

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**  
**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**«Προς την δημιουργία διαγονιδιακών φυτών ανθεκτικών στα  
αγροτικά παράσιτα *Tetranychus urticae* και *Bemisia tabaci* μέσω RNAi»**

**ΜΑΡΙΑ ΣΑΜΑΤΑ**  
**A.M.1528**

**Επιβλέπων καθηγητής**  
**ΚΑΛΑΝΤΙΔΗΣ ΚΡΙΤΩΝ**

**ΙΟΥΝΙΟΣ 2012**  
**ΗΡΑΚΛΕΙΟ**

## Περιεχόμενα

Περίληψη.....	4
<b>Abstract.....</b>	<b>5</b>
<b>1. Εισαγωγή .....</b>	<b>6</b>
1.1. Καταπολέμηση αγροτικών παρασίτων .....	6
1.1.1. Χημική καταπολέμηση .....	6
1.1.2. Βιολογική καταπολέμηση .....	7
1.1.3. Βιοτεχνολογικές μέθοδοι – Γενετική μηχανική .....	8
1.2. Ο μηχανισμός της RNA σίγησης .....	9
1.3. RNAi σαν μέθοδος καταπολέμησης.....	13
1.4. Πλεονεκτήματα του RNAi μέσω της τροφής σαν μέθοδος καταπολέμησης.....	15
1.5. <i>Tetranychus urticae</i> και <i>Bemisia tabaci</i> .....	16
1.5.1. <i>Tetranychus urticae</i> .....	16
1.5.2. <i>Bemisia tabaci</i> .....	18
1.6. Μηχανισμοί ανθεκτικότητας – p450s .....	19
1.7. NADPH - Cytochrome p450 Reductase.....	21
<b>Σκοπός.....</b>	<b>22</b>
<b>2. Υλικά και Μέθοδοι.....</b>	<b>23</b>
Περληπτικά η πειραματική διαδικασία .....	23
2.1 Πλασμιδιακές κατασκευές .....	25
2.2 Μετασηματισμός Αγροβακτηρίων .....	26
2.3 Αγροεμποτισμός .....	27
2.4 Μετασηματισμός φυλλικών δίσκων καπνού – Κατασκευή διαγονιδιακών φυτών	28
2.5 Εξαγωγή ολικού RNA από φυτικό ιστό.....	29

2.6	Στύπωμα κατά Northern για μικρά RNA .....	30
2.6.1	Ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτικό gel ακρυλαμίδης.....	30
2.6.2	Προυβριδοποίηση της μεμβράνης .....	31
2.6.3	Σύνθεση ραδιενεργού DNA ανιχνευτή με τη μέθοδο random priming .....	31
2.7	Εκτροφή και συγχρονισμός τετρανύχων .....	32
2.8	Ανάπτυξη τετρανύχων σε αγροεμποτισμένο φύλλο τομάτας .....	32
2.9	Εξαγωγή ολικού RNA από τετράνυχους.....	33
2.10	Αντίστροφη μεταγραφή (Reverse transcription).....	33
2.10.1	Απαλλαγή από DNA (DNase treatment).....	34
2.10.2	Σύνθεση cDNA .....	34
2.11	PCR πραγματικού χρόνου (Real- Time PCR).....	35
<b>3.</b>	<b>Αποτελέσματα .....</b>	<b>37</b>
3.1.	Κλωνοποίηση των TuCPR214 και BtCPR314 .....	37
3.2.	Έλεγχος λειτουργίας πλασμιδίου ρk7-TuCPR214 .....	38
3.3.	Εκτροφή τετρανύχων με αγροεμποτισμένα φύλλα hr\TuCPR.....	39
3.4.	Real-Time PCR για την ποσοτικοποίηση της έκφρασης της TuCPR .....	41
<b>4.</b>	<b>Συζήτηση .....</b>	<b>42</b>
	<b>Βιβλιογραφία .....</b>	<b>45</b>
	Παράρτημα.....	48

## Περίληψη

Ο μηχανισμός της RNA σίγηση είναι ένας θεμελιώδης μηχανισμός ρύθμισης της έκφρασης γονιδίων, συντηρημένος στους ευκαρυώτες. Βασικός παράγοντας είναι η ύπαρξη δίκλωνων μορίων RNA που οδηγούν στην καταστολή της έκφρασης συμπληρωματικών τους αλληλουχιών. Δρα είτε μεταγραφικά μέσω μεθυλίωσης του DNA και μέσω τροποποίησης των επιπέδων μεθυλίωσης των ιστονών, είτε μετα-μεταγραφικά μέσω καταστροφής του μεταγράφου ή αναστολής της μετάφρασής του. Στα ζώα συναντάται σαν RNA interference (RNAi). Φυσιολογικά ρόλος του είναι η σταθεροποίηση του γονιδιώματος έναντι των μεταθετών στοιχείων, άμυνα απέναντι σε εξωγενή νουκλεϊκά οξέα, ρύθμιση έκφρασης γονιδίων κ.ά. Έχει βρεθεί ότι η τεχνολογία του RNAi μπορεί να λειτουργήσει σαν εργαλείο για την κατασκευή διαγονιδιακών φυτών ανθεκτικών σε προκαρυωτικούς οργανισμούς και ιούς. Τα τελευταία χρόνια, πολλές επιτυχημένες μελέτες δείχνουν τη εφαρμογή της ανθεκτικότητας μέσω RNAi και για παθογόνους ευκαρυώτες, όπως νηματώδεις και φυτοφάγα έντομα. Διαγονιδιακά φυτά που παράγουν δίκλωνο RNA (dsRNA), με στόχο κατάλληλα ευκαρυωτικά γονίδια διαφόρων παρασίτων, απέκτησαν ανθεκτικότητα σε αυτά. Η επιτυχής μεταφορά dsRNA μέσω της τροφής έχει ήδη καταγραφεί στις τάξεις εντόμων κολεόπτερα, λεπιδόπτερα και ημίπτερα. Στην παρούσα εργασία προσπαθήσαμε να ελέγξουμε την τεχνική του RNAi μέσω της τροφής για το αραχνίδιο *Tetranychus urticae* και το έντομο *Bemisia tabaci* που αποτελούν πολύ σημαντικά αγροτικά παράσιτα σήμερα.

## Abstract

RNA silencing is a conserved mechanism found in most eukaryotes. It is triggered by the presence of double stranded RNA molecules which guide the suppression of complementary sequences. It acts either at the transcriptional level by causing epigenetic changes to DNA or histones, or post-transcriptionally by guiding the cleavage of the transcript or translational repression. In animals it is known as RNA interference (RNAi). This mechanism plays an important role for the defense against exogenous sequences from viruses, transgenes or transposons. It is cited that RNAi could be effective for the construction of transgenic plants resistant to prokaryotic pathogens such as viruses and bacteria. Recent studies show the success of RNAi through feeding as a potential method for crop resistance effective also against eukaryotic pests such as plant-nematodes and herbivorous insects. Transgenic plants are designed to produce dsRNA targeting suitable genes of their pests, and therefore become resistant to them. Successful studies have been reported in the orders of Coleoptera, Lepidoptera and Hemiptera. In the present study, we tried to examine the functionality of RNAi through feeding method to *Tetranychus urticae* (Acari) and *Bemisia tabaci* (Hemiptera) which are very important crop pest

## 1. Εισαγωγή

### 1.1. Καταπολέμηση αγροτικών παρασίτων

Τεράστιες καταστροφές προκαλούνται ετησίως στις αγροτικές καλλιέργειες από τα φυτο-παρασίτα ( έντομα, ακάρεα, νηματώδεις, μύκητες, βακτήρια και ιοί) είτε άμεσα είτε έμμεσα μέσω των ασθενειών που μεταφέρουν. Κοστίζουν στους καλλιεργητές δισεκατομμύρια δολάρια ετησίως, συνυπολογιζομένων των ζημιών που προκαλούν και των χρημάτων που επενδύονται στις μεθόδους καταπολέμησης.

#### 1.1.1. Χημική καταπολέμηση

Σήμερα κυκλοφορούν περισσότερες από 100 αποτελεσματικές χημικές ουσίες με τη μορφή αρκετών εκατοντάδων σκευασμάτων με παρασιτοκτόνο δράση. Διαδεδομένες είναι οι οργανοχλωριωμένες ενώσεις (συγγενείς του απαγορευμένου DDT), οι οργανοφοσφωρικές ενώσεις, οι καρβαμιδικές ενώσεις, τα νεονικοτινοειδή, τα πυρεθροειδή κ.ά.

Παρά την μεγάλη αποτελεσματικότητά τους, τα χημικά παρασιτοκτόνα έχουν βλαβερές συνέπειες αφού πολλές φορές είναι μη βιοδιασπώμενα και βιοσυσσωρευόμενα όντας σημαντικός κίνδυνος για το περιβάλλον και κατ' επέκταση την ανθρώπινη υγεία. Ακόμη, η δράση τους είναι μη ειδική με αποτέλεσμα να θανατώνονται και ωφέλιμοι πληθυσμοί εντόμων και αρπακτικών ακάρεων, προκαλώντας πρόβλημα, εκτός των άλλων, και για τη βιοποικιλότητα.

Παρ' όλα αυτά, η χημική καταπολέμηση είναι σήμερα είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος καταπολέμησης αφού είναι αποτελεσματική για πολύ μεγάλο αριθμό παθογόνων ταυτόχρονα και πολύ εύκολη στη χρήση από τους παραγωγούς.

Λόγω της αλόγιστης χρησιμοποίησης των χημικών ουσιών, όλο και περισσότεροι πληθυσμοί παρασίτων έχουν εμφανίσει ανθεκτικότητα στις χρησιμοποιούμενες χημικές ουσίες καταπολέμησης, καθιστώντας τις μη αποτελεσματικές. Το γεγονός αυτό της εμφάνισης ανθεκτικών πληθυσμών ωθεί στον σχεδιασμό νέων χημικών παρασιτοκτόνων ουσιών, διαφορετικής σύστασης. Όμως, με αυτόν τον τρόπο τελικά, ένας φαύλος κύκλος δημιουργείται αφού για άλλη μια φορά μαζική τους χρησιμοποίηση οδηγεί στην εμφάνιση νέων ανθεκτικών πληθυσμών

Εκτεταμένη έρευνα γίνεται, λοιπόν, πάνω στους μοριακούς μηχανισμούς της ανθεκτικότητας για να μπορέσουν να περιοριστούν οι ανθεκτικοί πληθυσμοί και να μειωθεί η ταχύτητα εμφάνισης νέων. Ακόμη, προσπάθεια γίνεται για την ανάπτυξη εναλλακτικών μορφών καταπολέμησης.

### 1.1.2. Βιολογική καταπολέμηση

Μια από τις εναλλακτικές μορφές καταπολέμησης φυτο- παρασίτων είναι η βιολογική. Στη βιολογική καταπολέμηση γίνεται προσπάθεια αντικατάστασης των χημικών παρασιτοκτόνων μέσω χρησιμοποίησης μεθόδων φυτοπροστασίας φυτικής ή γενικότερα φυσικής προέλευσης. Τέτοια μπορεί να είναι η χρήση φυσικών φυσικών εχθρών, η χρήση φυσικών σκευασμάτων και η χρήση παγίδων.

Γίνεται εκμετάλλευση, λοιπόν, των φυσικών εχθρών των παρασίτων, δηλαδή παρασιτοειδών και αρπακτικών εντόμων, ακάρεων και νηματωδών. Έτσι, είτε γίνεται προσπάθεια αύξησης στον αγρό των επιπέδων των ήδη υπάρχοντων πληθυσμών των φυσικών εχθρών, είτε γίνεται εκ νέου εξαπόλυσή τους.

Αυτή η μέθοδος καταπολέμησης χαρακτηρίζεται από μεγάλη εξειδίκευση στόχου, γεγονός που αποτελεί ταυτόχρονα θετικό και αρνητικό της, δεδομένου ότι για διαφορετικά παράσιτα είναι απαραίτητα διαφορετικά σκευάσματα. Ισχύει πως το αρχικό κόστος που απαιτεί είναι μεγάλο, παρ' όλα αυτά, αξίζει να σημειωθεί ότι ο χειρισμός των φυσικών εχθρών δεν είναι ιδιαίτερα δύσκολος και η μέθοδος έχει διάρκεια γιατί θα βρίσκονται στο χωράφι και την επόμενη χρονιά. (Κωβαίος and Κατσόγιαννος 2006)

Μια δεύτερη μέθοδος βιολογικής καταπολέμησης είναι η χρήση βιολογικών σκευασμάτων που, επίσης, είναι προερχόμενα από φυτά και μικροοργανισμούς. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το σκεύασμα κρυστάλλων της τοξίνης Cry του *Bacillus thuringiensis* (Elliott et al. 1988). Η πρωτεΐνη αυτή είναι αδιάλυτη στο νερό αλλά ασταθής σε αλκαλικά μέσα. Έτσι, ενεργοποιείται μόνο όταν έρθει σε επαφή με τα αλκαλικά υγρά του πεπτικού συστήματος προνυμφών ευαίσθητων εντόμων (Whalon and Wingerd 2003). Επίσης, ανάλογα με το στέλεχος του βάκιλλου που χρησιμοποιείται, στοχεύονται διαφορετικά είδη εντόμων. Συνεπώς, έχει εξειδικευμένη δράση και είναι ασφαλής για το περιβάλλον και τους ζωντανούς οργανισμούς. Παράλληλα, τέτοιου είδους σκευάσματα χαρακτηρίζονται από χαμηλή υπολλειμματικότητα στα τρόφιμα και, ως εντομοκτόνο

επαφής, απομακρύνονται μετά από το πλύσιμο. Συχνά, χρησιμοποιείται συμπληρωματικά με τη δράση χημικών εντομοκτόνων.

Στην κατηγορία των βιολογικών μεθόδων εντάσσονται επίσης και βιοτεχνικές μέθοδοι. Σ' αυτές τις μεθόδους περιλαμβάνονται η χρήση παγίδων που εκμεταλλεύονται την ιδιαίτερη συμπεριφορά των εντόμων. Έχουν κατασκευαστεί παγίδες με φερομόνες και άλλες ουσίες που έλκουν τα έντομα και τα καταπολεμούν (Foster and Harris 1997). Ακόμη, χρησιμοποιείται η μέθοδος της εξαπόλυσης στείρων αρσενικών για την παρεμπόδιση της επιτυχούς σύζευξης.

