέντρου. Αυτό περιγράφηκε πολύ αργότερα, τον 3^ο αιώνα π.Χ., από το βοτανολόγο Θεόφραστο που, στις ερευνητικές του εργασίες «Περί φυτών ιστορία» και «Περί φυτών αιτιών» (Theophrastus), μίλησε για το «σκουλήκι κάτω από το δέρμα της ελιάς που καταστρέφει τους καρπούς». Η ωοθητική δραστηριότητα των θηλυκών καθώς επίσης και η σίτιση της προνύμφης είναι υπεύθυνες για την καταστροφή του καρπού της ελιάς. Οι οπές στο δέρμα ελιών από την ωοαπόθεση και η σίτιση της προνύμφης με τη σάρκα των ελιών μπορούν να αναγκάσουν τους καρπούς της ελιάς να στεγνώσουν και να πέσουν από τα δέντρα (Nardi et al., 2003; Weems 1966) και αυξάνει την ευαισθησία των καρπών σε βακτήρια και μύκητες (Delkash-Roudsari et al., 2014) (Εικόνα 1.5). Με τον τρόπο αυτό ο καρπός γίνεται

ακατάλληλος για κονσερβοποίηση και γενικά για διάθεση στο εμπόριο, ενώ το λάδι που παράγεται από τους προσβεβλημένους καρπούς παρουσιάζει υψηλή οξύτητα λόγω της αποσύνθεσης του καρπού από τους μύκητες που αναπτύσσονται όπως ο μύκητας *Camarosporium dalmaticum* που προκαλεί την “ξεροβούλα” στις άγουρες και τη “σαποβούλα” στις ώριμες ελιές και ο μύκητας Μακροφώμα (*Macrophoma dalmatica*) που δημιουργεί μαύρες νεκρωτικές κηλίδες στον καρπό (Παναγόπουλος, 1997; Pereira et al., 2004).



Εικόνα 1.5 Η σπή ωστοκίας και η θρέψη της προνύμφης από το εσωτερικό του καρπού είναι υπεύθυνες για την αχρήστευση του καρπού και την ελάττωση του κέρδους από τη συγκομιδή.

2. Καταπολέμηση - πληθυσμιακός έλεγχος του δάκου

Παραδοσιακά, οι μέθοδοι καταστολής του δάκου έχουν βασιστεί σε ψεκασμούς που χρησιμοποιούν μη φιλικά προς το περιβάλλον εντομοκτόνα. Άλλες, περισσότερο εκλεκτικές μέθοδοι, όπως οι μέθοδοι παγίδευσης, έχουν αναπτυχθεί ως οικολογικά καλύτερες εναλλακτικές λύσεις (Bjeliš, 2009). Οι μέθοδοι καταπολέμησης του δάκου μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο μεγάλες κατηγορίες τη χημική και τη βιολογική καταπολέμηση. Στη χημική καταπολέμηση γίνεται χρήση εντομοκτόνων, ενώ στη βιολογική καταπολέμηση γίνεται χρήση παγίδων, ωφέλιμων εντόμων, τα οποία δρουν εναντίων του δάκου, και η τεχνική του στείρου εντόμου (Sterile Insect Technique, SIT).

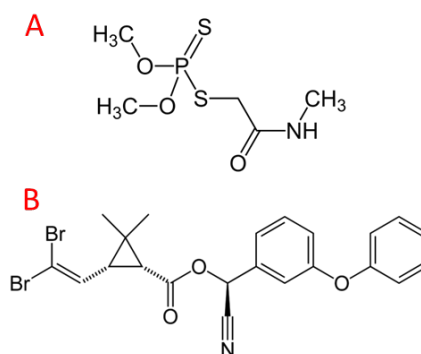
2.1 Χημική καταπολέμηση

Αν και υπάρχει ένα σύγχρονο ενδιαφέρον για τις περιβαλλοντικά συμβατές στρατηγικές, ο έλεγχος του πληθυσμού του *B. oleae* στην περιοχή της Μεσογείου παραμένει συνήθως βασισμένος στα εντομοκτόνα, ιδιαίτερα στα οργανοφωσφορικά (Organophosphates, OPs) (Haniotakis, 2003). Πρόσφατα, μερικά πυρεθροειδή (Pyrethroids) εντομοκτόνα έχουν καταχωρηθεί στην Ευρώπη με χρήση, κυρίως, ως ψεκασμοί δολώματος (bait sprays, εντομοκτόνο αναμειγμένο με προσελκυστική ουσία), με τη χρήση τους όμως να παραμένει ακόμη περιορισμένη.

2.1.1 Οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα

Τα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα είναι αναστολείς της ακετυλοχολινεστεράσης, ενός ενζύμου ουσιαστικού για τη λειτουργία του κεντρικού νευρικού συστήματος. Δρουν τόσο μέσω επαφής όσο και μέσω κατάποσης. Απορροφούνται εύκολα, κατανέμονται σε όλους τους ιστούς, αλλά αποικοδομούνται

σχετικά γρήγορα (Dauterman et al., 1960). Οι εφαρμογή των OPs εντομοκτόνων πραγματοποιείται με τον ψεκασμό των ελαιόδεντρων. Το χαρακτηριστικότερο παράδειγμα OP εντομοκτόνου είναι το Dimethoate (Εικόνα 1.6). Το Dimethoate, χρησιμοποιείται ευρέως λόγω της αποτελεσματικότητάς του και του σχετικά χαμηλότερου κόστους του. Επίσης θεωρείται ότι είναι προτιμητέο, σε σύγκριση με άλλα εντομοκτόνα, επειδή αφήνει χαμηλά υπολείμματα στο ελαιόλαδο, δεδομένου ότι είναι υδροδιαλυτό και απομακρύνεται μαζί με τα κατακάθια κατά την επεξεργασία (Stavridis et al., 2013). Η εκτενής χρήση των OPs έχει οδηγήσει στην επιλογή ανθεκτικών εναντίον τους εντόμων (Vontas et al., 2001, 2002, Skoutras et al., 2007).



Εικόνα 1.6 Χημικές δομές των εντομοκτόνων: A) Dimethoate, B) Deltamethrin.

2.1.2 Πυρεθροειδή εντομοκτόνα

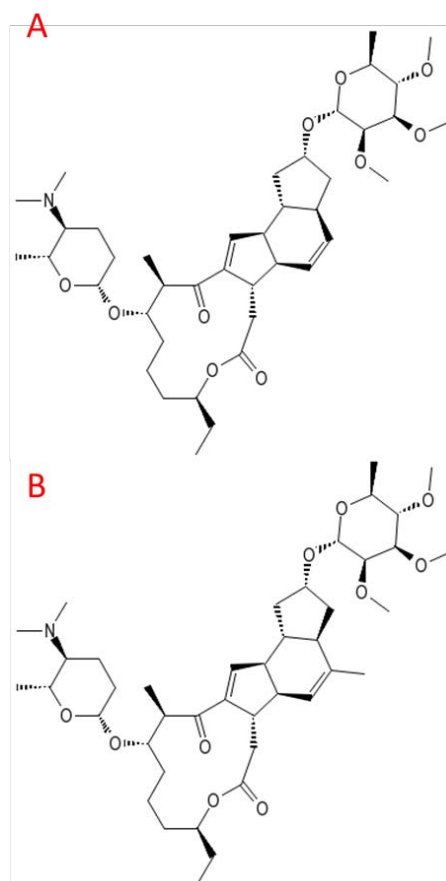
Τα πυρεθροειδή εντομοκτόνα είναι οργανικές ενώσεις παρόμοιες με τις φυσικές πυρεθρίνες (pyrethrins) που παράγονται από τα λουλούδια των πυρέθρων (*Chrysanthemum cinerariaefolium* και *C. coccineum*). Είναι συστατικά κυρίως των οικιακών εντομοκτόνων. Δρουν εμποδίζοντας τους διαύλους ιόντων κατά μήκος των νευραξόνων να κλείσουν οδηγώντας σε υπερδιέγερση (Soderlund et al., 2002). Αποικοδομούνται σχετικά εύκολα από το φως του ήλιου και την ατμόσφαιρα σε μια ή δύο ημέρες, και δεν έχουν σημαντικές επιπτώσεις στην ποιότητα υπόγειου νερού (U.S.E.P.A., 2002). Το Deltamethrin (Εικόνα 1.6), είναι ένα από τα πυρεθροειδή εντομοκτόνα που χρησιμοποιούνται εναντίων του *B. oleae* είτε με ψεκασμό κάλυψης είτε ως δολωματικός ψεκασμός (Mazomenos et al., 2002). Αποτελεί μέλος μιας από τις ασφαλέστερες κατηγορίες φυτοφαρμάκων: τα συνθετικά πυρεθροειδή. Είναι ιδιαίτερα τοξικό για την υδρόβια ζωή. Επιπλέον είναι ακόμη νευροτοξικό για τους ανθρώπους, αν και γενικά θεωρείται ασφαλές για χρήση κοντά σε κατοικημένες περιοχές (Bouwman et al., 2006). Μέχρι στιγμής τα πυρεθροειδή εντομοκτόνα αποτελούν μια εναλλακτική μορφή εντομοκτόνων στα οποία ο δάκος της ελιάς δεν έχει ακόμη αναπτύξει ανθεκτικότητα. Παρ' όλα αυτά, παρατηρείται μια σχετικά γρήγορη ανάπτυξη ανθεκτικότητας σε συγγενικά είδη Tephritidae, όπως το *Bactrocera dorsalis*, χωρίς όμως ο ακριβής μηχανισμός ανθεκτικότητας να είναι απολύτως σαφής.

2.1.3 Άλλοι τύποι εντομοκτόνων

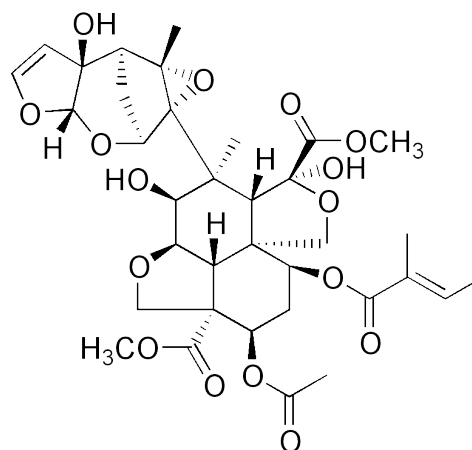
Ένας ιδιαίτερος τύπος εντομοκτόνου, ο οποίος εισήχθη μαζί με το Deltamethrin, είναι η μακροκυκλική λακτόνη Spinosad. Το Spinosad είναι ένα σχετικά νέο εντομοκτόνο, που προέρχεται από το βακτήριο *Saccharopolyspora spinosa* (Mertz & Yao), με αποτελεσματικότητα ενάντια σε ένα ευρύ φάσμα εντόμων, συμπεριλαμβανομένης του δάκου της ελιάς (Bret et al., 1997; Scott, 1998). Αποτελεί

μίγμα δύο σπινოსινών (spinosins), spinosyn A, το σημαντικότερο συστατικό, και spinosyn D (το δευτερεύον συστατικό), σε κατά προσέγγιση αναλογία 17:3 (Mertz et al., 1990) (Εικόνα 1.7). Αν και ο μηχανισμός δράσης του φαίνεται πως είναι μοναδικός, με κύριο στόχο την περιοχή του νικοτινικού υποδοχέα ακετυλοχολίνης (nAChR) (περιοχή διαφορετική από αυτή της νικοτίνης) και δευτερεύοντα στόχο περιοχή των υποδοχέων GABA (περιοχή διαφορετική από αυτή της αμπαμεκτίνης). Όμως, ο ακριβής στόχος του Spinosad παραμένει ακόμη ασαφής (Salgado, 1997; Thompson et al., 2000; Watson, 2001). Στην Κύπρο το Spinosad χρησιμοποιείται σποραδικά, μετά από την εισαγωγή του το 2002, ενώ στην Ελλάδα η χρήση του είναι πολύ περιορισμένη, μετά από την εισαγωγή του το 2004, και ιδιαίτερα χρησιμοποιείται στις βιολογικές ποικιλίες ελιών στην Κρήτη. Αντιθέτως, στην Καλιφόρνια είναι το μόνο εντομοκτόνο που χρησιμοποιείται ενάντια στο δάκο της ελιάς μετά από την εισαγωγή του το 2004. Η αποκλειστική χρήση του Spinosad στην Καλιφόρνια έχει οδηγήσει σε υψηλότερα επίπεδα ανθεκτικότητας των πληθυσμών *B. oleae* από ότι θα αναμενόταν να εμφανιστεί σε πληθυσμούς που δεν έχει εφαρμοσθεί καθόλου ή στους ελληνικούς και κυπριακούς πληθυσμούς που εκτέθηκαν ελάχιστα στο Spinosad (Kakani et al., 2010).

Μεταξύ των εντομοκτόνων με χαμηλό αντίκτυπο στο περιβάλλον ανήκει το Azadirachtin (Εικόνα 1.8), μια φυσική αποθητική ουσία που προέρχεται από το έλαιο των σπόρων από τους καρπούς του τροπικού δέντρου *Azadirachta indica*. Εντούτοις, η αποτελεσματικότητά του ενάντια στο δάκο δεν έχει εξεταστεί αρκετά (Stavridis et al., 2013).



Εικόνα 1.7 Χημικές δομές των εντομοκτόνων: A) spinosin A, B) spinosin D.



Εικόνα 1.8 Χημική δομή του Azadirachtin.

2.2 Βιολογική καταπολέμηση

2.2.1 Συστήματα παγίδευσης – Μαζική παγίδευση (Mass trapping)



Εικόνα 1.9 Δάκος κολλημένος σε παγίδα.

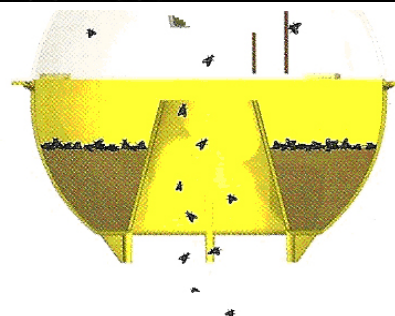
(attract and kill) φιλοσοφία των ψεκασμών δολώματος. Στη μαζική παγίδευση, αντί της προσέλκυσης των ενήλικων σε ένα μέρος του ελαιώνα (bait station), τα ενήλικα άτομα του δάκου της ελιάς προσελκύνονται σε μια παγίδα (Economidou, 1989) από τη τροφική, σεξουαλική ή χρωματική έλξη. Το κύριο πλεονέκτημα της μαζικής παγίδευσης είναι ότι οι χημικές ουσίες αποκλείονται από ολόκληρο τον ελαιώνα, και οι διάφορες παγίδες μπορούν να εγκατασταθούν σε κάθε δέντρο κατά τη διάρκεια της θερινής περιόδου (Varikou et al., 2015). Οι πρωτεΐνες είναι το σημαντικότερο συστατικό των προσελκυστικών που χρησιμοποιούνται στις παγίδες. Η αμμωνία, που εκπέμπεται από την αποσύνθεση των πρωτεϊνών, αποτελεί ισχυρό προσελκυστικό των ενήλικων θηλυκών της υποοικογένειας Dacinae επειδή απαιτούν μια πηγή πρωτεϊνών για την ωρίμανση των αυγών (Steiner et al., 1961; Metcalf, 1990; Varikou et al., 2015).

Χαρακτηριστικότερο παράδειγμα παγίδας είναι η παγίδα McPhail (Εικόνα 1.10). Η παγίδα αυτή αποτελείται από ένα ανεστραμμένο χωνί για βάση και ένα διαφανή κώδωνα (bell) στην κορυφή. Στο ανώτερο μέρος και μέσα στον κώδωνα βρίσκεται ο πάροχος των φερομονών/ προσελκυστικών ουσιών. Οι παγίδες συνήθως χρησιμοποιούν και ένα διάλυμα νερού – σαπουνιού. Τα έντομα εισέρχονται στην παγίδα μέσω μιας τρύπας στη βάση του χωνιού προσελκυσμένα από την ουσία που είναι κρεμασμένη μέσα στην κορυφή του κουδουνιού. Μόλις εισέλθουν στην παγίδα, τα έντομα παραμένουν μέσα λόγω της προσελκυστικής ουσίας και του φωτός, που εισέρχεται μέσω της διαφανούς κορυφής. Όταν εξαντλούνται πέφτουν στο διάλυμα νερού – σαπουνιού στη βάση του χωνιού όπου πνίγονται (www.biobestgroup.com).



McPhail trap being used with methyl eugenol, Tanzania

© MRAC 2006



Εικόνα 1.10 Πάνω παγίδα McPhail. Κάτω εγκάρσια τομή της παγίδας.

2.2.2 Ωφέλιμα έντομα

Πολλά έντομα έχουν ερευνηθεί ως πιθανοί βιολογικοί παράγοντες ελέγχου του δάκου της ελιάς. Οι Daane και Johnson (2010) συστήνουν τη χρήση μιας μικρής ομάδας βρακονιδικών σφηκών (braconid wasps) που παρασιτούν το δάκο της ελιάς κατά τη διάρκεια του κύκλου ζωής τους. Στα είδη των Braconid που παρασιτούν το δάκο της ελιάς συμπεριλαμβάνονται τα:



Εικόνα 1.11 Το παρασιτοειδές *Psyttalia concolor* ανακαλύφθηκε στην Κένυα, εκτράφηκε σε ένα εργαστήριο στη Γουατεμάλα, και εισήχθη στην Καλιφόρνια για το βιολογικό έλεγχο του δάκου της ελιάς. Φωτογραφία από την Peggy Greb, USDA.

- α) *Psyttalia lounsburyi*,
- β) *Psyttalia concolor*,
- γ) *Psyttalia ponerophaga*,
- δ) *Utetes africanus* και
- ε) *Bracon celer*.

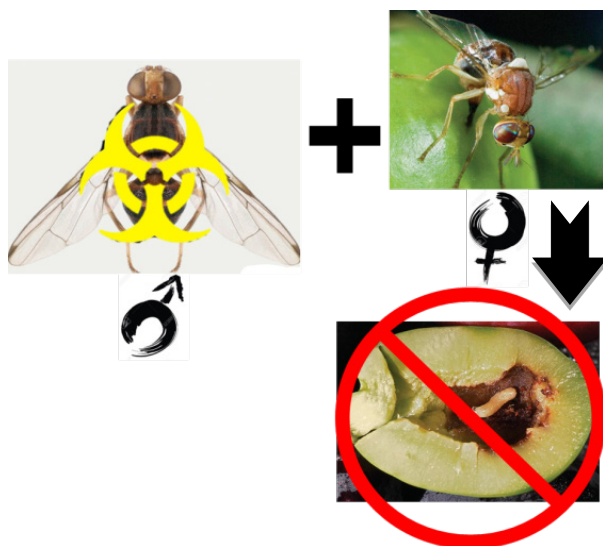
Η αφθονία τους και η αποτελεσματικότητά τους ποικίλλει ανάμεσα στις διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές (Daane et al., 2010). Το είδος *Psyttalia concolor* (Εικόνα 1.11) είχε παρουσιάσει μεικτά αποτελέσματα ως οργανισμός βιολογικού ελέγχου μετά από απελευθερώσεις που στόχευαν να ελέγξουν τον πληθυσμό της Μεσογειακής μύγας των φρούτων, *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (συνήθως γνωστή ως Medfly), στην Ευρώπη στη δεκαετία του '50 (Nardi et al., 2003).

Πολλές άλλες παρασιτοειδείς σφήκες βρίσκονται στις περιοχές όπου ο δάκος της ελιάς ενδημεί, αλλά, πολλές φορές, δεν είναι αρκετά άφθονες για να παρέχουν ικανοποιητικό έλεγχο του πληθυσμού του. Τα κοινά ευεργετικά έντομα όπως οι κοκκινελίδες (Coccinellidae, κοινώς πασχαλίτσες) και τα lacewings (Chrysopidae) είναι ατελέσφορα στον έλεγχο του δάκου της ελιάς, επειδή θήραμα αυτών των εντόμων είναι τα ανώριμα στάδια των παρασίτων, τα οποία, σε αυτήν την περίπτωση, είναι καλά κρυμμένα μέσα στον αναπτυσσόμενο καρπό (Nardi et al., 2003; Morgan et al., 2016).

2.2.3 Τεχνική του Στείρου Εντόμου (Sterile Insect Technique, SIT)

Οι ψεκασμοί με εντομοκτόνα και οι βασισμένες σε τροφή ή φερομόνες παγίδες είναι οι κύριες μέθοδοι ελέγχου του δάκου της ελιάς (Manousis and Moore, 1987; Haniotakis, 2005). Λαμβάνοντας υπόψη, όμως, την οικονομική σημασία του δάκου της ελιάς και την αυξημένη χρήση εντομοκτόνων για να τον ελεγχό του, η

Τεχνική του Στείρου Εντόμου (SIT) προτάθηκε ως η κατάλληλη μέθοδος ελέγχου για αυτό το παράσιτο (Ελληνικό Υπουργείο Γεωργίας 1961). Αυτή η τεχνική αποτελεί μια επιτυχή στρατηγική καταπολέμησης για πολλά καταστρεπτικά παράσιτα, όπως η μεσογειακή μύγα φρούτων, *C. capitata* (Morgan et al., 2016).



Εικόνα 1.12 Τεχνική Στείρου Εντόμου.

Η Τεχνική του Στείρου Εντόμου (Εικόνα 1.12) θεωρείται αποτελεσματική μέθοδος ελέγχου του πληθυσμού του δάκου της ελιάς και φιλική προς το περιβάλλον. Αυτή η μέθοδος ελέγχου περιλαμβάνει την εκτροφή και την απελευθέρωση μεγάλου αριθμού στείρων αρσενικών ατόμων. Όταν αυτά τα αρσενικά άτομα συζευχθούν με τα θηλυκά αγρίου τύπου, δεν μπορούν να παραχθούν βιώσιμα αυγά. Κατά συνέπεια, μειώνεται πολύ ο πληθυσμός των μυγών της γενιάς. Με τον καιρό, αυτό θα μπορούσε να

εξαλείψει ολόκληρο τον πληθυσμό των παρασίτων. Η απελευθέρωση στείρων εντόμων είναι ειδο-ειδική, φιλική προς το περιβάλλον και σχετικά γρήγορη. Τα μειονεκτήματα σε αυτήν την τεχνική έγκεινται στην αρχική οργάνωση του προγράμματος, δηλαδή η εξασφάλιση μιας τοποθεσίας για την εκτροφή των μυγών, στην επιλογή μιας αξιόπιστης μεθόδου στείρωσης και στη συγχρονισμένη απελευθέρωση των μυγών (Ant et al., 2012). Επίσης, τα θηλυκά που γεννούν τα στείρα αυγά θα βλάψουν και πάλι τα φρούτα με τους ωσθέτες τους.

Ο κύριος λόγος αποτυχίας ήταν η μειωμένη ανταγωνιστικότητα των εργαστηριακών αρσενικών σε σχέση με τα αρσενικά του φυσικού πληθυσμού. (Economidou, 1972). Πιο συγκεκριμένα, τα εργαστηριακά έντομα ήταν ώριμα για ζευγάρωμα σε ηλικία δύο έως τριών ημερών ενώ τα έντομα του φυσικού πληθυσμού ήταν ώριμα σε ηλικία τεσσάρων ημερών (Economidou et al., 1971). Σημαντική, για του σκοπούς της SIT, παρατήρηση ήταν ότι τα εργαστηριακά έντομα επέλεξαν να ζευγαρώσουν τις τέσσερις ώρες πριν το τέλος της φωτόφασης σε αντίθεση με τα έντομα του φυσικού πληθυσμού που επέλεξαν τις δύο τελευταίες ώρες (Zervas & Economidou, 1982). Τέλος, παρατηρήθηκε ότι τα εργαστηριακά έντομα ζευγαρώσαν λιγότερες φορές σε σύγκριση με τα έντομα του φυσικού πληθυσμού (Economidou, 1972). Συνεπώς η προσπάθεια εφαρμογής της μεθόδου στο δάκο εγκαταλείφθηκε λόγω της απουσίας βασικών μοριακών και γενετικών εργαλείων που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την επίλυση των ανωτέρων προβλημάτων.

Οι Δρ. Edward F. Knipling και Δρ Raymond C. Bushland μνημονεύονται για την έρευνα που οδήγησε στην «Τεχνική του Στείρου Εντόμου». Η τεχνική έχει ανακηρυχτεί ως «η μόνη πραγματική καινοτομία στον έλεγχο εντόμων τον 20^ο

αιώνα» και συνεχίζει να ενισχύει τις τρέχουσες «μάχες» ενάντια σε άλλα γεωργικά παράσιτα και έντομα που φέρουν μολυσματικά παθογόνα (Entomology today, 2016). Οι τρεις βασικότεροι τρόποι δημιουργίας των στειρών εντόμων, που αναφέρονται στη βιβλιογραφία, είναι μέσω ακτινοβολίας (Εικόνα 1.13), μέσω χημειοστειρωτικών και μέσω γενετικής τροποποίησης, η οποία είναι και η νεότερη υπό ανάπτυξη μέθοδος.

2.2.3.1 Μέσω ακτινοβολίας

Στην συγκεκριμένη πρακτική της SIT, η στειρότητα προκαλείται με την ακτινοβολία που εκπέμπεται από ραδιοϊσότοπα όπως το καίσιο-137 (^{137}Cs) και το κοβάλτιο-60 (^{60}Co) (Εικόνα 1.14). Η δόση της ακτινοβολίας που εφαρμόζεται δεν πρέπει να έχει κανένα σημαντικό δυσμενές αποτέλεσμα στη μακροζωία των αρσενικών, στη συμπεριφορά και στη δυνατότητα για ζευγάρωμα (de Magalhaes, 1970).

Sterile insect technique

ZAP MALE FLIES WITH RADIATION TO MAKE THEM STERILE



RELEASE MILLIONS OF STERILE MALES



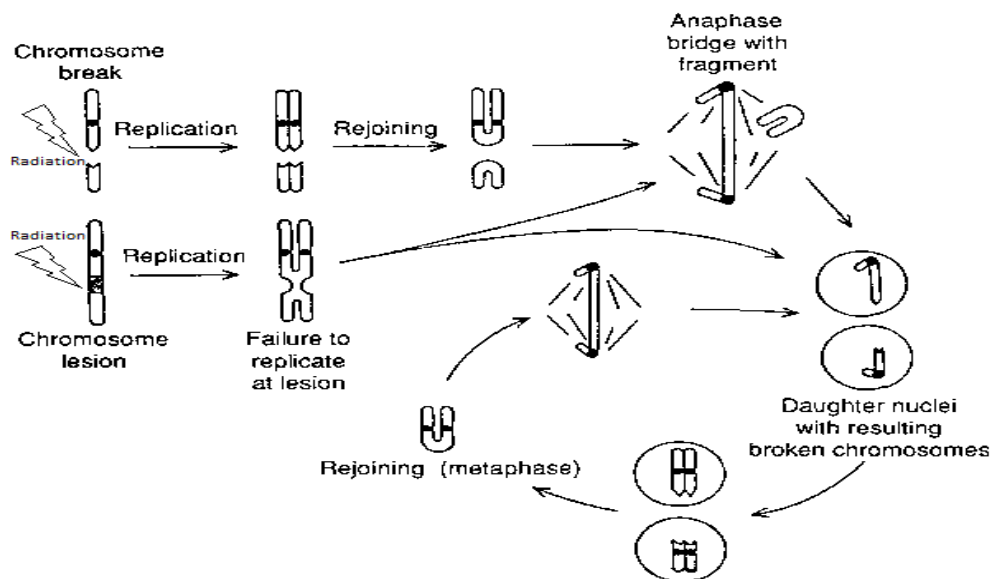
MALES MATE WITH WILD FEMALES



BUT EGGS DON'T HATCH



Εικόνα 1.13 Συνοπτικά SIT με στειρωση μέσω ραδιενέργειας.



Εικόνα 1.14 Κυτταρογενετικές συνέπειες χρωμοσωμικών βλαβών προκαλούμενων από τη ραδιενέργεια.

Τα πρώτα πειράματα που είχαν ως στόχο την στειρότητα του δάκου της ελιάς ως νύμφη, πραγματοποιήθηκαν το 1960, στην Ιταλία, από τους Mellis και Baccetti (Baccetti, 1961). Αυτή η εργασία ήταν πολύ σημαντική καθώς καθορίστηκαν οι τιμές για το εύρος της γ ακτινοβολίας που θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί (8000 – 1200rad), την κατάλληλη περίοδο εφαρμογής της (3 – 7 μέρες πριν την εμφάνιση του ενηλίκου) και την ελάχιστη αναλογία στειρών : αγρίου – τύπου αρσενικών (4:1). Το αποτέλεσμα ήταν ότι μόνο 1% των αυγών, που εναποτέθηκαν σε ελιές,

εκκολαφτήκαν. Αργότερα έγιναν νέες μελέτες για τη χρήση ^{60}Co και τη βελτιστοποίηση των συνθηκών εφαρμογής.

2.2.3.2 Μέσω χημειοστερωτικών

Η χρήση χημικών έχει μελετηθεί και για την επίτευξη στειρώσεως στο δάκο της ελιάς. Το ενδιαφέρον για τη χρήση χημειοστερωτικών προέκυψε τη δεκαετία του 1960. Το 1962 έγινε η πρώτη προσπάθεια για εφαρμογή τους στο δάκο της ελιάς. Στην έρευνά τους οι Ορφανίδης και Πατσάκος (Orphanidis and Patsakos, 1963) χρησιμοποίησαν το χημικό μεθαποξίδη (methaphoxide, metepa) και κατέληξαν τόσο στις συγκεντρώσεις που προκαλούν στειρότητα στα αρσενικά όσο και στη συγκέντρωση που προκαλεί θάνατο και στα δύο φύλλα. Ένα άλλο χημικό, που μελετήθηκε, είναι η αφοξίδη (aphoxide, tera) η οποία σε διαφορετικές συγκεντρώσεις προκαλεί στειρότητα ή θάνατο σε διαφορετικά ποσοστά και αναπτυξιακά στάδια του δάκου της ελιάς. Το tera θεωρείται ως το χημικό με τις καλύτερες ιδιότητες καθώς η δόσεις που προκαλούν στειρότητα είναι χαμηλότερες και διαθέτουν έναν πολύ καλό παράγοντα ασφαλείας (safety factor $\times 50$) (de Magalhaes, 1970).

Άλλα χημειοστερωτικά όπως η αζιριδίνη (aziridine apholate) αρχικά παρουσίασαν ελπιδοφόρα αποτελέσματα με μια σημαντική μείωση της γονιμότητας των θηλυκών και της παρατηρούμενης γονιμότητας στον άγριο πληθυσμό (Orphanidis et al., 1966). Εντούτοις, η περαιτέρω έρευνα ματαιώθηκε λόγω των καρκινογόνων ιδιοτήτων αυτών των χημικών (Orphanidis and Patsakos, 1963; Fytizas, 1967; Haniotakis and Galachtiou, 1973; reviewed at Estes et al., 2011). Μέχρι σήμερα, κανένα χημειοστερωτικό δεν έχει ανακαλυφθεί που να μπορεί να χρησιμοποιηθεί χωρίς, τουλάχιστον, να παρουσιάσει κάποιο κίνδυνο στους εργαζομένους στα εργοστάσια μαζικής-εκτροφής, ούτε υπάρχουν, ακόμα, χημικές ουσίες διαθέσιμες που μπορούν να εφαρμοστούν στο γηγενή πληθυσμό παρασίτων χωρίς να εγκυμονεί κίνδυνο για τα είδη μη-στόχους (de Magalhaes, 1970).