Αν και η εφαρμογή των βιολογικών μεθόδων έχει φανεί αποτελεσματική, για μεγάλο εύρους παραγωγή, ακόμα η σημαντικότερη εφαρμοζόμενη μέθοδος είναι η χημική καταπολέμηση.

### **1.1.3. Βιοτεχνολογικές μέθοδοι – Γενετική μηχανική**

Τις τελευταίες δεκαετίες, γίνονται ερευνητικές μελέτες για την αξιοποίηση των μεθόδων της γενετικής μηχανικής στην ανάπτυξη ανθεκτικών φυτά στα φυτο-παράσιτα. Χαρακτηριστικό παράδειγμα γενετικά τροποποιημένου φυτού που κατάφερε να περάσει όλα τα στάδια ελέγχου και να φτάσει να καλλιεργηθεί στον αγρό είναι τα Bt φυτά.

Οι επιστήμονες κατάφεραν να τροποποιήσουν γενετικά τα φυτά (καλαμπόκι, σόγια κ.ά) ώστε να εκφράζουν την τοξίνη Cry του *Bacillus thuringiensis*, που αναφέρθηκε παραπάνω, και μέσω αυτής να αποκτούν ανθεκτικότητα σε προνύμφες εντόμων. Η μέθοδος ήταν αποτελεσματική και χρησιμοποιήθηκε αλλά και χρησιμοποιείται ευρύτατα. Είναι εύκολη στην εφαρμογή της, χωρίς να χρειάζεται τροποποίηση των γεωργικών τεχνικών ή ειδική τεχνογνωσία. Παρουσιάζει ειδικότητα ανάλογα με το στέλεχος του βάκιλλου που επιλέγεται και δεν είναι επιβλαβής για τη βιοποικιλότητα ή τον άνθρωπο. Στατιστικά δείχνουν ότι για τα 10 πρώτα χρόνια εφαρμογής τους μειώθηκε η χρήση χημικών εντομοκτόνων κατά 24.3% για το Bt καλαμπόκι. (Brookes and Barfoot 2006). Παρ' όλα αυτά, το 2003 εμφανίστηκαν οι πρώτοι ανθεκτικοί πληθυσμοί εντόμων στην τοξίνη. (Tabashnik et al. 2003; Akhurst et al. 2003) Έρευνα στο τομέα συνεχίζει να γίνεται για την περαιτέρω βελτιστοποίηση της τεχνικής. Όμως, λόγω της εμφάνισης ανθεκτικότητας σταδιακά η μέθοδος έχει αρχίσει να χάνει την αξιοπιστία της και εγκαταλείπεται.



Πιο σύγχρονες μελέτες συνδυάζουν το μηχανισμό του RNAi (RNA interference) για την κατασκευή φυτών ανθεκτικών στα φυτοπαράσιτα.

### 1.2.0 μηχανισμός της RNA σίγησης

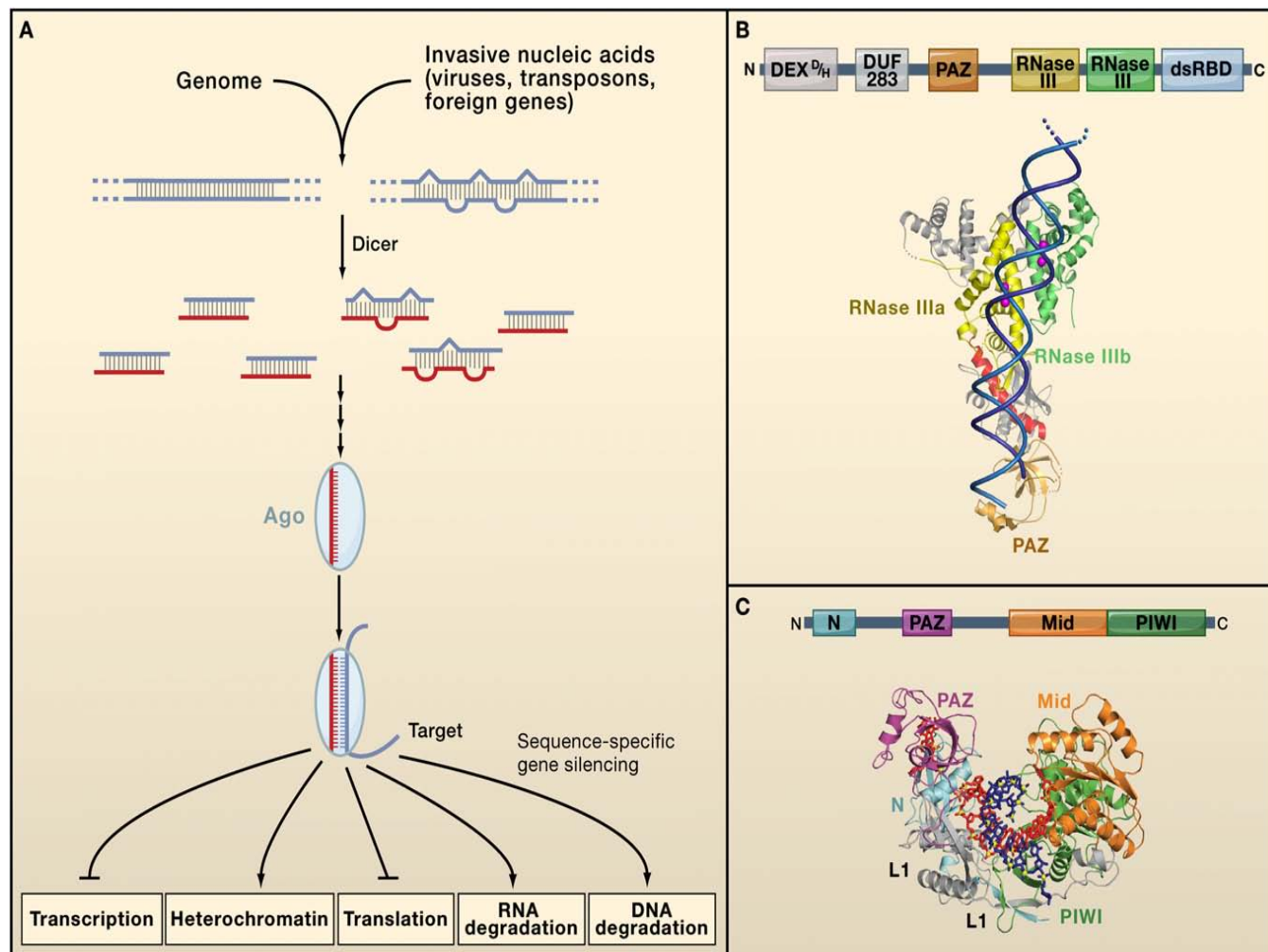
Η RNA σίγηση είναι ένας μηχανισμός που σχετίζεται με τη ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων μέσω της δράσης μικρών μη κωδικών RNA μήκους 18-24 νουκλεοτιδίων. Η ρύθμιση αυτή μπορεί να γίνεται σε μεταγραφικό (**Transcriptional Gene Silencing – TGS**) ή μετα-μεταγραφικό επίπεδο (**Post Transcriptional Gene Silencing – PTGS**).

Είναι ένας θεμελιώδης μηχανισμός συντηρημένος στους περισσότερους ευκαρυώτες (πρώτιστα, μύκητες, φυτά και ζώα) με αξιοσημείωτη εξαίρεση τον σακχαρομύκητα (*Saccharomyces cerevisiae*) στον οποίο απουσιάζει. Στα φυτά συνηθίζεται να χρησιμοποιείται ο όρος **RNA σίγηση (RNA silencing)**, στα ζώα συναντάται ως **RNA interference (RNAi)** ενώ στους μύκητες λέγεται **Quelling**.

Αποτελεί έναν πολύπλοκο μηχανισμό που ακόμα όλοι οι συμμετέχοντες παράγοντές του δεν έχουν πλήρως ταυτοποιηθεί. Ο ρόλος του φαίνεται να είναι καθοριστικός για την άμυνα του οργανισμού απέναντι σε εξωγενείς αλληλουχίες από ιούς, βακτήρια, μεταθετά στοιχεία και διαγονίδια. Σημαντικό ρόλο έχει, επίσης, στη ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων που συμμετέχουν σε αναπτυξιακά μονοπάτια, σε μηχανισμούς κυτταρικής διαφοροποίησης και μορφογένεσης. (Du and Zamore 2005) Έτσι, περιλαμβάνει πολλά επιμέρους μονοπάτια. Τρία είναι τα μεγαλύτερα, αυτό των **short-interfering RNAs - siRNAs**, των **micro-RNAs - miRNAs** και αυτό της **DNA μεθυλίωσης**. (Melnik et al. 2011)

Ο μηχανισμός ενεργοποιείται από την παρουσία δίκλωνου RNA. Αυτό μπορεί να είναι εξωγενούς προέλευσης, πλήρους εσωτερικής συμπληρωματικότητας και να οδηγεί στη δημιουργία των siRNAs, είτε προερχόμενο από ενδογενή μετάγραφα που λόγω εσωτερικής, μη πλήρους συμπληρωματικότητας διαμορφώνουν δομή θηλιάς οδηγώντας στην δημιουργία των micro-RNAs (miRNAs). Και στις δύο περιπτώσεις, το δίκλωνο RNA κόβεται σε μικρά RNA μήκους 21-25 νουκλεοτιδίων από μια πρωτεΐνη της οικογένειας των RNAsών III, την **Dicer** (Bernstein et al. 2001) κ έπειτα ενσωματώνονται σε ένα ειδικό πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο, το **RNA- Induced Silencing Complex (RISC)**. Έτσι, λειτουργούν σαν οδηγοί προς συμπληρωματικές αλληλουχίες, προκαλώντας την καταστροφή ή

αναστολή της μετάφρασης ομόλογων mRNA αλλά και επιγενετικές τροποποιήσεις σε ομόλογες περιοχές του γονιδιώματος.



Εικόνα 1 Α. Παρουσίαση των μονοπατιών της RNA σίγησης. Β. Το γενικό μοτίβο διάταξης των υπομονάδων της πρωτεΐνης Dicer. Κρυσταλλική δομή της Dicer της *Giardia*. Γ. Το γενικό μοτίβο διάταξης των υπομονάδων της πρωτεΐνης AGO. Κρυσταλλική δομή της AGO του *Thermus thermophilus*. (Carthew and Sontheimer 2009)

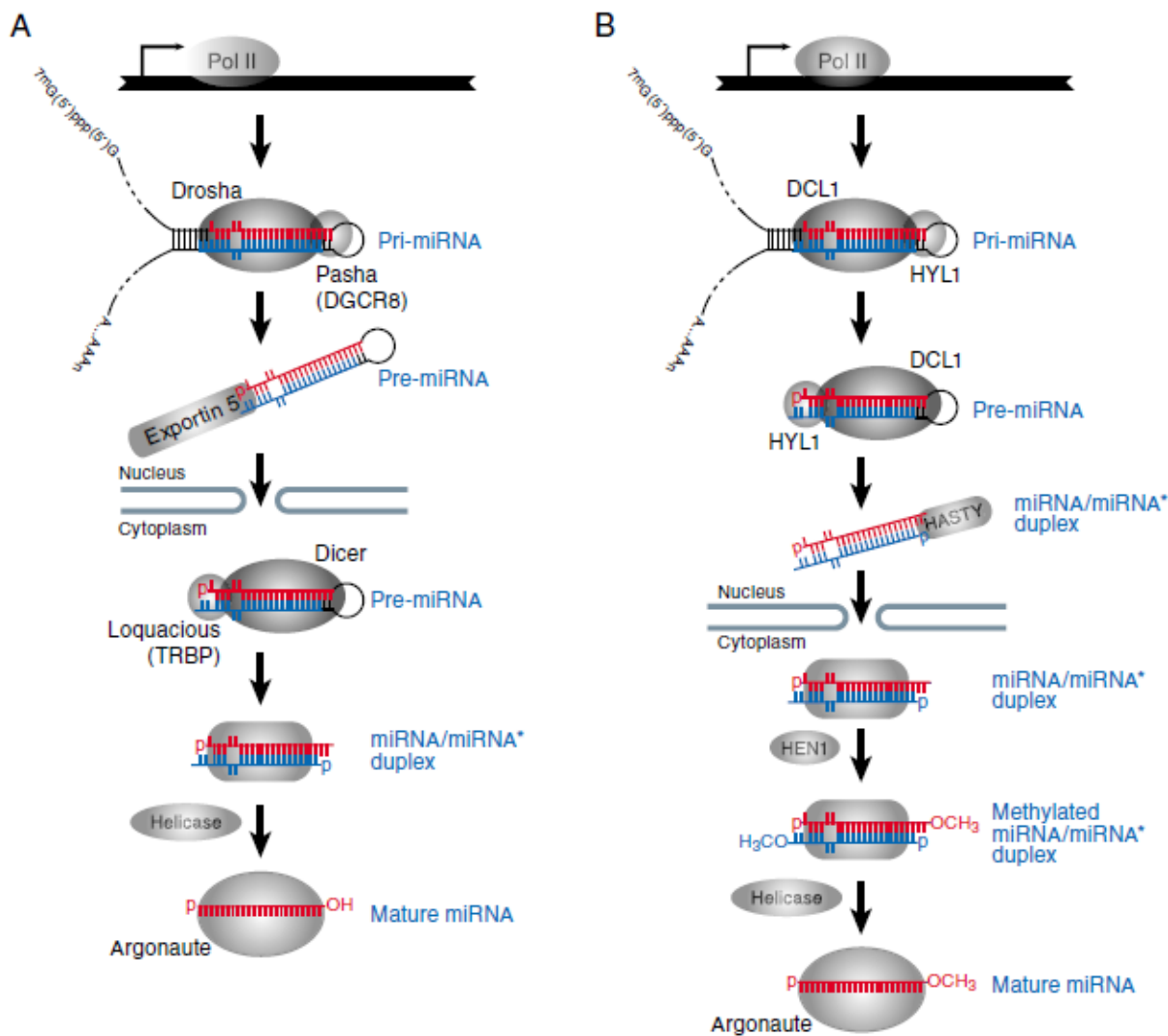
Οι πρωτεΐνες Dicer κόβουν ειδικά δίκλωνο μόριο RNA αφήνοντας χαρακτηριστικά 2 προεξέχοντα νουκλεοτίδια στο 5' άκρο και μια φωσφορική ομάδα στο 3'. Ο αριθμός των διαφορετικών Dicer ποικίλλει στους οργανισμούς. Ο *Caenorhabditis elegans* έχει μια μονο, η *Drosophila melanogaster* έχει δύο, μια υπεύθυνη για τα miRNA και μια για τα siRNA ενώ στο φυτό μοντέλο *Arabidopsis thaliana* υπάρχουν 4 DCLs (Dicer-like proteins), ομόλογων της ζωικής Dicer: Η DCL-1 είναι υπεύθυνη για τη βιογένεση των miRNA (μήκους ~21

νουκλεοτιδίων) από ατελώς συμπληρωματικές δομές φουρκέτας, η DCL-2 και η DCL-4 είναι υπεύθυνες για τη δημιουργία των siRNA από εξωγενή δίκλινα RNA και σχετίζονται επίσης με τον πολλαπλασιασμό και την μετάδοση του σήματος της σίγησης από κύτταρο σε κύτταρο, ενώ η DCL-3 είναι υπεύθυνη για τη βιογένεση των μικρών RNA μήκους 24 νουκλεοτιδίων που σχετίζονται με τη μεθυλίωση. (Carthew and Sontheimer 2009)

Αφού δημιουργηθούν τα μικρά RNA από τις Dicers, είτε miRNA ή siRNA αναγνωρίζονται στο κυτταρόπλασμα από το μεγαλοπρωτεϊνικό RISC, με βασική πρωτεΐνη μια πρωτεΐνη **Αργοναύτη (Argonaute – AGO)**. Η πρωτεΐνη AGO έχει μια PIWI υπομονάδα υπεύθυνη για αναγνώριση μικρών RNA και πρόσδεση στο 5' άκρο τους, και μια PAZ υπομονάδα υπεύθυνη για την πρόσδεση στο 3' άκρο μονόκλωνου RNA (βλ. εικόνα 1). Ανήκει στην οικογένεια των RNAsών Η που αναγνωρίζουν υβριδικά μόρια DNA-RNA και τα κόβουν ενδονουκλεοτιδικά. Έτσι, λοιπόν, η μια αλυσίδα των μικρών RNA ενσωματώνεται στο RISC για να λειτουργήσει σαν οδηγός προς όλες τις πλήρως συμπληρωματικές ή μερικώς συμπληρωματικές προς αυτήν αλληλουχίες για να καταστείλλει την έκφρασή τους. Η επιλογή της αλυσίδας που θα λειτουργήσει σαν αλληλουχία οδηγός φαίνεται να γίνεται από το RISC με βάση τη θερμοδυναμική σταθερότητα των άκρων. Η αλυσίδα της οποίας το 5' άκρο είναι θερμοδυναμικά ασταθέστερο φορτώνεται στο RISC, ενώ η άλλη αποδομείται. (Preall and Sontheimer 2005)

Η βιογένεση των miRNAs παρουσιάζει κάποιες διαφορές ανάμεσα στα μετάζωα και τα φυτά (βλ. εικόνα 2). Στα ζώα, το μακρύ δίκλινο RNA, το pri-miRNA, που παράγεται από την πολυμεράση II από κωδικές περιοχές του γονιδιώματος ή από ιντρόνια (mirtrons), αρχικά, υφίσταται μια επεξεργασία στον πυρήνα από ένα ένζυμο που ανήκει επίσης στην οικογένεια των Dicer αλλά δε συναντάται στα φυτά, την Drosha. Η Drosha παράγει το pre-miRNA. Αυτό μέσω μιας εξπορτίνης βγαίνει στο κυτταρόπλασμα, όπου και αναγνωρίζεται από την Dicer και κόβεται σε μικρά δίκλινα μόρια RNA. Στα φυτά η διαδικασία αυτή, γίνεται σε ένα μόνο στάδιο από την DCL-1 στον πυρήνα. Τα μικρά δίκλινα RNA που παράγονται μεταφέρονται στο κυτταρόπλασμα από μια ορθόλογη πρωτεΐνη της ζωικής εξπορτίνης στο κυτταρόπλασμα. Σε αντίθεση με τα ζωικά miRNA, τα φυτικά miRNA υπόκεινται σε μεθυλίωση του 2' υδροξυλίου του 3' άκρου από τη **HEN1**

μεθυλοτρανσφεράση. Με αυτόν τον τρόπο γίνονται δομικά πιο σταθερά, ή πιθανώς διευκολύνεται η ενσωμάτωση στο σύμπλοκο RISC. (Li et al. 2005)



Εικόνα 2 Βιογένεση των miRNAs στα ζώα και τα φυτά. (Du and Zamore 2005)

Διαφορές ανάμεσα στο βασίλειο των φυτών και των ζώων εμφανίζονται και στο ποσοστό της συμπληρωματικότητας μεταξύ μικρού RNA και αλληλουχίας στόχου, που απαιτείται για να επιτευχθεί η καταστολή (Axtell et al. 2011). Η καταστολή της έκφρασης μπορεί να γίνει α)μέσω άμεσης ή έμμεσης καταστροφής του μεταγράφου, β)μέσω αναστολής της μετάφρασης, γ)μέσω μεθυλίωσης των κυτοσινών της αλληλουχίας ή δ)των ιστονών της χρωματίνης (Melnyk et al. 2011). Στα φυτά, στις περισσότερες περιπτώσεις

παρατηρείται πλήρης συμπληρωματικότητα με το mRNA στόχο και επέρχεται κόψιμο και καταστροφή του μεταγράφου. Εντούτοις, στα ζώα σπάνια συναντάται η πλήρης συμπληρωματικότητα και έχει παρατηρηθεί στα φυτά. Μια μικρή περιοχή συμπληρωματικότητας αρκεί για να επιτευχθεί καταστολή. Αυτή η περιοχή βρίσκεται στο 5' άκρο του miRNA, πιο συγκεκριμένα στην περιοχή μεταξύ των 2-8 νουκλεοτιδίων και ονομάζεται περιοχή seed. Η περιοχή seed προσδέεται στην 3' αμετάφραστη περιοχή των ζωικών mRNA. Στις περιπτώσεις αυτές, μη πλήρους συμπληρωματικότητας, λοιπόν, επέρχεται αναστολή της μετάφρασης του στόχου και όχι κοπή του μεταγράφου (Axtell et al. 2011). Δεδομένου ότι η seed περιοχή είναι πολύ μικρού μήκους, ένα miRNA έχει παραπάνω από έναν πιθανούς στόχους. Συχνά, ένα miRNA είναι στόχος πολλών διαφορετικών miRNA. Υπολογιστικές και πειραματικές μελέτες έχουν δείξει πως πάνω από το 30% των γονιδίων των θηλαστικών ελέγχονται από miRNA. (Nilsen 2007)

### **1.3.RNAi σαν μέθοδος καταπολέμησης**

Ο μηχανισμός του RNAi με τη βοήθεια της βιοτεχνολογίας, όντας συντηρημένος στους οργανισμούς, μπορεί να λειτουργήσει σαν εργαλείο για την καταπολέμηση των ζημιογόνων προς τα φυτά οργανισμών. dsRNA μπορεί τεχνητά να παράγεται από το φυτό και να στοχεύει αλληλουχίες παρασιτικού οργανισμού, οι οποίες θα καταστέλλονται όταν υπάρξει προσβολή. Μπορεί να στοχευθούν θεμελιώδη γονίδια για την επιβίωση του παθογόνου παρασίτου ή γονίδια που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα του σε παρασιτοκτόνα.

Οι πρώτες σχετικές αναφορές κατασκευής διαγονιδιακών φυτών ανθεκτικών μέσω της παραγωγής dsRNA ήταν σε ιούς (Smith et al. 2000; Wang et al. 2000; Kalantidis et al. 2002). Αντίστοιχα, κατασκευάστηκαν διαγονιδιακά φυτά ανθεκτικά σε βακτήρια (Escobar et al. 2001).

Στη συνέχεια, αντίστοιχες μελέτες εφαρμόστηκαν και για φυτοπαρασιτικούς νηματώδεις (Huang et al. 2006; Yadav et al. 2006). Ήταν γνωστό πως στον *C.elegans*, όταν εισαχθούν siRNAs εξωγενούς προελεύσεως είτε απλά μέσω εμβάπτισης σε διάλυμα dsRNA, είτε μέσω τροφής από μετασχηματισμένα βακτήρια επάγεται γονιδιακή σίγηση (Fire et al. 1998). Επίσης siRNAs φυτικής προελεύσεως, όταν ενέθηκαν στο *C.elegans* ενεργοποίησαν

το RNAi. (Boutla et al. 2002). Με βάση αυτά, οι Huang et al κατασκεύασαν φυτά ανθεκτικά σε νηματώδεις των ριζών (root-knot nematodes) που παρήγαγαν dsRNA για το γονίδιο *16D10*, το οποίο έδειξαν πως είναι απαραίτητο για να εγκαθιδρυθεί η μόλυνση του νηματώδη στο φυτό. Οι Yadav et al, στη δεύτερη δημοσίευση, στοχεύοντας μέσω dsRNA παραγόμενο από το φυτό, housekeeping γονίδια του νηματώδη των ριζών, μια ιντεγκράση και έναν παράγοντα ωρίμανσης του DNA, έδειξαν πως επέρχεται καταστολή τους και σαν συνέπεια μειωμένη επιτυχία προσβολής.

Μετά το 2006, που επαληθεύτηκε πως τεχνητό dsRNA επάγει αποτελεσματικά το μηχανισμό του RNAi και σε έντομα, και συγκεκριμένα στο *Epirhyas postvittana* (Turner et al. 2006), το 2007 δύο επαναστατικές μελέτες απέδειξαν την αποτελεσματικότητα της μεθόδου του RNAi προερχόμενο από διαγονιδιακά φυτά σαν μέθοδο καταπολέμησης παρασιτικών εντόμων. (Baum et al. 2007; Mao et al. 2007). Οι Mao et al., κατασκεύασαν φυτά καλαμποκιού, καπνού *Nicotiana tabacum* και *Arabidopsis thaliana* ανθεκτικά στο λεπιδόπτερο *Helicoverpa armigera*. Συγκεκριμένα, έχοντας αναγνωρίσει ένα γονίδιο της οικογένειας των P450 μονοοξυγενασών, το *CYPAE14*, υπεύθυνο για το σύστημα αποτοξικοποίησης του *H. armigera*, κατασκεύασαν διαγονιδιακά φυτά που παρήγαγαν δίκλωνο RNA έναντι αυτού, καθιστώντας το ευάλωτο στις αλληλοπαθητικές ουσίες που φυσικά εκκρίνουν τα φυτά και συγκεκριμένα στο gossypol. Οι Baum et al., απέδειξαν την τεχνική σε κολεόπτερα (Western corn rootworm), στοχεύοντας με δίκλωνο RNA παραγόμενο από φυτά καλαμποκιού, μια V-ATPάση. Οι προνύμφες έδειξαν πολύ μειωμένη ανάπτυξη κ θνησιμότητα.

Ακολούθησε η εφαρμογή της μεθόδου σε ημίπτερα (Zha et al. 2010; Pitino et al. 2011). Οι Zha et al δούλεψαν με τον οργανισμό *Nilaparvata lugens Stal* που αποτελεί καταστροφικό παράσιτο του ρυζιού. Εντόπισαν τρία γονίδια, το *NIHT1*, το *Nlcar* και το *Nltry* που εκφράζονται στο μεσέντερο. Αφού κατασκεύασαν διαγονιδιακά φυτά ρυζιού που παρήγαγαν τα αντίστοιχα dsRNA για τα γονίδια αυτά, μετά από τροφή 3 μερών των εντόμων, έδειξαν καταστολή τους. Οι Pitino et al, δουλεύοντας με τον οργανισμό *Myzus persicae* επέλεξαν το γονίδιο *Rack1* που εκφράζεται κατά κύριο λόγο στο μεσέντερο, και το γονίδιο *C002* που εκφράζεται στους σιελογόνους αδένες. Μετασχηματίζοντας τα φυτά παροδικά με αγροεμποτισμό, είτε κατασκευάζοντας εξ' ολοκλήρου διαγονιδιακά φυτά

προς την παραγωγή dsRNA από αυτά εναντίον των προαναφερθέντων γονιδίων, έδειξαν μέχρι και 60% καταστολή τους μετά από 17 ημέρες τροφής. Επιπλέον, σημειώθηκε μείωση των επιπέδων γονιμότητας των ατόμων, υποδηλώνοντας ότι τα δύο γονίδια- στόχοι ήταν θεμελιώδους σημασία για τον οργανισμό.

#### **1.4. Πλεονεκτήματα του RNAi μέσω της τροφής σαν μέθοδος καταπολέμησης**

Η μέθοδος του RNAi που ξεκινά με την παραγωγή dsRNA από το φυτό παρουσιάζει σημαντικά πλεονεκτήματα σαν μέθοδος καταπολέμησης. Πρώτα απ' όλα είναι διαρκής και ασφαλής για το περιβάλλον και τον άνθρωπο. Πρέπει να σημειωθεί ότι παρουσιάζει πολύ υψηλή εξειδίκευση στόχου. Μετά από σωστό σχεδιασμό, δεν επηρεάζονται η ανάπτυξη του φυτού, ούτε οργανισμοί μη-στόχοι. Παράλληλα, δίδει τη δυνατότητα για μεγαλύτερου εύρους προστασία ταυτόχρονα, στοχεύοντας γονίδια συντηρημένα σε πολλαπλούς οργανισμών. Ήδη αυτό έχει εφαρμοστεί για την ανθεκτικότητα σε ιούς, κ συγκεκριμένα σε 3 RNA ιούς ταυτόχρονα, τους PLRV, PVY, PVX (Arif et al. 2010).