2.2.3.3 Μέσω γενετικής τροποποίησης

Η κλασική γενετική μας παρέχει τη δυνατότητα να αποφύγουμε την ανάγκη για την εφαρμογή ακτινοβολίας ή χημικών ώστε να δημιουργήσουμε στείρα έντομα. Θα μπορούσαμε να πούμε ότι οι πρώτες προσπάθειες για εφαρμογή στειρότητας στα έντομα μέσω γενετικών τροποποιήσεων έγιναν περί το 1940 από τον Serebrovskii. Ο Serebrovskii, γνωρίζοντας ότι οι χρωμοσωμικές μετατοπίσεις σε ετεροζυγωτία μπορούν να οδηγήσουν σε στειρότητα, εργάστηκε πάνω στα έντομα *Musca domestica* L και *Calandra granaria* L πραγματοποιώντας διασταυρώσεις. Η εργασία του αυτή, όμως, δεν μπόρεσε να ολοκληρωθεί λόγω των καταστροφικών συνθηκών στην Σοβιετική Ένωση (U.S.S.R.) του Δευτέρου Παγκοσμίου πολέμου (WWII) (Klassen and Curtis, 2005).

Το ζητούμενο στην SIT είναι οι απόγονοι που προκύπτουν, από το ζευγάρι μεταξύ των απελευθερούμενων εντόμων και του άγριου πληθυσμού, είτε να είναι στείροι είτε να πεθαίνουν. Έτσι με τη βοήθεια της τεχνολογίας του ανασυνδυασμένου

DNA βρέθηκαν καλύτερες λύσεις όπως είναι η εισαγωγή στα έντομα γονιδιακών κατασκευών – συστημάτων οι οποίες προκαλούν το θάνατο στις κατάλληλες συνθήκες. Παραδείγματα αποτελούν τα έντομα τα οποία πεθαίνουν σε μια συγκεκριμένη θερμοκρασία (Schliekelman and Gould, 2000) και το σύστημα απελευθέρωσης εντόμων φορέων του επικρατούς θανατηφόρου γονιδίου, γνωστό ως RIDL[®] (Release of Insects carrying a Dominant Lethal) (Alphey, 2007; Alphey et al., 2007; Fu et al., 2007; Gong et al., 2005; Thomas et al., 2000). Στο σύστημα της RIDL, όσο τα έντομα είναι στη μονάδα μαζικής εκτροφής, γίνεται καταστολή του θανατηφόρου γονιδίου με την προσθήκη του «αντίδοτου» στην τροφή. Μετά την απελευθέρωση, χωρίς τη χρήση ακτινοβολίας, τα έντομα θα ζευγαρώσουν με τον ενδογενή άγριο πληθυσμό. Ένα αντίγραφο του RIDL θα περάσει στους απογόνους οι οποίοι χωρίς το «αντίδοτο» πεθαίνουν. Σήμερα έχουν δημιουργηθεί τέτοια έντομα με πιο χαρακτηριστικό αυτό της Medfly (Gong et al., 2005).

Με τις γνώσεις πλέον της γενετικής καθίσταται σήμερα δυνατή η επίλυση και αρκετών προβλημάτων που προκύπτουν με τις τεχνικές της κλασσικής SIT. Στην κλασσική SIT απελευθερώνονται τόσο αρσενικά όσο και θηλυκά στείρα άτομα. Όμως, η απελευθέρωση και θηλυκών, παρατηρήθηκε, ότι αυξάνει τον πληθυσμό των θηλυκών στο περιβάλλον. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, από τη μια να αυξάνουν οι ζημιές στον καρπό από την ωοθεσία και από την άλλη τα στείρα αρσενικά να ζευγαρώνουν και με στείρα θηλυκά, ελαττώνοντας την αποτελεσματικότητα της μεθόδου. Προέκυψε, λοιπόν, η ανάγκη για το διαχωρισμό των δύο φύλων. Τη λύση, στο πρόβλημα του διαχωρισμού των θηλυκών πριν την απελευθέρωση στο περιβάλλον, έδωσε η γενετική και η τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA. Αναπτύχθηκαν σειρές διαφόρων εντόμων της Medfly οι οποίες είτε είχαν διαφορετικό χρώμα αρσενικού και θηλυκού βομβυκίου (Franz, 2005) (Εικόνα 1.15), είτε τα θηλυκά ήταν ευαίσθητα στη θερμοκρασία ενώ τα αρσενικά όχι (Robinson, 2002; Robinson et al., 1999), είτε τα θηλυκά πέθαιναν με την ανάπτυξη της ειδικής για θηλυκά RIDL, διότι η απουσία του αντίδοτου σκότωνε τα θηλυκά αλλά όχι τα αρσενικά (Alphey, 2007; Alphey et al., 2007).



Εικόνα 1.15 Διαχωρισμός αρσενικών και θηλυκών στο στάδιο της νύμφης. Τα αρσενικά παρουσιάζουν τον φυσιολογικό καφέ χρωματισμό ενώ στα θηλυκά εμφανίζονται τον μεταλλαγμένο λευκό χρωματισμό.

Βέβαια, η προοπτική χρήσης των μεθόδων του ανασυνδυασμένου DNA σε προγράμματα SIT θα φέρει στο προσκήνιο ρυθμιστικά θέματα που σχετίζονται με τη χρήση γενετικά τροποποιημένων οργανισμών (Genetically Modified Organisms, GMOs).

3. Η τεχνολογία της παρεμβολής RNA (RNA interference, RNAi)

Η τεχνική RNAi οδηγεί στην καταστολή της έκφρασης γονιδίων από μικρά μη κωδικοποιητικά μόρια RNA (non coding RNA). Αυτό συμβαίνει, κυρίως, με τον κατακερματισμό του mRNA – στόχου κατά αλληλουχιοειδικό (sequence – specific) τρόπο. Το φαινόμενο της παρεμβολής RNA μιμείται ουσιαστικά τη ρύθμιση της μετάφρασης των mRNA από τα μικροRNA. Το φαινόμενο αυτό ανακαλύφθηκε όταν παρατηρήθηκε ότι παρασκευές σημαινόντων μορίων RNA καταστέλλουν τη γονιδιακή έκφραση. Η πρώτη εφαρμογή έγινε στον νηματώδη *Caenorhabditis elegans*, το 1998, από τους Andrew Fire και Craig C. Mello οι οποίοι

The Nobel Prize Medal for Physiology or Medicine



Andrew Z. Fire

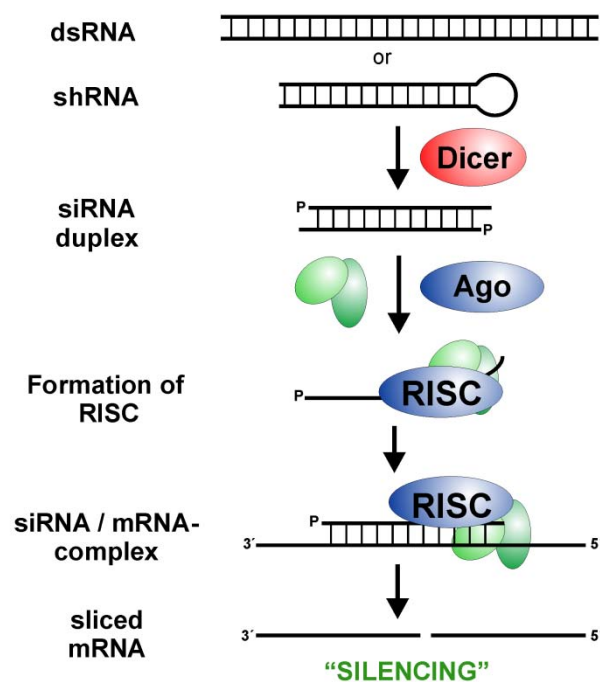
Craig C. Mello

Εικόνα 1.16 Andrew Fire και Craig Mello βραβείο Νόμπελ για την τεχνολογία του RNAi, 2006.

και τιμήθηκαν με το βραβείο Νόμπελ Ιατρικής (Nobel Prize in Physiology or Medicine) το 2006 (Fire et al., 1998) (Εικόνα 1.16). Η τεχνολογία του RNAi, πλέον, έχει εφαρμογή σε πολλούς τομείς όπως είναι η καταστολή γονιδίων, η λειτουργική γενετική, η ιολογία, ο καρκίνος, τα εντομοκτόνα και η βιοτεχνολογία. Η αποτελεσματικότητα ενός πειράματος RNAi μπορεί να επηρεαστεί έντονα από τον τρόπο χορήγησης του dsRNA. Οι τρεις πιο κοινές μέθοδοι χορήγησης, είναι η μικροένεση (microinjection), η σίτιση (ingestion/feeding) και ο διαποτισμός (soaking).

3.1 Μηχανισμός RNAi

Μόλις το δίκλωνο RNA (double stranded RNA, dsRNA) εισέλθει στο κύτταρο αναγνωρίζεται και ενεργοποιεί τη ριβονουκλεάση Dicer, η οποία αναγνωρίζει τα dsRNAs. Η RNase III Dicer κατακερματίζει το dsRNA σε μικρά θραύσματα μήκους 20 – 25 bp με μια προεξοχή δύο βάσεων σε κάθε 3' άκρο. Τα dsRNA θραύσματα αυτά ονομάζονται siRNAs (small interfering RNAs). Τα siRNAs γίνονται μονόκλωνα και ενσωματώνονται στο RNA-επαγόμενο σύμπλοκο σίγησης (RNA-induced silencing



Εικόνα 1.17 Σχηματική αναπαράσταση του μηχανισμού δράσης της RNAi.

complex, RISC). Μετά την ενσωμάτωση του siRNA στο RISC, το σύμπλοκο αναγνωρίζει τα mRNA που είναι συμπληρωματικά με το siRNA και τα κατακερματίζουν. Έτσι δεν δίνουν τη δυνατότητα σε αυτά τα mRNA να χρησιμοποιηθούν ως εκμαγεία για την κωδικοποίηση πρωτεϊνών (Siomi et al., 2009; Agrawal et al., 2003) (Εικόνα 1.17).

3.2 Εφαρμογή μέσω μικροένεσης

Η μικροένεση χρησιμοποιήθηκε πρώτα από τους Fire και Mello (Fire et al., 1998) ως ο τρόπος με τον οποίο πραγματοποίησαν την εισαγωγή του dsRNA στον *C. elegans*. Παρ' όλα αυτά η μικροένεση είναι ακόμα ένα ευρέως χρησιμοποιημένο και πολύ αποδοτικό ερευνητικό εργαλείο για τη χορήγηση dsRNA στους οργανισμούς *in vivo* (Εικόνα 1.18). Στα έντομα, η μικροένεση γίνεται τόσο σε προνύμφες όσο και σε ενήλικα άτομα. Στις προνύμφες η ένεση γίνεται ραχιαία είτε ανάμεσα είτε μέσα στους δακτυλίους τους ενώ στα ενήλικα το καλύτερο και ευκολότερο σημείο είναι ο ιστός κάτω από τα φτερά. Η διακύμανση των ποσοστών επιτυχίας των πειραμάτων με μικροένεση από είδος σε είδος είναι μεγάλη. Συνήθως η αιτία είναι άγνωστη και θα μπορούσε να είναι ένας συνδυασμός πολλών παραγόντων όπως το στάδιο ζωής του εντόμου, η συγκέντρωση και η ποσότητα του dsRNA που χρησιμοποιείται, ο ιστός όπου το γονίδιο – στόχος εκφράζεται αλλά και το ίδιο το γονίδιο (Na Yu et al., 2013).

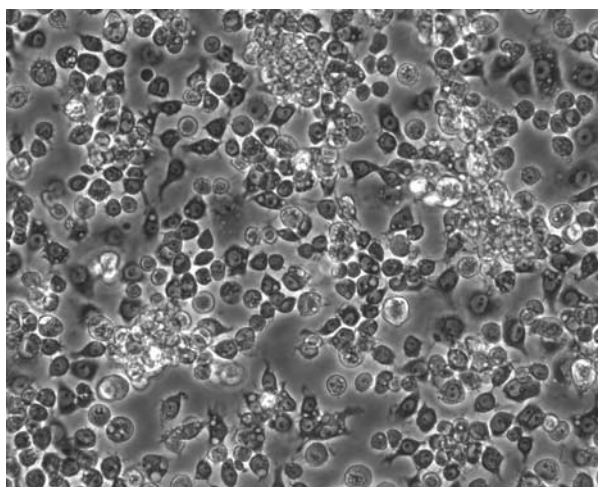


Εικόνα 1.18 Μικροένεση σε έμβρυα *Drosophila melanogaster*.

3.3 Εφαρμογή μέσω διαποτισμού

Τα τελευταία χρόνια, ο διαποτισμός του οργανισμού σε ένα διάλυμα που περιέχει το dsRNA, φαίνεται να είναι μια δημοφιλής μέθοδος για την εφαρμογή της RNAi κυρίως λόγω της ευκολίας εφαρμογής της. Ο διαποτισμός εφαρμόστηκε για πρώτη φορά από τους Tabara et al. (1998), οι οποίοι διαπίστωσαν ότι επιτεύχθηκε RNAi με απλό διαποτισμό του *C. elegans* στο διάλυμα του dsRNA. Κατά συνέπεια, αυτή η τεχνική εφαρμόστηκε για τη μεγάλη κλίμακα ανάλυση της λειτουργίας γονιδίων σε αυτό το είδος (Maeda et al., 2001).

Στα έντομα, τα περισσότερα από τα πειράματα διαποτισμού έγιναν σε κυτταρικές σειρές διαφόρων εντόμων. Η πρώτη κυτταρική σειρά που χρησιμοποιήθηκε για τα πειράματα



Εικόνα 1.19 S2 κυτταρική σειρά από τη *Drosophila melanogaster*. Φωτογραφία από *Drosophila Genetics Resource Center*.

διαποτισμού ήταν τα S2 κύτταρα που προήλθαν από έμβρυα της *D. melanogaster* (Clemens et al., 2000) (Εικόνα 1.19).

3.3 Εφαρμογή μέσω τροφής

Οι Timmon και Fire, το 1998, ανέφεραν ότι ο *C. elegans*, τρεφόμενος με βακτήρια *Escherichia coli* που εκφράζουν dsRNA, παρουσίασε ίδιο φαινότυπο με άτομα που έφεραν τις αντίστοιχες μεταλλάξεις απώλειας-λειτουργίας (loss-of-function mutants) (Timmon & Fire, 1998; Timmon et al., 2001). Αυτή η ανακάλυψη δημιούργησε μια πρόσθετη μέθοδο χορήγησης dsRNA στους οργανισμούς για την εφαρμογή της RNAi. Μετά από την αρχική ανακάλυψη στο νηματώδη, η τεχνική εφαρμόστηκε σε διάφορα έντομα όπως το *Spodoptera exigua*, το *Diabrotica virgifera virgifera*, και το *Epirhyas postvittana* (Turner et al., 2006; Baum et al., 2007; Tian et al., 2009; Surakasi et al., 2011).

Οι κύριες στρατηγικές που χρησιμοποιούνται στα πειράματα σίτισης με dsRNA είναι δύο: α) το dsRNA εκφράζεται από τα βακτήρια, β) συντίθεται τεχνητά, *in vitro*, και έπειτα χορηγείται στα έντομα, είτε αναμιγνύοντάς το με την τροφή είτε με τη μορφή σταγονιδίων.

Η χορήγηση του dsRNA στα έντομα μέσω τροφής έχει αρκετά πλεονεκτήματα. Κατ' αρχάς είναι οικονομικώς αποδοτική και εύκολη στην εκτέλεση. Επίσης, αυτή η μέθοδος είναι εξαιρετική για μεγάλης κλίμακας ανάλυση της λειτουργίας γονιδίων, ειδικά γονιδίων σημαντικών για τον έλεγχο παρασίτων (Kamath et al., 2000). Ένα άλλο πλεονέκτημα, είναι η πρακτικότητα της μεθόδου για τα μικρά έντομα όπως οι αφίδες (aphids) και οι προνύμφες πρώτου και δευτέρου σταδίου (Tian et al., 2009; Walshe et al., 2009). Όμως, εμφανίζει και ορισμένα μειονεκτήματα. Ένα από αυτά είναι ότι αυτός ο τρόπος εφαρμογής της RNAi δεν είναι ο κατάλληλος για όλα τα είδη των οργανισμών (Araujo et al., 2006; Rajagopal et al., 2002). Επιπλέον η αποτελεσματικότητα της RNAi μέσω τροφής διαφέρει από οργανισμό σε οργανισμό πιθανόν λόγω του διαφορετικού στομαχικού περιβάλλοντος. Γι' αυτό, οι συγκεντρώσεις του dsRNA που χορηγούνται απαιτούν βελτιστοποίηση ανάλογα με την περίπτωση (Turner et al., 2006). Τέλος, ένα ακόμη μειονέκτημα είναι ότι δεν μπορεί να υπολογισθεί η ποσότητα του dsRNA που εισέρχεται στον οργανισμό του εντόμου (Surakasi et al., 2011).

4. Growth arrest specific 8 (Gas8): το γονίδιο – στόχος

Η Growth arrest-specific 8 (*Gas8*) (Εικόνα 1.20) είναι μια πρωτεΐνη η οποία δεσμεύει την μικροτουμπουλίνη (microtubule-binding) και αναφέρεται ως ρυθμιστής της δυνεΐνης (dynein) στα κύτταρα των θηλαστικών. Στο ποντίκι,

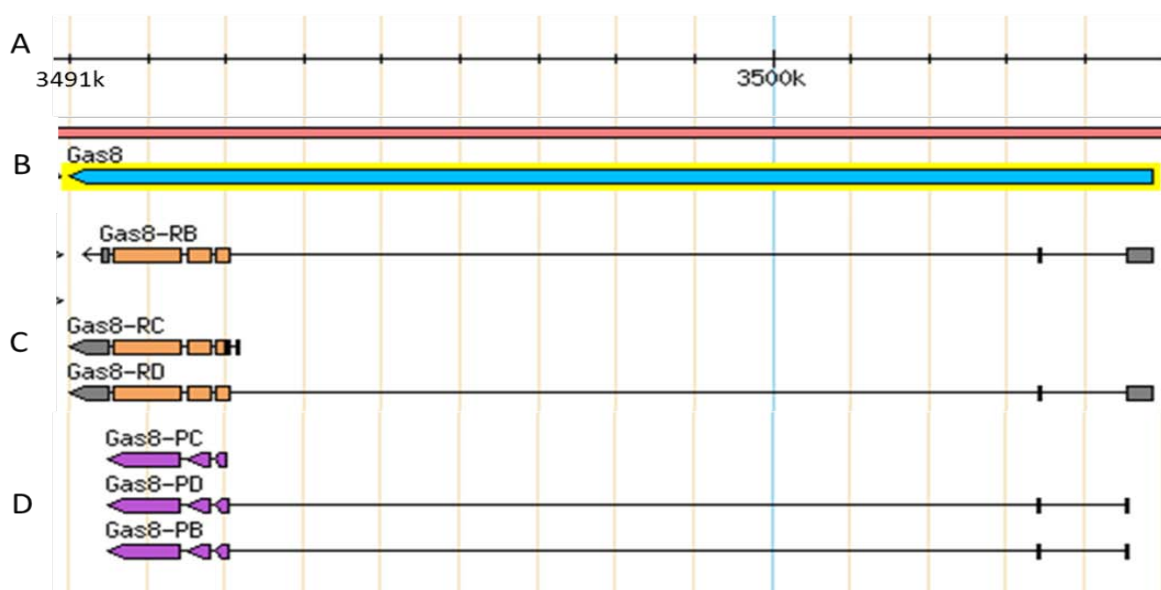


Εικόνα 1.20 Μοντέλο της πρωτεΐνης *Gas8* βασισμένο μόνο στην αλληλουχία του γονιδίου.

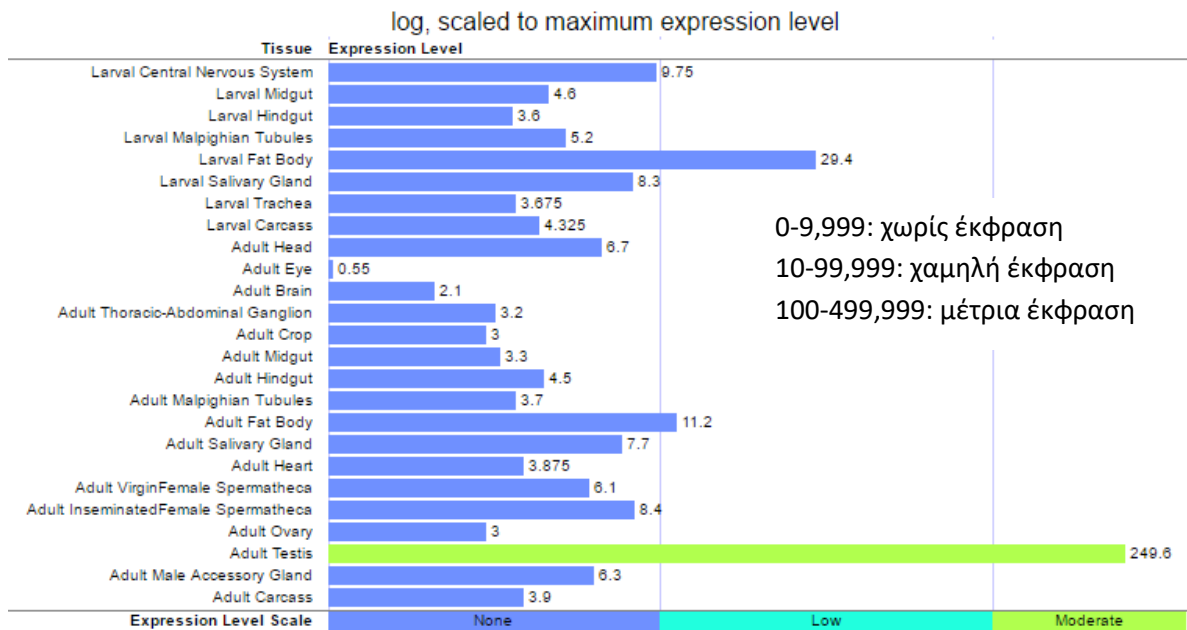
η πρωτεΐνη *Gas8* εντοπίζεται κυρίως στα κύτταρα των όρχεων. Η έκφρασή της παρατηρείται κατά τη διάρκεια της εφηβείας και συγκεκριμένα της σπερματογένεσης. Στους ανθρώπους, είναι απύσα στα στείρα αρσενικά άτομα που στερούνται τη δυνατότητα γαμετογένεσης. Ο εντοπισμός της *Gas8* στο μηχανισμό κίνησης (motility apparatus) των μετα-μειωτικών (post-meiotic) γαμετοκυττάρων και των ώριμων σπερματοζωαρίων, μαζί με την ανίχνευσή της στα τριχίδια της στοιβάδας του κροσσωτού επιθηλίου των πνευμονικών βρόγχων και των σαλπίνγων, υποδηλώνει ότι η *Gas8* μπορεί να έχει ρόλο στους μηχανισμούς κίνησης των κυττάρων (Yeh et al., 2002).

Το γονίδιο αυτό έχει εντοπιστεί και στη *Drosophila melanogaster*, παρ' όλα αυτά δεν υπάρχουν πειραματικά δεδομένα για τη λειτουργία αυτού του γονιδίου. Η λειτουργία του στην *D. melanogaster* προκύπτει από τη σύγκριση της αλληλουχίας του με αντίστοιχα ομόλογα γονίδια στα θηλαστικά τα οποία έχουν μελετηθεί επαρκώς. Η ομολογία του με τα γονίδια *Gas* των θηλαστικών υποδεικνύει τον πιθανό ρόλο του στην κινητικότητα των σπερματοζωαρίων (www.uniprot.org). Σύμφωνα με την Uniprot, η *Gas8* στην *D. melanogaster*, είναι μια κυτταροσκελετική πρωτεΐνη σύνδεσης που λειτουργεί πιθανότατα ως ρυθμιστής της δυνεΐνης.

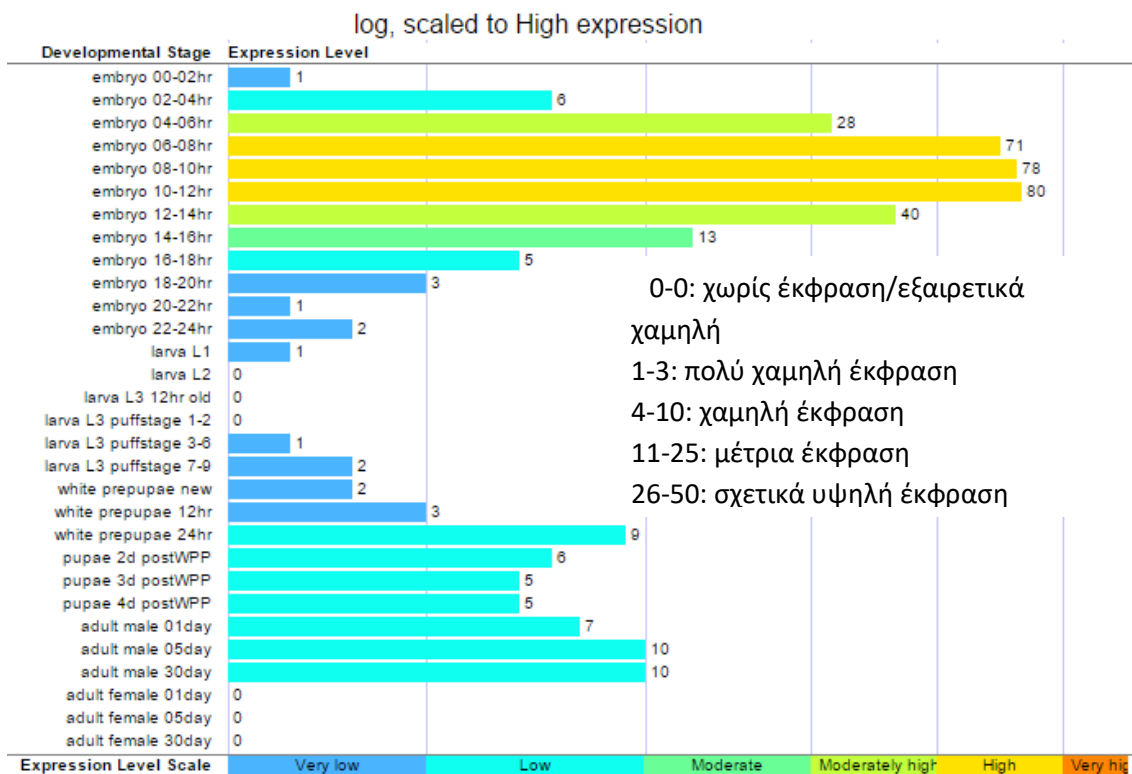
Πρόσφατα το γονίδιο *Gas8* εντοπίστηκε και στο δάκο της ελιάς (Sagri et al., 2014). Από το γονίδιο αυτό, στη *D. melanogaster* προκύπτουν τρία διαφορετικά εναλλακτικά μεταγγραφα που οδηγούν στην κωδικοποίηση δύο μοναδικών πολυπεπτιδίων (Εικόνα 1.21). Εκφράζεται στους όρχεις των ενήλικων ατόμων της *D. melanogaster* (Εικόνα 1.22), ενώ παράλληλα εμφανίζει πολύ μεγάλη έκφραση και στα πρώτα στάδια της εμβρυογένεσης (Εικόνα 1.23).



Εικόνα 1.21 Α) Θέση στο χρωμόσωμα X της *Dmel*. Β) Φορά του γονιδίου στο χρωμόσωμα. Γ) Τα τρία εναλλακτικά μεταγγραφα. Δ) Τα δύο μοναδικά πολυπεπτιδία που κωδικοποιούνται. Εικόνα από Flybase. FlyBaseID: FBgn0029667



Εικόνα 1.22 Διάγραμμα έκφρασης του *Gas8* στους διάφορους ιστούς της *Dmel*. Εικόνα από Flybase. FlyBaseID: FBgn0029667



Εικόνα 1.23 Διάγραμμα έκφρασης του *Gas8* στα διάφορα αναπτυξιακά στάδια της *Dmel*. Εικόνα από Flybase. FlyBaseID: FBgn0029667

5. Σκοπός εργασίας

Η RNAi μέσω τροφής είναι μια τεχνική της Μοριακής Βιολογίας η οποία μας δίνει τη δυνατότητα να ρυθμίσουμε την έκφραση ορισμένων γονιδίων των οργανισμών. Σκοπός της παρούσης εργασίας είναι να μελετήσουμε τη δυνατότητα χρησιμοποίησης της RNAi μέσω τροφής για την αποσιώπηση του γονιδίου *Gas8*, το οποίο σχετίζεται με τη γονιμότητά, με στόχο την επιτυχή στείρωση των αρσενικών δάκων. Η παραπάνω μεθοδολογία εφαρμόζεται για πρώτη φορά στο δάκο της ελιάς. Με την εργασία αυτή ευελπιστούμε να βάλουμε τα θεμέλια για την εφαρμογή της RNAi μέσω τροφής στο δάκο, για την αποσιώπηση επιλεγμένων γονιδίων, με απώτερο σκοπό τον πληθυσμιακό έλεγχο και την καταπολέμησή του εντόμου.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

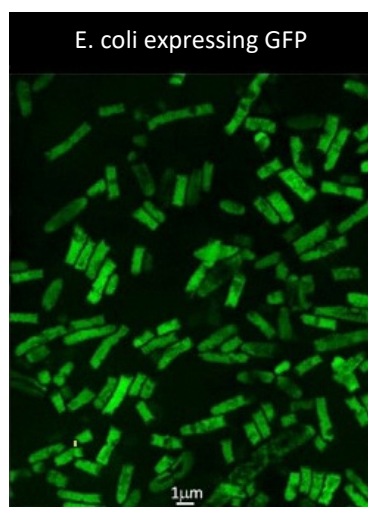
2.1 ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΗ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ

2.1.1 Βακτηριακά στελέχη *Escherichia coli*

Τα βακτηριακά στελέχη XL1 Blue και HT115A(DE3) που χρησιμοποιήθηκαν είναι του εργαστήριου του κ. Ταβερναράκη από το Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας του Ιδρύματος Τεχνολογίας και Έρευνας στην Κρήτη.

2.1.1.1 XL1 Blue

Το XL1 Blue (Εικόνα 2.1) είναι ένα στέλεχος το οποίο χρησιμοποιείται πολύ συχνά για κλωνοποιήσεις. Είναι σχεδιασμένο με σκοπό να παρέχει έναν ξενιστή ιδανικό για την βέλτιστη διάδοση τόσο πλασμιδιακών φορέων όσο και φορέων λ φάγων. Επιτρέπουν τη διαλογή αποικιών μέσω του συστήματος X-gal/lacZ και την παρασκευή υψηλής ποιότητας πλασμιδιακού DNA. Τέλος διαθέτει ένα επίσωμα φάγου F' το οποίο παρέχει την ανθεκτικότητα στην Τετρακυκλίνη (Tc) (www.agilent.com) (Πίνακας 2.1).



Εικόνα 2.1 *E. coli* (XL1-Blue) εκφράζοντα SGFP2. Φωτογραφίες των: Drs. Takahisa Suzuki και Ikuo Wada, Ιατρική σχολή Πανεπιστημίου της Φουκουσίμα.