Μεγάλο πλεονέκτημα της μεθόδου, ακόμα, είναι πως πολύ δύσκολα μπορεί να επέλθει μείωση της ανθεκτικότητας λόγω μεταλλαγών. Δεδομένου ότι πρόκειται για RNA - RNA αλληλεπιδράσεις και όχι πρωτεϊνικές, δεν είναι απαραίτητη η πλήρης ομολογία. Πιο συγκεκριμένα, στην περίπτωση των μεθόδων που βασίζονται σε πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις, μια σημειακή μεταλλαγή θα μπορούσε να τροποποιήσει την αλληλουχία των αμινοξέων της πρωτεΐνης αλλάζοντας την ή κάνοντάς την τελείως ανενεργή. Στην περίπτωση του RNAi, πρέπει πάρα πολλές μεταλλαγές να συσσωρευτούν στη συγκεκριμένη περιοχή ώστε κανένα από τα μικρά RNA που προκύπτουν να μην είναι πλέον λειτουργικό, πράγμα που είναι μικρές οι πιθανότητες να συμβεί. Δεύτερον, λαμβάνοντας υπόψη πως, δυνητικά, όλα τα γονίδια που όταν κατασταλούν προκαλούν μειωμένη βιωσιμότητα του εχθρού, πολλοί είναι οι δυνητικά καλοί στόχοι του RNAi. Το γεγονός αυτό της ύπαρξης πολλών εναλλακτικών στόχων δίδει μεγάλο πλεονέκτημα ευελιξίας σε περίπτωση εμφάνισης ανθεκτικότητας. (Niu et al. 2010)

Τέλος, η εφαρμογή της μεθόδου στον αγρό δε θα προκαλέσει δυσκολίες αφού δεν επιβάλλει αλλαγές στις γεωργικές τεχνικές, ή δεν απαιτεί ειδική τεχνογνωσία. Βέβαια,

όπως και κάθε άλλη μέθοδος καταπολέμησης, πριν εφαρμοστεί στον αγρό πρέπει να περάσει από πολλά στάδια ελέγχου για να εξασφαλιστεί η ασφάλεια και η αποτελεσματικότητά της.

Αυτή η μέθοδος μπορεί να λειτουργήσει και σαν εργαλείο ανίχνευσης πιθανών γονιδίων σημαντικών για την ανθεκτικότητα. Ακόμη μπορεί να εφαρμοστεί σαν μέθοδος καταστολής γονιδίων αφού στα έντομα και τα ακάρεα, η κατασκευή knock-out ή knock-down ατόμων δεν είναι ακόμα εύκολη. Το πλεονέκτημά της προς την τεχνητή διαίτα και τις μικροενέσεις που χρησιμοποιούνται είναι η συνεχής παραγωγή δίκλωνου RNA, δομικά σταθερού, από το φυτό. (Huvenne and Smagghe 2009)

## 1.5. *Tetranychus urticae* και *Bemisia tabaci*

### 1.5.1. *Tetranychus urticae*

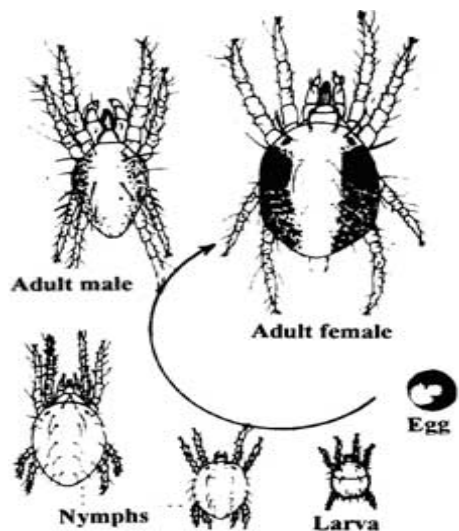
Ο *Tetranychus urticae*, γνωστός σαν τετράνυχος ο δίστικτος (two-spotted spider mite) είναι από τα πιο καταστροφικά παράσιτα των αγροτικών καλλιεργιών παγκοσμίως. Ανήκει στην κλάση των αραχνιδίων και συγκεκριμένα στα ακάρεα. Η πλήρης του συστηματική του φαίνεται στον πίνακα 1.

<i>Tetranychus urticae</i>	
<b>Φύλο</b>	Αρθρόποδα
<b>Υποφύλο</b>	Chelicerata
<b>Κλάση</b>	Αραχνίδια
<b>Τάξη</b>	Ακάρεα
<b>Οικογένεια</b>	Tetranychidae

Πίνακας 1 Συστηματική κατάταξη του *Tetranychus urticae*



Ο κύκλος ζωής του διαρκεί περίπου 30 μέρες σε ευνοϊκές συνθήκες υγρασίας και θερμοκρασίας. Κάθε θηλυκό έχει διάρκεια ωοτοκίας δύο βδομάδων στις οποίες γεννά 50-100 αυγά. Τα αυγά εκκολάπτονται μέσα σε 4-5 ημέρες σε προνύμφες (larvae). Στη συνέχεια ακολουθούν τα στάδια της πρωτονύμφης και της δευτερονύμφης, στα οποία παραμένουν περίπου δυο ημέρες μέχρι να μεταμορφωθούν στα ενήλικα άτομα. Στο στάδιο της προνύμφης υπάρχουν 3 ζεύγη ποδιών, ενώ από το στάδιο της πρωτονύμφης και μετά υπάρχουν 4 ζεύγη ποδιών. Ανάμεσα στα 4 στάδια υπάρχουν καταστάσεις στις οποίες ο οργανισμός παραμένει αδρανής, περικλειόμενος από εξωτερικό σκληρό περίβλημα, τα λεγόμενα ήσυχα στάδια (quiescent stages) της πρωτοχρυσαλίδας, δευτεροχρυσαλίδας και τελιοχρυσαλίδας. Στο ενήλικο στάδιο ο οργανισμός έχει μέγεθος γύρω στα 0,4-0,5 χιλιοστά.



Εικόνα 3 Κύκλος ζωής τετρανύχου

Ο τετράνυχος πολλαπλασιάζεται με αρρενότοκη παρθενογένεση. Έτσι, τα αυγά που υφίστανται γονιμοποίηση δίδουν θηλυκά διπλοειδή άτομα, ενώ τα αυγά που δεν γονιμοποιούνται δίδουν αρσενικά απλοειδή άτομα.

Είναι από τους εξαιρετικά πολυφάγους οργανισμούς. Αναπτύσσεται εύκολα σε πάνω από 1.100 φυτικά είδη από διαφορετικές οικογένειες (Grbic et al. 2011) συμπεριλαμβανομένων των περισσότερων φυτών οικονομικής σημασίας όπως το καλαμπόκι, η σόγια, το φασόλι, η ντομάτα, το μαρούλι, τα αγγούρια, οι πιπεριές κ. ά (Jeppson et al. 1975)

Ανήκει στα μυζητικά παράσιτα. Έχει στοματικά όργανα σε σχήμα στυλέτου και ρουφάει τους χυμούς από τα φύλλα προκαλώντας χαρακτηριστικές λευκές κηλίδες και χλωρωτικό φαινότυπο (βλ. εικόνα 4).



Εικόνα 4 Φύλλα φασολιού μετά από εισβολή του τετρανύχου

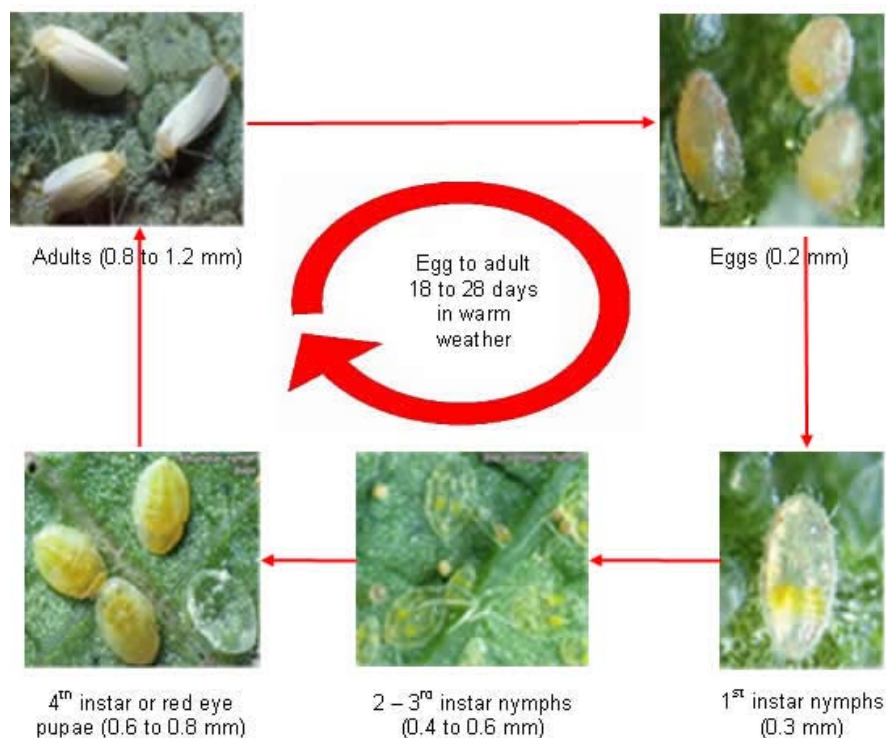
### 1.5.2. *Bemisia tabaci*

Ο οργανισμός *Bemisia tabaci* (Gennadius, 1889), ο γνωστός αλευρώδης, είναι από τα πιο σημαντικά αγροτικά παράσιτα παγκοσμίως. Συναντάται σε όλες τις ηπείρους, εκτός της Ανταρκτικής, και βρίσκεται στη λίστα με τα 100 πιο καταστροφικά είδη (ISSG 2010). Ανήκει στα έντομα, στα ημίπτερα και η πλήρης συστηματική της κατάταξη φαίνεται στον πίνακα 2.

<i>Bemisia tabaci</i>	
Φύλο	Αρθρόποδα
Υποφύλο	Hexapoda
Κλάση	Έντομα
Τάξη	Ημίπτερα
Υπόταξη	Homoptera
Οικογένεια	Aleurodidae

Πίνακας 2 Συστηματική ταξινόμηση του *Bemisia tabaci* (Gennadius,1989)

Αναπαράγεται με αρρενότοκη παρθενογένεση. Τα θηλυκά άτομα γεννούν περίπου 300 αυγά, τα οποία τοποθετούν κάθετα στην κάτω επιφάνεια του φύλλου. Ο κύκλος ζωής του διαρκεί περίπου 25 ημέρες. Τα θηλυκά άτομα ζουν 10-15 μέρες τους καλοκαιρινούς μήνες (>20°C) και 30-60 μέρες κατά τους χειμερινούς μήνες (~14°C). Τα αυγά μέσα σε 5-10 μέρες δίδουν προνύμφες 1<sup>ου</sup> σταδίου. Ανάλογα με τον ξενιστή και τις θερμοκρασίες ολοκληρώνουν τον βιολογικό τους κύκλο από 15-30 μέρες (προνύμφη 1<sup>ου</sup>- 2<sup>ου</sup>- 3<sup>ου</sup>-4<sup>ου</sup> σταδίου- ακμαίο άτομο). (βλ εικόνα 5) Περισσότερο ζημιογόνες είναι οι προνύμφες 3<sup>ου</sup> και 4<sup>ου</sup> σταδίου όπως και τα ακμαία. Τρέφονται απομυζώντας τους χυμούς των φύλλων. Τα προσβαλλόμενα φύλλα εμφανίζουν κιτρινοπράσινο χρωματισμό (χλώρωση).



Εικόνα 5 Κύκλος ζωής του αλευρώδη (*Bemisia tabaci*)

### 1.6. Μηχανισμοί ανθεκτικότητας – p450s

Τόσο ο τετράνυχος, όσο και ο αλευρώδης, λόγω του μικρού κύκλου ζωής τους, λόγω της αναπαραγωγής μέσω αρρενότοκης παρθενογένεσης και της υψηλής αναπαραγωγικής ικανότητας αλλά και λόγω της αυξημένης χρήσης παρασιτοκτόνων εμφανίζουν πολύ γρήγορα ανθεκτικότητα σε όλο και περισσότερα παρασιτοκτόνα. Στον πίνακα 3 παρουσιάζονται οι 10 πρώτοι οργανισμοί των αρθροπόδων που εμφανίζουν πιο γρήγορα ανθεκτικότητα στις χρησιμοποιούμενες ουσίες της χημικής καταπολέμησης. Η κατάταξη γίνεται με βάση τον αριθμό των διαφορετικών χημικών ουσιών στα οποία έχει αναφερθεί ανθεκτικότητα. Βλέπουμε πως ο τετράνυχος βρίσκεται στην 1<sup>η</sup> θέση, ενώ και ο αλευρώδης βρίσκεται στους 10 πρώτους.

Species	Taxonomy	Pest type	No. active ingredients	Cases
<i>Tetranychus urticae</i>	Acari: Tetranychidae	Crop	92	367
<i>Plutella xylostella</i>	Lepidoptera: Plutellidae	Crop	81	437
<i>Myzus persicae</i>	Homoptera: Aphididae	Crop	73	320
<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	Coleoptera: Chrysomelidae	Crop	51	188
<i>Musca domestica</i>	Diptera: Muscidae	Urban	47	195
<i>Blattella germanica</i>	Blattodea: Blattellidae	Urban	43	213
<i>Boophilus microplus</i>	Acari: Ixodidae	Livestock	43	151
<i>Helicoverpa armigera</i>	Lepidoptera: Noctuidae	Crop	42	608
<i>Bemisia tabaci</i>	Homoptera: Aleyrodidae	Crop	42	281
<i>Panonychus ulmi</i>	Acari: Tetranychidae	Crop	42	181

Πίνακας 3 Παράσιτα που εμφανίζουν γρήγορα ανθεκτικότητα στη χημική καταπολέμηση (Whalon et al. 2008), (Van Leeuwen et al. 2010)

Η ανθεκτικότητα στα παρασιτοκτόνα επέρχεται είτε λόγω αλλαγής στην αλληλεπίδραση μεταξύ παρασιτοκτόνου και ενδογενούς στόχου του μέσα στον οργανισμό του παρασίτου λόγω μεταλλαγής στο στόχο του παρασιτοκτόνου, είτε λόγω ποιοτικής (αλλαγή στη δράση) ή ποσοτικής αλλαγής (αύξηση ενεργότητας) των ενζύμων αποτοξικοποίησης του παρασίτου, ώστε το παρασιτοκτόνο διασπάται πριν αναγνωρίσει το στόχο του (Van Leeuwen et al. 2005; Van Leeuwen et al. 2010). Γνωστά ένζυμα αποτοξικοποίησης είναι οι εστεράσες, οι θειολομεταφοράσες της γλουταθειόνης, οι P450 μονοοξυγενάσες κ.ά. (Feyereisen 2005)

Οι P450s αποτελούν μια από τις μεγαλύτερες κατηγορίες ενζύμων, των μονοοξυγενασών καταλύοντας την αντίδραση προσθήκης ενός ατόμου από το μοριακό οξυγόνο σε οργανικές ουσίες, προκαλώντας, έτσι, την αναγωγή του δεύτερου ατόμου οξυγόνου σε νερό, σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:  $RH + O_2 + 2H^+ + 2e^- \rightarrow ROH + H_2O$ .

Ο αριθμός των P450s στο κύτταρο είναι πολύ μεγάλος και φαίνεται να εμπλέκονται σε πληθώρα μηχανισμών τόσο σε αναπτυξιακά αλλά και ρυθμιστικά μονοπάτια του οργανισμού. Εμπλέκονται με τη βιοσύνθεση και το μεταβολισμό ενδογενών ουσιών όπως στεροειδείς ορμόνες και λίπη, ενώ η δράση τους έχει συσχετιστεί έντονα με την αποτοξικοποίηση ξеноβιοτικών ουσιών, συμπεριλαμβανομένου και των εντομοκτόνων. (Feyereisen 2005)

### 1.7.NADPH - Cytochrome p450 Reductase

Για να ενεργοποιηθούν τα p450 είναι απαραίτητη η παρουσία ενός δότη ηλεκτρονίων που θα τα ανάγει - της αναγωγής των κυτοχρωμάτων P450 ( **NADPH- Cytochrome P450 Reductase – CPR**).

Η CPR ανήκει στην οικογένεια των φλαβοπρωτεϊνών και είναι μια θειολοπρωτεΐνη. Μεταφέρει ηλεκτρόνια στις P450 από το NADPH. Έχει μια FAD υπομονάδα με ικανότητα αναγνώρισης του NADPH, και μια FMN υπομονάδα. (Vermilion et al. 1981) Τα ηλεκτρόνια από το NADPH μεταφέρονται μέσω της FAD και έπειτα της FMN υπομονάδας της, στα p450s ανάγοντας, όσο αυτή οξειδώνεται.

Βρίσκεται προσδεμένη στις μεμβράνες του ενδοπλασματικού δικτύου μέσω του αμινοτελικού της άκρου ή προσδεμένη στις μεμβράνες των μιτοχονδρίων (Kida et al. 1998)

Εκτός από τις P450, η CPR λειτουργεί σαν δότης ηλεκτρονίων και για άλλες μονοοξυγενάσες που βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα. (Zhu et al. 2012) Τόσο η CPR όσο και οι P450s εντοπίζονται στους περισσότερους ιστούς.

Πληθώρα γονιδίων κωδικοποιούν τις διαφορετικές πρωτεΐνες P450 στους οργανισμούς. Μόνο ένα γονίδιο έχει βρεθεί να κωδικοποιεί τη CPR. Λόγω αυτού, η CPR αποτελεί έναν πολύ καλό στόχο για καταστολή αφού αν με κάποιον τρόπο κατασταλεί η δράση της σαν βασική αναγωγή, δυνητικά στοχεύονται όλα τα P450s ταυτόχρονα και καταστέλλονται. Συνεπώς, μειώνονται τα επίπεδα αποτοξικοποίησης και η δράση των παρασιτοκτόνων καθίσταται και πάλι ενεργή. Καταστολή της CPR μέσω RNAi με μικροένεση έχει επιτευχθεί στο κουνούπι -*Anopheles gambiae* (Lycett et al. 2006) και στον κοριό - *Cimex lectularius* (Zhu et al. 2012). Στην πρώτη μελέτη, κάνοντας βιοδοκιμές με περμεθρίνη παρατήρησαν αυξημένα επίπεδα ευαισθησίας συγκριτικά με τον ανθεκτικό σε αυτήν πληθυσμό ενώ στη δεύτερη μελέτη παρατήρησαν αύξηση της ευαισθησίας στην χημική ουσία δελταμεθρίνη. Ακόμη, παρατηρήθηκαν μείωση της γονιμότητας και καθυστέρηση στην ανάπτυξη.

## Σκοπός

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να επιτευχθεί προστασία των φυτών από τους οργανισμούς *Bemisia tabaci* και *Tetranychus urticae*, δύο βασικά αγροτικά παράσιτα, μέσω της έκφρασης dsRNA από τα φυτά για το γονίδιο της CPR. Βασιζόμενοι στις βιβλιογραφικές αναφορές που καταγράφουν επιτυχία της μεθόδου, θελήσαμε να διερευνήσουμε την εφαρμογή αυτής της τεχνικής στους δύο αυτούς οργανισμούς. Η *Bemisia tabaci* ανήκει στα έντομα, στην τάξη των ημιπτέρων στα οποία όπως αναφέρθηκε παραπάνω έχει καταγραφεί επιτυχημένη εφαρμογή. Ο *Tetranychus urticae*, ανήκει στα αραχνίδια, στα οποία σχετική βιβλιογραφική αναφορά δεν έχει καταγραφεί μέχρι στιγμής.

Γι' αυτό το σκοπό, χρησιμοποιήθηκαν αγροεμποτισμένα φύλλα τομάτας που παρήγαγαν παροδικά dsRNA της CPR του τετρανύχου με τα οποία τράφηκαν οι τετράνυχοι. Ακόμη, κατασκευάστηκαν διαγονιδιακά φυτά καπνού που παρήγαγαν dsRNA της CPR του αλευρώδη.

## 2. Υλικά και Μέθοδοι

### Περιληπτικά η πειραματική διαδικασία

TuCPR , BtCPR



**1.** Σχεδίαση ειδικών *primer*, PCR, Απομόνωση και καθαρισμός τμημάτων DNA

**TuCPR214 & BtCPR314**



**2.** Κλωνοποίηση στο δυαδικό φορέα **pK7GWIWG2(I)**

**hp\TuCPR & hp\BtCPR**

**3.** Μετασηματισμός σε αγροβακτήρια

### **hp\TuCPR**

**4.** Αγροεμπότισμός -> έλεγχος λειτουργίας

*i.* RNA extraction από φυτικό ιστό

*ii.* Northern blot

**5.1** Αγροεμπότισμός σε φύλλα τομάτας

**5.2** Εκτροφή τετρανύχων με αγροεμπότισμένα φύλλα

**5.3** Ανάλυση έκφρασης TuCPR

*i.* RNA Extraction από άτομα Τετρανύχων

*ii.* cDNA synthesis

*iii.* Real-Time PCR

### **hp\BtCPR**

**6.** Κατασκευή διαγονιδιακών φυτών καπνού

Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων απαραίτητη ήταν η κατασκευή 2 πλασμιδιακών κατασκευών που οδηγούν στην παραγωγή dsRNA από κομμάτια των γονιδίων της CPR του τετρανύχου (**TuCPR**) και της CPR του αλευρώδη (**BtCPR**) στο φυτικό κύτταρο. Τα κομμάτια της CPR που επιλέχθηκαν είχαν μήκος ικανό για καταστολή (>200 βάσεις). Το μακρύ δίκλωνο RNA των πλασμιδίων, όπως αναλυτικά περιγράφηκε παραπάνω, αναγνωρίζεται από το μηχανισμό της σίγησης στο φυτό επάγοντας την δημιουργία μικρών μορίων RNA των siRNAs. Στη δεδομένη περίπτωση, δεν υπάρχει ενδογενής στόχος φυτό για τα siRNA αφού είναι ομόλογα με γονίδιο των παρασίτων. Επομένως στο φυτό θα είναι αδρανής. Κατά την προσβολή του παρασίτου μπορούν δυνητικά να οδηγήσουν στην καταστολή της TuCPR και της BtCPR αντίστοιχα μέσω του μηχανισμού του RNAi των παρασίτων.

Γι' αυτό τον σκοπό, χρησιμοποιήθηκαν δυαδικοί φορείς που εκφράζουν την επιλεγμένη αλληλουχία υπό τον έλεγχο ισχυρού υποκινητή για την ενσωμάτωση τους στο φυτικό γονιδίωμα και ισχυρή έκφρασή τους από τους κυτταρικούς μηχανισμούς.

Οι δυο πλασμιδιακές κατασκευές μετασχηματίστηκαν σε αγροβακτήρια. Τα αγροβακτήρια στη φύση φέρουν το πλασμίδιο Ti. Μέρος αυτού, το T-DNA (transferred DNA) ενσωματώνεται στο φυτικό γονιδίωμα κατά τη μόλυνση. Η επιτυχής μεταφορά του T-DNA εξασφαλίζεται από την παρουσία δύο συνοριακών αλληλουχιών που περιέχει. Την ιδιότητα αυτή του αγροβακτηρίου εκμεταλλευόμαστε για την γενετική τροποποίηση φυτών.

Πραγματοποιήθηκε, λοιπόν, κατασκευή διαγονιδιακών φυτών καπνού (*Nicotiana tabacum*) που εξέφραζαν τη **hp\BtCPR** μέσω γενετικής τροποποίησης από το αγροβακτήριο.

Για την **hp\TuCPR** πραγματοποιήθηκε παροδικός μετασχηματισμός φύλλων ντομάτας, ποικιλίας Moneymaker, μέσω αγροεμποτισμού. Ακολούθησε εκτροφή συγχρονισμένων ατόμων τετρανύχων με τα αγροεμποτισμένα φύλλα, φαινοτυπική παρατήρηση τους για 7 ημέρες, καταγραφή της θνησιμότητας και έπειτα συλλογή τους για μοριακή ανάλυση. Μετά από εξαγωγή ολικού RNA και αντίστροφη μεταγραφή του σε cDNA έγινε Real-Time PCR για τον έλεγχο των επιπέδων έκφρασης της TuCPR.



## 2.1 Πλασμιδιακές κατασκευές

Για την κλωνοποίηση των κομματιών της TuCPR και της BtCPR στους δυαδικούς φορείς χρησιμοποιήθηκαν προηγούμενες πλασμιδιακές κατασκευές στις οποίες είχαν ήδη κλωνοποιηθεί ολόκληρα τα γονίδια της TuCPR και BtCPR αντίστοιχα.

Σχεδιάστηκαν εκκινητές για κομμάτια των γονιδίων ικανά για καταστολή (214 βάσεις για την TuCPR και 314 βάσεις για την BtCPR). Τα κομμάτια αυτά ελέγχθηκε μέσω βιοπληροφορικής ανάλυσης με το πρόγραμμα BLAST® πως δεν παρουσίαζαν ομολογία με άλλα γονίδια των παρασίτων ούτε με φυτικά γονίδια ώστε να επιτευχθεί μόνο η υπό μελέτη σίγηση. Επίσης, ελέγχθηκε πως δεν παρουσίαζαν ομολογία με συντηρημένα μοτίβα πρωτεϊνικών υπομονάδων για να μην στοχευθούν για καταστολή ανεπιθύμητα και αυτές.

Στα άκρα των εκκινητών προστέθηκαν αλληλουχίες αναγνώρισης περιοριστικών ενζύμων για την ενσωμάτωση τους σε πλασμιδιακό φορέα. Στον Forward εκκινητή TuCPR\214 προστέθηκε αλληλουχία αναγνώρισης της BamHI ενώ στο Reverse της XhoI. Στον εκκινητή BtCPR\314 Forward προστέθηκε αλληλουχία αναγνώρισης της EcoRI και στον Reverse της XhoI. Οι αλληλουχίες των εκκινητών παρουσιάζονται στον πίνακα 4.

	Forward	Reverse
TuCPR\214	<b>GGGATCCTT</b> ATGCAGCTTTCTCTCGT	<b>GCTCGAGCTT</b> GACTTGTPTTGCCACT
BtCPR\314	<b>TCGAATTCCT</b> CAGAAGCGTTGTACACAC	<b>CTCTCGAGG</b> AGTATGCCACGGATCCAAA

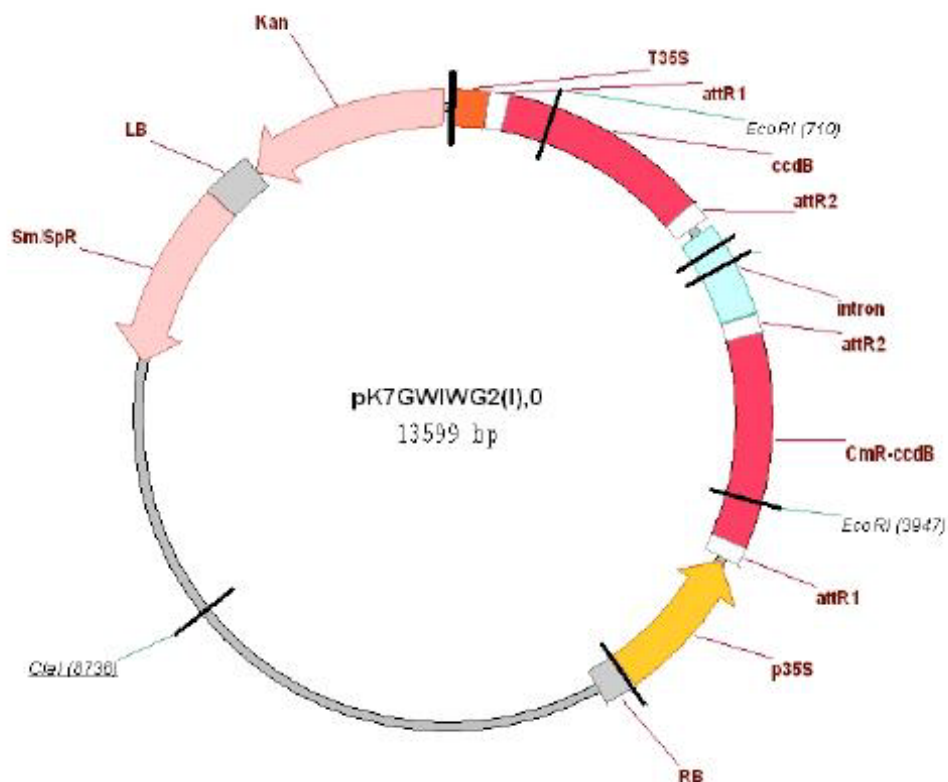
Πίνακας 4 Εκκινητές για την απομόνωση κομματιών από τα γονίδια TuCPR και BtCPR.

Με την Αλυσιδωτή αντίδραση Πολυμεράσης (PCR) επιτεύχθηκε η απομόνωση των κομματιών TuCPR\214 και BtCPR\314.