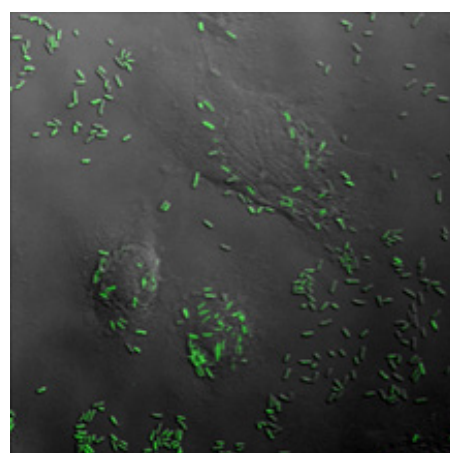
Στέλεχος *E. coli* XL1 Blue

Γενότυπος	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac</i>
Επίσωμα φάγου	F', <i>proAB, lacIqZΔM15, Tn10, Tc^r</i>
Φαινότυπος	Tc ανθεκτικότητα

Πίνακας 2.1 Χαρακτηριστικά στελέχους *E. coli* XL1 Blue.

2.1.1.2 HT115A DE3

Το στέλεχος HT115A DE3 (Εικόνα 2.2) είναι ειδικά σχεδιασμένο από τους *L. Timmons et al.* του Πανεπιστημίου του Στανφορντ (Stanford University) για εφαρμογές παραγωγής δίκλωνου RNA (dsRNA). Το εν λόγω στέλεχος αναπτύσσεται καλύτερα σε θρεπτικό 2×YT, είναι ανθεκτικό στην Tc και ο προτεινόμενος τρόπος μετασχηματισμού είναι μέσω τεχνικών CaCl₂. Διαθέτει το γονίδιο της T7 RNA πολυμεράσης, με δυνατότητα επαγωγής αυτής ύστερα από προσθήκη κατάλληλης συγκέντρωσης IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside). Επιπλέον συνθέτει μια ελαττωματική RNase III



Εικόνα 2.2 HT115A(DE3) εκφράζοντα GFP. Katherine García et al., Ινστιτούτο Διατροφής και Τεχνολογίας Τροφίμων, Πανεπιστήμιο Χιλής.

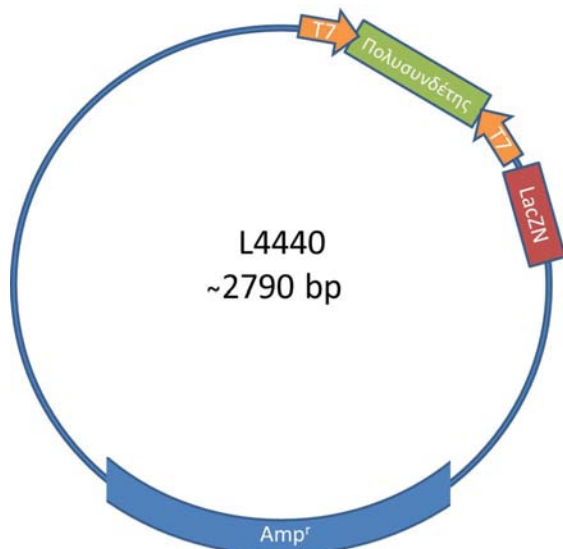
(Πίνακας 2.2). Τα δύο αυτά κύρια στοιχεία του δίνουν την δυνατότητα, όταν μετασχηματιστεί με έναν πλασμιδιακό φορέα που φέρει T7 εκκινήτες, όπως ο L4440, να παράγει υψηλές ποσότητες dsRNA το οποίο δεν θα μπορεί να κατακερματίσει (Polacek, 2005; www.cgc.cbs.umn.edu).

Στα HT115 βακτηριακά κύτταρα το γονίδιο της T7 RNA πολυμεράσης έχει ενσωματωθεί καθοδικά του οπερονίου της λακτόζης και βρίσκεται υπό τον μεταγραφικό έλεγχο του lac χειριστή. Το IPTG είναι ένα μόριο που μιμείται την αλλολακτόζη (allolactose), ενός μεταβολίτη της λακτόζης που επάγει τη έκφραση του οπερονίου της λακτόζης (lac operon). Δηλαδή χρησιμοποιείται για την επαγωγή της έκφρασης ενός γονιδίου το οποίο βρίσκεται υπό τον έλεγχο του lac χειριστή. Αντίθετα με την αλλολακτόζη, το IPTG δεν μπορεί να υδρολυθεί από την β-γαλακτοσιδάση (β-galactosidase). Αυτό σημαίνει ότι η συγκέντρωσή του παραμένει σταθερή κατά τη διάρκεια ενός πειράματος. Το IPTG λειτουργεί όπως η λακτόζη με αποτέλεσμα την άρση της καταστολής του γονιδίου της T7 RNA πολυμεράσης.

Στέλεχος <i>E. coli</i> HT115A(DE3)	
Γενότυπος	F-, <i>mcrA</i> , <i>mcrB</i> , IN(<i>rrnD-rrnE</i>)1, <i>rnc14::Tn10</i> (DE3 lysogen: <i>lavUV5</i> promoter - T7 polymerase)
Φαινότυπος	Tc ^r , IPTG – επαγόμενη T7 πολυμεράση, RNase III(-)

Πίνακας 2.2 Χαρακτηριστικά στελέχους *E. coli* HT115A(DE3).

2.1.2 Πλασμιδιακός φορέας



Εικόνα 2.3 Ο φορέας L4440. Διακρίνονται οι T7 εκκινήτες και το γονίδιο ανθεκτικότητας στην Amp.

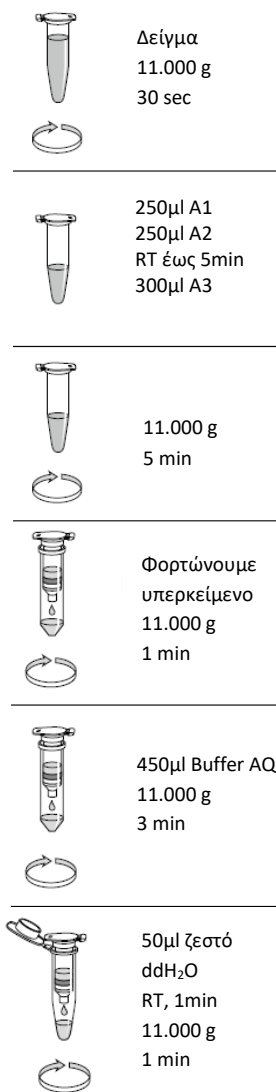
Ο φορέας που χρησιμοποιήσαμε είναι ο L4440 με μέγεθος περίπου 2790 ζευγών βάσεων (base pair, bp) (Εικόνα 2.3). Είναι ένας φορέας ειδικά κατασκευασμένος για την παραγωγή dsRNA από βακτήρια. Το κύριο χαρακτηριστικό του είναι η ύπαρξη, εκατέρωθεν του πολυσυνδέτη, T7 υποκινητών οι οποίοι αναγνωρίζονται από την T7 RNA πολυμεράση. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα η εν λόγω RNA πολυμεράση να μεταγράφει το ένθεμα και από τις δύο πλευρές οδηγώντας έτσι στην παραγωγή του επιθυμητού dsRNA. Επιπλέον διαθέτει γονίδιο το οποίο προσδίδει ανθεκτικότητα στην Αμπικιλίνη (Amp^r) Ο φορέας αυτός

δημιουργήθηκε από τους Fire et al. της Addgene και είναι μέρος ενός μεγαλύτερου kit με φορείς [Fire Lab *C. Elegans* Vector Kit 1999 (unpublished)].

2.1.2.1 Απομόνωση

Πραγματοποιήσαμε απομόνωση του φορέα από τα XL1 Blue κύτταρα με το Nucleospin® Plasmid Quick Pure Kit (Macherey – Nagel®) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

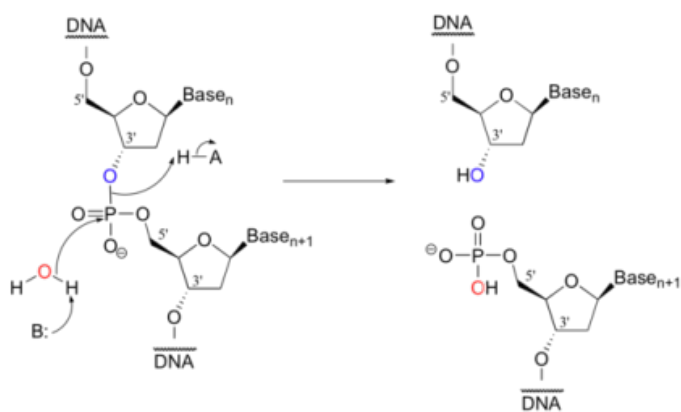
1. Καλλιεργούμε XL1 Blue κύτταρα σε LB θρεπτικό υλικό στους 37°C και σε 210rpm για περίπου 12 ώρες (O/N).
2. Συλλέγουμε κύτταρα από 1 – 3ml καλλιέργειας σε κωνικό μικροσωληνάριο (eppendorf) με φυγοκέντρηση σε 11.000g για 30sec και απομακρύνουμε το υπερκείμενο.
3. *Λύση κυττάρων.*
Εναιωρούμε το ίζημα των κυττάρων σε 250μl buffer A1 και 250μl buffer A2, αναμιγνύουμε ελαφρά αναποδογυρίζοντας το μικροσωληνάριο 6 – 8 φορές. Αφήνουμε σε θερμοκρασία δωματίου (room temperature, RT) για 5 λεπτά και προσθέτουμε 300μl buffer A3.
4. Αναμιγνύουμε καλά 6 – 8 φορές. Φυγοκεντρούμε σε 11.000g για 5min.
5. *Πρόσδεση DNA στη στήλη.*
Προσθέτουμε το υπερκείμενο από το βήμα 4 (μέγιστο 750μl) στη στήλη σε νέο μικροσωληνάριο και φυγοκεντρούμε σε 11.000g για 1min. Απορρίπτουμε το διήθημα και επαναλαμβάνουμε τη φυγοκέντρηση για το υπόλοιπο υπερκείμενο.
6. *Πλύση και στέγνωμα στήλης.*
Προσθέτουμε 450μl buffer AQ και φυγοκεντρούμε σε 11.000g για 3min. Το στέγνωμα της στήλης γίνεται κατά την φυγοκέντρηση.
7. *Έκλυση πλασμιδίου.*
Τοποθετούμε τη στήλη σε νέο μικροσωληνάριο και προσθέτουμε με προσοχή στο κέντρο 50μl ddH₂O, που έχουμε πρώτα θερμάνει στους 50°C. Διατηρούμε σε RT για 1min και φυγοκεντρούμε στα 11,000g για 1min. Επαναλαμβάνουμε το βήμα αυτό άλλη μία φορά και φτάνουμε σε τελικό όγκο έκλυσης 100μl (Εικόνα 2.4).



Εικόνα 2.4 Σχηματική απεικόνιση διαδικασίας απομόνωσης πλασμιδιακού DNA από βακτηριακά κύτταρα.

2.1.2.2 Πέψη

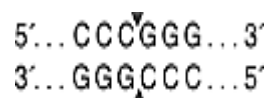
Σύμφωνα με τους Hartl και Jones (2001), η πέψη με ένζυμα περιορισμού περιγράφεται ως εξής: «Αυτή η ενζυματική τεχνική μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την διάσπαση μορίων DNA σε ειδικές θέσεις. Έτσι εξασφαλίζεται ότι όλα τα θραύσματα DNA που περιέχουν την ίδια αλληλουχία DNA έχουν και το ίδιο μέγεθος. Επιπλέον, κάθε θραύσμα που περιέχει την επιθυμητή αλληλουχία, την έχει ακριβώς στην ίδια θέση εντός του θραύσματος. Η μέθοδος της πέψης κάνει χρήση ενζύμων που ονομάζονται ενδονουκλεάσες περιορισμού ή ένζυμα περιορισμού, και είναι σε θέση να διασπών τα μόρια του DNA σε θέσεις ειδικές για το καθένα οι οποίες έχουν πολύ μικρό μέγεθος» (Hartl and Jones, 2001).



Εικόνα 2.5 Σχηματική απεικόνιση αντίδρασης πέψης. Η χημεία της αντίδρασης είναι εννοιολογικά απλή, πρόκειται για την υδρόλυση ενός φωσφοδιεστερικού δεσμού.

Η χημεία της αντίδρασης που καταλύουν οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες είναι εννοιολογικά απλή. Είναι απλώς η υδρόλυση ενός φωσφορικού διεστέρα (φωσφοδιεστερικός δεσμός) (Εικόνα 2.5).

Η πέψη μας (Πίνακας 2.3) πραγματοποιήθηκε με την περιοριστική ενδονουκλεάση SmaI (New England Biolabs, NEB) με σκοπό την προετοιμασία του φορέα για την ενσωμάτωση σε αυτόν του επιθυμητού ενθέματος. Το εν λόγω ένζυμο αφήνει τυφλά άκρα στο φορέα μας (Εικόνα 2.6).



Εικόνα 2.6 Θέση κοπής της περιοριστικής ενδονουκλεάσης SmaI.

Αντιδραστήρια	Ποσότητες	Συνθήκες
pL4440	Επιθυμητή ποσότητα	1 ώρα
Buffer 4 10×	1×	25 °C
SmaI	4 unit	Αδρανοποίηση ενζύμου: 20 min 60 °C
ddH ₂ O	Επιθυμητή ποσότητα	
Vτ	Επιθυμητός τελικός όγκος	

Πίνακας 2.3 Πρωτόκολλο αντίδρασης πέψης με την περιοριστική ενδονουκλεάση SmaI.

2.1.2.3 Ηλεκτροφόρηση και εκχύλιση DNA από πήκτωμα αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση έγινε σε πήκτωμα αγαρόζης 1% με Buffer TBE 0,5× (Πίνακας 2.4), σε 100V για ~30 min.

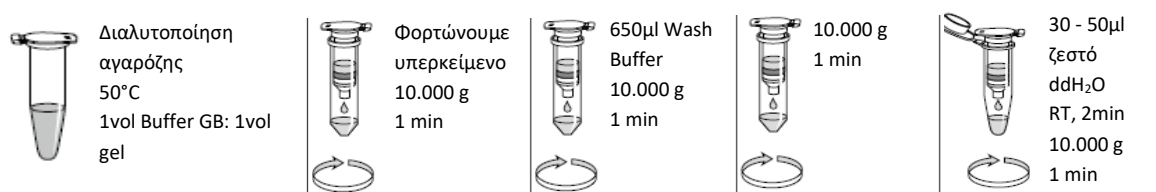
Στη συνέχεια έγινε ανάκτηση του κομμένου πλασμιδίου με το GF-1 Nucleic Acid Extraction Kit® (Vivantis).

Συστατικά	Ποσότητες
Tris base	54,0 gr
Boric acid	27,5 gr
EDTA pH 8,0	20,0 ml
H ₂ O	1000,0 ml

Πίνακας 2.4 Συνταγή 1 lt TBE 5×.

Όλα τα βήματα πραγματοποιούνται σε RT.

1. Έπειτα από την ηλεκτροφόρηση οπτικοποιούμε στο UV, κόβουμε την επιθυμητή ζώνη και την προσθέτουμε σε κωνικό μικροσωληνάριο.
2. Διαλυτοποίηση αγαρόζης.
Υπολογίζουμε το βάρος των κομματιών και προσθέτουμε 1 όγκο buffer GB για 1 όγκο αγαρόζης. Φυγοκεντρούμε ώστε η αγαρόζη να πέσει κάτω. Τοποθετούμε στους 65°C μέχρι η αγαρόζη να διαλυτοποιηθεί πλήρως.
3. Μεταφορά στη στήλη.
Τοποθετούμε τη στήλη σε ένα μικροσωληνάριο και σε αυτή προσθέτουμε το δείγμα. Φυγοκεντρούμε σε 10.000g για 1min, απορρίπτουμε το διήθημα και επαναλαμβάνουμε σε περίπτωση που έχει περισσέψει δείγμα.
4. Πλύση στήλης.
Προσθέτουμε 650μl Wash Buffer, φυγοκεντρούμε σε 10.000g για 1min και απορρίπτουμε το διήθημα.
5. Στέγνωμα στήλης.
Φυγοκεντρούμε σε 10.000g για 1min.
6. Έκλυση DNA.
7. Τοποθετούμε τη στήλη σε νέο μικροσωληνάριο. Προσθέτουμε 30 – 50μl ddH₂O. Διατηρούμε στον πάγο για 2min και έπειτα φυγοκεντρούμε σε 10.000g για 1min σε RT (Εικόνα 2.7).



Εικόνα 2.7 Σχηματική απεικόνιση διαδικασίας εκχύλισης DNA από πήκτωμα αγαρόζης.

2.1.3 Ένθεμα

Το ένθεμα, μεγέθους 500bp, είναι ένα τμήμα του γονιδίου *Growth arrest specific 8 (Gas8)* και ενισχύθηκε με PCR του χρωμοσωμικού DNA που απομονώθηκε από αρσενικά και θηλυκά άτομα δάκου. Οι εκκινητές Gas8 (Πίνακας 2.22) σχεδιάστηκαν με το πρόγραμμα Primer – BLAST (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primerblast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome).

2.1.3.1 Απομόνωση Χρωμοσωμικού DNA

Η απομόνωση του DNA είναι μια διαδικασία καθαρισμού και παραλαβής του DNA από το δείγμα χρησιμοποιώντας έναν συνδυασμό φυσικών και χημικών μεθόδων (Εικόνα 2.8). Η πρώτη απομόνωση του DNA έγινε το 1869 από τον Friedrich Miescher. Στις μέρες μας, η απομόνωση DNA, είναι μια διαδικασία που χρησιμοποιείται κατά κόρον στη μοριακή βιολογία και στις ιατροδικαστικές αναλύσεις (Dahm, 2008). Η απομόνωση έγινε με το Wizard® Genomic Purification DNA kit (PROMEGA).

1. Επιλέγουμε τέσσερα αρσενικά και τέσσερα θηλυκά άτομα.
2. Αναισθητοποιούμε στον πάγο
3. Τέμνουμε και απομακρύνουμε την κοιλία, διατηρούμε το θώρακα και την κεφαλή.
4. Τοποθετούμε ένα έντομο ανά μικροσωληνάριο.
5. Προσθέτουμε 400μl Nuclei Lysis Solution (διατηρείται στον πάγο) σε κάθε μικροσωληνάριο.
6. Με τη βοήθεια ειδικού εμβόλου λιώνουμε το έντομο.
7. Επιάζουμε στο υδατόλουτρο στους 65°C για 15 – 30min.
8. Προσθέτουμε 135μl Protein Precipitation Solution, αναδεύουμε με vortex και τοποθετούμε στον πάγο για 5min.
9. Φυγοκεντρούμε στο μέγιστο των στροφών της φυγόκεντρου (max speed) για 5min.
10. Παραλαμβάνουμε το υπερκείμενο και το τοποθετούμε σε νέα μικροσωληνάρια.
11. Κατακρημνίζουμε το DNA με 400μl ισοπροπανόλη και το επαναδιαλύουμε σε 100μl ddH₂O.
12. Προσθέτουμε 3μl TE-RNase buffer στο καθένα, τα τοποθετούμε στους 37°C για 30 min και στη συνέχεια τα τοποθετούμε overnight στους 4°C.



Εικόνα 2.8 Σχηματική απεικόνιση διαδικασίας απομόνωσης DNA από ζωικό ιστό.

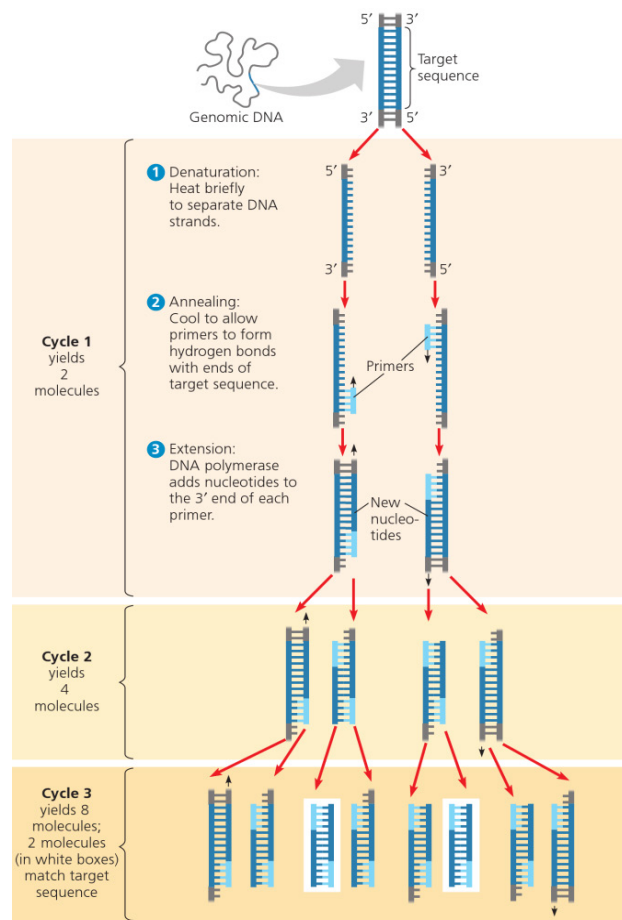
2.1.3.2 Ενίσχυση με Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) είναι μία τεχνική που χρησιμοποιείται στη μοριακή βιολογία για να ενισχυθεί ένα μόνο αντίγραφο ή μερικά αντίγραφα ενός τμήματος DNA, δημιουργώντας από χιλιάδες έως εκατομμύρια αντίγραφα της συγκεκριμένης αλληλουχίας. Είναι μια εύκολη και φθηνή μέθοδος για να ενισχυθεί ένα συγκεκριμένο τμήμα του DNA. Είναι χρήσιμη στην διάγνωση και την παρακολούθηση των γενετικών ασθενειών, στην εγκληματολογία, στη μελέτη της λειτουργίας των στοχευμένων τμημάτων και σε πολλές ακόμη εφαρμογές (Barlett et al., 2003).

Η μέθοδος βασίζεται στη θερμική κυκλοποίηση, κύκλοι επαναλαμβανόμενης θέρμανσης και ψύξης της αντίδρασης, για την τήξη και την αντιγραφή του DNA. Οι εκκινητές, (5' και 3' primers) οι οποίοι έχουν αλληλουχίες συμπληρωματικές προς την περιοχή-στόχο και βρίσκονται εκατέρωθεν αυτής, μαζί με μια DNA πολυμεράση είναι βασικά συστατικά για να καταστεί δυνατή η επιλεκτική και επαναλαμβανόμενη εκθετική ενίσχυση. Η PCR μπορεί σε μεγάλο βαθμό να τροποποιηθεί για να εκτελεί ένα ευρύ φάσμα των γενετικών χειρισμών (πχ. real time-PCR, ποσοτική PCR) (Barlett et al., 2003). Η αντίδραση (Πίνακας 2.5) πραγματοποιήθηκε με το ένζυμο High Fidelity (HiFi) polymerase της εταιρίας KAPA και το προϊόν που προέκυψε διέθετε τυφλά άκρα.

Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 2.9 κάθε κύκλος της PCR αποτελείται από μια σειρά συγκεκριμένων σταδίων:

1. Αποδιάταξη του DNA. Η θερμοκρασία συνήθως αυξάνεται στους 98°C ώστε να αποχωριστούν οι δύο κλώνοι του DNA.
2. Υβριδοποίηση εκκινητών. Οι εκκινητές εκτός από τη συμπληρωματικότητα για το στόχο έχουν και μια τιμή T_m (melting temperature). Η τιμή αυτή δίνει την τιμή για την θερμοκρασία υβριδοποίησης των εκκινητών.
3. Κλωνική επέκταση. Η θερμοκρασία αυξάνεται στην βέλτιστη θερμοκρασία λειτουργίας της DNA πολυμεράσης και αυτή με τη σειρά της αναγνωρίζει τους εκκινητές και ξεκινά να τους επεκτείνει.



Εικόνα 2.9 Σχηματική απεικόνιση των τριών πρώτων κύκλων της PCR.

Αυτά τα τρία βήματα αποτελούν έναν ολόκληρο κύκλο PCR. Αυτός ο κύκλος επαναλαμβάνεται περισσότερες από 30 φορές ανάλογα με τις απαιτήσεις του πειράματος.

Αντιδραστήρια	Ποσότητες	Πρόγραμμα PCR		
			T °C	Χρόνος
DNA	Επιθυμητή ποσότητα			
Buffer 10×	1×	<i>Αρχική αποδιάταξη</i>	95	3 min
dNTPs	2,5 mM (έκαστο)	<i>Αποδιάταξη</i>	98	20 sec
Primer Forward	10 pmol/μl	<i>Υβριδοποίηση εκκινητών</i>	53	20 sec
Primer Reverse	10 pmol/μl	<i>Κλωνική επέκταση</i>	72	30 sec
Taq polymerase	1 unit	<i>Τελική επέκταση</i>	72	5 min
ddH ₂ O	Έως τον τελικό όγκο			
Vτ	Επιθυμητός τελικός όγκος	<i>Κύκλοι PCR</i>	30	

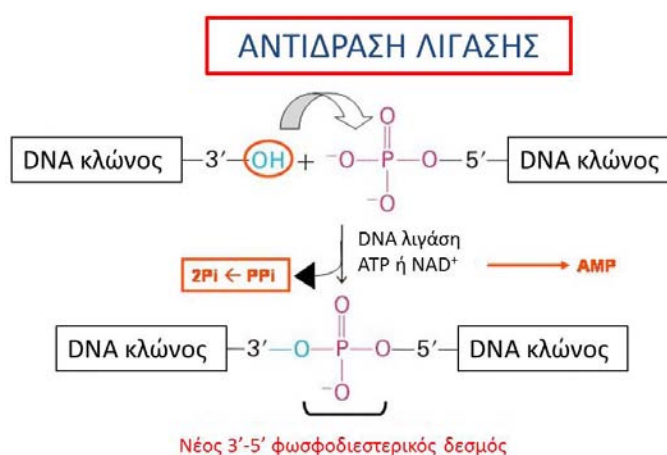
Πίνακας 2.5 Πρωτόκολλο αντίδρασης PCR με την HiFi KAPA polymerase.

2.1.4 Σχηματισμός ανασυνδυσμένου φορέα (αντίδραση λιγάσης)

Στην μοριακή βιολογία, αντίδραση λιγάσης (ligation) είναι η ένωση δύο θραυσμάτων νουκλεϊνικού οξέος μέσω της δράσης ενός ενζύμου. Είναι μια απαραίτητη εργαστηριακή διαδικασία στην μοριακή κλωνοποίηση του DNA σύμφωνα με την οποία τα θραύσματα DNA συνδέονται μεταξύ τους για να δημιουργήσουν μόρια ανασυνδυσμένου DNA, όπως για παράδειγμα όταν ένα θραύσμα ξένου DNA εισάγεται

σε ένα πλασμίδιο. Τα άκρα των θραυσμάτων DNA συνδέονται μεταξύ τους με το σχηματισμό φωσφοδιεστερικού δεσμού μεταξύ του 3'-υδροξυλίου του ενός άκρου του DNA με την 5'-φωσφορική ομάδα του άλλου (Εικόνα 2.10). Ένας συν-παράγοντας γενικά εμπλέκεται στην αντίδραση, και αυτό είναι συνήθως ένα μόριο ATP ή NAD⁺. Η αντίδραση αυτή μπορεί να πραγματοποιηθεί τόσο μεταξύ θραυσμάτων DNA με τυφλά άκρα όσο και μεταξύ θραυσμάτων DNA με κολλώδη άκρα (συμπληρωματικά) (Lucotte et al., 1993; Dugaiczky et al., 1975) (Εικόνα 2.11).

Για την αντίδραση λιγάσης (Πίνακας 2.6) χρησιμοποιήθηκε ο κομμένος φορέας L4440 και το τμήμα 500 bp του γονιδίου *Gas8* που ενισχύθηκε από το γονιδιωματικό DNA του δάκου. Το ένζυμο της αντίδρασης που χρησιμοποιήθηκε



Εικόνα 2.10 Σχηματική απεικόνιση αντίδρασης λιγάσης. Η DNA λιγάση ενώνει ελεύθερα άκρα DNA δημιουργώντας 3'-5' φωσφοδιεστερικό δεσμό χρησιμοποιώντας ένα μόριο ATP.

είναι η T4 DNA ligase (Fermentas). Κατά την αντίδραση λιγάσης δεν επιτυγχάνεται ανασυνδυασμός όλων των πλασμιδιακών φορέων. Ένα ποσοστό αυτών ανασυνδυάζεται και λαμβάνει το ένθεμά, ένα ποσοστό επανασυνδέεται με τον εαυτό του (self ligation) χωρίς να λάβει το ένθεμα και τέλος μπορεί να υπάρχει και ένα μικρό ποσοστό το οποίο παραμένει γραμμικό (Marchuk et al., 1991).



Εικόνα 2.11 Αριστερά αντίδραση λιγάσης ανάμεσα σε κολλώδη άκρα. Δεξιά αντίδραση λιγάσης ανάμεσα σε τυφλά άκρα.

Αντιδραστήρια	Αντίδραση λιγάσης	Αρνητικός μάρτυρας	Συνθήκες
Φορέας (L4440)	20,0 – 100,0 ng	20,0 – 100,0 ng	1 ώρα 22 °C
Ένθεμα	1:1 – 5:1 (ένθεμα:φορέας)	-	
Buffer 10×	1×	1×	
50% PEG 4000	20,0 μl	20,0 μl	
T4 ligase	5 units	5 units	
ddH₂O	Έως τον τελικό όγκο	Έως τον τελικό όγκο	
Vτ	Επιθυμητός τελικός όγκος	Επιθυμητός τελικός όγκος	

Πίνακας 2.6 Πρωτόκολλο αντίδρασης λιγάσης με την T4 DNA ligase.

Οι χρησιμοποιηθείσες ποσότητες του φορέα και του ενθέματος στην αντίδραση υπολογίστηκαν με βάση τον παρακάτω τύπο:

$$ng \text{ ενθέματος} = \frac{\text{Συγκέντρωση φορέα} \times \text{μέγεθος ενθέματος}}{\text{μέγεθος φορέα}} \times \frac{5}{1}$$

2.1.5 Μετασηματισμός βακτηρίων

Όπως προαναφέρθηκε τα βακτήρια τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για να μετασηματιστούν με τον ανασυνδυασμένο φορέα L4440 είναι το στέλεχος *E. coli* HT115(DE3).

2.1.5.1 Δημιουργία κυττάρων για μετασχηματισμό

1. Καλλιεργούμε τα κύτταρα σε 2 ml LB θρεπτικό υλικό για 12 ώρες στους 37°C και σε 210rpm.
2. Ενοφθαλμίζουμε 2 ml θρεπτικού με την προηγούμενη καλλιέργεια και το καλλιεργούμε για 4 ώρες στους 37°C και σε 210rpm.
3. Μετά την παρέλευση 4 ωρών μεταφέρουμε 1ml σε μικροσωληνάριο.
4. Διατηρούμε τα κύτταρα στον πάγο για 10min.

Στη συνέχεια και μέχρι το βήμα 10 τα κύτταρα διατηρούνται στον πάγο.

5. Παραλαμβάνουμε τα κύτταρα με φυγοκέντρηση σε 4000rpm και στους 4°C για 2min.
6. Επιστρέφουμε τα κύτταρα στον πάγο και αφαιρούμε το υπερκείμενο.
7. Επαναδιαλύουμε το ίζημα σε 1ml κρύου CaCl₂ 50mM.
8. Κατακρημνίζουμε τα κύτταρα με φυγοκέντρηση σε 4000rpm και στους 4°C για 2 min.
9. Επαναδιαλύουμε το ίζημα σε 100μl κρύου CaCl 50mM.
10. Διατηρούμε στον πάγο για 30min. (Στο σημείο αυτό μπορούμε να αποθηκεύσουμε μέρος των Competent κυττάρων σε γλυκερόλη για μελλοντική χρήση).

Φυσιολογικό κύτταρο.



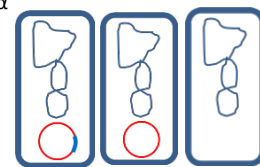
Κατεργασία με CaCl₂ και κρύες συνθήκες εξασθενεί την μεμβράνη και καλύπτει τα αρνητικά της φορτία.



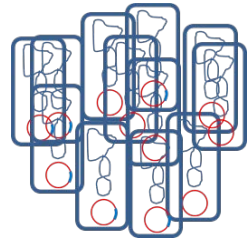
Θερμικός παλμός βοηθά το πλασμίδιο να εισέλθει στο κύτταρο.



Τρεις περιπτώσεις μετά τον μετασχηματισμό. Βακτήρια με ανασυνδυασμένο πλασμίδιο, με απλό πλασμίδιο, χωρίς πλασμίδιο.



Μικρή υγρή καλλιέργεια των κυττάρων ώστε να επανέλθουν από το σοκ.



Στρώσιμο σε τρυβλία



Καλλιέργεια τρυβλίων



Εικόνα 2.12 Σχηματική απεικόνιση διαδικασίας μετασχηματισμού βακτηρίων.

2.1.5.2 Μετασχηματισμός

1. Προσθέτουμε 10μl από το προϊόν της αντίδρασης λιγάσης.
2. Τοποθετούμε στον πάγο για 30min.
3. Προκαλούμε θερμικό σοκ των βακτηρίων με μεταφορά τους στο υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 37°C για 1 min.
4. Επανατοποθετούμε στον πάγο για 2 min.
5. Προσθέτουμε 1ml Super Optimal Broth (SOC) στο σωληνάριο και επωάζουμε στους 37°C, σε 210rpm για 1 ώρα.
6. Φυγοκεντρούμε σε 4.000rpm για 2 min.
7. Επαναδιαλύουμε σε 200μl LB θρεπτικό υλικό.

8. Απλώνουμε τα κύτταρα σε τρυβλία LB Agar με Τετρακυκλίνη (Tc) και Αμικιλίνη (Amp) κατά το δοκούν.
9. Επωάζουμε στους 37°C για 14 – 16 ώρες (Εικόνα 2.12).

LB Broth/Agar	
Συστατικά	Ποσότητες
LB Broth	25,0 gr/1000,0 ml
LB Agar	40,0 gr/1000,0 ml
dH₂O	Ανάλογα την ποσότητα που θέλουμε
Tc	12,5 µg/ml
Amp	10,0 µg/ml
Super Optimal Broth (SOC)	
Συστατικά	Ποσότητες
Tryprone	2,0 % w/v
Yeast extract	0,5 % w/v
NaCl	10,0 mM
KCl	2,5 mM
MgCl₂	10,0 mM
MgSO₄	10,0 mM
Glucose	20,0 mM
ddH₂O	Ανάλογα την ποσότητα που θέλουμε

Πίνακας 2.7 Συνταγές θρεπτικών που χρησιμοποιήθηκαν ανωτέρω.

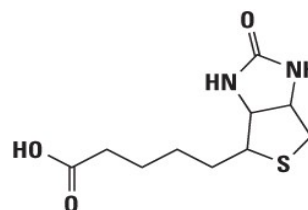
2.1.6 Επιλογή κλώνων

Η επιλογή των αποικιών με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο πραγματοποιήθηκε με α) *In Situ* υβριδισμό, β) colony PCR, γ) πέψεις με διαφορετικά ένζυμα περιορισμού για επιβεβαίωση ύπαρξης του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου και δ) αλληλούχηση του ανασυνδυασμένου πλασμιδιακού φορέα.

2.1.6.1 *In Situ* Υβριδοποίηση αποικιών

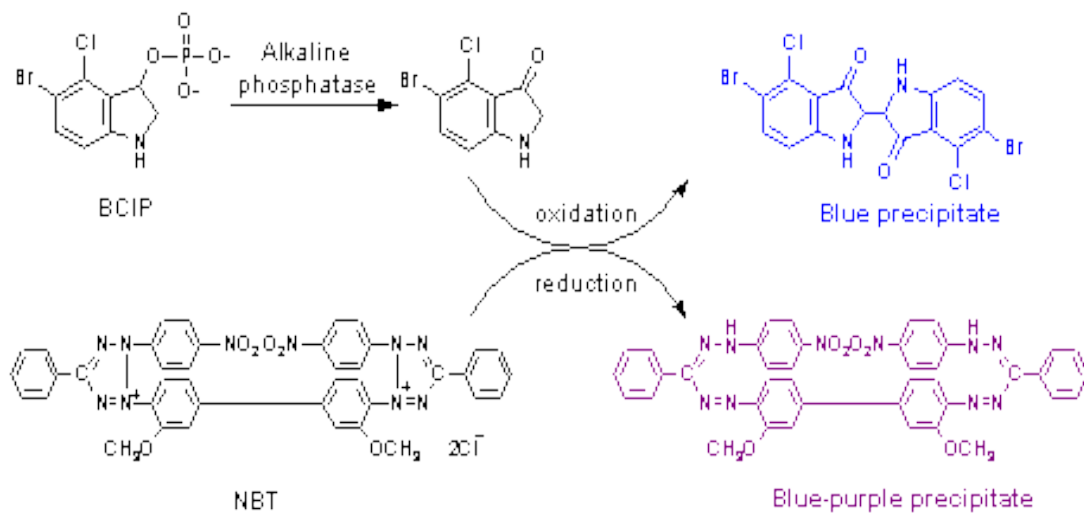
Η *In Situ* Υβριδοποίηση αποικιών, γνωστή και ως Colony Screening, είναι μια τεχνική η οποία μας δίνει την δυνατότητα ανίχνευσης του επιθυμητού στόχου με απ' ευθείας υβριδοποίηση του κατάλληλου σημασμένου ανιχνευτή σε αποικίες κυττάρων χωρίς να απαιτείται πρώτα η απομόνωση νουκλεϊκών οξέων από αυτές και η ηλεκτροφόρησή τους. Σε γενικές γραμμές θα μπορούσαμε να χωρίσουμε την τεχνική αυτή σε τέσσερις επιμέρους διαδικασίες: α) κατασκευή – έλεγχος λειτουργικότητας ανιχνευτή, β) στρώσιμο τρυβλίων – προϋβριδοποίηση, γ) υβριδοποίηση και δ) εμφάνιση.

Στην τεχνική αυτή χρησιμοποιήθηκαν βιοτινυλιωμένα νουκλεοτιδία, δηλαδή χρησιμοποιήθηκε μη ραδιενεργός τρόπος σήμανσης των νουκλεοτιδίων του

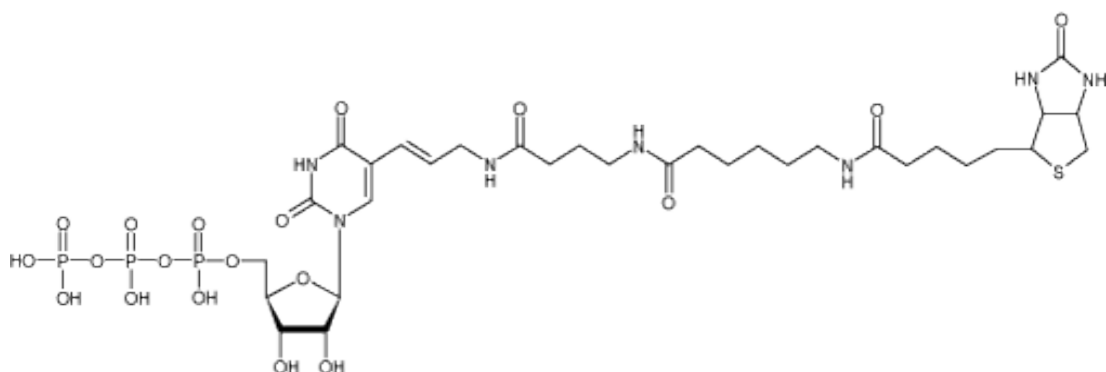


Εικόνα 2.13 Συντακτικός τύπος Βιοτίνης.

ανιχνευτή. Πιο συγκεκριμένα χρησιμοποιούμε bio-UTPs (Εικόνες 2.13, 2.15) τα οποία ενσωματώνονται στο DNA με τη βοήθεια μιας πολυμεράσης. Το DNA αυτό στη συνέχεια θα χρησιμοποιηθεί ως ανιχνευτής. Το βιοτινυλιωμένο DNA αναγνωρίζεται από τη στρεπταβιδίνη η οποία είναι χημικώς «ζευγαρωμένη» με ένα ένζυμο (εν προκειμένω αλκαλική φωσφατάση). Η αλκαλική φωσφατάση θα καταλύσει τη χρωματομετρική αντίδραση και θα επιβεβαιωθεί έτσι η παρουσία της αλληλουχίας – στόχου. Το υποστρώματα της αλκαλικής φωσφατάσης είναι το BCIP από το οποίο η φωσφατάση αφαιρεί τη φωσφορική του ομάδα και έτσι αυτό αντιδρά με το NBT. Αυτή η αντίδραση οδηγεί στην οξείδωση του BCIP, την αναγωγή του NBT και την παραγωγή, από αμφότερα, μπλε προϊόντων τα οποία είναι αυτά που βλέπουμε (Langer et al., 1981; Leary et al., 1983) (Εικόνα 2.14).



Εικόνα 2.14 Σχηματική αναπαράσταση της αντίδρασης παραγωγής των τελικών χρωμογόνων μορίων που μας δίνουν το σήμα.



Εικόνα 2.15 Συντακτικός τύπος βιοτινυλιωμένου UTP.

2.1.6.1.1 Διαλύματα

Στον παρακάτω πίνακα παρατίθενται τα διαλύματα που χρησιμοποιήσαμε για την περάτωση όλων των σταδίων της *In Situ* Υβριδοποίησης.

Όνομασία Δ/τος	Συστατικά	Ποσότητες
Διάλυμα Α	Tris – HCl pH 7,5	0,1 M
	NaCl	0,15 M
	H ₂ O	Έως συμπλήρωσης τελικού όγκου
Διάλυμα Β (Blocking Solution) 10×	Αποβουτυρωμένο γάλα σε σκόνη	10,0 gr
	Διάλυμα Α	100,0 ml
Διάλυμα Β με αντίσωμα	Στρεπταβιδίνη	5,0 μl/10,0 ml δ/τος Β
Διάλυμα C	Tris – HCl pH 9,5	0,1 M
	NaCl	0,1 M
	MgCl ₂	0,05 M
	H ₂ O	Έως συμπλήρωσης τελικού όγκου
Διάλυμα C με NBT/BCIP	NBT	50,0 μl/10,0 ml δ/τος C
	BCIP	37,5 μl/10,0 ml δ/τος C
Αποδιάταξης	NaCl	1,5 M
	NaOH	0,5 M
	H ₂ O	Έως συμπλήρωσης τελικού όγκου
Εξουδετέρωσης	NaCl	1,5 M
	Tris – HCl pH 7,5	0,5 M
	H ₂ O	Έως συμπλήρωσης τελικού όγκου
SSC 20×	NaCl	0,1753 gr/ml
	Sodium Citrate	0,0882 gr/ml
	H ₂ O	Έως συμπλήρωσης τελικού όγκου
Denharts 50×	Φικόλη	0,01 gr/ml
	PVP	0,01 gr/ml
	BSA (fraction V)	0,01 gr/ml
	H ₂ O	Έως συμπλήρωσης τελικού όγκου
SDS 10%	SDS	10,0 gr/ 100ml H ₂ O
Προϋβριδοποίησης	SSC 20×	6×
	SDS 10%	0,5%
	Denharts 50×	5×
	salmon sperm DNA (ssDNA)	100,0 μl/10,0 ml δ/τος
	H ₂ O	Έως συμπλήρωσης τελικού όγκου
Υβριδοποίησης	δ/μα Προϋβριδοποίησης	10,0 ml/100,0 cm ² μεμβράνης
	Ανιχνευτής	~ 1γ
Wash 1	SSC 20×	2×
	SDS 10%	0,1%
	H ₂ O	Έως συμπλήρωσης τελικού όγκου
Wash 2	SSC 20×	0,2×
	SDS 10%	0,1%
	H ₂ O	Έως συμπλήρωσης τελικού όγκου

Πίνακας 2.8 Συνταγές δ/των της *In Situ* υβριδοποίησης.

Στον παρακάτω πίνακα παρατίθενται συνοπτικά η ιδιότητα και ο λόγος χρήσης των διαλυμάτων που χρησιμοποιήσαμε για την περάτωση όλων των σταδίων της *In Situ* Υβριδοποίησης.

Όνομασία Δ/τος	Ιδιότητα/ λόγος χρήσης
Διάλυμα Α	Ρυθμιστικό διάλυμα
Διάλυμα Β (Blocking Solution) 10×	Καλύπτει πιθανές θέσεις πρόσδεσης DNA στη μεμβράνη και δεν επιτρέπει τη σύνδεση του ανιχνευτή σε αυτές.
Διάλυμα Β με αντίσωμα	Περιέχει επιπλέον την Στρεπταβιδίνη
Διάλυμα C	Ρυθμιστικό διάλυμα ώστε να δημιουργηθούν οι κατάλληλες συνθήκες λειτουργίας της αλκαλικής φωσφατάσης
Διάλυμα C με NBT/BCIP	Περιέχει επιπλέον τα υποστρώματα του ενζύμου
Αποδιάταξης	Αποδιάταξει το DNA για να επιτραπεί στον ανιχνευτή η υβριδοποίηση
Εξουδετέρωσης	Εξουδετερώνει το NaOH του δ/τος αποδιάταξης
SSC 20×	Αλατούχο δ/μα που βοηθά στην απομάκρυνση περισσευόμενων συστατικών από τη μεμβράνη (πχ. Συστατικά του δ/τος που χρησιμοποιήθηκε πριν από αυτό) και υποβοηθά την αυστηρότητα του υβριδισμού
Denharts 50×	Βοηθάει στην πλήρη κατάργηση μη-ειδικών σημάτων στο φόντο της μεμβράνης
SDS 10%	Απορρυπαντικό
Προϋβριδοποίησης	Προετοιμάζει την μεμβράνη ελαχιστοποιώντας τις πιθανές μη ειδικές συνδέσεις του probe σε αυτή με το ssDNA που περιέχει
Υβριδοποίησης	Περιέχει τον ανιχνευτή
Wash 1	Ξεπλένεται η περίσσεια ανιχνευτή
Wash 2	Απομακρύνονται πιθανοί μη-ειδικοί υβριδισμοί του DNA ανιχνευτή

Πίνακας 2.9 Ιδιότητες/λόγος χρήσης των διαλυμάτων υβριδοποίησης.

2.1.6.1.2 Κατασκευή – έλεγχος λειτουργικότητας ανιχνευτή

Η κατασκευή του ανιχνευτή γίνεται με τη χρήση bio-UTPs και της Klenow DNA Polymerase I (Fermentas). Το τμήμα DNA που χρησιμοποιήθηκε είναι προϊόν πέψης, μεγέθους 600bp, του ανασυνδιασμένου φορέα με το ένζυμο περιορισμού EcoR I (για την πέψη βλέπε ενότητα 2.1.6.3 για τα στοιχεία της αντίδρασης).

Αντιδραστήρια	Ποσότητες	Συνθήκες
DNA	Επιθυμητή ποσότητα	16 ώρες 37°C
Buffer 10×	1×	
dNTPs -dTTPs	0,33 mM (έκαστο)	
Bio-UTPs	0,035 mM	
Klenow DNA pol I	5 unit	
ddH ₂ O	Έως τελικού όγκου	
Vτ	Επιθυμητός τελικός όγκος	

Πίνακας 2.10 Πρωτόκολλο δημιουργίας DNA ανιχνευτή με bio-UTPs.

1. Προσθέτουμε σε ένα μικροσωληνάριο το DNA και το Buffer του ενζύμου και βράζουμε στους 100°C για 10min.
2. Μεταφέρουμε στον πάγο για 1min.
3. Αμέσως πραγματοποιούμε quick spin και επανατοποθετούμε στον πάγο για 1min.
4. Προσθέτουμε και τα υπόλοιπα συστατικά της αντίδρασης (Πίνακας 2.10).
5. Τοποθετούμε το μικροσωληνάριο στους 37°C για 16 ώρες.
6. Πραγματοποιούμε καθαρισμό με φαινόλη/χλωροφόρμιο (βλέπε ενότητα 2.2.2) και επαναδιάλυνουμε σε 50μl ddH₂O.

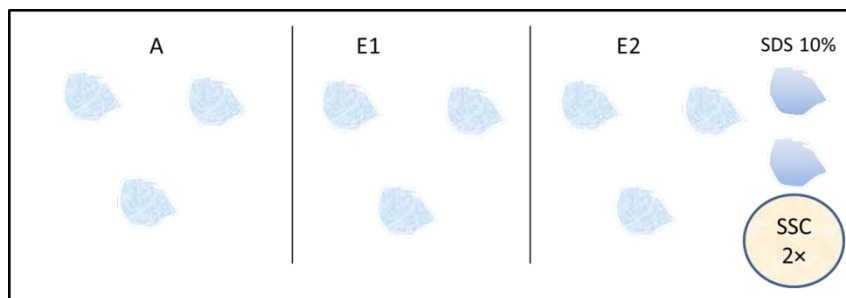
Ο έλεγχος του ανιχνευτή γίνεται για να επιβεβαιώσουμε ότι είναι λειτουργικός και το σήμα που δίνει σε διάφορες αραιώσεις.

1. Ετοιμάζουμε τις αραιώσεις του ανιχνευτή. Αναμειγνύουμε 2μl ανιχνευτή, με 8μl ddH₂O. Από αυτό το διάλυμα κάνουμε τις αραιώσεις 1:10, 3:10 και 6:10 σε τελικό όγκο 10μl. Αυτές τις αραιώσεις τις τοποθετούμε σε μια μεμβράνη Whatman®.
2. Παρασκευάζουμε αραιώση του δ/τος B από 10× σε 1× (η αραιώση γίνεται σε δ/μα A)
3. Τοποθετούμε τη μεμβράνη σε τρυβλίο, προσθέτουμε δ/μα A και αναδεύουμε σε RT για 1min.
4. Αδειάζουμε το δ/μα A, προσθέτουμε δ/μα B 1× και αναδεύουμε σε RT για 30min.
5. Αδειάζουμε το δ/μα B 1×, προσθέτουμε δ/μα B με αντίσωμα και αναδεύουμε σε RT για 30min.

6. Αδειάζουμε το δ/μα B με αντίσωμα και συνεχίζουμε με δύο πλύσεις με δ/μα A και σε κάθε πλύση αναδεύουμε σε RT για 15min.
7. Μετά το πέρας και της δεύτερης πλύσης αδειάζουμε το δ/μα A, προσθέτουμε το δ/μα C και αναδεύουμε σε RT για 2min.
8. Ετοιμάζουμε το δ/μα C με NBT και BCIP.
9. Αδειάζουμε το δ/μα C από το τρυβλίο και μεταφέρουμε τη μεμβράνη σε σκοτεινό μέρος.
10. Ρίχνουμε πάνω από τη μεμβράνη το δ/μα C με τα NBT και BCIP.
11. Περιμένουμε να παρατηρήσουμε το σήμα.
12. Η αντίδραση διακόπτεται με H₂O.

2.1.6.1.3 Μεταφορά αποικιών στη μεμβράνη – προϋβριδοποίηση

Στο στάδιο αυτό μεταφέρουμε τις αποικίες από το τρυβλίο στην μεμβράνη κυτταρίνης και την προετοιμάζουμε για την υβριδοποίηση.



Εικόνα 2.16 Σχηματική απεικόνιση ζελατίνας εργασίας.

1. Στρώνουμε στον πάγκο ζελατίνα και σημειώνουμε τις ενδείξεις A (Αποδιάταξη), E₁ (Εξουδετέρωση 1), E₂ (Εξουδετέρωση 2), 10% SDS και σε ένα άδειο τρυβλίο προσθέτουμε SSC 2× (Εικόνα 2.16).
2. Κόβουμε μεμβράνες κυτταρίνης με διάμετρο ανάλογη του μεγέθους του τρυβλίου (petri).
3. Σε άδειο τρυβλίο βάζουμε 1ml LB και εκεί διαβρέχουμε κάθε μεμβράνη μόνο από την πλευρά που θα ακουμπήσει τις αποικίες.
4. Αφού βρέξουμε τη μεμβράνη την απλώνουμε με τη βοήθεια λαβίδων στο τρυβλίο και την αφήνουμε εκεί για 2 min.
5. Αμέσως μετά την ακουμπάμε για λίγα δευτερόλεπτα στο SDS 10% με την πλευρά των αποικιών προς τα πάνω (colony side up).
6. Την τοποθετούμε πάλι colony side up στο δ/μα Αποδιάταξης (θέση A, βλέπε ανωτέρω σχήμα) για 2 min χωρίς το δ/μα τα περάσει πάνω από τη μεμβράνη.
7. Αμέσως μετά την τοποθετούμε colony side up για 2 min στο δ/μα Εξουδετέρωσης (θέση E₁) χωρίς το δ/μα τα περάσει πάνω από τη μεμβράνη.
8. Στη συνέχεια για 2 min στην θέση E₂ colony side up.
9. Τέλος για 2min στο SSC 2×.
10. Στεγνώνουμε τη μεμβράνη για περίπου 20 min και στη συνέχεια την ψήνουμε στους 80°C για 1 ώρα.

11. Αμέσως μετά τοποθετούμε τη μεμβράνη σε δ/μα SSC 2× με 1ml SDS 10% /100ml SSC και την τρίβουμε απαλά με το γάντι για να φύγει το ανάγλυφο των αποικιών. Κατόπιν ξεπλένουμε σε δ/μα SSC 2×.
12. Παρασκευάζουμε το δ/μα Προϋβριδοποίησης (συστατικά βλ. Πίνακας 2.8). Το ssDNA το προσθέτουμε τελευταίο στο δ/μα αφού πρώτα το βράσουμε στους 100°C για 10min και το αφήσουμε 1min στον πάγο με σκοπό να αναδιαταχτεί. Το ssDNA το βράζουμε μέσα στο μικροσωληνάριο στο οποίο βρίσκεται. Ο όγκος (ml) του δ/τος προϋβριδοποίησης υπολογίζεται με βάση τον τύπο:

$$\text{Εμβαδό μεμβράνης (cm}^2\text{)} \times 0,2$$

13. Αδειάζουμε το δ/μα Προϋβριδοποίησης σε ένα τρυβλίο και εμποτίζουμε την μεμβράνη πριν τη βάλουμε στον κύλινδρο υβριδοποίησης. Μόλις τη βάλουμε στο σωλήνα προσθέτουμε όλο το δ/μα Προϋβριδοποίησης.
14. Τοποθετούμε τον σωλήνα στη κατάλληλη θερμοκρασία υβριδοποίησης, για 2 ώρες με περιστροφή.

2.1.6.1.4 Υβριδοποίηση

Στο στάδιο αυτό πραγματοποιούμε την υβριδοποίηση του ανιχνευτή μας στην αλληλουχία – στόχο.

1. Βράζουμε τον ανιχνευτή που κατασκευάσαμε για 10 min και αμέσως μετά τον τοποθετούμε για 1 min στον πάγο.
2. Σε falcon ετοιμάζουμε το δ/μα Υβριδοποίησης (βλέπε Πίνακα 2.8).
3. Αφαιρούμε το δ/μα Προϋβριδοποίησης και προσθέτουμε το δ/μα Υβριδοποίησης στο σωλήνα.
4. Τοποθετούμε το σωλήνα στη κατάλληλη θερμοκρασία υβριδοποίησης, με ανάδευση, O/N περίπου 16 ώρες.

2.1.6.1.5 Εμφάνιση

Η εμφάνιση είναι το τελικό στάδιο της διαδικασίας της Υβριδοποίησης κατά το οποίο στη μεμβράνη εμφανίζονται οι αποικίες οι οποίες περιέχουν την αλληλουχία στόχο, δηλαδή το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο.

1. Απομακρύνουμε τον ανιχνευτή με το δ/μα υβριδοποίησης από τον κυλινδρικό σωλήνα.
2. Βγάζουμε τις μεμβράνες από το σωλήνα με τη βοήθεια μικρής ποσότητας δ/τος Wash 1.
3. Πραγματοποιούμε δύο πλύσεις με το δ/μα Wash 1 σε RT, με ανάδευση για 5min.
4. Εν συνεχεία πραγματοποιούμε δύο πλύσεις με δ/μα Wash 2 σε θερμοκρασία υβριδοποίησης, με ανάδευση για 20 min.

5. Πραγματοποιούμε μια πλύση με δ/μα A σε RT, με ανάδευση για 1 – 2 min.
6. Αδειάζουμε το δ/μα A, προσθέτουμε δ/μα B 1× και αναδεύουμε σε RT για 30min.
7. Αδειάζουμε το δ/μα B 1×, προσθέτουμε δ/μα B με αντίσωμα και αναδεύουμε σε RT για 30min.
8. Αδειάζουμε το δ/μα B με αντίσωμα και συνεχίζουμε με δύο πλύσεις με δ/μα A και σε κάθε πλύση αναδεύουμε σε RT για 15min.
9. Μετά το πέρας και της δεύτερης πλύσης αδειάζουμε το δ/μα A, προσθέτουμε το δ/μα C και αναδεύουμε σε RT για 2min.
10. Ετοιμάζουμε το δ/μα C με NBT και BCIP.
11. Αδειάζουμε το δ/μα C από το τρυβλίο και μεταφέρουμε τη μεμβράνη σε σκοτεινό μέρος.
12. Ρίχνουμε πάνω από τη μεμβράνη το δ/μα C με τα NBT και BCIP.
13. Περιμένουμε να παρατηρήσουμε το σήμα.
14. Η αντίδραση διακόπτεται με H₂O.

2.1.6.2 Colony PCR

Στην colony PCR, βακτηριακές αποικίες ελέγχονται άμεσα με PCR, για την ανίχνευση του ανασυνδυασμένου φορέα DNA. Γίνεται δειγματοληψία αποικιών με ένα στείρο ρύγχος πιπέτας (pipette tip) και μια μικρή ποσότητα κυττάρων μεταφέρεται σε PCR buffer. Για την απελευθέρωση του DNA από τα κύτταρα, η PCR είτε θα ξεκινήσει με ένα εκτεταμένο χρονικό διάστημα στους 95°C (όταν χρησιμοποιείται η απλή συνήθης πολυμεράση), ή με ένα σύντομο βήμα αποδιάταξης στους 100°C και ειδική χημική DNA πολυμεράση (Ρανίον, 2006). Πέραν τούτων των στοιχείων η colony PCR ακολουθείται η ίδια διαδικασία με οποιαδήποτε άλλη PCR. Για την περάτωση των colony PCR χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές Universal T7 (Πίνακας 2.22).

Η αντίδραση μας (Πίνακας 2.11) πραγματοποιήθηκε με την απλή Maximo Taq DNA Polymerase της εταιρίας GeneON. Από κάθε αποικία, που επιλέγουμε για PCR, δημιουργούμε «αντίγραφο» μεταφέροντας με το ρύγχος της πιπέτας λίγα κύτταρα σε ένα νέο τρυβλίο με θρεπτικό υλικό.

Αντιδραστήρια	Ποσότητες	Πρόγραμμα PCR		
			T °C	Χρόνος
DNA	Μία αποικία			
Buffer 10×	1×	<i>Αρχική αποδιάταξη</i>	95	5 min
dNTPs	2,5 mM (έκαστο)	<i>Αποδιάταξη</i>	94	20 sec
Primer Forward	10 pmol/μl	<i>Υβριδοποίηση εκκινητών</i>	53	30 sec
Primer Reverse	10 pmol/μl	<i>Κλωνική επέκταση</i>	72	1:30 min
Taq polymerase	1 unit	<i>Τελική επέκταση</i>	72	30 min
ddH ₂ O	Έως τον τελικό όγκο	<i>Τέλος</i>	12	∞
Vτ	Επιθυμητός τελικός όγκος	<i>Κύκλοι PCR</i>	32	

Πίνακας 2.11 Πρωτόκολλο πραγματοποίησης colony PCR.

2.1.6.3 Πέψη DNA

Η χρήση ενζύμων περιορισμού για την επιβεβαίωση της ύπαρξης του επιθυμητού ανασυνδυασμένου πλασμιδίου σε αποικίες βακτηρίων είναι μια συνήθης διαδικασία η οποία μπορεί να δώσει με ακρίβεια θετικά ή αρνητικά αποτελέσματα. Βασική προϋπόθεση για την πραγμάτωσή της είναι η γνώση των σημείων πέψης των ενζύμων τόσο στον πλασμιδιακό φορέα όσο και στο ένθεμα. Αυτή η γνώση μας δίνει τη δυνατότητα να κάνουμε χρήση των κατάλληλων ενζύμων περιορισμού αλλά και να έχουμε την ευχέρεια να προβλέψουμε τα τμήματα του DNA που θα προκύψουν από κάθε πέψη.

Στην παρούσα εργασία οι πέψεις έγιναν με τρεις διαφορετικές περιοριστικές ενδονουκλεάσες (Πίνακας 2.12).

Αντιδραστήρια	Ποσότητες		
	Xho I	Rsa I	EcoR I
DNA	Επιθυμητή ποσότητα	Επιθυμητή ποσότητα	Επιθυμητή ποσότητα
Buffer Cutsmart 10×	1×	1×	-
Buffer H 10×	-	-	1×
Ενδονουκλεάσες	20 units	10 units	15 units
ddH ₂ O	Έως τελικού όγκου	Έως τελικού όγκου	Έως τελικού όγκου
V _T	Επιθυμητός τελικός όγκος	Επιθυμητός τελικός όγκος	Επιθυμητός τελικός όγκος
Συνθήκες	1ώρα/37°C, 20min απενεργοποίηση	1ώρα/37°C	1ώρα/37°C

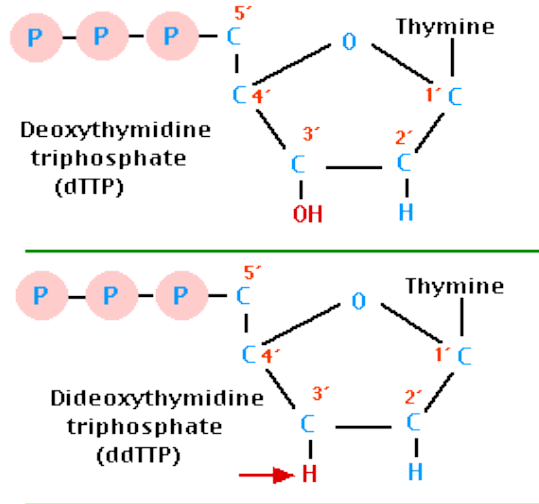
Πίνακας 2.12 Πρωτόκολλο αντιδράσεων πέψης με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες XhoI, RsaI και EcoRI.