Ακολούθησε κλωνοποίησή τους με βάση τις γενικές αρχές που παραθέτονται στο Molecular Cloning (Sambrook et al. 1989) (ενδονουκλεοτιδική κοπή, αντιδράσεις σύνδεσης, μετασχηματισμός σε δεκτικά κύτταρα, απομόνωση και καθαρισμός ανασυνδυασμένου πλασμιδίου). Τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν της εταιρείας New England Biolabs και της Minotech (IMBB-FORTH).

Χρησιμοποιήθηκε το σύστημα **Gateway® cloning technology** (Invitrogen™) που βασίζεται στην ιδιότητα ανασυνδυασμού του βακτηριοφάγου λ. Έτσι, αρχικά, τα ενθέματα κλωνοποιήθηκαν σε φορέα δότη **pENTR3C** με τα ένζυμα BamHI – XhoI για την TuCPR\214

και τα ένζυμα *ECORI*-*XhoI* για την *BtCPR\314* ανάμεσα στις θέσεις *attL1* και *attL2* για να πραγματοποιηθεί ο ανασυνδυασμός. Σαν φορέας δέκτης με θέσεις *attR1* και *attR2* αλλά και δυαδικός φορέας, επιλέχθηκε ο **pK7GWIWG2(I)** (Karimi et al. 2002) (βλ. εικόνα 6). Η αντίδραση ανασυνδυασμού έγινε με το ένζυμο κλωνάση (Invitrogen™).



Εικόνα 6 Χάρτης δυαδικού φορέα pK7GWIWG2(I).

Ο pK7GWIWG2(I) είναι φορέας που παράγει δίκλινα μόρια RNA και περιέχει σαν γονίδια επιλογής για τα βακτήρια ένα γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό σπεκτινομυκίνη. Για την επιλογή των γενετικά τροποποιημένων φυτών περιέχει γονίδιο ανθεκτικότητας στην καναμυκίνη. Επίσης, περιέχει τις συνοριακές αλληλουχίες του T-DNA (LB – RB).

Μετά την κλωνοποίηση των ενθεμάτων στον τελικό φορέα δέκτη, εκτός από ειδικές επαληθευτικές πέψεις με περιοριστικά ένζυμα έγινε και αλληλούχισή τους από την **VBC Biotech Αυστρίας**.

## 2.2 Μετασηματισμός Αγροβακτηρίων

Αγροβακτήρια στελέχους C58C1 μετασηματιστήκαν με τα πλασμίδια ως εξής:

- 5μg πλασμιδιακού DNA προστίθενται σε δεκτικά κύτταρα αγροβακτηρίων που έχουν αφεθεί να ξεπαγώσουν στον πάγο.
- Αμέσως παγώνονται σε υγρό άζωτο
- Επώάζονται στους 37° για 30 λεπτά
- Προστίθεται 1ml θρεπτικού LB
- Επώαση στους 28° για 2 ώρες υπό ανάδευση
- Επίστρωση των αγροβακτηρίων μετά από κατακρήμισή τους με μικρή φυγοκέντρηση, σε στερεό LB παρουσία κατάλληλων αντιβιοτικών επιλογής για 2 μέρες.
- Οι αποικίες που θα μεγαλώσουν ελέγχονται με εξαγωγή πλασμιδιακού DNA και μετασχηματισμό του σε E.coli. Μετά από εξαγωγή του πλασμιδιακού DNA γίνονται διαγνωστικές πέψεις με κατάλληλα περιοριστικά ένζυμα.

### 2.3 Αγροεμποτισμός

Με τον αγροεμποτισμό επιτυγχάνεται παροδικός μετασχηματισμός φυτικών κυττάρων από το αγροβακτήριο. Με αυτή τη μέθοδο, μπορεί γρήγορα σε μια περιοχή του φύλλου να επέλθει μετασχηματισμός και τα αγροεμποτισμένα φύλλα να χρησιμοποιηθούν αντί διαγονιδιακών φυτών τα οποία χρειάζονται χρόνο για να κατασκευαστούν.

Στην παρούσα μελέτη, πραγματοποιήθηκε αγροεμποτισμός φύλλων καπνού για τα πλασμίδια  $pk7-TuCPR\214$  ( $hp\TuCPR$ ) και  $pk7-BtCPR314$  ( $hp\BtCPR$ ), πρώτον για τον έλεγχο της λειτουργίας τους και στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε εκ νέου αγροεμποτισμός σε φύλλα τομάτας, ποικιλίας Moneymaker για τα πλασμίδια  $hp\TuCPR$  και  $hp\GFP$  ( $pFGC5841$ ) (Koscianska et al. 2005) για τη εκτροφή τετρανύχων με αυτών.



Εικόνα 7 Τομάτα ποικιλίας Moneymaker

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

- Καλλιέργειες αγροβακτηρίων σε θρεπτικό LB με ριφαμπικίνη και κατάλληλο αντιβιοτικό επιλογής (σπεκτινομυκίνη για τον pK7GWIWG2(I) και καναμυκίνη για τον pFGC5841) επωάζονται στους 28° υπό ανάδευση για 48 ώρες περίπου
- Φυγοκέντρηση στις 2700 στροφές στους 4° για να κατακρημνιστούν τα κύτταρα
- Επαναδιάλυση της πελλέτας σε ίσο όγκο διαλύματος MMA (βλ. πίνακα 5)
- Επώαση στους 28° υπό ανάδευση για 1 ώρα
- Φυγοκέντρηση στις 2700 στροφές στους 4° για να κατακρημνιστούν τα κύτταρα
- Έκπλυση της πελλέτας μέσω επαναδιάλυσής της σε MgCl<sub>2</sub> 10mM (3 φορές)
- Αραίωση της καλλιέργειας μέχρι τελικής OD ίση με 0,1-0,2 στα 600nm.
- Σε νεαρά φυτά που δεν έχουν ποτιστεί, με τη βοήθεια βελόνας, γίνεται μικρή εκδορά στο κάτω μέρος του φύλλου χωρίς αυτό να τρυπήσει
- Με σύριγγα (1ml) εισάγεται το εναιώρημα αγροβακτηριδίων

Η επιτυχία της διαδικασίας του αγροεμποτισμού επαληθεύονταν, αρχικά με έλεγχο του φθορισμού μετά από τρεις μέρες σε αγροεμποτισμένα φύλλα με πλασμιδιακή κατασκευή που εξέφραζε την GFP πρωτεΐνη.

MMA	
Macroelements (Duchefa®)	1x
Microelements (Duchefa®)	1x
MES ,pH=5.7	10mM
Ακετοσυριγκονη	200uM

Πίνακας 5 Σύσταση διαλύματος MMA

## 2.4 Μετασηματισμός φυλλικών δίσκων καπνού - Κατασκευή διαγονιδιακών φυτών

- Καλλιέργειες μετασηματισμένων αγροβακτηρίων σε θρεπτικό LB παρουσία ριφαμπικίνης και κατάλληλου αντιβιοτικού επιλογής (σπεκτινομυκίνη για τον pK7GWIWG2(I)) επωάζονται στους 28° υπό ανάδευση για 48 ώρες περίπου

- Όταν η OD ισούται με 0,7 – 1, οι καλλιέργειες φυγοκεντρώνται στις 2700 στροφές στους 4° για 10 λεπτά
- Η πελλέτα επαναδιαλύεται σε 20ml MS (Murashige and Skoog 1962)
- Επιλέγονται φύλλα από νεαρά φυτά και επωάζονται σε διάλυμα 10%χλωρίνης και 200μM Tween-20 για 15λεπτά

#### Σε αποστειρωμένη εστία:

- Τα φύλλα ξεπλένονται 3 φορές με απιονισμένο νερό
- Τοποθετούνται σε τρυβλίο με MS και κόβονται φυλλικοί δίσκοι με αποστειρωμένο φυλλοτρυπητή
- Οι φυλλικοί δίσκοι επωάζονται σε MS με τα αγροβακτήρια για 20 λεπτά με τακτική ήπια ανάδευση
- Ξεπλένονται ήπια με MS
- Μεταφέρονται σε τρυβλία με στερεό υπόστρωμα MS χωρίς αντιβιοτικό και διατηρούνται σε θάλαμο ανάπτυξης στους 24°
- Την επόμενη μέρα μεταφέρονται σε τρυβλία MS με αντιβιοτικά επιλογής (σεφοταξίμη 250μg/ml για τα αγροβακτήρια και καναμυκίνη 100μg/ml για τα φυτά)
- Σαν θετικό control λειτουργούν μη μετασχηματισμένοι φυλλικοί δίσκοι σε τρυβλία χωρίς αντιβιοτικά
- Σαν αρνητικό control λειτουργούν μη μετασχηματισμένοι φυλλικοί δίσκοι σε τρυβλία με αντιβιοτικά
- Οι φυλλικοί δίσκοι μεταφέρονται σε φρέσκο θρεπτικό ανά 3-4 μέρες μέχρι να επέλθει καλλογένεση οπότε και μεταφέρονται σε μεγαλύτερα δοχεία για να αναπτυχθεί κανονικά το τροποποιημένο φυτό

## 2.5 Εξαγωγή ολικού RNA από φυτικό ιστό

- Λειοτριβούνται και ζυγίζονται 100ug ιστού παρουσία υγρού αζώτου
- Προστίθεται 1ml **Trizol** (βλ. πίνακα 7)
- Ισχυρή ανάδευση και επώαση 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου

- Φυγοκέντρηση στις 12000 στροφές στους 4° για 20λεπτά
- Στο υπερκείμενο προστίθενται 200ul χλωροφορμίου
- Ισχυρή ανάδευση και επώαση 10-15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- Προστίθενται 250ul ισοπροπανόλη και 250ul **Salts (0.8M Sodium nitrate-1.2M NaCl)**
- Ισχυρή ανάδευση και επώαση 10-15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- Κατακρήμνιση στις 12000 στροφές στους 4° για 20 λεπτά
- Έκπλυση της πελλέτας με 70% αιθανόλη
- Φυγοκέντρηση στις 12000 για 5 λεπτά
- Αφήνεται να στεγνώσει
- Επαναδιάλυση σε απιονισμένο νερό

<u>TRIzol</u>	
Phenol in saturated buffer	38%
Guanidine thiocyanate	0.8M
Ammonium thiocyanate	0.4M
Sodium acetate pH	3M
Glycerol	5%

**Πίνακας 6** Σύσταση διαλύματος Trizol για εξαγωγή ολικού RNA

## 2.6 Στύπωμα κατά Northern για μικρά RNA

Το στύπωμα κατά Northern έγινε σύμφωνα με τους (Sambrook et al. 1989). Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση μικρών RNA προερχόμενο από τις πλασμιδιακές κατασκευές για τον έλεγχο λειτουργικότητάς τους.

### 2.6.1 Ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτικό gel ακρυλαμίδης

- 50ug ολικού RNA διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτικό gel ακρυλαμίδης( Acrylamide 15% w/v, Urea 7M, TBE 0,5x) . Η ηλεκτροφόρηση γίνεται στα 100V μέσα σε διάλυμα TBE 1x.

- Το gel βάφεται με βρωμιούχο αιθίδιο και φωτογραφίζεται υπό υπεριώδες φως για να ελεγχθεί αν τα δείγματα είναι ισοφορτωμένα.
- Μεταφορά των RNA σε μεμβράνη NYTRAN® N της WHATMAN™ με το σύστημα **Pierce Fast Semi-Dry Blotter** της ThermoScientific™. Μονιμοποίηση των RNA στη μεμβράνη (crosslink) μετά από έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία.

### 2.6.2 Προυβριδοποίηση της μεμβράνης

- Το διάλυμα προυβριδοποίησης (βλ πίνακα 7) προθερμαίνεται στους 50°
- Τοποθετείται η μεμβράνη με τα RNA σε ειδικό κύλινδρο
- Προστίθεται το διάλυμα προυβριδοποίησης
- Επώαση στους 50° για 1 ώρα υπό περιστροφή

Διάλυμα προυβριδοποίησης	
SSC	5x
Denhardt's	0.1x
1% w/v Ficoll 400	
1% PVP 40	
1% BSA	
SDS	1%
tRNAs	10mg/ml

**Πίνακας 7** Σύσταση διαλύματος προυβριδοποίησης

### 2.6.3 Σύνθεση ραδιενεργού DNA ανιχνευτή με τη μέθοδο random priming

- 100ng εκμαγείου DNA παρουσία random primers θερμαίνονται στους 95° για 5 λεπτά
- Επώαση στον πάγο για 2 λεπτά
- Προσθήκη 0.5mM dGTP, 0.5mM dTTP, 1x random priming buffer (Invitrogen™), 5 units Klenow
- Προσθήκη ραδιενεργών ( $\alpha$ -<sup>32</sup>P) dATP και dCTP

- Ήπια ανακίνηση
- Επώαση στους 37° για 45 λεπτά
- Καθαρισμός του probe με φυγοκέντρηση στις 2700 στροφές για 1 λεπτό σε στήλη Sephadex με G-25 agarose beads διαλυμένα σε TE 1x
- Ο probe προστίθεται στο διάλυμα προυβριδοποίησης και επωάζεται με τη μεμβράνη στους 50° για μια νύχτα υπό περιστροφή
- Έκπλυση της μεμβράνης με SDS 2%, SSC 2x για 20 λεπτά. (3 φορές)
- Έκθεση και εμφάνισή της σε φιλμ

## 2.7 Εκτροφή και συγχρονισμός τετρανύχων

Για την παρούσα πειραματική εργασία χρησιμοποιήθηκε στέλεχος τετρανύχων (*Tetranychus urticae*) που είχε εκτραφεί σε φύλλα τομάτας ποικιλίας Moneymaker για αρκετό χρονικό διάστημα ώστε να προσαρμοστεί.

Για την ελεγχόμενη εκτροφή και παρατήρηση των ατόμων, φύλλα τομάτας κόβονταν και τοποθετούνταν πάνω σε απορροφητικό βαμβάκι μέσα σε τρυβλίο με νερό. Τα όρια του φύλλου καλύπτονταν με ταινίες χαρτιού για να εμποδίζεται η διαφυγή των τετρανύχων στο υγρό βαμβάκι. Η πάνω πλευρά του φύλλου επιλέχθηκε αφού παρατηρήθηκε ότι τα άτομα επιβιώνουν βέλτιστα εκεί. Τα τρυβλία διατηρούνταν σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών θερμοκρασίας 25°, 40% υγρασία και 16 ώρες φως.