2.1.6.4 Αλληλούχηση ανασυνδυασμένου πλασμιδίου

Με την αλληλούχηση δίνεται η δυνατότητα να διαβάσουμε την ακριβή αλληλουχία βάσεων του τμήματος DNA που τελικώς εισήχθη στον πλασμιδικό φορέα, εξαλείφοντας οποιαδήποτε αμφιβολία μπορεί να υπήρχε για την εισαγωγή του επιθυμητού ενθέματος.

Η προετοιμασία για την αλληλούχηση περιλαμβάνει την απομόνωση του πλασμιδίου από καλλιέργεια του βακτηριακού κλώνου που το φέρει και την αποστολή του σε εξωτερικό συνεργάτη για την αλληλούχηση του. Στην παρούσα εργασία τα δείγματά μας εστάλησαν στη Macrogen. Η συγκεκριμένη εταιρία διαθέτει τόσο τεχνολογίες αλληλούχησης νέας γενιάς (Next Generation Sequencing, NGS) όσο και την κλασική μέθοδο αλληλούχησης Sanger σε συνδυασμό με ηλεκτροφόρηση σε τριχοειδή για την εξαγωγή των αποτελεσμάτων (www.macrogen.com).

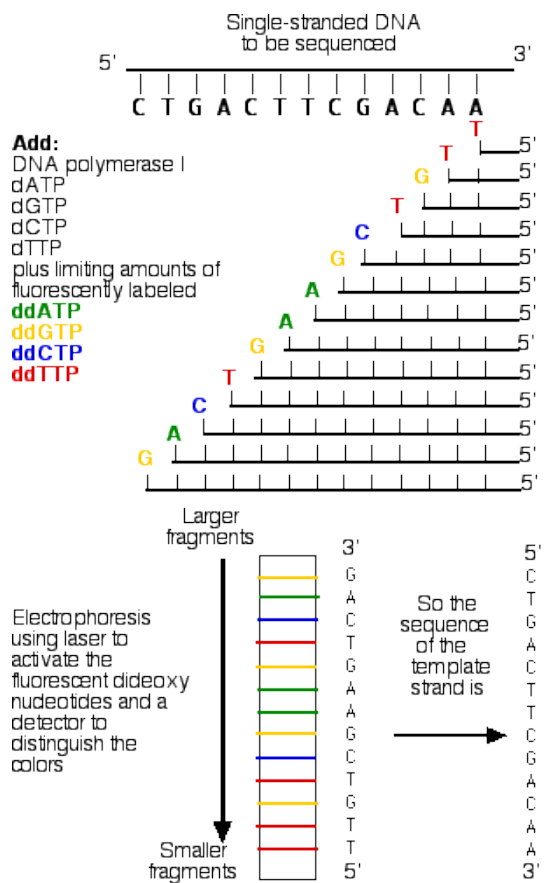
Η αλληλούχιση κατά Sanger είναι μια μέθοδος βασισμένη στην εκλεκτική ενσωμάτωση διδεοξυνουκλεοτιδίων κατά τη διάρκεια της *in vitro* αντιγραφής του DNA από την DNA πολυμεράση, με αποτέλεσμα να εμποδίζουν την περαιτέρω επιμήκυνση της αλυσίδας (Sanger et al., 1975; 1977). Η τεχνική αυτή αναπτύχθηκε από τους Sanger F. et al., το 1977, καθιστώντας την μια ευρύτατα χρησιμοποιημένη μέθοδο αλληλούχισης για περίπου 25 έτη. Πιο πρόσφατα, η αλληλούχιση κατά Sanger μεγάλης κλίμακας έχει αντικατασταθεί από τις μεθόδους «NGS», ειδικά για τις μεγάλης κλίμακας, αυτοματοποιημένες αναλύσεις γονιδιωμάτων. Παρ' όλα ταύτα, η μέθοδος Sanger παραμένει σε ευρεία χρήση, για τα μικρότερης κλίμακας προγράμματα, για την επικύρωση των αποτελεσμάτων των NGS και για τη δυνατότητα ανάγνωσης μιας αρκετά μακριάς αλυσίδας DNA (> 500 νουκλεοτιδίων) (Schuster, 2008).



Εικόνα 2.17 Επάνω: φυσικό dTTP. Κάτω: τροποποιημένο ddTTP.

Η αλληλούχιση κατά Sanger είναι μια απλή τεχνική η οποία απαιτεί: 1) το μονόκλωνο DNA εκμαγείο, 2) έναν DNA εκκινητή, 3) την DNA πολυμεράση, 4) τα φυσιολογικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs) και 5) τα τροποποιημένα διδεοξυριβονουκλεοτίδια (ddNTPs) τα οποία και σταματούν την επιμήκυνση της αντιγραφόμενης αλυσίδας (Εικόνα 2.17). Το ddNTP δεν διαθέτει το 3' OH της δεοξυριβόζης, και η DNA πολυμεράση δεν μπορεί να επιμηκύνει την αλυσίδα, δημιουργώντας έτσι μία αλυσίδα μικρότερου μήκους από την αλυσίδα εκμαγείο.

Το δείγμα DNA που πρόκειται να αλληλουχηθεί χωρίζεται σε τέσσερις ξεχωριστές αντιδράσεις αλληλούχισης. Κάθε μια από αυτές διαθέτει όλα τα φυσικά dNTPs, τη DNA πολυμεράση και ένα από τα τέσσερα ddNTPs σε αναλογία 1:100 με το αντίστοιχο dNTP (πχ. 0.005mM ddATP : 0.5mM dATP). Με αυτό τον τρόπο δίνεται η δυνατότητα



Εικόνα 2.18 Αλληλούχιση κατά Sanger.

στην DNA πολυμεράση να δημιουργήσει αρκετά μικρότερα τμήματα, τα οποία λήγουν στο αντίστοιχο ddNTP, ενώ παράλληλα καταφέρνει να αντιγράψει ολόκληρη την αλληλουχία. Τα τμήματα δημιουργούνται όταν η DNA πολυμεράση προσθέτει ένα ddNTP αντί για dNTP. Μετά από έναν ορισμένο αριθμό κύκλων επιμήκυνσης της αλληλουχίας, πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και διαχωρισμός των τμημάτων με βάση το μέγεθός τους (Sanger et al., 1977). Πλέον τα ddNTPs είναι συνήθως σημασμένα με φθορίζουσα ουσία και η ηλεκτροφόρηση γίνεται συνήθως σε τριχοειδή (capillary electrophoresis). Η ηλεκτροφόρηση διαβάζεται από μια συσκευή η οποία αναγνωρίζει το φθορισμό και με τη βοήθεια ενός λογισμικού καταγράφεται και παρουσιάζεται το αποτέλεσμα της αλληλούχησης (Kan et al., 2004) (Εικόνα 2.18).

2.1.7 Ανάπτυξη και αποθήκευση επιθυμητού κλώνου

Από τη στιγμή που έχουμε επιβεβαιώσει με τους τρόπους που αναφέρθηκαν προηγουμένως ποιες από τις αποικίες μας έχουν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο τις επιλέγουμε και τις αποθηκεύουμε σε stock γλυκερόλης στους -80°C για μελλοντικές χρήσεις.

1. Ενοφθαλμίζουμε με αποικία 2,5ml φρέσκου LB θρεπτικού υλικού με αντιβιοτικά Tc/Amp και την επιτρέπουμε να αναπτυχθεί μέχρι την αρχή της στατικής φάσης της βακτηριακής ανάπτυξης.
2. Σε αποστειρωμένο μικροσωληνάριο προσθέτουμε glycerol (αποστειρωμένη) σε τελική συγκέντρωση 20% και συμπληρώνουμε με την καλλιέργεια έως τελικού όγκου 1ml.
3. Αναδεύουμε και τοποθετούμε στους -80°C .

2.2 ΕΚΦΡΑΣΗ dsRNA

Σκοπός της έκφρασης του dsRNA είναι αφενός να επιβεβαιώσουμε ότι όντως γίνεται παραγωγή του επιθυμητού dsRNA από το βακτηριακό μας στέλεχος και αφετέρου να προσδιορίσουμε σε τι συγκέντρωση παράγεται. Επιπλέον η απομόνωση και ο καθαρισμός του παραγόμενου dsRNA είναι διαδικασίες απαραίτητες για την μετέπειτα χρήση του στην τροφή των δάκων πέρα από τη χρήση των βακτηρίων.

2.2.1 Καλλιέργεια βακτηρίων

1. Από το stock γλυκερόλης που διαθέτουμε ενοφθαλμίζουμε 1ml LB θρεπτικού υλικού με αντιβιοτικά Tc/Amp και την τοποθετούμε για 12 ώρες στους 37°C , σε 210rpm.
2. Εμβολιάζουμε 100ml θρεπτικού υλικού 2×YT (Πίνακας 2.13) με το 1ml της καλλιέργειας και αυξάνουμε τα rpm του επωαστήρα στα 250 διατηρώντας όμως θερμοκρασία στους 37°C . Καλλιεργούμε έως O.D. $600 \cong 0,5$ (Πίνακας 2.14).

- Μόλις η καλλιέργεια φτάσει την επιθυμητή οπτική πυκνότητα προσθέτουμε 0,04mM IPTG. Επωάζουμε στους 37°C και σε 220rpm για 4 ώρες.

Θρεπτικό 2×YT

Συστατικά	Ποσότητες
Τρυπτόνη	16,0 gr/1000,0 ml
Εκχύλισμα ζύμης	10,0 gr/1000,0 ml
NaCl	5,0 gr/1000,0 ml
dH ₂ O	Ανάλογα την ποσότητα που θέλουμε
Tc	12,5 µg/ml
Amp	10,0 µg/ml

Πίνακας 2.13 Συνταγή παρασκευής θρεπτικού 2×YT.

Μετρήσεις απορρόφησης καλλιέργειας

Χρόνος (min)	A (O.D. ₆₀₀)
0	0
120	0,181
180	0,480

Πίνακας 2.14 Μετρήσεις απορρόφησης καλλιέργειας. Φαίνεται ότι στις 3 ώρες περίπου τα βακτηριακά κύτταρα φτάνουν το επιθυμητό O.D.₆₀₀.

2.2.2 Απομόνωση – καθαρισμός dsRNA

- Φυγοκεντρούμε την καλλιέργειά μας σε 5.000g για 10min και απορρίπτουμε το υπερκείμενο.
- Επαναδιαλύουμε το ίζημα σε 500µl δ/τος 1M NH₄Ac/10mM EDTA.
- Προσθέτουμε ίσο όγκο φαινόλη/χλωροφόρμιο.
- Διατηρούμε στους 65°C για 30min και φυγοκεντρούμε σε 12.000g για 15min.
- Μεταφέρουμε την άνω φάση σε νέο μικροσωληνάριο, προσθέτουμε ίσο όγκο ισοπροπανόλης και το τοποθετούμε στους -20°C για 12 ώρες.
- Φυγοκεντρούμε σε 12.000g για 30min. Απορρίπτουμε το υπερκείμενο.
- Προσθέτουμε μισό όγκο απόλυτης αιθανόλης 70% (EtOH 70%) και φυγοκεντρούμε σε 12.000g για 5min με σκοπό να πλύνουμε το ίζημα.
- Αφαιρούμε την αιθανόλη και αφήνουμε να στεγνώσει.
- Προσθέτουμε 100µl ddH₂O και αναδεύουμε για να διαλυθεί το ίζημα.
- Πραγματοποιούμε επίδραση με DNase (βλέπε πίνακα 2.15 *Επίδραση με DNase*)
- Πραγματοποιούμε επίδραση με RNase (βλέπε πίνακα 2.16 *Επίδραση με RNase*)
- Καθαρίζουμε το δείγμα μας με φαινόλη/χλωροφόρμιο με τη διαφορά ότι αντί για οξικό Na (CH₃COONa) προσθέτουμε 1 όγκο ισοπροπανόλης.
- Επαναδιαλύουμε το ίζημα σε 100µl TE Buffer.

Επίδραση με DNase (TURBO DNA – free™ kit)

Αντιδραστήρια	Ποσότητες	Διαδικασία
dsRNA	Επιθυμητή ποσότητα	1. 25min/ 37°C 2. Προσθήκη Inactivation Buffer 1/10 όγκου αντίδρασης 3. Ανακίνηση 5min/ RT 4. Φυγοκέντρωση 10.000g/ 90sec 5. Υπερκείμενο σε νέο tube
TURBO DNase Buffer 10×	1×	
TURBO DNase	2 units	
ddH ₂ O	Έως τελικού όγκου	
Vτ	Επιθυμητός τελικός όγκος	

Πίνακας 2.15 Πρωτόκολλο επίδρασης με DNase.

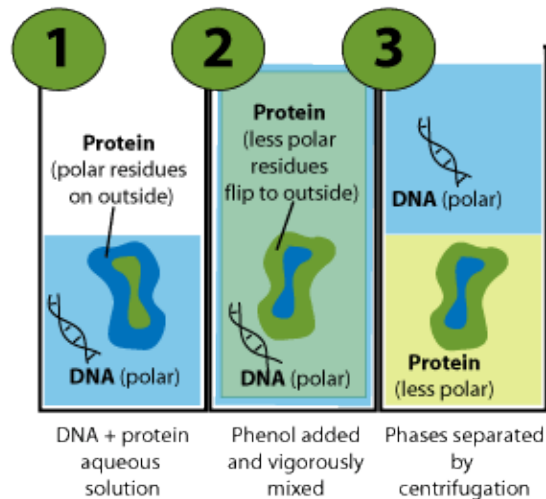
Επίδραση με RNase A (Fermentas)

Αντιδραστήρια	Ποσότητες	Διαδικασία
dsRNA	Το υπερκείμενο της κατεργασίας με DNase	30min/ 37°C * Η RNase A απαιτεί προσθήκη 300mM NaCl για να μην πέσει το dsRNA
NaCl	300mM	
RNase A	1μg/ml	
ddH ₂ O	Έως τελικού όγκου	
Vτ	Επιθυμητός τελικός όγκος	

Πίνακας 2.16 Πρωτόκολλο επίδρασης με RNase.

2.2.2.1 Καθαρισμός φαινόλης/ χλωροφορμίου

1. Μεταφέρουμε το προς καθαρισμό δείγμα σε μικροσωληνάριο.
2. Προσθέτουμε dH₂O έως τελικού όγκου 300μl.
3. Προσθέτουμε 150μl φαινόλη.
4. Προσθέτουμε 150μl χλωροφόρμιο.
5. Αναδεύουμε καλά και φυγοκεντρούμε σε μέγιστη ταχύτητα για 5min.
6. Αφαιρούμε την άνω φάση με προσοχή, να μην παραλάβουμε και φαινόλη, και την μεταφέρουμε σε νέο μικροσωληνάριο.
7. Προσθέτουμε ίσο όγκο χλωροφορμίου αναδεύουμε καλά και φυγοκεντρούμε σε μέγιστη ταχύτητα για 5min.
8. Αφαιρούμε την άνω φάση και τη μεταφέρουμε σε νέο μικροσωληνάριο.
9. Επαναλαμβάνουμε τα βήματα 7 και 8 άλλη μία φορά.
10. Προσθέτουμε dH₂O έως τελικού όγκου 300μl και προσθέτουμε 30μl οξικό Na (CH₃COONa) για τελική συγκέντρωση 0,3M.



Εικόνα 2.19 Σχηματική απεικόνιση διαχωρισμού φάσεων με χρήση φαινόλης και χλωροφορμίου.

11. Επωάζουμε για 15min σε RT.
12. Φυγοκεντρούμε σε max speed για 15min απορρίπτουμε το υπερκείμενο.
13. Στο παρατηρούμενο ίζημα, προσθέτουμε μισό όγκο EtOH 70% και φυγοκεντρούμε σε max speed για 5min.
14. Αφαιρούμε την EtOH 70% και στεγνώνουμε το ίζημα.
15. Επαναδιαλύουμε το ίζημα στην επιθυμητή ποσότητα dH₂O (Εικόνα 2.19).

2.3 RNA ΣΙΓΗΣΗ ΜΕΣΩ ΤΡΟΦΗΣ

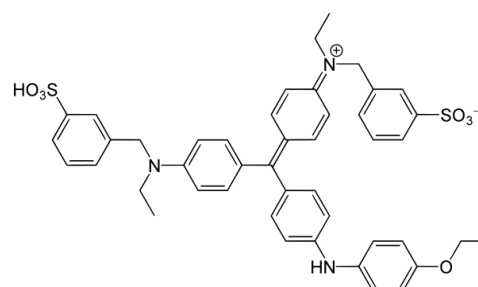
2.3.1 Καλλιέργεια και χρώση βακτηρίων

1. Ενοφθαλμίζουμε από το stock γλυκερόλης 1ml LB θρεπτικού υλικού και το καλλιεργούμε για 12 ώρες στους 37°C και σε 210rpm.
2. Μεταφέρουμε την καλλιέργεια σε επιθυμητή ποσότητα θρεπτικού υλικού βαφής κυττάρων (Πίνακας 2.17).
3. Επωάζουμε την νέα καλλιέργεια στους 37°C και σε 250rpm έως να φτάσει O.D. 600 \cong 0,5.
4. Επάγουμε την παραγωγή του dsRNA με 0,4mM IPTG και επωάζουμε για 4 ώρες στους 37°C και σε 220rpm.
5. Φυγοκεντρούμε σε 5.000g για 10min και απορρίπτουμε το υπερκείμενο.
6. Επαναδιαλύουμε το ίζημα σε dH₂O με σκοπό να αποκτήσει τελική συγκέντρωση 250 \times .

Θρεπτικό βαφής κυττάρων	
Συστατικά	Ποσότητες
Coomassie Brilliant Blue R-250 1%	0,1%
2\timesYT	Έως τελικού όγκου
Vτ	Επιθυμητός τελικός όγκος

Πίνακας 2.17 Συνταγή θρεπτικού βαφής κυττάρων.

Coomassie Brilliant Blue (C.B.B.) είναι το όνομα για δύο παρόμοιες χρωστικές τριφαινυλομεθανίου που αναπτύχθηκαν αρχικά για χρήση στην υφαντουργία. Σήμερα χρησιμοποιούνται συνήθως για τη χρώση των πρωτεϊνών στην αναλυτική βιοχημεία. Η χρωστική C.B.B. G-250 διαφέρει από C.B.B. R-250 (Εικόνα 2.20) με την προσθήκη δύο ομάδων μεθυλίου. Στα πειράματά μας χρησιμοποιήθηκε η C.B.B. R-250.



Εικόνα 2.20 Συντακτικός τύπος Χρωστικής Coomassie Brilliant Blue R-250

2.3.2 Διατροφή εντόμων

Για την διατροφή των εντόμων ακολουθήσαμε δύο διαφορετικές κατευθύνσεις. Στην πρώτη από το στάδιο των αυγών 48 ωρών χορηγήσαμε στα έντομα καλλιέργεια βακτηρίων συμπυκνωμένη κατά $125\times$ και τα αφήσαμε να αναπτυχθούν έως το στάδιο της νύμφης (~7 – 8 ημέρες). Στη δεύτερη, ξεκινώντας από αυγά 48 ωρών χορηγούμε ανά μία ημέρα καλλιέργεια βακτηρίων συμπυκνωμένη κατά $30\times$. Η διατροφή αυτή διήρκησε έως ότου τα έντομα έφτασαν στο στάδιο της νύμφης (8 ημέρες). Οι τρόποι διατροφής ήταν ίδιοι τόσο για το γονίδιο *Gas8* όσο και για το γονίδιο αναφοράς *GFP*.

Η διατροφή των εντόμων διακόπτεται αφού συλλέξουμε από κάθε διατροφή ($125\times$, $30\times$) και από κάθε γονίδιο (*Gas8*, *GFP*) τον επιθυμητό αριθμό προνυμφών και βομβυκίων.

2.3.2.1 Διατροφή με βακτήρια συμπυκνωμένα κατά $125\times$

Σε αυτόν τον τρόπο διατροφής προσθέτουμε περίπου 50 αυγά 48 ωρών σε 20gr τροφής προνυμφών (Πίνακας 2.18).

1. Από το stock γλυκερόλης του βακτηριακού κλώνου, που διαθέτουμε, ενοφθαλμίζουμε 2,5ml LB θρεπτικού υλικού με αντιβιοτικά Tc/Amp και την τοποθετούμε για 12 ώρες στους 37°C , σε 210rpm (O/N).
2. Μεταφέρουμε την καλλιέργεια σε 250ml $2\times$ YT θρεπτικού υλικού, με αντιβιοτικά Tc/Amp.
3. Επωάζουμε την καλλιέργεια στους 37°C και σε 250rpm έως να φτάσει O.D. $600 \cong 0,5$ (~4 ώρες).
4. Επάγουμε την παραγωγή του dsRNA με 0,4mM IPTG και επωάζουμε για 4 ώρες στους 37°C και σε 220rpm.
5. Φυγοκεντρούμε στα 5.000g για 10min και απορρίπτουμε το υπερκείμενο.
6. Με λαβίδα παραλαμβάνουμε το ίζημα και το αναμιγνύουμε με τροφή ώστε να γίνει συμπύκνωση σε τελική συγκέντρωση $125\times$.
7. Μεταφέρουμε το μίγμα στο δοχείο ανάπτυξης των προνυμφών.
8. Αναδεύουμε το μίγμα με την ήδη υπάρχουσα τροφή με μεγάλη προσοχή ώστε να αποφύγουμε τυχόν τραυματισμό των αυγών.
9. Αφήνουμε τα αυγά να εκκολαφθούν και να μεγαλώσουν έως το στάδιο της νύμφης.

2.3.2.2 Διατροφή με βακτήρια συμπυκνωμένα κατά 30×

Σε αυτόν τον τρόπο διατροφής προσθέτουμε περίπου 50 αυγά 48 ωρών σε 2gr τροφής προνυμφών (Πίνακας 2.18).

1. Από το stock γλυκερόλης του βακτηριακού κλώνου, που διαθέτουμε, ενοφθαλμίζουμε 2,5ml LB θρεπτικού υλικού με αντιβιοτικά Tc/Amp και την τοποθετούμε για 12 ώρες στους 37°C, σε 210rpm (O/N).
2. Μεταφέρουμε την καλλιέργεια σε 60ml 2×YT θρεπτικού υλικού, με αντιβιοτικά Tc/Amp.
3. Επωάζουμε την καλλιέργεια στους 37°C και σε 250rpm έως να φτάσει O.D. 600 \cong 0,5 (~2,5 ώρες).
4. Επάγουμε την παραγωγή του dsRNA με 0,4mM IPTG και επωάζουμε για 4 ώρες στους 37°C και σε 220rpm.
5. Φυγοκεντρούμε στα 5.000g για 10min και απορρίπτουμε το υπερκείμενο.
6. Με λαβίδα παραλαμβάνουμε το ίζημα και το αναμιγνύουμε με τροφή ώστε να γίνει συμπύκνωση σε τελική συγκέντρωση 30×.
7. Μεταφέρουμε το μίγμα στο δοχείο που μεγαλώνουν οι προνύμφες.
8. Αναδεύουμε το μίγμα με την ήδη υπάρχουσα τροφή απαλά ώστε να μην τραυματιστούν τα αυγά.
9. Μετά από μια μέρα ακολουθώντας την ίδια διαδικασία χορηγούμε την επόμενη «δόση» τροφής και συνεχίζουμε έως τα έντομα να φτάσουν στο στάδιο της νύμφης.

Τροφή Προνυμφών για ~1kg

Συστατικά	Ποσότητες
Μαγιά μύρας	75,0 gr
Υδρολυμένη σόγια	30,0 gr
Ζάχαρη	20,0 gr
Κυτταρίνη	275,0 gr
Νιπαγίνη	2,0 gr
Σορβικό κάλιο	0,5 gr
Ελαιόλαδο	20,0 ml
Tween - 80	7,5 ml
HCl 2M	30,0 ml
H ₂ O	550,0 ml

Πίνακας 2.18 Συνταγή τροφής προνυμφών.

2.4 ΑΝΑΛΥΣΗ RNA ΣΙΓΗΣΗΣ

Για να μπορέσουμε να διαπιστώσουμε τα επίπεδα σίγησης του γονιδίου *Gas8* πρέπει να μελετήσουμε την έκφρασή του με τη βοήθεια αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (real time – PCR).

Απομονώνουμε RNA από το στάδιο ανάπτυξης του δάκου που μας ενδιαφέρει (προνύμφη και νύμφη) και με αντίστροφη μεταγραφή το μετατρέπουμε σε cDNA. Επιπλέον, κατά τα αναπτυξιακά στάδια του εντόμου, δεν είναι εφικτός ο προσδιορισμός του φύλου. Γι' αυτό πραγματοποιούμε και απομόνωση DNA από κάθε pronύμφη ή νύμφη που απομονώσαμε RNA. Το DNA αυτό το χρησιμοποιούμε για να πραγματοποιήσουμε PCR με ειδικά ζεύγη εκκινητών που θα μας επιτρέψουν να προσδιορίσουμε το φύλο.

2.4.1 Απομόνωση RNA

Η απομόνωση τόσο του RNA όσο και του DNA έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο του αντιδραστηρίου TRI Reagent® (Molecular Research Center) (βλέπε ενότητα 2.4.2).

Προετοιμασία ιστού

1. Συλλέγουμε τους επιθυμητούς ιστούς, τους τοποθετούμε σε μικροσωληνάρια και προσθέτουμε 100μl TRI Reagent®.
2. Με τη βοήθεια εμβόλου ομογενοποιούμε τους ιστούς και στη συνέχεια συμπληρώνουμε TRI Reagent® έως τελικού όγκου 300μl.
3. Αφήνουμε τους ιστούς για 5min σε RT, αναδεύουμε ήπια με vortex και τους αφήνουμε άλλα 5min σε RT.
4. Φυγοκεντρούμε για 10min σε 12.000g και στους 4°C.

Απομόνωση RNA

1. Μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε νέα μικροσωληνάρια και προσθέτουμε BCP (1-Bromo-3-Chloro-Propane) σε αναλογία 0,1ml BCP/1ml TRI Reagent®.
2. Αναδεύουμε δυνατά με το χέρι για 15sec και τα αφήνουμε για 3min σε RT.
3. Φυγοκεντρούμε για 10min σε 12.000g και στους 4°C.
4. Στο μικροσωληνάριο θα δημιουργηθούν τρεις φάσεις. Η άνω φάση (υδατική) περιέχει το RNA, η μεσόφαση περιέχει τις πρωτεΐνες και η κάτω φάση (οργανική) το DNA. Συλλέγουμε με προσοχή την άνω φάση και τη μεταφέρουμε σε νέα μικροσωληνάρια. Τις υπόλοιπες δύο φάσεις τις διατηρούμε στον πάγο για να πραγματοποιήσουμε την απομόνωση του DNA.
5. Στα μικροσωληνάρια, με την άνω φάση, προσθέτουμε ισοπροπανόλη, αναδεύουμε απαλά και αφήνουμε για 8min σε RT σε αναλογία 0,5ml ισοπροπανόλης/1ml TRI Reagent®.
6. Φυγοκεντρούμε για 10min σε 12.000g και στους 4°C. Απορρίπτουμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε 75% αιθανόλη σε αναλογία 1ml αιθανόλης/1ml TRI Reagent®.
7. Φυγοκεντρούμε για 5min σε 12.000g και στους 4°C. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο και αφήνουμε το ίζημα να στεγνώσει για 2 – 3min.

8. Προσθέτουμε 15μl ζεστό dH₂O (55°C) και αναδεύουμε για να διαλυτοποιηθεί το ίζημα.
9. Αποθηκεύουμε το RNA είτε στους -80°C (μακροχρόνια αποθήκευση) είτε στους -20°C (σύντομη αποθήκευση μιας ημέρας).

2.4.2 Απομόνωση DNA

Προετοιμασία ιστού

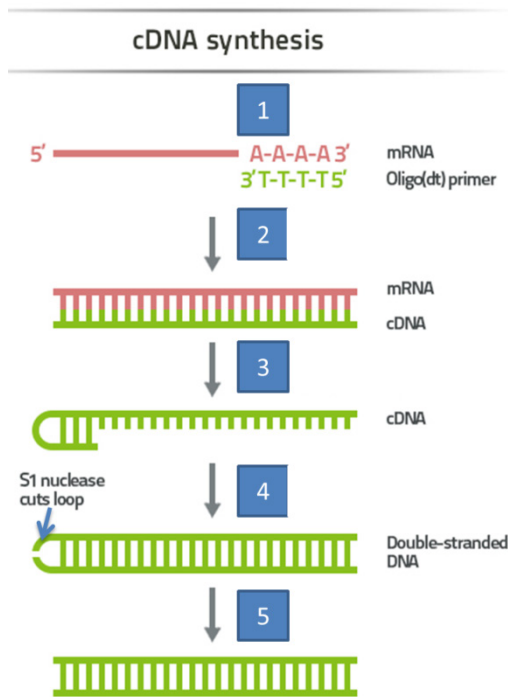
1. Συλλέγουμε τους επιθυμητούς ιστούς, τους τοποθετούμε σε μικροσωληνάρια και προσθέτουμε 100μl TRI Reagent®.
2. Με τη βοήθεια εμβόλου ομογενοποιούμε τους ιστούς και στη συνέχεια συμπληρώνουμε TRI Reagent® έως τελικού όγκου 300μl.
3. Αφήνουμε τους ιστούς για 5min σε RT, αναδεύουμε ήπια με vortex και τους αφήνουμε άλλα 5min σε RT.
4. Φυγοκεντρούμε για 10min σε 12.000g και στους 4°C.

Απομόνωση DNA

1. Στα δείγματα που έχουμε διατηρήσει στον πάγο στο βήμα 4 της απομόνωσης RNA (βλέπε ενότητα 2.4.1) κατακρημνίζουμε το DNA προσθέτοντας αιθανόλη 100% σε αναλογία 0,3ml αιθανόλης/1ml TRI Reagent®.
2. Αφήνουμε τα δείγματα για 2 – 3min σε RT και φυγοκεντρούμε για 5min σε 2.000g.
3. Απορρίπτουμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε διάλυμα Sodium citrate 1M σε 10% EtOH σε αναλογία 1ml Sodium citrate/1ml TRI Reagent®. Αναδεύουμε περιστασιακά για 30min σε RT.
4. Φυγοκεντρούμε για 5min σε 2.000g.
5. Επαναλαμβάνουμε τα βήματα 3 και 4 άλλη μία φορά.
6. Απορρίπτουμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε 75% αιθανόλη σε αναλογία 1,5ml αιθανόλης/1ml TRI Reagent®. Αναδεύουμε περιστασιακά για 10 – 20 min σε RT.
7. Φυγοκεντρούμε για 5min σε 2.000g και στους 4°C. Απορρίπτουμε το υπερκείμενο και στεγνώνουμε το ίζημα για 3 – 5min.
8. Επαναδιαλύουμε το ίζημα σε 20μl 8mM NaOH.
9. Αποθηκεύουμε το DNA στους 4°C

2.4.3 Σύνθεση cDNA

Στη μοριακή Βιολογία το complimentary DNA (cDNA) είναι ένα δίκλωνο μόριο DNA που συντίθεται από το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση (reverse transcriptase), το οποίο χρησιμοποιεί ως εκμαγείο το RNA (πχ. mRNA ή microRNA). Το cDNA συνήθως χρησιμοποιείται για να κλωνοποιήσουμε ευκαρυωτικά γονίδια σε προκαρυωτικά κύτταρα καθώς δεν διαθέτει εσώνια (Croy, 1998) (Εικόνα 2.21).