Έγινε συγχρονισμός των ατόμων μεταφέροντας θηλυκά άτομα από τον συνολικό πληθυσμό στα φύλλα και αφήνοντας τα να γεννήσουν αυγά για 6 ή 12 ώρες. Έπειτα μεταφέροντάς να γεννήσουν σε νέο φύλλο.

## 2.8 Ανάπτυξη τετρανύχων σε αγροεμποτισμένο φύλλο τομάτας

Συγχρονισμένα άτομα στο στάδιο της πρωτονύμφης, αρσενικά και θηλυκά μεταφέρονταν σε αγροεμποτισμένα φύλλα τομάτας δύο ημερών. Έγινε αγροεμποτισμός με αγροβακτήρια που περιείχαν το πλασμίδιο **hp\CPR** που κατασκευάσαμε και σαν control για την εξειδίκευση της καταστολής με βάση την αλληλουχία, χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο **hp\GFP (pFGC5841)**, (Koscianska et al. 2005) που παράγει dsRNA για την πρωτεΐνη GFP σε antisense-sense φορά, χωρίς ενδογενή στόχο στο φυτό ή τα ακάρεα.



Κάθε φύλλο παρατηρούνταν καθημερινά και γίνονταν καταγραφή του αριθμού των νεκρών και ζωντανών ατόμων. Αλλαγή του φύλλου λόγω καταστροφής του από τους τετράνυχους έγινε την 5<sup>η</sup> μέρα.

## 2.9 Εξαγωγή ολικού RNA από τετράνυχους

Η εξαγωγή RNA από τους τετράνυχους έγινε με το RNAeasy® Mini kit (Quiagen) και η διαδικασία περιγράφεται περιληπτικά παρακάτω:

- Γίνεται λειοτριβήση 50 ατόμων μέσα σε 350μl διαλύματος RWL
- Το διάλυμα φυγοκεντρείται για 3 λεπτά στις 13000 στροφές σε θερμοκρασία δωματίου
- Στο υπερκείμενο προστίθεται ίσος όγκος 70% αιθανόλης
- Το διάλυμα φορτώνεται σε κολώνα χρωματογραφίας (RNAeasy column)
- Φυγοκέντρωση για 15 δευτερόλεπτα στις 10000 στροφές σε θερμοκρασία δωματίου
- Τα RNA βρίσκονται προσδεμένα στην κολώνα
- Έκπλυση της κολώνας δύο φορές με 700μl RW1 διαλύματος με ενδιάμεση φυγοκέντρωση 15 δευτερόλεπτα στις 10000 στροφές σε θερμοκρασία δωματίου
- Έκπλυση με 500μl διαλύματος RPE με φυγοκέντρωση στις παραπάνω συνθήκες.
- Γίνεται επιπλέον μια φυγοκέντρωση για να αφαιρεθεί όλο το πλεονάζον διάλυμα από την κολώνα.
- Έκλυση των RNA γίνεται με 30μl νερού και φυγοκέντρωση για 1 λεπτό στις προαναφερθείσες συνθήκες.

## 2.10 Αντίστροφη μεταγραφή (Reverse transcription)

Μέσω της αντίστροφης μεταγραφής, έχοντας σαν εκμαγείο το μονόκλωνο RNA ειδικό ένζυμο, η αντίστροφη μεταγραφάση, συνθέτει το συμπληρωματικό κλώνο DNA. Έτσι, στις περαιτέρω διαδικασίες της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) και PCR πραγματικού χρόνου (Real-Time PCR) που θα ακολουθήσουν θα αναλυθούν μόνο οι αλληλουχίες των ώριμων mRNA απαλλαγμένων από τις αλληλουχίες των ιντρονίων τους που δεν εκφράζονται.

### 2.10.1 Απαλλαγή από DNA (DNase treatment)

Η απαλλαγή των RNA από εναπομείναντα μόρια DNA είναι απαραίτητη για τη διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής και της PCR πραγματικού χρόνου που ακολούθησε. Η διαδικασία έγινε με το TURBO™ DNase kit (Ambion®). Η μέθοδος περιγράφεται περιληπτικά παρακάτω:

- Σε διάλυμα RNA προστίθεται 10% του αρχικού όγκου TURBO DNase Buffer 10x και 1μl TURBO DNase
- Επώαση 30 λεπτά στους 37°
- Προστίθεται ειδικό διάλυμα, που σταματά την αντίδραση (DNase Inactivation Reagent) σε ποσότητα 10% του όγκου
- Επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- Φυγοκέντρηση στις 8000 στροφές για 1,5 λεπτό
- Το υπερκείμενο περιέχει το καθαρό RNA

### 2.10.2 Σύνθεση cDNA

Η σύνθεση του συμπληρωματικού κλώνου DNA έγινε με το σύστημα **SuperScript® III Reverse Transcriptase (Invitrogen™)**. Το πρωτόκολλο αυτό εκμεταλλεύεται την ουρά πολύ-A των mRNA που αποκτούν μετά τη φυσιολογική μεταγραφή τους στο κύτταρο. Αυτή υβριδοποιείται με σειρά από θυμίνες (oligo-dT) που θα λειτουργήσουν σαν εκκινητές για την αντίστροφη μεταγραφάση. Η διαδικασία περιγράφεται περιληπτικά παρακάτω:

- Σε 1μg RNA προστίθενται oligo-dT 2.5μM
- Επώαση 10 λεπτά στους 65°
- Επώαση 2 λεπτά στον πάγο
- Προστίθενται διάλυμα FSB 0.8x, 0.1mM DTT, 0,5mM dNTPs, 40 units αναστολέα RNασών (RNase OUT™ Recombinant RNase Inhibitor)
- Επώαση στους 50° για 2 λεπτά
- Προσθήκη του ενζύμου Superscript III
- Η αντίδραση γίνεται στους 50° για 15 λεπτά
- Επώαση στους 70° για 15 λεπτά για να σταματήσει η αντίδραση

Για να γίνει έλεγχος της επιτυχούς σύνθεσης cDNA ακολουθεί **PCR** με εκκινητές για γνωστής αλληλουχίας ριβοσωμικού γονίδιο. Η μέθοδος γίνεται με τις κλασσικές αρχές που αναφέρονται στο (Sambrook et al. 1989).

### 2.11 PCR πραγματικού χρόνου (Real- Time PCR)

Η τεχνική της Real time επιτρέπει την ποσοτικοποίηση του cDNA και επομένως του mRNA που μεταγράφεται από το γονίδιο αυτό, σε δείγματα άγνωστης συγκέντρωσης, συγκρίνοντας τα με ένα ενδογενές σύστημα αναφοράς, ένα γονίδιο θεμελιώδους σημασίας για τον οργανισμό που τα επίπεδα του δύσκολα μεταβάλλονται.

Έτσι, η μέθοδος της Real-Time PCR χρησιμοποιήθηκε για να ελεγχθούν τα επίπεδα έκφρασης της TuCPR μετά από εκτροφή των τετρανύχων με dsRNA της CPR.

Οι αντιδράσεις Real Time PCR πραγματοποιήθηκαν σε μηχάνημα qPCR της εταιρείας Biorad στο εργαστήριο Μοριακής Εντομολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης.

Βασική αρχή λειτουργίας της τεχνικής, είναι η ποσοτικοποίηση της εκπομπής φθορισμού της φθορίζουσας χρωστικής SYBR Green η οποία προσδένεται σε δίκλωνο DNA. Με αυτόν τον τρόπο γνωρίζουμε σε κάθε κύκλο της PCR την ποσότητα DNA που αντιγράφεται.

Για τη μέθοδο αυτή χρησιμοποιήθηκε cDNA από άτομα τετρανύχων που συλλέχτηκαν, έχοντας τραφεί από φύλλα μετασηματισμένα με hr\TuCPR και άτομα από φύλλα μετασηματισμένα με hr\GFP σαν control. Έγιναν τρεις βιολογικές επαναλήψεις και δύο τεχνικές.

Σαν γονίδια αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν το γονίδιο της ακτίνης και το γονίδιο της ριβοσωμικής πρωτεΐνης Rp49. Οι αλληλουχίες των primer που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στον πίνακα 9. Η αραίωση των primer που χρησιμοποιήθηκε ήταν 0.5μM.

	Forward	Reverse
<b>Rp49</b>	AAA TTA AGA GGA ACT GGC GAA A	GCA TGT GTC TGG TGG CTT T
<b>Actin</b>	GCC ATC CCT TCG TTT GGA TTT GGC T	TCT CGG ACA ATT TCT CGC TCA GCA
<b>CPR</b>	TTA TGC CGT TTT TGG ATT GG	GCA TCA TCA TCA CCC ATG C

**Πίνακας 8** Αλληλουχίες εκκινητών για τη Real-Time PCR

Για το σχηματισμό της πρότυπης καμπύλης και τη διεξαγωγή της αντίδρασης μετά από δοκιμαστικές Real-Time PCR επιλέχθηκε σαν βέλτιστη θερμοκρασία πολυμερισμού για τα τρία γονίδια οι 58°. Για την πρότυπη καμπύλη χρησιμοποιήθηκαν αραιώσεις από μείγμα των cDNA (pool cDNA) ποσότητας 200ng, 40ng, 8ng και 1.6ng. Χρησιμοποιήθηκε το Kara™ SYBR FAST qPCR Kit.

Οι συνθήκες της Real-Time PCR ήταν ίδιες για όλες τις αντιδράσεις και για τα 3 γονίδια και το πρόγραμμα που ακολουθήθηκε είναι το εξής:

1. Hot start για την DNA πολυμεράση στους 95° για 3 λεπτά
2. Αποδιάταξη των κλώνων στους 95° για 15 δευτερόλεπτα
3. Υβριδοποίηση των primer στους 58° για 30 δευτερόλεπτα
4. Πολυμερισμός στους 72° για 30 δευτερόλεπτα
5. Μέτρηση του φθορισμού
6. Επανάληψη των βημάτων 2-5 35 φορές
7. Ανίχνευση φθορισμού από τους 65° μέχρι τους 95° αυξάνοντας 1° ανα 0,2' για τον έλεγχο ύπαρξης primer dimmers και τον υπολογισμό της αποτελεσματικότητας της αντίδρασης.

Ακολούθησε επεξεργασία των δεδομένων με τη σουίτα Relative Expression Software Tool- Multiple Condition Solver- REST-MCS©- version 1 (Pfaffl and Horgan 2002). Το διάγραμμα που κατασκευάστηκε για τη γραμμική απεικόνιση των επιπέδων έκφρασης CPR συγκρινόμενα ανάμεσα στην κατάσταση control (hp\GFP) και την κατάσταση hp\GFP

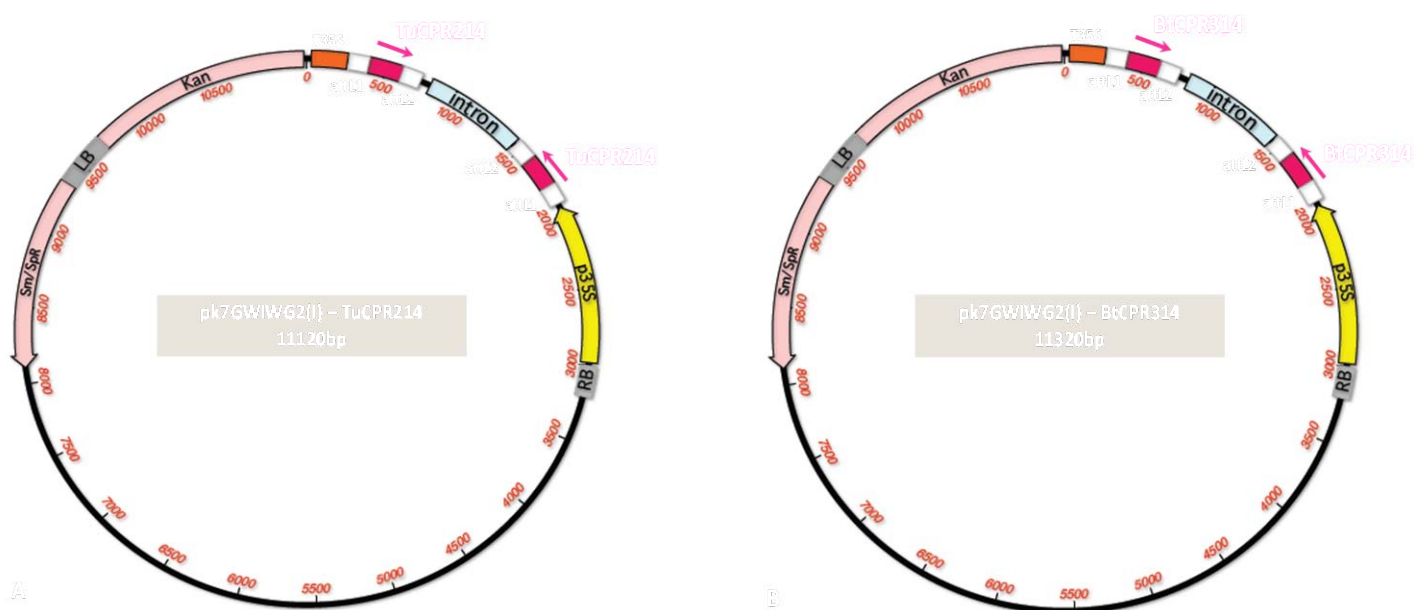
$$\text{παρουσιάζει το λόγο } R = \frac{(E_{CPR})^{\Delta CP_{CPR}} (MEAN_{hp\backslash GFP} - MEAN_{hp\backslash CPR})}{(E_{ref})^{\Delta CP_{ref}} (MEAN_{hp\backslash GFP} - MEAN_{hp\backslash CPR})},$$

όπου E η απόδοση (efficiency) της αντίδρασης για το κάθε γονίδιο και σαν ref αναφέρονται τα γονίδια αναφοράς Rp49 και ακτίνη.