Εικόνα 2.21 Σχηματική απεικόνιση ενός εκ των τρόπων σύνθεσης cDNA με τη χρήση oligo(dt) εκκινητών.

1. Ένας oligo dT εκκινητής συνδέεται στην 3' πολυ(A) ουρά του κάθε mRNA.
2. Η αντίστροφη μεταγραφή συνθέτει το cDNA χρησιμοποιώντας το RNA ως εκμαγείο.
3. Το υβρίδιο cDNA – RNA που προκύπτει υποβάλλεται σε επεξεργασία με αλκαλικό δ/μα ή με RNase και έτσι υδρολύεται το RNA.
4. Το μονόκλωνο DNA σχηματίζει ένα βρόγχο στο 3' άκρο του ο οποίος χρησιμοποιείται ως εκκινητής για την DNA πολυμεράση που θα συνδέσει τον δεύτερο κλώνο DNA.
5. Μια S1 νουκλεάση θα κόψει τον βρόγχο και έτσι έχουμε το ds cDNA.

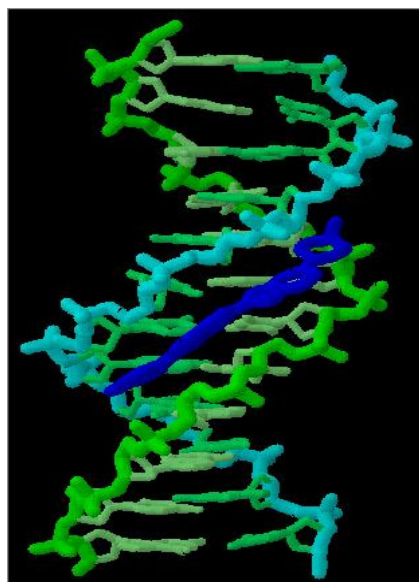
1. Επιλέγουμε τα δείγματά RNA που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν για τη σύνθεση του cDNA.
2. Πραγματοποιούμε αντίδραση καθαρισμού με DNase (βλέπε ενότητα 2.2.2 Πίνακας 2.15).
3. Προσθέτουμε την επιθυμητή ποσότητα RNA και Mix1 (Πίνακας 2.19) στο μικροσωληνάριο.
4. Τοποθετούμε στους 65°C για 5min και αμέσως μεταφέρουμε στον πάγο με σκοπό να σταματήσουμε την αντίδραση.
5. Όσο τα δείγματα είναι στον πάγο προσθέτουμε το Mix2 στο μικροσωληνάριο και τοποθετούμε στους 37°C για 2min.
6. Μεταφέρουμε στον πάγο και προσθέτουμε το ένζυμο M-MLV (Invitrogen) (αντίστροφη μεταγραφή).
7. Τοποθετούμε τα δείγματά μας σε κατάλληλο πρόγραμμα σε έναν θερμικό κυκλοποιητή με σκοπό να ολοκληρωθεί η αντίδραση (Πίνακας 2.19)
8. Αποθηκεύουμε το cDNA στους -20°C.

	Αντιδραστήρια	Ποσότητες	Πρόγραμμα θ. κυκλοποιητή
Mix1	Random Primers 300ng/μl	1μl /αντίδραση	25°C: 10min 37°C: 50min 70°C: 15min
	dNTPs	10mM έκαστο	
	H ₂ O	έως τελικού όγκου	
Mix2	Buffer 5×	4μl	
	DTT 0,1M	2μl	
	RNase inhibitor 40u/μl	1μl	

Πίνακας 2.19 Πρωτόκολλο αντίδρασης σύνθεσης cDNA.

2.4.4 Real – Time PCR

Η real time-PCR πραγματοποιήθηκε σε κυκλοποιητή της BioRad® και χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές Gas8 RT για το γονίδιο στόχο και 14-3-3z για το γονίδιο αναφοράς (Πίνακας 2.22) από προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου (Sagiti et al., 2014) για την ενίσχυση τμήματος 126bp του γονιδίου *Gas8* (Πίνακας 2.20).



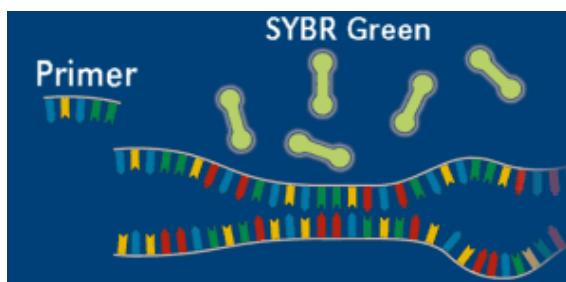
Εικόνα 2.22 Η χρωστική *SYBR Green I* (μπλε χρώμα) που προσδένεται στη μικρή αύλακα του DNA και χρησιμεύει ως ανιχνευτής των προϊόντων PCR.

σηματιστεί μόνο το ειδικό προϊόν PCR, θα είναι ορατή μόνο μια κορυφή στην εικόνα ενδείξεων των σημείων τήξης (Ginzinger, 2002; van der Velden; 2003).

Η απλούστερη τεχνική real time – PCR βασίζεται στην ανίχνευση των προϊόντων της PCR με την ενσωμάτωση της χρωστικής SYBR Green I στο DNA. Η χρωστική αυτή μπορεί να προσδένεται στη μικρή αύλακα του δίκλωνου DNA, όπου ενισχύει σημαντικά τον φθορισμό του (Εικόνα 2.22). Το σήμα φθορισμού αυξάνει σταδιακά κατά τη διάρκεια της φάσης επιμήκυνσης, γίνεται μέγιστο στο τέλος κάθε αντίστοιχης φάσης και μειώνεται ή εκλείπει κατά τη φάση αποδιάταξης (Εικόνα 2.23). Πρέπει να σημειωθεί ότι αυτή η τεχνική δεν παρουσιάζει απόλυτη εξειδίκευση και ότι ταυτόχρονα μπορεί να ανιχνευθούν διμερή των εκκινητών και μη ειδικά προϊόντα PCR. Προκειμένου να εκτιμηθεί αν έχουν σχηματιστεί ειδικά προϊόντα PCR, πραγματοποιείται ανάλυση της καμπύλης τήξης (melting curve). Αν έχει

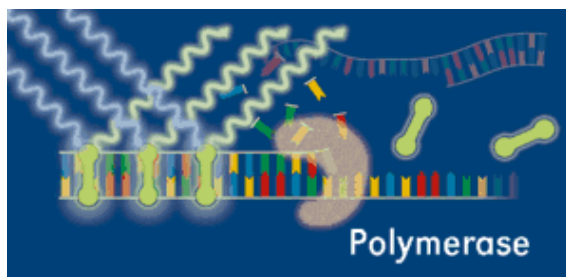
Αντιδραστήρια	Ποσότητες	Πρόγραμμα real time – PCR		
			T °C	Χρόνος
cDNA	5μl από αραιώση 1:10	<i>Αρχική αποδιάταξη</i>	50°C	2 min
			95°C	3 min
Primer Forward	400 nM	<i>Αποδιάταξη</i>	95°C	10 sec
Primer Reverse	400 nM	<i>Υβριδοποίηση εκκινητών</i>	55°C	20 sec
SYBR Green I	2× → 1×	<i>Κλωνική επέκταση</i>	72°C	30 sec
		<i>Melting curve</i>	55°C	κάθε 0,5 sec
ddH ₂ O	Έως τον τελικό όγκο	<i>Τέλος</i>	95°C	ανεβαίνει 0,5°C
Vτ	15μl	<i>Κύκλοι PCR</i>	49	

Πίνακας 2.20 Πρωτόκολλο αντίδρασης real time – PCR.

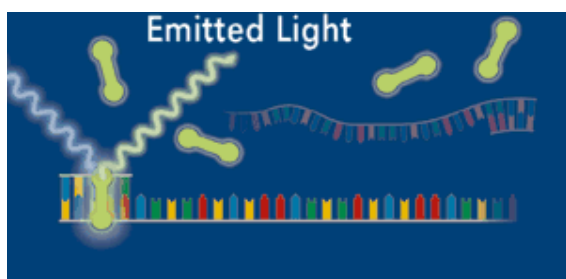


Εικόνα 2.23 Σχηματική αναπαράσταση της ανάλυσης RT-PCR με τη χρήση της χρωστικής SYBR Green I :

Α) Αποδιάταξη του δίκλωνου DNA και χρήση κατάλληλων εκκινητών και μορίων χρωστικής για την επακόλουθη επιμήκυνση και πολλαπλασιασμό των μορίων DNA



Β) Υβριδισμός των ειδικών για τα μόρια DNA εκκινητών και έναρξη της πρόσδεσης μορίων SYBR Green I στη μικρή αύλακα και της ανίχνευσης φθορισμού



Γ) Επιμήκυνση και δημιουργία δίκλωνων μορίων DNA με την ταυτόχρονη πρόσδεση χρωστικής. Στο τέλος της φάσης επιμήκυνσης το σήμα φθορισμού αποκτά τη μέγιστη τιμή.

2.4.5 Έλεγχος του φύλου των εντόμου με PCR

Για τον έλεγχο του φύλου των εντόμων πραγματοποιήσαμε PCR (Πίνακας 2.21) με τους ειδικούς αρρενοειδικούς εκκινητές sc6626 (Πίνακας 2.22) οι οποίοι χρησιμοποιούνται σε άλλη μελέτη του εργαστηρίου μας για το δάκο της ελιάς.

Αντιδραστήρια	Ποσότητες	Πρόγραμμα PCR		
			T °C	Χρόνος
DNA	Επιθυμητή ποσότητα	<i>Αρχική αποδιάταξη</i>	94	3 min
Buffer 10×	1×	<i>Αποδιάταξη</i>	94	30 sec
dNTPs	2,5 mM (έκαστο)	<i>Υβριδοποίηση εκκινητών</i>	55	30 sec
Primer Forward	10 pmol/μl	<i>Κλωνική επέκταση</i>	72	1:30 min
Primer Reverse	10 pmol/μl	<i>Τελική επέκταση</i>	72	5 min
Taq polymerase	1 unit			
ddH ₂ O	Έως τον τελικό όγκο			
Vτ	Επιθυμητός τελικός όγκος	<i>Κύκλοι PCR</i>	30	

Πίνακας 2.21 Πρωτόκολλο αντίδρασης PCR.

2.5 CONTROL GFP

Το γονίδιο αναφοράς που χρησιμοποιήσαμε είναι τμήμα 300bp του γονιδίου της Green Fluorescent Protein (GFP). Το τμήμα αυτό δεν έχει κάποια επίπτωση στον οργανισμό του δάκου και είναι ιδανικό για να λειτουργήσει ως μέτρο σύγκρισης για την διαδικασία της σίγησης.

Ακολουθήθηκαν επακριβώς τα βήματα της διαδικασίας για την πλασμιδιακή κλωνοποίηση του *Gas8* ώστε να δημιουργήσουμε έναν ανασυνδυασμένο πλασμιδιακό φορέα, να μετασηματίσουμε βακτηριακά κύτταρα *E. coli* HT115 DE3, να βρούμε τα μετασηματισμένα βακτήρια και να επιβεβαιώσουμε την ύπαρξη του GFP μέσα σε αυτά.

Τέλος η χρώση των βακτηρίων αυτών και η διατροφή που ακολουθήθηκε για τα έντομα είναι ίδιες όπως και στο γονίδιο στόχο, το *Gas8*.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ

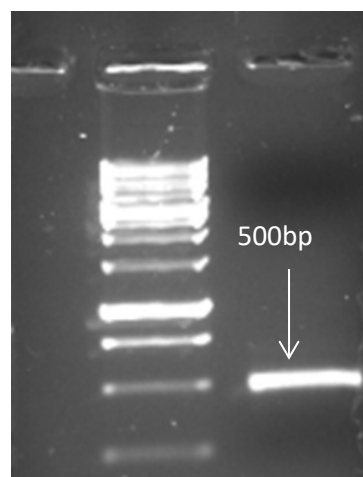
Όνομα εκκινήτων		Αλληλουχία	Tm	Προϊόν
Gas8	Forward	5'-GTTTGAGGTTGAG-3'	53,9°C	500bp
	Reverse	5'-CCATCATGGATATCTTGC-3'	51,6°C	
Gas8 RT	Forward	5'-AGATGGAGCGTGAACGTGAAG-3'	55°C	126bp
	Reverse	5'-CGTGATCCTTGTGACGAACC-3'	55°C	
T7 Universal	Forward	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'	53°C	bp
14-3-3zeta	Forward	5'-GTCTTCTCGACAAACACC-3'	55°C	102bp
	Reverse	5'-CCACCTCAGCTAAATACC-3'	55°C	
sc6626	Forward	5'-TTAGATAGACTCAGGGAACG-3'	55°C	500bp
	Reverse	5'-AATTGAAGTGTAGGCAGAG-3'	55°C	

Πίνακας 2.22 Συγκεντρωτικός πίνακας των αλληλουχιών όλων των εκκινήτων που χρησιμοποιήθηκαν στις διάφορες PCR.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Ενίσχυση και απομόνωση γονίδιου – στόχου

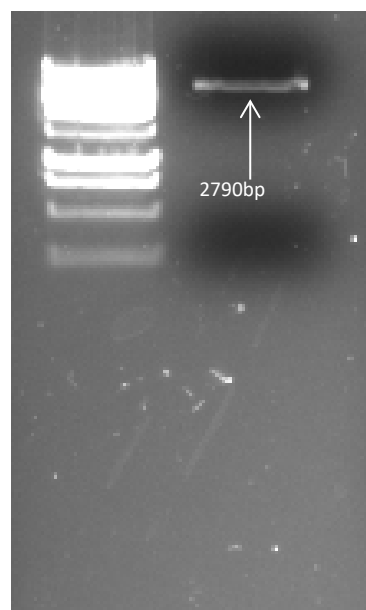
Κατά την πειραματική διαδικασία ενισχύσαμε και απομονώσαμε το γονίδιο στόχο από το γονιδιωματικό DNA ενήλικων ατόμων. Συγκεκριμένα πραγματοποιήσαμε απομόνωση γονιδιωματικού DNA και ενίσχυση, με αντίδραση PCR, τμήματος του γονιδίου *Gas8*. Σχεδιάστηκαν εκκινητές οι οποίοι ενισχύουν τμήμα μεγέθους 500bp (Εικόνα 3.1). Για την αντίδραση χρησιμοποιήσαμε τη High Fidelity Polymerase (KAPA). Ηλεκτροφορήσαμε το προϊόν της PCR και στη συνέχεια απομονώσαμε από το πήκτωμα αγαρόζης (gel extraction) την επιθυμητή ζώνη. Τέλος πραγματοποιήσαμε ηλεκτροφόρηση ποσοτικοποίησης (Εικόνα 3.1). Από τη σύγκριση των ζωνών συμπεράναμε ότι η συγκέντρωση του επιθυμητού τμήματος DNA είναι περίπου 125 – 150 ng/μl. Το τμήμα αυτό το χρησιμοποιήσαμε στη συνέχεια ως ένθεμα για την δημιουργία του ανασυνδυασμένου φορέα.



Εικόνα 3.1 Ηλεκτροφόρηση ποσοτικοποίησης του τμήματος 500bp που ενισχύθηκε.

3.2 Απομόνωση και προετοιμασία πλασμιδιακού φορέα L4440

Απομονώσαμε το φορέα L4440 από κύτταρα *E. coli* XL1 Blue. Καλλιεργήσαμε τα βακτηριακά κύτταρα και απομονώσαμε τον φορέα με το Nucleospin® Plasmid Quick Pure Kit (Macherey – Nagel®). Αμέσως μετά την απομόνωση πραγματοποιήσαμε αντίδραση πέψης του φορέα. Ποσοτικοποιήσαμε την αντίδραση αυτή (Εικόνα 3.2), και υπολογίσαμε ότι η συγκέντρωση του φορέα είναι περίπου 30 ng/μl.



Εικόνα 3.2 Ηλεκτροφόρηση ποσοτικοποίησης του φορέα L4440.

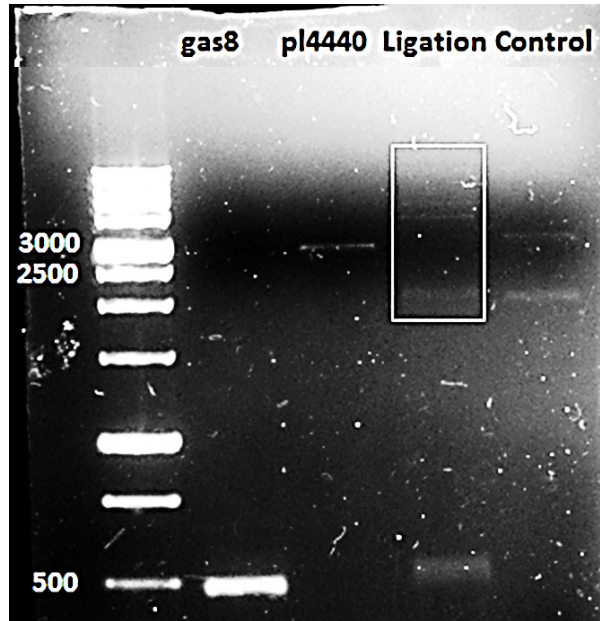
3.3 Δημιουργία ανασυνδυασμένου φορέα – αντίδραση λιγάσης

Έχοντας απομονώσει και ποσοτικοποιήσει τόσο το ένθεμα (500bp, *Gas8*), όσο και τον φορέα (2790bp, L4440), πραγματοποιήσαμε αντίδραση λιγάσης με την T4 DNA ligase (Fermentas). Στη συνέχεια ηλεκτροφορήσαμε σε πήκτωμα αγαρόζης μικρή ποσότητα του προϊόντος της αντίδρασης, τον αρνητικό μάρτυρα, το ένθεμα και

το πλασμίδιο (Εικόνα 3.3). Παρατηρήσαμε το πρότυπο ζωνών των διαφορετικών μορφών που μπορεί να λάβει ένας κυκλικός φορέας κατά τη διάρκεια της αντίδρασης (open circular, closed circular, self ligated).

3.4 Μετασχηματισμός βακτηρίων HT115 (DE3)

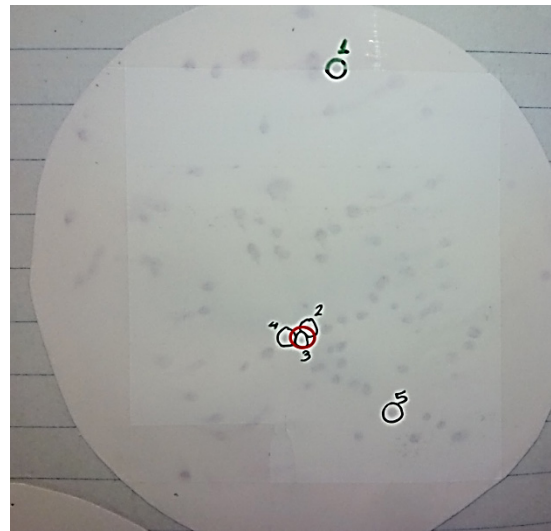
Πραγματοποιήσαμε μετασχηματισμό βακτηριακών κυττάρων HT115 (DE3) με θερμικό σοκ (heat shock). Μετά το μετασχηματισμό απλώσαμε τα κύτταρα σε τρυβλία (petri) με στερεό θρεπτικό LB agar και τα επώασαμε στους 37°C για να αναπτυχθούν αποικίες (Εικόνα 3.4). Στη συνέχεια πραγματοποιήσαμε υβριδισμό κατά Southern στις αποικίες για να δούμε ποιες από αυτές διαθέτουν τον ανασυνδυασμένο φορέα L4440-Gas8 (Εικόνα3.5). Η υβριδοποίηση έγινε με βιοτινυλιωμένο ανιχνευτή συμπληρωματικό για το ένθεμα μήκους 500bp.



Εικόνα 3.3 Ηλεκτροφόρηση αντίδρασης λιγάσης. *gas8*: μόνο το ένθεμα (500bp). *pI4440*: μόνο ο φορέας (2790bp). *Ligation*: αντίδραση λιγάσης. *Control*: αρνητικός μάρτυρας.



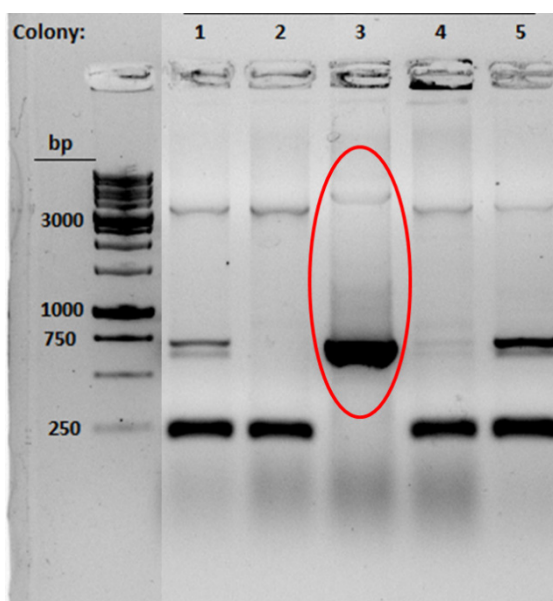
Εικόνα 3.4 Οι αποικίες βακτηρίων που μεγάλωσαν μετά τον μετασχηματισμό. Στις αποικίες αυτές περιλαμβάνονται βακτήρια τα οποία περιέχουν ή τον ανασυνδυασμένο φορέα ή μη ανασυνδυασμένο φορέα. Με βέλος φαίνεται μια από τις αποικίες που φέρουν τον ανασυνδυασμένο φορέα.



Εικόνα 3.5 Μembrάνη κυτταρίνης στην οποία έγινε η μεταφορά των αποικιών του τρυβλίου με σκοπό την εφαρμογή της υβριδοποίησης. Με πράσινο κύκλο φαίνονται ορισμένες από τις αποικίες που επιλέχθηκαν για περαιτέρω έλεγχο. Με κόκκινο κύκλο φαίνεται μια από τις αποικίες που φέρουν τον ανασυνδυασμένο φορέα.

3.5 Έλεγχος αποικιών μέσω Colony PCR

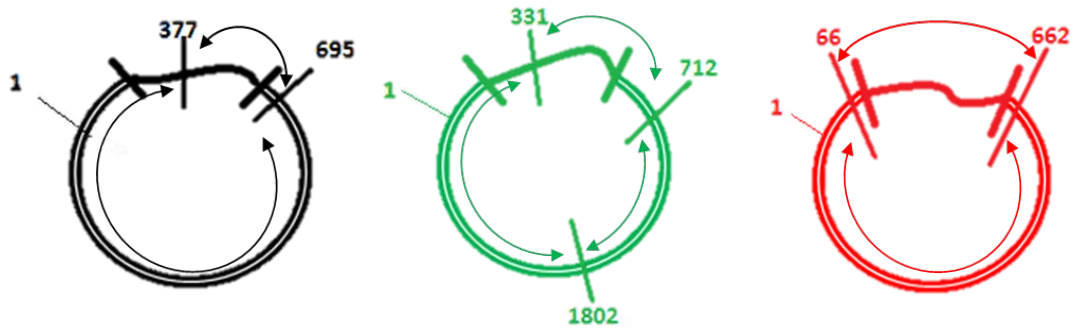
Αμέσως μετά την υβριδοποίηση επιλέξαμε 5 από τις αποικίες του τρυβλίου, που είχαν χρωμογόνο αντίδραση, και πραγματοποιήσαμε Colony PCR για να επιβεβαιώσουμε την ύπαρξη του ανασυνδιασμένου φορέα στην αποικία. Χρησιμοποιήσαμε T7 εκκινητές, η αλληλουχία των οποίων υπάρχει εκατέρωθεν του πολυσυνδέτη συνεπώς και του ενθέματος στον φορέα μας. Στη συνέχεια ηλεκτροφορήσαμε τα προϊόντα των Colony PCRs σε πήκτωμα αγαρόζης (Εικόνα 3.6). Το αναμενόμενο προϊόν της Colony PCR έχει μήκος ~730bp (500bp το ένθεμα + 230bp πολυσυνδέτης). Σε περίπτωση που κάποια αποικία δεν διαθέτει τον ανασυνδυασμένο φορέα η Colony PCR έδινε ως προϊόν μόνο τον πολυσυνδέτη ~230bp. Κατ' αυτό τον τρόπο αναγνωρίσαμε μια από τις 5 αποικίες (αποικία 3, σε κόκκινο κύκλο), η οποία διαθέτει μόνο τον ανασυνδιασμένο φορέα μας. Οι αποικίες 1, 4 και 5 φαίνεται να διαθέτουν τόσο τον ανασυνδυασμένο φορέα όσο και τον μη ανασυνδυασμένο (πιθανώς μικτές αποικίες). Η αποικία 2 διαθέτει μόνο τον μη ανασυνδυασμένο φορέα.



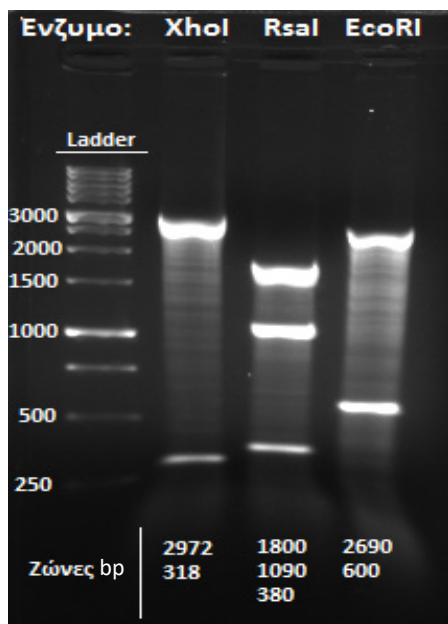
Εικόνα 3.6 Ηλεκτροφόρηση των Colony PCR με σκοπό την επιβεβαίωση ύπαρξης μόνο του ανασυνδυασμένου φορέα (αρνητική εμφάνιση). Αποικίες 1, 4 και 5 φαίνεται να διαθέτουν τόσο τον ανασυνδυασμένο φορέα όσο και τον μη ανασυνδυασμένο (πιθανώς αποικίες από δύο διαφορετικά βακτήρια που ενώθηκαν. Η αποικία 2 διαθέτει μόνο τον μη ανασυνδυασμένο φορέα. Σε κόκκινο κύκλο η αποικία 3 η οποία φέρει μόνο τον ανασυνδυασμένο φορέα.

3.6 Επιβεβαίωση της παρουσίας του ενθέματος μετά από πέψη με ένζυμα περιορισμού

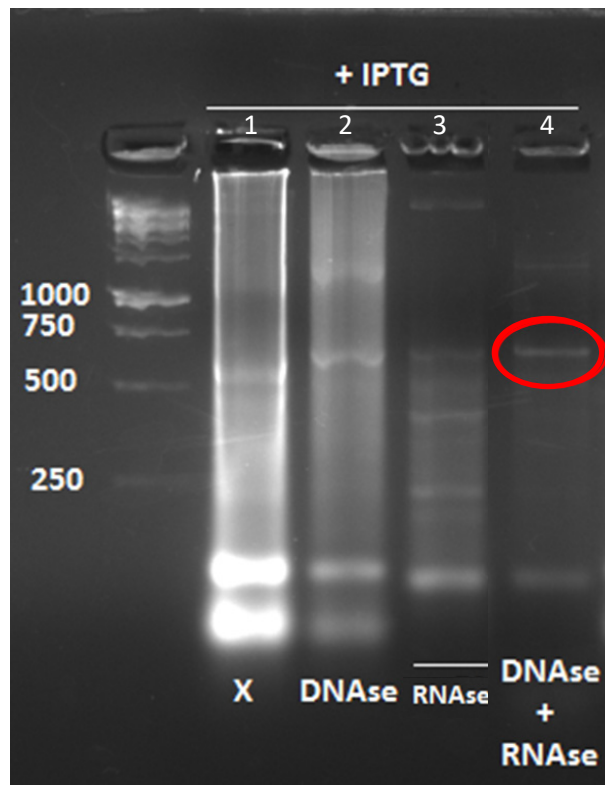
Παρά το γεγονός ότι η Colony PCR μας έδωσε προϊόν ~730bp, που σημαίνει ότι διαθέτουμε το ένθεμα στο πλασμίδιο, αποφασίσαμε να κάνουμε μία επιπλέον επιβεβαίωση πραγματοποιώντας πέψεις με ένζυμα περιορισμού. Πριν πραγματοποιήσουμε τις πέψεις ήταν αναγκαίο να δούμε ποια ένζυμα περιορισμού μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε. Με τη βοήθεια του προγράμματος OMIGA® δημιουργήσαμε εικονικά τον ανασυνδυασμένο φορέα μας. Κατόπιν εντοπίσαμε, με τη βοήθεια του ίδιου προγράμματος, τις θέσεις κοπής για τα τρία διαφορετικά ένζυμα περιορισμού XhoI, RsaI και EcoRI (Εικόνα 3.7). Στη συνέχεια πραγματοποιήσαμε τις πέψεις και τα προϊόντα των πέψεων ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης (Εικόνα 3.8).



Εικόνα 3.7 Θέσεις κοπής στον ανασυνδυασμένο φορέα L4440-Gas8. Με μαύρο: θέσεις κοπής XhoI. Με πράσινο: θέσεις κοπής RsaI. Με κόκκινο: θέσεις κοπής EcoRI.



Εικόνα 3.8 Ηλεκτροφόρηση των πέψεων με τα ένζυμα περιορισμού XhoI, RsaI και EcoRI. Στο κάτω μέρος της εικόνας φαίνονται τα ακριβή μεγέθη των ζωνών.



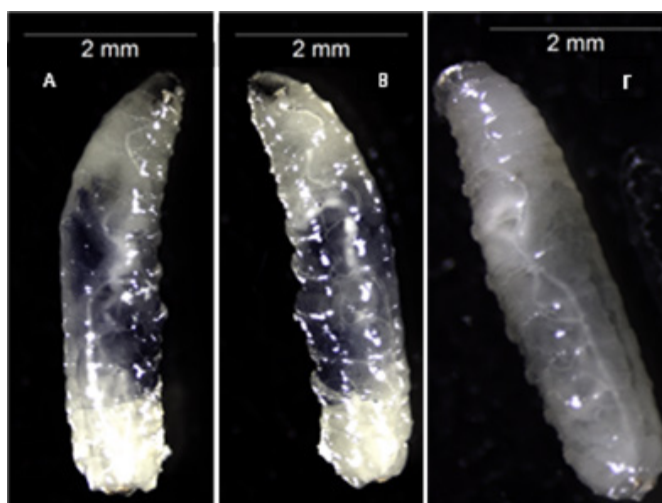
Εικόνα 3.9 Ηλεκτροφόρηση των διαφόρων καθαρισμών του δείγματος που απομονώθηκε. 1) Χωρίς κάποιον καθαρισμό. 2) Μόνο με καθαρισμό από DNase. 3) Μόνο με καθαρισμό από RNase. 4) Με καθαρισμό τόσο από DNase όσο και από RNase. Σε κόκκινο κύκλο το dsRNA.

3.7 Έκφραση του dsRNA από τα βακτηριακά κύτταρα

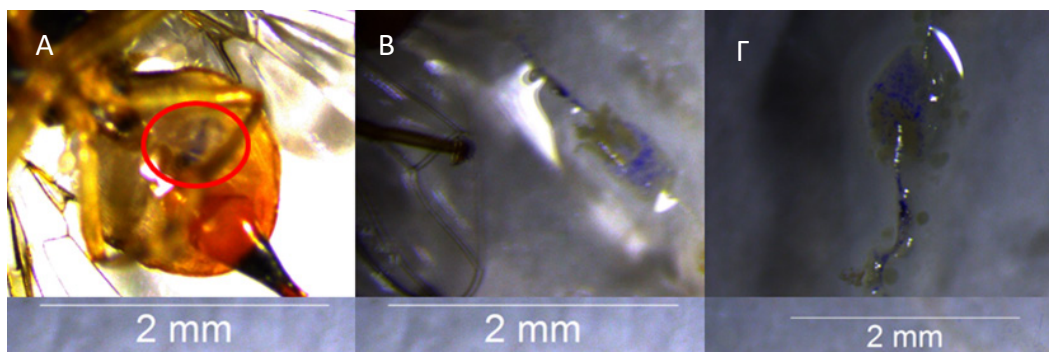
Σε επόμενο στάδιο έγινε επαγωγή της έκφρασης του dsRNA ώστε να επιβεβαιώσουμε ότι το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο που εισαγάγαμε στα βακτηριακά κύτταρα είναι λειτουργικό. Η επαγωγή του dsRNA γίνεται με την καλλιέργεια των βακτηρίων μαζί με IPTG. Αμέσως μετά απομονώσαμε τα νουκλεϊκά οξέα από τα κύτταρα της καλλιέργειας. Στη συνέχεια πραγματοποιήσαμε καθαρισμό μέρους του δείγματος με DNase και RNase και τα ηλεκτροφορήσαμε σε πήκτωμα αγαρόζης (Εικόνα 3.9). Ως θετικούς μάρτυρες της λειτουργίας των DNase και RNase πραγματοποιήσαμε και καθαρισμό τόσο μόνο με DNase όσο και μόνο με RNase.

3.8 Καλλιέργεια και χρώση βακτηρίων

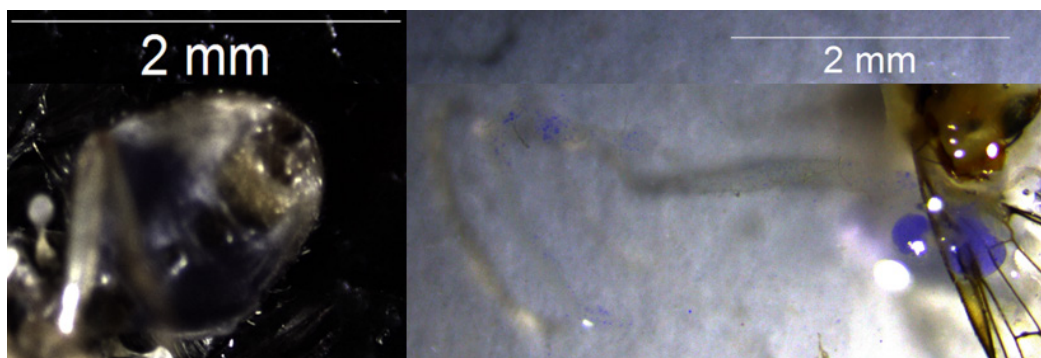
Τα έντομα συτίστηκαν με βακτήρια τα οποία είχαν μεγαλώσει σε θρεπτικό που περιείχε τη χρωστική Coomassie Brilliant Blue R-250 η οποία τα χρωμάτιζε μπλέ. Παρατηρώντας, κατά τη διάρκεια της διατροφής, τις κοιλίες τους διαπιστώσαμε ότι ο πεπτικός τους σωλήνας ήταν μπλε. Αυτό σημαίνει ότι τα βακτήρια είχαν εισέλθει στον πεπτικό τους σωλήνα (Εικόνες 3.10, 3.11, 3.12).



Εικόνα 3.10 Α) και Β) δεξί και αριστερό προφίλ προνύμφης. Φαίνεται καθαρά ο μπλε πεπτικός σωλήνας. Γ) ως αρνητικός μάρτυρας προνύμφη η οποία δεν σιτίζονταν με βακτήρια.



Εικόνα 3.11 Α) σε κόκκινο κύκλο διαφαίνεται τμήμα του μπλε πεπτικού σωλήνα στην κοιλία θηλυκού ατόμου. Β) και Γ) τμήματα του πεπτικού του σωλήνα.



Εικόνα 3.12 Αριστερά κοιλία αρσενικού ατόμου. Το μπλε χρώμα οφείλεται στα βακτήρια που εισήλθαν στον πεπτικό σωλήνα μέσω της τροφής. Δεξιά τμήμα του πεπτικού του σωλήνα.

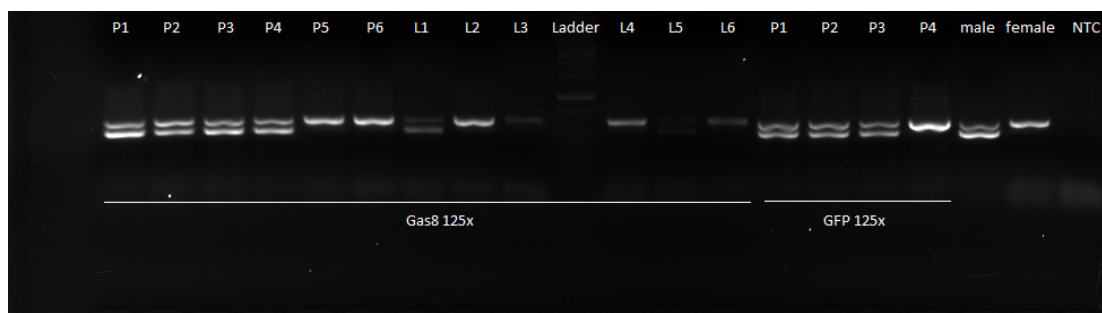
3.9 Διατροφή και επιλογή των εντόμων

Ακολουθήθηκαν δύο διαφορετικές διατροφικές προσεγγίσεις, τόσο για το γονίδιο *Gas8*, όσο και για το γονίδιο αναφοράς *GFP*. Στην πρώτη προσέγγιση χορηγήσαμε σε αυγά 48 ωρών 125× συμπυκνωμένη καλλιέργεια χρωματισμένων βακτηρίων μία φορά και τα αφήσαμε να αναπτυχθούν. Στη δεύτερη προσέγγιση

χορηγούσαμε σε αυγά 48 ωρών 30× συμπυκνωμένη καλλιέργεια χρωματισμένων βακτηρίων ανά 48ωρο. Σε κάθε διατροφική προσέγγιση εναποθέσαμε αρχικά ~50 αυγά. Και στις δύο περιπτώσεις σταματήσαμε τη διατροφή όταν τα έντομα έφτασαν στο στάδιο της νύμφης. Στην πρώτη προσέγγιση τα έντομα αναπτύχθηκαν μέσα στα φυσιολογικά χρονικά όρια των 7 – 8 ημερών. Στη δεύτερη προσέγγιση παρατηρήθηκε μια καθυστέρηση της ανάπτυξης των εντόμων κατά 1 – 2 ημέρες συγκριτικά με τα έντομα της πρώτης προσέγγισης. Σε κάθε προσέγγιση αναπτύχθηκε το 95% των νυμφών. Από κάθε προσέγγιση επιλέχθηκαν έξι προνύμφες τρίτου σταδίου και έξι νύμφες 1^{ου} σταδίου για ανάλυση RNA σίγησης.

3.10 Ανάλυση RNA σίγησης

Πριν την ανάλυση της RNA σίγησης πραγματοποιήσαμε απομόνωση DNA και RNA από τους επιλεγμένους ιστούς. Το RNA το χρησιμοποιήσαμε για να συνθέσουμε το cDNA το οποίο χρησιμοποιείται για την ανάλυση της σίγησης μέσω real – time PCR. Το DNA το χρησιμοποιήσαμε για να πραγματοποιήσουμε PCR με κατάλληλους εκκινητές με σκοπό την αναγνώριση του φύλλου των εντόμων, δεδομένου ότι στα στάδια των προνυμφών και των νυμφών δεν είναι δυνατός αυτός ο διαχωρισμός (Εικόνα 3.15).

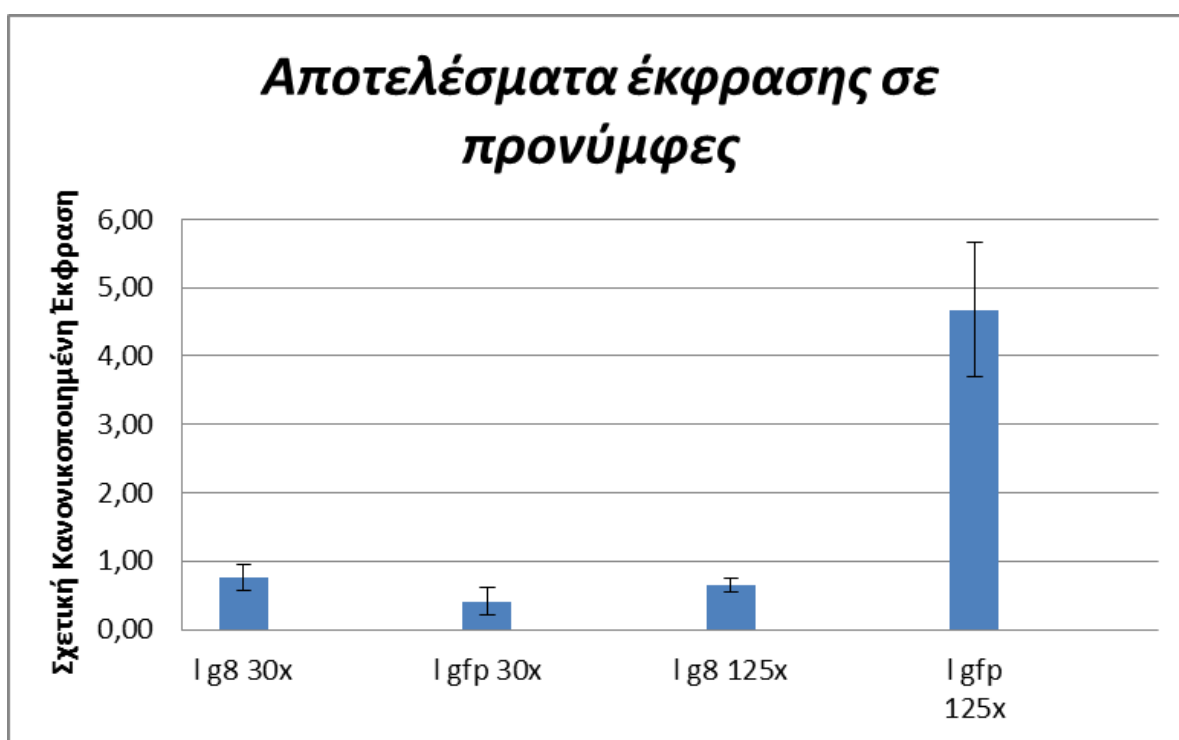


Εικόνα 3.13 Στην εικόνα φαίνονται τα αποτελέσματα της PCR για τον έλεγχο του φύλλου σε ορισμένα από τα δείγματα. Με δύο ζώνες είναι τα αρσενικά ενώ με μία τα θηλυκά. P: προνύμφη (Pupa), L: νύμφη (Larva), male: αρσενικός θετικός μάρτυρας, female: θηλυκός θετικός μάρτυρας, NTC: αρνητικός μάρτυρας.

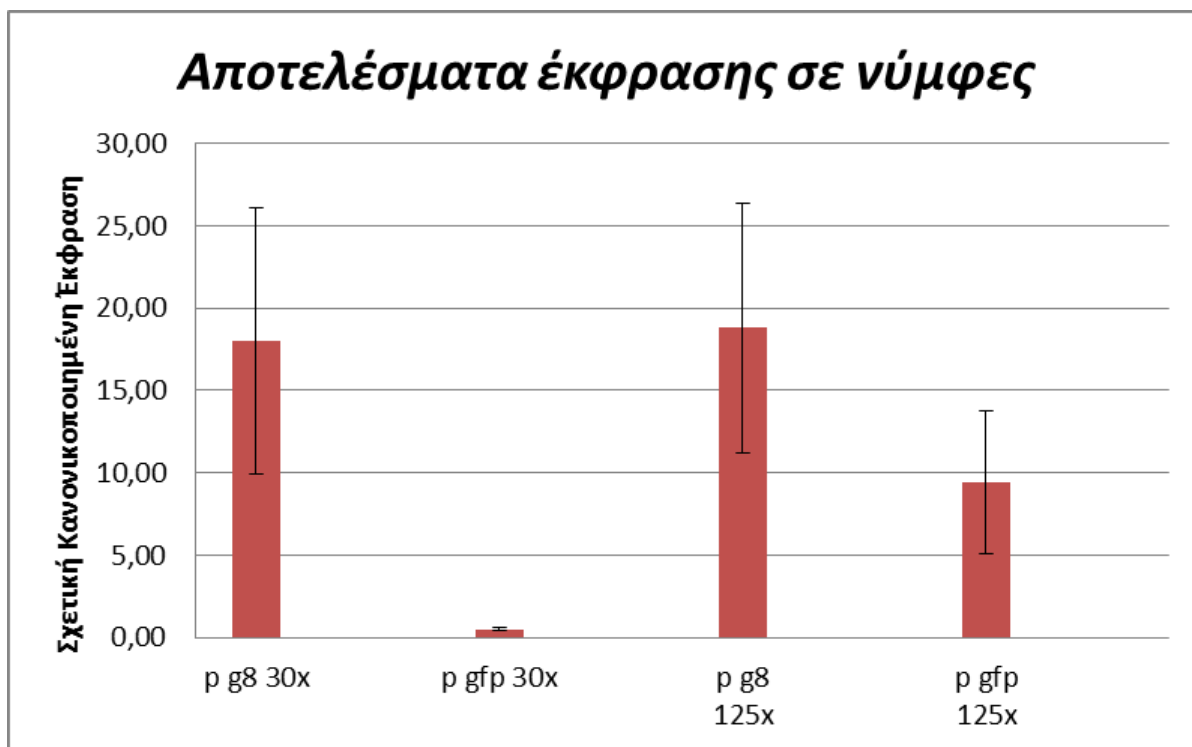
Στην Εικόνα 3.13 παρατηρούμε τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης για τον καθορισμό του φύλλου προνυμφών και νυμφών που διατρέφονταν με συμπυκνωμένη καλλιέργεια 125× βακτηρίων που παρήγαγαν το dsRNA του γονιδίου στόχου *Gas8* και νυμφών που διατρέφονταν με συμπυκνωμένη καλλιέργεια 125× βακτηρίων που παρήγαγαν το dsRNA του γονιδίου αναφοράς *GFP*. Παρατηρούμε ότι με τη βοήθεια των αρρενοειδικών εκκινητών που χρησιμοποιήσαμε κατέστη δυνατός ο ξεκάθαρος διαχωρισμός του φύλλου.

Παρακάτω παρατίθενται τα διαγράμματα με την ανάλυση των αποτελεσμάτων της real time – PCR. Στα αυτά διαγράμματα συγκρίνουμε το αποτέλεσμα της real time – PCR για το γονίδιο στόχο μας (*Gas8*) με το αποτέλεσμα για το γονίδιο αναφοράς (control) (*GFP*) με σκοπό να διακρίνουμε εάν έγινε ή όχι σίγηση του γονιδίου – στόχου. Όταν, δηλαδή, τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου – στόχου είναι

χαμηλότερα από αυτά του control τότε υπάρχει ένα ποσοστό σίγησης. Αντίθετα όταν είναι υψηλότερα από αυτά του control τότε η σίγηση είναι ανεπιτυχής. Το Διάγραμμα 3.1 αφορά τα αποτελέσματα για τις προνύμφες της πρώτης διατροφής με συμπυκνωμένη καλλιέργεια βακτηρίων 125× και της δεύτερης διατροφής με συμπυκνωμένη καλλιέργεια 30×. Αντίστοιχα, το Διάγραμμα 3.2 αφορά τα αποτελέσματα για τις νύμφες και των δύο διατροφών. Τόσο το Διάγραμμα 3.1 όσο και το 3.2 παρουσιάζουν τη Σχετική Κανονικοποιημένη Έκφραση (Relative Normalized Expression) για το γονίδιο – στόχο.



Διάγραμμα 3.1 Στο διάγραμμα αυτό βλέπουμε τη σχετική κανονικοποιημένη έκφραση του γονιδίου – στόχου *Gas8* σε προνύμφες οι οποίες τράφηκαν με καλλιέργεια βακτηρίων που παρήγαγαν το *dsRNA* είτε συμπυκνωμένη κατά 30× είτε κατά 125×. *l*: *larvae* (προνύμφη), *g8*: διατροφή με *Gas8 dsRNA*, *gfp*: διατροφή με *GFP dsRNA*, 30×: καλλιέργεια συμπυκνωμένη κατά 30 φορές, 125×: καλλιέργεια συμπυκνωμένη κατά 125 φορές.



Διάγραμμα 3.2 Στο διάγραμμα αυτό βλέπουμε τη σχετική κανονικοποιημένη έκφραση του γονιδίου – στόχου *Gas8* σε νύμφες οι οποίες τράφηκαν με καλλιέργεια βακτηρίων που παρήγαγαν το dsRNA είτε συμπυκνωμένη κατά 30x είτε κατά 125x. *l: larvae* (προνύμφη), *g8*: διατροφή με *Gas8* dsRNA, *gfp*: διατροφή με GFP dsRNA, 30x: καλλιέργεια συμπυκνωμένη κατά 30 φορές, 125x: καλλιέργεια συμπυκνωμένη κατά 125 φορές.

Αυτό που προκύπτει από την ανωτέρω ανάλυση είναι ότι στις προνύμφες που τράφηκαν με συμπυκνωμένη καλλιέργεια βακτηρίων 125x υπάρχει μια εμφανής σίγηση του γονιδίου – στόχου της τάξεως του 86,08%. Αντίθετα στις προνύμφες που τράφηκαν με συμπυκνωμένη καλλιέργεια βακτηρίων 30x δεν προκύπτει αυτό το αποτέλεσμα καθώς τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου – στόχου είναι υψηλότερα από αυτά του γονιδίου αναφοράς. Όσον αφορά τις νύμφες, αυτές που τράφηκαν με συμπυκνωμένη καλλιέργεια βακτηρίων 30x του γονιδίου – στόχου έχει υψηλότερα επίπεδα έκφρασης από το control, ενώ αυτές που τράφηκαν με 125x δεν εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η τεχνολογία της RNA παρεμβολής (RNAi) είναι ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο εργαλείο για τις μελέτες της αντίστροφης γενετικής στη μελέτη της λειτουργίας των γονιδίων (Silva et al., 2004). Παράλληλα, τεχνολογίες βασισμένες στην RNAi αρχίζουν να αναπτύσσονται με εφαρμογή σε διάφορους τομείς όπως η βελτιστοποίηση των καλλιεργειών και ο έλεγχος του πληθυσμού των εντόμων (Katoch et al., 2013; Zhang et al., 2013). Στον τομέα του ελέγχου του πληθυσμού των εντόμων σημαντικό αναπτυσσόμενο κομμάτι αποτελούν τεχνικές οι οποίες στοχεύουν στη στείρωση των αρσενικών εντόμων. Τα στείρα αρσενικά στο περιβάλλον, ανταγωνίζονται με τα αρσενικά άτομα του γηγενούς πληθυσμού για τα διαθέσιμα προς ζευγάρωμα θηλυκά και έτσι επιτυγχάνεται ο έλεγχος του πληθυσμού. Αυτό μπορεί να εφαρμοστεί με διάφορους τρόπους. Ενδεικτικά παραδείγματα είναι η τεχνική του στείρου εντόμου (SIT) και ο ψεκασμός των ελαιόδεντρων με dsRNA ενός γονιδίου – στόχου. Οι δύο αυτές τεχνικές αν και έχουν διαφορετικές αρχές εφαρμογής και λειτουργίας αποσκοπούν και οι δύο στην στείρωση των εντόμων. Για το λόγο αυτό έγινε και η επιλογή του γονιδίου *Gas8*. Το *Gas8* είναι ένα γονίδιο το οποίο φέρεται να εμπλέκεται στην κινητικότητα του σπέρματος (www.uniprot.org). Ο ρόλος αυτός το καθιστά ιδανικό στόχο για την επίτευξη της στείρωσης σε αρσενικά έντομα.

Ένα από τα βασικότερα προβλήματα που προκύπτουν σε αυτές τις εφαρμογές είναι ο προσδιορισμός της κατάλληλης συγκέντρωσης στην οποία θα χορηγηθεί το dsRNA ώστε να επιτευχθεί το επιθυμητό αποτέλεσμα. Η αποτελεσματικότητα της RNAi διαφέρει από οργανισμό σε οργανισμό με αποτέλεσμα σε κάθε νέο οργανισμό που προσπαθούμε να την εφαρμόσουμε οι κατάλληλες συνθήκες να πρέπει να υπολογιστούν ξανά από την αρχή (Wynant et al., 2014).

Οι Li *et al.* (2011), οι οποίοι εφάρμοσαν στην εργασία τους την RNAi μέσω τροφής με απώτερο σκοπό την σίγηση τεσσάρων γονιδίων του *Bactrocera dorsalis*, ακολούθησαν ένα μοτίβο διατροφής στο οποίο τάζαν τα έντομα με καλλιέργεια βακτηρίων συμπυκνωμένη κατά 250×. Τα αποτελέσματά τους ήταν άκρως ενθαρρυντικά καθώς κατάφεραν να επιτύχουν τη σίγηση των γονιδίων – στόχων. Σε αντίθεση με τους Li *et al.* τα δικά μας αποτελέσματα δεν είχαν αναμενόμενη επιτυχία. Πιο συγκεκριμένα θρέψαμε και εμείς τα έντομά μας με συμπυκνωμένη καλλιέργεια βακτηρίων κατά 250×. Από τα εκατό, περίπου, αυγά που ξεκίνησαν σε αυτή τη διατροφή μόνο τα τρία κατάφεραν να φτάσουν στο στάδιο της νύμφης. Επιπλέον παρατηρήθηκε μια καθυστέρηση της ανάπτυξης των εντόμων κατά επτά ημέρες σε σχέση με τον εργαστηριακό πληθυσμό. Πιθανολογούμε ότι αυτό μπορεί να οφείλεται σε δύο λόγους. Πρώτον, η επιπλέον υγρασία που προστέθηκε στην τροφή των εντόμων δεν επέτρεψε τα αυγά να αναπτυχθούν καθόλου και δεύτερον η συγκέντρωση των βακτηρίων στον πεπτικό σωλήνα των εντόμων ήταν πολύ μεγάλη. Πιθανόν ο υπερπληθυσμός βακτηρίων καταλάωνε τα θρεπτικά συστατικά και δεν επέτρεπε στα έντομα να θρέφονται σωστά. Αυτό οδηγούσε στην ανάπτυξη μόνο του 3% των εντόμων και στην υστέρηση της ανάπτυξης σε ποσοστό 97%. Η σύγκριση των αποτελεσμάτων των δύο προαναφερθέντων εργασιών οδηγούν στο συμπέρασμα

ότι η αποτελεσματικότητα της RNAi διαφέρει από οργανισμό σε οργανισμό. Το συμπέρασμα αυτό ενισχύεται και από τα αποτελέσματα της εργασίας των Wang *et al.* (2016) οι οποίοι σύγκριναν τα αποτελέσματα της RNAi σε τέσσερεις διαφορετικούς οργανισμούς (*P. americana*, *Z. atratus*, *L. migratoria*, *S. litura*). Σε αυτή την εργασία διαπίστωσαν ότι τα επίπεδα σίγησης διέφεραν από οργανισμό σε οργανισμό τόσο στον τρόπο χορήγησης του dsRNA όσο και στη συγκέντρωση του χορηγούμενου dsRNA. Σε ότι αφορά τη χορήγηση μέσω διατροφής τα υψηλότερα επίπεδα σίγησης (47%) παρατηρήθηκαν στο έντομο *P. americana* και σε συγκέντρωση 25μg dsRNA. Επιπλέον τα επίπεδα σίγησης διαφέρουν και ανάμεσα στα αναπτυξιακά στάδια. Εμείς πραγματοποιήσαμε σίγηση σε προνύμφες και νύμφες ενώ οι Wang *et al.* σε ενήλικα άτομα. Αυτό, όμως, δεν αναιρεί την διαπίστωση τους για τις διαφορές ανάμεσα στους διάφορους οργανισμούς.

Στη συνέχεια προχωρήσαμε στην εφαρμογή δύο νέων μοτίβων διατροφής με συμπυκνωμένες καλλιέργειες 30× και 125×. Οι δύο αυτές διατροφικές διαδικασίες, σε αντίθεση με την διατροφή των 250×, έδωσαν πολύ μεγαλύτερα ποσοστά ανάπτυξης των εντόμων. Στις δύο αυτές περιπτώσεις παρατηρήθηκε ανάπτυξη των εντόμων μέχρι το στάδιο της νύμφης σε ποσοστό 95%. Σε ότι αφορά την ανάπτυξη των συγκεκριμένων εντόμων έγινε μέσα στα φυσιολογικά πλαίσια ανάπτυξης 7-8 ημερών σε αντίθεση με τη διατροφή των 250× όπου παρατηρήθηκε η υστέρηση της ανάπτυξης. Το ίδιο ποσοστό ανάπτυξης παρατηρήθηκε και στις καλλιέργειες αναφοράς στις οποίες τα έντομα θρέφονταν με βακτήρια τα οποία εξέφραζαν το dsRNA του γονιδίου αναφοράς *GFP*. Οι Tian *et al.* (2009) χρησιμοποίησαν τρεις διαφορετικές διατροφές για τις προνύμφες του εντόμου *S. exigua* με συμπυκνώσεις καλλιέργειας 250×, 50× και 10×. Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα είδαμε ότι στην διατροφή με τη συμπύκνωση 250× το 88,64% των εντόμων τους έφτασαν στο στάδιο της νύμφης ενώ σύμφωνα με τη μελέτη τους και οι άλλες δύο συμπυκνώσεις είχαν παρόμοια αποτελέσματα χωρίς να παρουσιάζουν κάποια σημαντική απόκλιση από την συμπύκνωση 250×.

Τα αποτελέσματα της διατροφής με συμπυκνωμένη καλλιέργεια βακτηρίων 125× έδειξαν μια ικανοποιητική σίγηση του γονιδίου – στόχου στις προνύμφες της τάξεως του 86,08%. Οι Singh *et al.* (2013) στην εργασία τους παρουσίασαν σίγηση τεσσάρων γονιδίων σε προνύμφες του *Aedes aegypti* με τα ποσοστά σίγησης να κυμαίνονται από το 30% έως το 50% ανάλογα με το γονίδιο – στόχο. Σε άλλη εργασία οι Jing Yang & Zhao-jun Han (2014) πραγματοποίησαν σίγηση του γονιδίου της *υπερελικοειδούς πρωτεΐνης (USP)* σε προνύμφες μέσω διατροφής με βακτήρια που παρήγαγαν το κατάλληλο dsRNA. Στα αποτελέσματα της εργασίας τους παρουσιάζουν τη σίγηση του γονιδίου *USP* με ποσοστό 40,3%. Συγκρίνοντας τα αποτελέσματά μας στο στάδιο της προνύμφης με τις δύο προαναφερθείσες εργασίες θεωρούμε ότι είναι άκρως ενθαρρυντικά.

Στη διατροφή με τη συμπύκνωση 125× η σίγηση στις προνύμφες δεν διατηρήθηκε και στις νύμφες καθώς εκεί παρατηρήθηκε επαύξηση της έκφρασης του γονιδίου – στόχου. Επιπλέον, τα αποτελέσματα της διατροφής με συμπυκνωμένη

καλλιέργεια βακτηρίων 30× ήταν αρνητικά. Παρατηρήσαμε ότι το γονίδιο – στόχος παρέμενε σε υψηλά επίπεδα έκφρασης τόσο στις προνύμφες όσο και στις νύμφες. Στο στάδιο της νύμφης στο έντομο επέρχονται ριζικές μορφολογικές αλλαγές. Σε αυτό το στάδιο λαμβάνει χώρα ιστόλυση και ιστογένεση (Agrell, 1951), διαδικασίες κατά τις οποίες πρωτεάσες και δεοξυριβονουκλεάσες εκφράζονται σε υψηλά επίπεδα. Έτσι, μπορούμε να υποθέσουμε θεωρούμε ότι οι πρωτεάσες σε συνδυασμό με τις δεοξυριβονουκλεάσες, εκτός από πρωτεΐνες και DNA των κυττάρων του οργανισμού, θα μπορούσαν να αρχίσουν να αποδομούν τόσο το γενετικό υλικό των βακτηρίων όσο και συστατικά της μεμβράνης τους με αποτέλεσμα αυτά να οδηγούνται σε λύση. Αυτή η λύση οδηγεί σε ελάττωση του δυναμικού των βακτηρίων στο εσωτερικό του πεπτικού σωλήνα της νύμφης με αποτέλεσμα να μην παράγεται η απαραίτητη ποσότητα που παράγονταν προηγουμένως.

Επιπλέον, το dsRNA από τη στιγμή που απελευθερώνεται μέσα στον οργανισμό είτε με μικροένεση είτε μέσω τροφής μέχρι να φτάσει στον ιστό που βρίσκεται το γονίδιο – στόχος πρέπει να ξεπεράσει ορισμένα εμπόδια. Αρκετοί είναι οι μηχανισμοί που έχουν προταθεί για την ανοχή των εντόμων στην RNAi και πολλοί έχουν αποδειχθεί πειραματικά. Επιγραμματικά αναφέρουμε την αποικοδόμηση του dsRNA στην αιμολέμφο, τη μειωμένη πρόσληψη dsRNA από τα κύτταρα και τη μειωμένη επαγωγή των συστατικών του μηχανισμού της RNAi κατά την έκθεση του οργανισμού στο dsRNA. Στις παραγράφους που ακολουθούν θα προσπαθήσουμε να αναπτύξουμε, εν συντομία, τους προαναφερθέντες μηχανισμούς με απώτερο σκοπό να διαφανούν τα προβλήματα που έχει να αντιμετωπίσει η RNAi από τη στιγμή που το dsRNA θα εισέλθει στον οργανισμό.

Όσον αφορά την αιμολέμφο, συγκρίνοντας τα αποτελέσματα των Wang *et al.* (2016) και των Jayendra *et al.* (2016) παρατηρούμε πως και οι δύο συγκλίνουν στο συμπέρασμα ότι τα συστατικά της αιμολέμφου εκάστου εντόμου διαδραματίζουν σημαίνοντα ρόλο στην ευκολία ή δυσκολία επιτυχίας της RNAi. Τα έντομα έχουν ένα ανοικτό κυκλοφορικό σύστημα και τα όργανα είναι μέσα στην αιμολέμφο. Πιο συγκεκριμένα οι Wang *et al.* (2016) υποστηρίζουν ότι αυτό έχει ως αποτέλεσμα η περιεκτικότητα σε dsRNA της αιμολέμφου μπορεί να είναι μια σημαντική παράμετρος που υποδεικνύει αμέσως όχι μόνο τις εσωτερικές δόσεις των dsRNA στα διάφορα όργανα και κύτταρα, αλλά και τη δυναμική του μεταβολισμού του στα έντομα.

Οι μηχανισμοί με τους οποίους το dsRNA εισέρχεται στα κύτταρα του οργανισμού δεν είναι ακόμη σαφείς, όμως η έρευνα στον *C. elegans* και στη *D. melanogaster* έφεραν στο προσκήνιο δύο μονοπάτια (Tomoyasu *et al.*, 2008). Το πρώτο μονοπάτι εμπλέκει μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη – κανάλι (SID-1/-2). Το δεύτερο μονοπάτι είναι αυτό της ενδοκυττάρωσης. Στο πρώτο μονοπάτι οι πρωτεΐνες SID-1 και SID-2 συνεργάζονται μεταξύ τους και οδηγούν στην πρόσδεση του dsRNA στη μεμβράνη, στην μεταφορά του στο εσωτερικό του κυττάρου και στην απελευθέρωση σε αυτό (Whangbo *et al.*, 2008). Σε έντομα, όπως η *Drosophila*, τα οποία στερούνται ορθόλογα του γονιδίου *SID-1* η είσοδος του dsRNA γίνεται με

ενδοκυττάρωση (δεύτερο μονοπάτι) (Whyard *et al.*, 2009). Είναι κατανοητό λοιπόν πως οποιαδήποτε αναστολή ενός μονοπατιού, για οποιονδήποτε λόγο, δεν επιτρέπει το εξωγενές dsRNA να εισέλθει στο κύτταρο αποτρέποντας τη σίγηση του γονιδίου – στόχου.

Στην εργασία τους οι Garbutt και Reynolds (2012) διερεύνησαν κατά πόσον η έκφραση των συστατικών του μηχανισμού της RNAi αυξάνεται ως απόκριση στο dsRNA στις προνύμφες του εντόμου *M. sexta*. Τα πειράματά τους με μικροένεση αποκάλυψαν ότι τα επίπεδα των mRNA της Dicer-2 και, σε μικρότερο βαθμό, των mRNA της Argonaute-2 ήταν αυξημένα μετά την ένεση με το dsRNA με έναν συγκεκριμένο και δοσο-εξαρτώμενο τρόπο. Είναι ενδιαφέρον ότι η έκφραση των άλλων γονιδίων του μηχανισμού της RNAi που δοκιμάστηκαν, *translin*, *VIG* και *TSN*, δεν ανταποκρίθηκε στο εξωγενές dsRNA. Οι ίδιοι υποθέτουν ότι οι Dicer-2 και Argonaute-2 έχουν και επιπλέον ρόλους πέραν του ρόλου στην ενδογενή RNAi (όπως η λειτουργία ως υποδοχείς που αναγνωρίζουν ανοσολογικά μοτίβα, immune pattern recognition receptors – PRRs) που οδηγούν σε αυτή την υπερέκφραση ως αντίδραση στο εξωγενές dsRNA. Αναφερόμενοι στους πιθανούς λόγους έλλειψης της RNAi σε κάποιο έντομο παραθέτουν δύο υποθέσεις. Πρώτη υπόθεση είναι ότι τα χαμηλά επίπεδα έκφρασης ενός ή περισσότερων συστατικών του μηχανισμού του RNAi δεν επαρκούν για να επέλθει η σίγηση. Δεύτερη υπόθεση είναι η ύπαρξη κάποιων στοιχείων του μηχανισμού κάτω από αυστηρό έλεγχο που περιορίζει το χρόνο δράσης του στοιχείου και επομένως και του όλου μηχανισμού.

Οι Jayendra *et al.* (2016) στα αποτελέσματά της εργασίας τους πάνω στα λεπιδόπτερα έντομα υποστηρίζουν ότι ένας επιπλέον παράγοντας που επηρεάζει την RNAi είναι η παγίδευση του dsRNA σε όξινα σώματα (acidic bodies) μέσα στο κύτταρο. Ως εκ τούτου η απουσία επεξεργασίας των μακρών (long) dsRNA σε siRNAs, είναι υπεύθυνη για την μικρή ανταπόκριση στην RNAi που παρατηρήθηκε στα λεπιδόπτερα έντομα.

Αξιολογώντας τα ανωτέρω αποτελέσματα και τις πληροφορίες που υπάρχουν στη βιβλιογραφία πιθανολογούμε ότι η κατάλληλη συμπύκνωση της βακτηριακής καλλιέργειας βρίσκεται ανάμεσα στις 125× και 250×. Αυτό το υποθέτουμε διότι φαίνεται πως η συμπύκνωση 30× είναι πολύ χαμηλή με αναποτελεσματική σίγηση σε προνύμφες και νύμφες, αντίθετα η συμπύκνωση 250× είναι πολύ υψηλή θανατώνοντας τα έντομα, ενώ η συμπύκνωση 125× είναι αποτελεσματική στις προνύμφες και αναποτελεσματική στις νύμφες. Συνεπώς η έρευνα για την ανακάλυψη της βέλτιστης συγκέντρωσης των χορηγούμενων βακτηρίων, ώστε να επιτευχθεί το μεγαλύτερο ποσοστό σίγησης του γονιδίου *Gasδ* ή άλλων γονιδίων που εμπλέκονται στη γονιμότητα του δάκου της ελιάς, θα πρέπει να είναι ένας από τους επόμενους στόχους.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. **Agrawal, N., Dasaradhi, P. V. N., Mohmmmed, A., Malhotra, P., Bhatnagar, R. K., & Mukherjee, S. K., 2003.** RNA Interference: Biology, Mechanism, and Applications. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(4), 657–685. <http://doi.org/10.1128/MMBR.67.4.657-685.2003>
2. **Alphey L., 2007.** Engineering insects for the Sterile Insect Technique, p. 51-60, In M. Vreysen, et al., eds. *Areawide control of insect pests: from research to field implementation*. Springer, Dordrecht, The Netherlands
3. **Alphey L., Nimmo D., O'Connell S. and Alphey N., 2007.** Insect population suppression using engineered insects, In S. Aksoy, ed. *Transgenesis and the management of vector-borne disease*. Landes Bioscience, Austin, Texas.
4. **Ant T, Koukidou M, Rempoulakis P, Gong HF, Economopoulos A, Vontas J, Alphey L, 2012.** Control of the olive fruit fly using genetics-enhanced sterile insect technique. *BioMed Central Biology* 10: 1-8.
5. **Araujo R.N., Santos A., Pinto F.S., Gontijo N.F., Lehane M.J. and Pereira M.H., 2006.** RNA interference of the salivary gland nitrophorin 2 in the triatomine bug *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) by dsRNA ingestion or injection. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 36, 683–693.
6. **Baccetti B, Cappellini M., 1961.** Ricerche sulla sterilizzazione di insetti nocivi con radiazioni ionizzanti. *Nuntius Radiologicus* 7, 600–603
7. **Bartlett J. M. S., Stirling D., 2003.** A Short History of the Polymerase Chain Reaction. *PCR Protocols. Methods in Molecular Biology*. 226 (2nd ed.). pp. 3–6. doi:10.1385/1-59259-384-4:3. ISBN 1-59259-384-4.
8. **Baum J.A., Bogaert T., Clinton W., Heck G.R., Feldmann P., Ilagan O., Johnson S., Plaetinck G., Munyikwa T., Pleau M., Vaughn T. and Roberts J. 2007.** Control of coleopteran insect pests through RNA interference. *Nature Biotechnology*, 25, 1322–1326.
9. **Bjeliš M., 2009.** Control of olive fruit fly – *Bactrocera oleae* Rossi (Diptera, Tephritidae) by mass trapping and bait sprays methods in dalmatia. *Zbornik predavanj in referatov 9. Slovenskega posvetovanja o varstvu rastlin z mednarodno udeležbo Nova Gorica*, 4.–5. marec 2009.
10. **Bouwman B. Sereda and H.M. Meinhardt, H.; B. Sereda and H.M. Meinhardt December 2006.** Simultaneous presence of DDT and pyrethroid residues in human breast milk from a malaria endemic area in South Africa. *Environmental Pollution* 144 (3): 902–917. doi:10.1016/j.envpol.2006.02.002. PMID 16564119
11. **Bret BL, Larson LL, Schoonover JR, Sparks TC and Thompson GD, 1997.** Biological properties of spinosad. *Down to Earth* 52:6–13.
12. **Bueno, A.M. and O. Jones, 2002.** Alternative methods for controlling the olive fly, *Bactrocera oleae*, involving semiochemicals. *IOBC WPRS Bulletin*, Vol. 25(9), p.p. 147-155.
13. **Clemens J.C., Worby C.A., Simonson-Leff N., Muda M., Maehama T., Hemmings B.A. and Dixon J.E., 2000.** Use of double-stranded RNA *Drosophila* cell lines to dissect signal transduction pathways. *Proceedings of*

- the National Academy of Sciences of the United States of America, 97, 6499–6503.
14. **Croy R., 1998.** Molecular Genetics II - Genetic Engineering Course (Supplementary notes). Durham University durham.ac.uk.
 15. **Daane KM, Johnson MW, 2010;** Olive fruit fly: Managing an ancient pest in modern times. Annual Review of Entomology 55: 151-169.
 16. **Dahm R., 2008.** Discovering DNA: Friedrich Miescher and the early years of nucleic acid research.. Human Genetics 122 (6): 565–81. doi:10.1007/s00439-007-0433-0. PMID 17901982
 17. **Dauterman, W. C.; Viado, G. B.; Casida, J. E.; O'Brien, R. D. (1960).** Insecticide Residues, Persistence of Dimethoate and Metabolites Following Foliar Application to Plants. Journal of Agricultural and Food Chemistry 8 (2): 115. doi:10.1021/jf60108a013
 18. **de Magalhaes Silva G, 1970.** Sterile-male technique for control of the olive fly. Review of work on rearing and irradiation. IAEA, Vienna.
 19. **Delkash-Roudsari S, Zibae A, Abbc-Mozhdehi MR. 2014.** Digestive proteolytic activity in larvae and adults of *Bactrocera oleae* Gmelin (Diptera: Tephritidae). Journal of Asia-Pacific Entomology 17: 483-491.
 20. **Dugaiczuk A, Boyer HW, Goodman HM, 1975.** Ligation of EcoRI endonuclease-generated DNA fragments into linear and circular structures. Journal of Molecular Biology 96 (1): 171–84. doi:10.1016/0022-2836(75)90189-8. PMID 169355.
 21. **Economopoulos A.P., 1972.** Sexual competitiveness of γ -ray sterilized males of *Dacus oleae*. Mating frequency of artificially reared and wild females. Environmental Entomology 1, 490-497.
 22. **Economopoulos A.P., 1989.** Use of traps based on color and/or shape, pp. 315e327. In: Robinson, A.S., Hooper, G. (Eds.), World Crop Pests, Fruit Flies, Their Biology, Natural Enemies and Control, vol. 3B. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, 447 pp.
 23. **Economopoulos A. P., Giannakakis A., Tzanakakis M. E., Voyadjoglou A. V., 1971.** Reproductive Behavior and Physiology of the Olive Fruit Fly. 1. Anatomy of the Adult Rectum and Odors Emitted by Adults. Annals of the Entomological Society of America Sep 1971, 64 (5) 1112-1116; DOI:10.1093/aesa/64.5.1112.
 24. **Ekesi S., Nderitu P.W. and Rwomushana I. 2006.** Field infestation, life history and demographic parameters of the fruit fly *Bactrocera invadens* (Diptera: Tephritidae) in Africa. Bulletin of Entomological Research, 96, pp 379-386. doi:10.1079/BER2006442.
 25. **Entomology Today, 2016.** Edward Knipling and Raymond Bushland Win Award for the Sterile Insect Technique, June 22, 2016.
 26. **Fire A, Xu S, Montgomery M, Kostas S, Driver S, Mello C; Xu; Montgomery; Kostas; Driver; Mello 1998.** Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. Nature. 391 (6669): 806–11.

27. **Fletcher BS, 1989.** Ecology; movements of tephritid fruit flies. In: Robinson AS, Hooper G, eds. *Fruit Flies; Their Biology, Natural Enemies and Control*. World Crop Pests, 3(B). Amsterdam, Netherlands: Elsevier, 209-219.
28. **Franz G., 2005.** Genetic sexing strains in Mediterranean fruit fly, an example for other species amenable to largescale rearing for the sterile insect technique. In *Sterile Insect Technique Principles and practice in area-wide integrated pest management*, V.A. Dyck, J. Hendrichs, and A.S. Robinson, eds. (The Netherlands, Springer), pp. 427-451.
29. **Fytizas E, 1967.** Action du tepa sur les adultes de *Dacus oleae* Gmel. (Diptera: Tephritidae), en fonction des quantites du chimiosterilisant utilisees. *Ann. Inst. Phytopathol. Benaki* 8, 32–46.
30. **Ginzinger D., 2002.** Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. *Experimental Hematology* 30 503–512.
31. **Haniotakis GE, 2003.** Olive pest control: present status and prospects. Proc IOBC/WPRS Conf – Integrated Protection of Olive Crops, Chania, Crete.
32. **Haniotakis GE, 2005.** Olive pest control: present status and prospects. *Int. Protect. Olive Crops IOBC/WPRS Bull.* 28, 1–9.
33. **Haniotakis GE, Galachtiou CG, 1973.** Metepa sterilization of olive fruit-fly. *J. Econ. Entomol.* 66, 55–61.
34. **Hartl D. L., Jones E. W., 2001.** *Genetics: Analysis of Genes and Genomes*, Fifth Edition. ISBN 0-7637-0913-1
35. **Kakani, E. G., Zygouridis, N. E., Tsoumani, K. T., Seraphides, N., Zalom, F. G. and Mathiopoulos, K. D. 2010.** Spinosad resistance development in wild olive fruit fly *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae) populations in California. *Pest. Manag. Sci.*, 66: 447–453. doi: 10.1002/ps.1921.
36. **Kamath R.S., Martinez-Campos M., Zipperlen P., Frasher A.G. and Ahringer J., 2000.** Effectiveness of specific RNA mediated interference through ingested double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Genome Biology*, 2, research/0002.
37. **Kan C.W., Fredlake C.P., Doherty E.A.S., Barron A.E., 2004.** DNA sequencing and genotyping in miniaturized electrophoresis systems. *Electrophoresis*. 25 (21-22): 3564–3588. doi:10.1002/elps.200406161
38. **Kandybina MN, 1977.** The larvae of fruit-flies (Diptera, Tephritidae). *Keys to the fauna of the USSR* No.114.
39. **Klassen W. and Curtis C. F., 2005.** History of the sterile insect technique, Chapter 1.1 at *Sterile Insect Technique Principles and Practice in Area-Wide Integrated Pest Management*, Springer Publications.
40. **Knipling E. F., 1959.** Sterile-Male Method of Population Control. *Science* 09 Oct 1959 : 902-904.
41. **Langer P. R., Waldrop A. A., & Ward D. C., 1981.** Enzymatic synthesis of biotin-labeled polynucleotides: novel nucleic acid affinity probes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78(11), 6633–6637.

42. **Leary J. J., Brigati D. J., & Ward D. C., 1983.** Rapid and sensitive colorimetric method for visualizing biotin-labeled DNA probes hybridized to DNA or RNA immobilized on nitrocellulose: Bio-blots. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80(13), 4045–4049.
43. **Lucotte G., Baneyx F., 1993.** *Introduction to Molecular Cloning Techniques*. Wiley-Blackwell. p. 156. ISBN 978-0471188490.
44. **Maeda I., Kohara Y., Yamamoto M. and Sugimoto A., 2001.** Large-scale analysis of gene function in *Caenorhabditis elegans* by high-throughput RNA. *Current Biology*, 11, 171–176.
45. **Manousis T, Moore N, 1987.** Control of *Dacus oleae*, a major pest of olives. *Insect Sci. Appl.* 8, 1–9.
46. **Marbach A., Bettenbrock K., 2012.** lac operon induction in *Escherichia coli*: Systematic comparison of IPTG and TMG induction and influence of the transacetylase LacA. *Journal of Biotechnology*. 157 (1): 82–8. doi:10.1016/j.jbiotec.2011.10.009
47. **Marchuk D., Drumm M., Saulino A., & Collins F. S., 1991.** Construction of T-vectors, a rapid and general system for direct cloning of unmodified PCR products. *Nucleic Acids Research*, 19(5), 1154.
48. **Margaritopoulos J. T., Skouras P., Tsitsipis J. A., Vontas J., 2008.** Efficacy of the pyrethroid alpha-cypermethrin against *Bactrocera oleae* populations from Greece, and improved diagnostic for an iAChE mutation. *Pest Management Science* · September 2008. DOI: 10.1002/ps.1580 · Source: PubMed
49. **Margaritopoulos, J. T., Skavdis, G., Kalogiannis, N., Nikou, D., Morou, E., Skouras, P. J., Tsitsipis, J. A. and Vontas, J. 2008,** Efficacy of the pyrethroid alpha-cypermethrin against *Bactrocera oleae* populations from Greece, and improved diagnostic for an iAChE mutation. *Pest. Manag. Sci.*, 64: 900–908. doi: 10.1002/ps.1580.
50. **Mazomenos B. E., Pantazi-Mazomenou A., Stefanou D., 2002;** Attract and kill of the olive fruit fly *Bactrocera oleae* in Greece as a part of an integrated control system, *IOBC wprs Bulletin* Vol. 25.
51. **Mertz Frederick, Raymond C. Yao, 1990.** *Saccharopolyspora spinosa* sp. nov. Isolated from soil Collected in a Sugar Mill Rum Still. *International Journal of Systematic Bacteriology* 40 (1): 34–39. doi:10.1099/00207713-40-1-34
52. **Metcalf, R., 1990.** Chemical ecology of dacinae fruit flies (Diptera: Tephritidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 83 (6), 1017e1030 (14).
53. **Morgan A. Byron and Jennifer L. Gillett-Kaufman, 2016.** Featured creatures, olive fruit fly, *Bactrocera oleae* (Rossi) (Insecta: Diptera: Tephritidae). University of Florida.
54. **Na Yu., Olivier C., Jisheng L., Jinzhi N., Kaat C., Silvia C., Hanneke H. and Guy S., 2013.** Delivery of dsRNA for RNAi in insects: an overview and

- future directions. *Insect Science* 20, 4–14, DOI 10.1111/j.1744-7917.2012.01534.x
55. **Nardi F, Carapelli A, Dallai R, Frati F. 2003.** The mitochondrial genome of the olive fly *Bactrocera oleae*: two haplotypes from distant geographical locations. *Insect Molecular Biology* 12: 605-611.
 56. **Nardi, F., Carapelli, A., Dallai, R., Roderick, G. K. and Frati, F., 2005.** Population structure and colonization history of the olive fly, *Bactrocera oleae* (Diptera, Tephritidae). *Molecular Ecology*, 14: 2729–2738. doi:10.1111/j.1365-294X.2005.02610.x.
 57. **Neuenschwander P. and Michelakis S., 1978.** The infestation of *Dacus oleae* (Gmel.) (Diptera: Tephritidae) at harvest time and its influence on yield and quality of olive oil in Crete.- *Zeitschrift für Angewandte Entomologie*, 86: 420- 433.
 58. **Neuenschwander P. and Michelakis S., 1981.** Olive fruit drop caused by *Dacus oleae* (Gmel.) (Dipt. Tephritidae). *Zeitschrift für Angewandte Entomologie*, 91: 193–205. doi: 10.1111/j.1439-0418.1981.tb04467.x.
 59. **Neuenschwander P., Canard M., Michelakis S., 1981.** The attractivity of protein hydrolysate baited McPhail traps to different chrysophid and hemerobiid species (Neuroptera), *Annals of the Entomological Society of France*, 17, 213 – 20.
 60. **Orphanidis P. and Patsakos P., 1963.** Recherches en laboratoire sur la sterilization d' adultes de *Dacus oleae* Gmel. au moyen de Metaphoxide et d' Aphoxide (Comparaison avec les resultants obtenus sur *Ceratitis capitata* Wied.). *Ann. Inst. Phytopathol. Benaki* 5, 305–322.
 61. **Orphanidis PS, Patsakos PG, Kalmoukos PE, 1966.** Preliminary field experiment on the chemosterilization of *Dacus oleae* (Gmel.) adults. *Ann. Benaki Phytopath. Inst. N.S.* 7, 188–201.
 62. **Pavlov A.R., Pavlova N.V., Kozyavkin S.A., Slesarev A.I., 2006.** Thermostable DNA Polymerases for a Wide Spectrum of Applications: Comparison of a Robust Hybrid TopoTaq to other enzymes. In Kieleczawa J. *DNA Sequencing II: Optimizing Preparation and Cleanup*. Jones and Bartlett. pp. 241–257. ISBN 0-7637-3383-0.
 63. **Pereira J.A., Alves M.R., Casal S., Oliveira M.B.P.P., 2004.** Effect of olive fruit fly infestation on the quality of olive oil from cultivars cobrançosa, madural and verdeal transmontana. *Italian Journal of Food Science*. ISSN 1120-1770. 16:3, p. 355-365.
 64. **Polacek N., 2005.** RNA Interference in Practice. Principles, Basics, and Methods for Gene Silencing in *C. elegans*, *Drosophila*, and Mammals. Von Ute Schepers.. *Angewandte Chemie*, 117: 3063. doi:10.1002/ange.200385272
 65. **Rajagopal R., Sivakumar S., Agrawal N., Malhotra P. and Bhatnagar R.K., 2002.** Silencing of midgut aminopeptidase N of *Spodoptera litura* by double-stranded RNA establishes its role as *Bacillus thuringiensis* toxin receptor. *The Journal of Biological Chemistry*, 277, 46849–46851.

66. **Rice R., Phillips P. A., Stewart-Leslie J., Sibbett G. S., 2003.** Olive fruit fly populations measured in Central and Southern California; *California Agriculture* 57 (4): 122–127. doi:10.3733/ca.v057n04p122.
67. **Rice Richard E., 2000.** Bionomics of the Olive Fruit Fly *Bactrocera (Dacus) oleae*; U.C. Kearney Agricultural Center; KAC Plant Protection Quarterly.
68. **Robinson A., 2002.** Genetic sexing strains in medfly, *Ceratitidis capitata*, sterile insect technique programmes. *Genetica* 116: 5-13.
69. **Robinson A., Franz G., and Fisher K. 1999.** Genetic sexing strains in the medfly, *Ceratitidis capitata*: Development, Mass Rearing and Field Application. *Trends in Entomology* 2: 81-104.
70. **Sagri E, Reczko M, Tsoumani KT, Gregoriou ME, Harokopos V, Mavridou AM, Tastsoglou S, Athanasiadis K, Ragoussis J, Mathiopoulos KD, 2014.** The molecular biology of the olive fly comes of age. *BMC Genet.* 2014;15 Suppl 2:S8. doi: 10.1186/1471-2156-15-S2-S8.
71. **Salgado VL, 1997.** The modes of action of spinosad and other insect control products. *Down to Earth* 52:35–43.
72. **Sanger F., Coulson A.R., 1975.** A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J. Mol. Biol.* 94 (3): 441–8. doi:10.1016/0022-2836(75)90213-2
73. **Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R., 1977.** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74 (12): 5463–7. Bibcode:1977PNAS...74.5463S. doi:10.1073/pnas.74.12.5463
74. **Schuster S.C., 2008.** Next-generation sequencing transforms today's biology. *Nat. Methods* 5:16-18.
75. **Scott JG, 1998.** Toxicity of spinosad to susceptible and resistant strains of house flies *Musca domestica*. *Pestic Sci* 54:131–133.
76. **Siomi H., Siomi M. C., 2009.** On the road to reading the RNA-interference code. *Nature.* 457 (7228): 396–404.
77. **Skouras PJ, Margaritopoulos JT, Seraphides N, Ioannides IM, Kakani EG, Mathiopoulos KD, et al, 2007.** Organophosphate resistance in olive fruit fly *Bactrocera oleae* populations in Greece and Cyprus. *Pest Manag Sci* 63:42–48.
78. **Soderlund D. M., et al., 2002.** Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: implications for cumulative risk assessment, *Toxicology* 2002 171, 3-59. doi: 10.1016/s0300-483x(01)00569-8.
79. **Stavridis D.G., Ioannidis P., Deligeorgidis P.N., Deligeorgidis N.P. and Ipsilandis C.G., 2013.** A pesticide effect study on *Bactrocera oleae* in central Greece. *Asia Pacific Journal of Research*, Vol: I Issue XI, ISSN: 2320-5504, E-ISSN-2347-4793
80. **Steiner, L.F., Rohwer, G.G., Ayers, E.L., Christenson, L.D., 1961.** The role of attractants in the recent Mediterranean fruit fly eradication program in Florida. *J. Econ. Entomol.* 54, 30e35.

81. **Surakasi V.P., Mohamed A.A.M. and Kim Y., 2011.** RNA interference of beta 1 integrin subunit impairs development and immune responses of the beet armyworm, *Spodoptera exigua*. *Journal of Insect Physiology*, 57, 1537–1544.
82. **Tabara H., Grishok A. and Mello C.C. 1998.** RNAi in *C. elegans*: soaking in the genome sequence. *Science*, 282, 430– 431.
83. **Theophrastus:** Enquiry into plants (History of plants HP), I & II (HORT, A. F., translator). London, Cambridge & Massachusetts; **1916**, [in ancient Greek with English translation].
84. **Thompson GD, Dutton R and Sparks TC, 2000.** Spinosad – a case study: an example from a natural products discovery programme. *PestManag Sci* 56:696–702.
85. **Tian A. and Palli S.R., 2008.** Identification and characterization of nuclear receptors from the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 38, 430–439.
86. **Timmon L. and Fire A., 1998.** Specific interference by ingested dsRNA. *Nature*, 395, 854.
87. **Timmon L., Court D.L. and Fire A., 2001.** Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Gene*, 263, 103–112.
88. **Tsiropoulos G. J. 1984.** Amino-acid synthesis in adult *Dacus oleae* (Gmelin) (Diptera Tephritidae) determined with [U-14C] glucose; *Arch Int Physiol Biochim.* 92(4): 313–316.
89. **Tsolakis, H., Ragusa E., and Tarantino P., 2011.** Control of *Bactrocera oleae* by low environmental impact methods: NPC methodology to evaluate the efficacy of lure-and-kill method and copper hydroxide treatments. *Bulletin of Insectology*, Vol. 64 (1), p.p. 1-8.
90. **Turner C.T., Davy M.W., MacDiarmid R.M., Plummer K.M., Birch N.P. and Newcomb R.D., 2006.** RNA interference in the light brown apple moth, *Epiphyas postvittana* (Walker) induced by double-stranded RNA feeding. *Insect Molecular Biology*, 15, 383–391.
91. **Tzanakakis M. E., 2003;** Seasonal development and dormancy of insects and mites feeding on olive: A review, *Netherlands Journal of Zoology* 52(2-4):87-224.
92. **U.S.E.P.A. (United States Environmental Protection Agency), 2002.** Permethrin, Resmethrin, Sumithrin: Synthetic Pyrethroids For Mosquito Control. April 17, 2002.
93. **van der Velden VHJ, Hochhaus A, Cazzaniga G, Szczepanski T, Gabert J and van Dongen JJM., 2003.** Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia* 17, 1013–1034
94. **Varikou K., Garantonakis N., Birouraki A., 2015.** Residual attractiveness of various bait spray solutions to *Bactrocera oleae*. *Crop Protection* 68: 60-66.

95. **Vontas J, Cosmidis N, Loukas M, Tsakas S, Hejazi MJ, Ayoutanti A, et al, 2001.** Altered acetylcholinesterase confers organophosphate resistance in the olive fruit fly *Bactrocera oleae*. *Pestic Biochem Physiol* 71:124–132.
96. **Vontas J, Hejazi MJ, Hawkes NJ, Cosmidis N, Loukas M, Janes R, et al, 2002.** Resistance-associated point mutations of organophosphate insensitive acetylcholinesterase in the olive fruit fly *Bactrocera oleae*. *Insect Mol Biol* 11:329–336.
97. **Vossen P, Varela L, Devarenne A., 2006.** Olive fruit fly. University of California Cooperative Extension - Sonoma County.
98. **Walshe D.P., Lehane S.M., Lehane M.J. and Haines L.R., 2009.** Prolonged gene knockdown in the tsetse fly *Glossina* by feeding double stranded RNA. *Insect Molecular Biology*, 18, 11–19.
99. **Watson GB, 2001.** Actions of insecticidal spinosyns on ϵ -aminobutyric acid responses from small-diameter cockroach neurons. *Pestic Biochem Physiol* 71:20–28.
100. **Weems H. V. and Nation J. L., 1999.** Olive Fruit Fly, *Bactrocera oleae* (Gmelin) (Insecta: Diptera: Tephritidae)
101. **White IM, Hancock DL, 1997.** CABIKEY to the Dacini (Diptera, Tephritidae) of the Asian, Pacific and Australasian Regions. Wallingford, UK: CAB International.
102. **White IM, Meyer Mde, Stonehouse J, 2000.** A review of native and introduced fruit flies (Diptera, Tephritidae) in the Indian Ocean islands of Mauritius, Réunion, Rodrigues and Seychelles. Proceedings of the Indian Ocean Commission, Regional Fruit Fly Symposium, Flic en Flac, Mauritius, 5th-9th June, 2000, 15-21; 22 ref.
103. www.agilent.com/cs/library/brochures/5989-8281ENUS.pdf
104. www.biobestgroup.com; integrated pest management, biological control and pollination. Home/ Biobest products/ Monitoring and scouting/ Pheromone Traps/ McPhail Trap.
105. www.cgc.cbs.umn.edu/strain.php?id=8854
106. http://www.macrogen.com/eng/business/ngs_overview.html
107. www.uniprot.org/uniprot/Q8MT08
108. **Yeh S.D., Chen Y.J., Chang A.C., Ray R., She B.R., Lee W.S., Chiang H.S., Cohen S.N., Lin-Chao S., 2002.** Isolation and properties of Gas8, a growth arrest-specific gene regulated during male gametogenesis to produce a protein associated with the sperm motility apparatus. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(8):6311-6317. DOI: 10.1074/jbc.M106941200. PMID: 11751847.
109. **Zervas G. A., Economopoulos A. P., 1982.** Mating Frequency in Caged Populations of Wild and Artificially Reared (Normal or γ -Sterilized) Olive Fruit Flies. *Environmental Entomology* Feb 1982, 11 (1) 17–20; DOI: 10.1093/ee/11.1.17.
110. **Ελληνικό Υπουργείο Γεωργίας, 1961.** Περιγραφή της έρευνας για τον έλεγχο του δάκου της ελιάς, 33.

111. **Παναγόπουλος Χ.Γ. 1997.** Ασθένειες καρποφόρων δένδρων και αμπέλου.
Εκδόσεις: Α. Σταμούλης. Αθήνα, σελ. 429.
112. **Σαγρή Χ. Ε., 2009.** Εξάπλωση μεταλλάξεων που σχετίζονται με την
ανθεκτικότητα του δάκου της ελιάς σε οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα.
Πτυχιακή διατριβή για το πρόγραμμα μεταπτυχιακών σπουδών, Τμήμα
Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.
113. **Τζανακάκης Ε. Μίνως: Εντομολογίαΐ 1995,** University studio press.