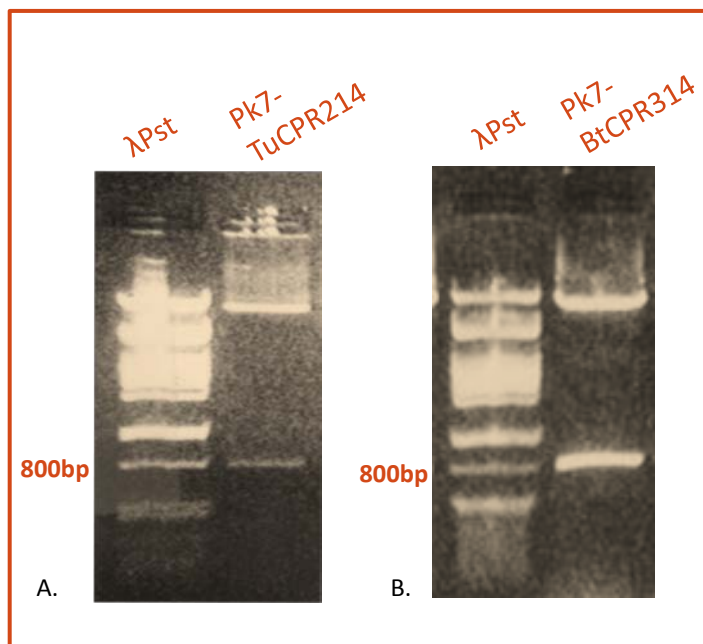
### 3. Αποτελέσματα

#### 3.1.Κλωνοποίηση των TuCPR214 και BtCPR314

Με βάση τις βασικές αρχές κλωνοποίησης, αφού απομονώθηκαν με PCR τα κομμάτια των 214 βάσεων για τη CPR του τετρανύχου και των 314 βάσεων για τη CPR του αλευρώδη, κλωνοποιήθηκαν στον φορέα δότη pENTR3c. Με το σύστημα Gateway®, μέσω ανασυνδυασμού τα ενθέματα κλωνοποιήθηκαν στον δυαδικό φορέα pK7GIWG2(I). Στον φορέα αυτό, λόγω της διάταξης του, τα γραμμικά τμήματα DNA εισάγονται δύο φορές με αντίθετη πάντα φορά. Έτσι, υπό ισχυρό υποκινητή 35S εκφράζεται μετάγραφο με εσωτερική συμπληρωματικότητα που διπλώνει σε δομή φουρκέτας (hairpin). Γραφική απεικόνιση των πλασμιδιακών κατασκευών παρουσιάζεται στην παρακάτω εικόνα.



Η επιτυχία της κλωνοποίησης των τμημάτων DNA στο φορέα ελέγχθηκε, αρχικά, με περιοριστική κοπή των πλασμιδίων με το ένζυμο XhoI που και στις δύο περιπτώσεις είχε σχεδιαστεί να υπάρχει στον Forward εκκινητή των ενθεμάτων, ενώ δεν αναγνώριζε άλλη θέση του πλασμιδίου. Έτσι, αφού υπάρχουν δυο μόνο θέσεις αναγνώρισης του ενζύμου, από το κυκλικό πλασμιδιακό DNA μετά από ενδονουκλεοτιδική κοπή με το συγκεκριμένο ένζυμο αναμένανε να προκύψει γραμμικό τμήμα (βλ. εικόνα 8).



**Εικόνα 8** Αναγνωριστική πέψη A) pK7GWIWG2(I) –TuCPR214 και B) pK7GWIWG2(I) – BtCPR314 με το ένζυμο XhoI.

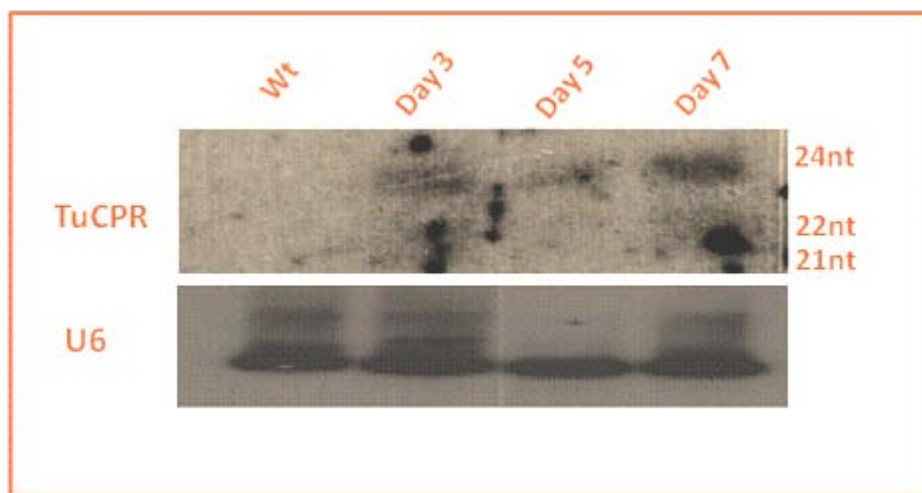
Παρατηρούμε στην εικόνα 8, ότι το μήκος του γραμμικού τμήματος που προέκυψε είναι 800 βάσεις περίπου, όσο και το μήκος του ιντρονίου στον φορέα. Συμπεραίνουμε, λοιπόν, πως τα ενθέματα έχουν μπει σε **sense-antisense φορά**. Σε αντίθετη περίπτωση (antisense-sense φορά), το γραμμικό προϊόν πέψης από το ένζυμο XhoI θα έδιδε θα περιείχε εκτός από το ιντρόνιο και δύο φορές το μήκος του ενθέματος, δηλαδή 1500 βάσεις περίπου.

Εκτός από την επαλήθευση με περιοριστικά ένζυμα, στη συνέχεια, η αλληλουχία των ενθεμάτων που κλωνοποιήθηκαν επαληθεύτηκε και με αλληλούχιση. (βλ Παράρτημα)

### 3.2. Έλεγχος λειτουργίας πλασμιδίου pK7-TuCPR214

Για να επαληθευτεί η λειτουργία του πλασμιδίου pK7-TuCPR214 (**hp\TuCPR**) και η επιτυχής παραγωγή δίκλωνου RNA ή μικρών RNA, έγινε παροδικός μετασχηματισμός του σε φύλλα καπνού με αγροεμποτισμό. Συλλογή των αγροεμποτισμένων φύλλων έγινε 3, 5 και 7 μέρες μετά τη μόλυνση με το αγροβακτήριο και ακολούθησε εξαγωγή ολικού RNA. Στη συνέχεια, με Northern blot ελέγχθηκε η παρουσία μικρών RNA της TuCPR. Το προϊόν

PCR της CPR, 214 βάσεων που χρησιμοποιήθηκε στην κλωνοποίηση, λειτούργησε σαν υπόστρωμα για τη δημιουργία ραδιενεργά σημασμένου ανιχνευτή. Στην εικόνα 9 φαίνονται τα μικρά RNA για την TuCPR που ανιχνεύθηκαν που αποδεικνύουν τη λειτουργικότητα του πλασμιδίου στα φυτά μέχρι και 7 ημέρες μετά τη μόλυνση.



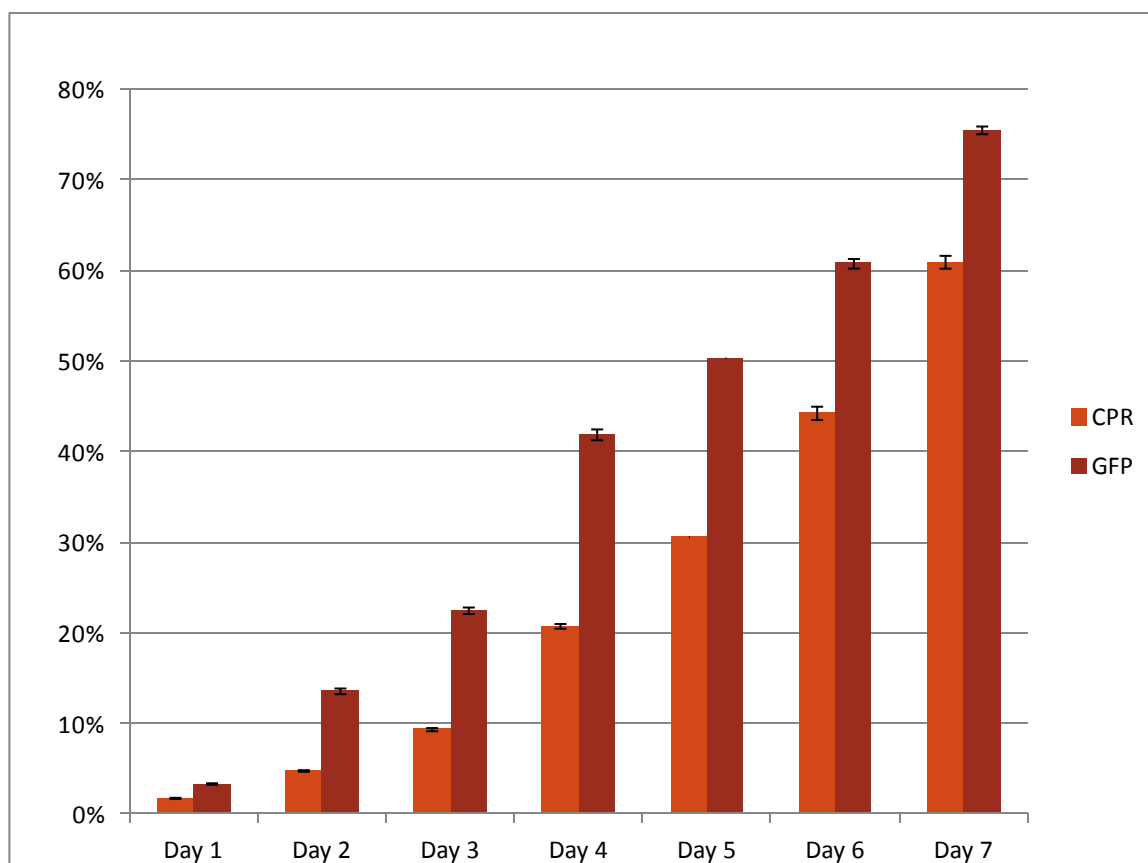
**Εικόνα 9** Πήκτωμα πολυ-ακρυλαμίδης 15%. Northern blot για την ανίχνευση μικρών RNA της TuCPR από αγροεμποτισμένα φύλλα καπνού 3, 5 και 7 μέρες μετά τη μόλυνση. Σαν loading control χρησιμοποιήθηκε το RNA U6.

### 3.3. Εκτροφή τετρανύχων με αγροεμποτισμένα φύλλα hr\TuCPR

Νεαρά φύλλα τομάτας ποικιλίας Moneymaker αγροεμποτίστηκαν με το πλασμίδιο hr\TuCPR. Δύο μέρες μετά τη μόλυνση από το αγροβακτήριο, μεταφέρονταν σ' αυτά συγχρονισμένες πρωτονύμφες τετρανύχων προερχόμενες από πληθυσμό που έχει προσαρμοστεί σε τομάτα. Σαν control για την ειδικότητα της μεθόδου, αντίστοιχα άτομα τετρανύχων μεταφέρθηκαν σε φύλλα τομάτας αγροεμποτισμένα με το πλασμίδιο hr\GFP που όμως θεωρητικά δεν έχει ενδογενή στόχο στον τετρανύχο.

Καθημερινά γινόταν φαινοτυπική παρατήρηση συμπεριφοράς των τετρανύχων με το στερεοσκόπιο. Συγκρίναμε την κινητικότητα των τετρανύχων hr\TuCPR με τα άτομα control. Δεν υπήρξε κάποια παρατηρήσιμη διαφορά. Επιπλέον, παρατηρούνταν η ανάπτυξη των ατόμων από στάδιο σε στάδιο μέχρι το ενήλικο. Δεν παρατηρήθηκε καθυστέρηση στην ανάπτυξη σε κανέναν από τους δύο πληθυσμούς.

Τέλος, καθημερινά καταγράφονταν η θνησιμότητα των ατόμων. Με βάση την καταγραφή των νεκρών ατόμων από κάθε ημέρα, κατασκευάστηκε το διάγραμμα της εικόνας 10. Τα άτομα που τράφησαν με φύλλα που παράγαν dsRNA για την CPR δεν εμφανίζουν αυξημένη θνησιμότητα.



**Εικόνα 10** Διάγραμμα ποσοστού θνησιμότητας στα άτομα τετρανύχου από τα φύλλα που εξέφραζαν dsRNA για τη CPR και την GFP.

Στο διάγραμμα παρατηρούμε πως, περιέργως, καθημερινά τα ποσοστά θνησιμότητας του πληθυσμού hr\GFP, που λειτουργούσε σαν πληθυσμός control, είναι μεγαλύτερα από αυτά του πληθυσμού hr\CPR. Δεδομένου ότι η hr\GFP δεν έχει ενδογενή στόχο στο φυτό, ούτε στον τετρανύχο, δε θεωρούμε το γεγονός τυχαίο αφού αντίστοιχα αποτελέσματα είχαν παρατηρηθεί και σε προκαταρκτικά πειράματα. Συνεπώς, η hr\GFP ήταν τοξική με κάποιο τρόπο για τους τετρανύχους.

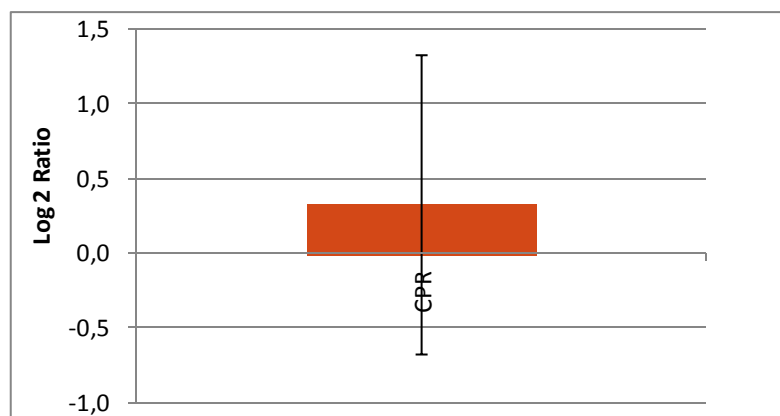


Για να βρεθεί πιθανή ερμηνεία στο παραπάνω πρόβλημα έγινε η εξής βιοπληροφορική ανάλυση: Η αλληλουχία της hr\GFP του πλασμιδίου pFGC5841 (Koscianska et al. 2005) κόπηκε σε αλληλεπικαλυπτόμενα κομμάτια των 21 νουκλεοτιδίων και έγινε Blast με το γονιδίωμα του τετρανύχου για να εντοπιστούν πιθανοί στόχοι. Όμως, δεν εντοπίστηκε κάποιο συγκεκριμένο γονίδιο που καταστέλλεται ικανά ώστε να δώσει θνησιγόνο φαινότυπο.

### 3.4. Real-Time PCR για την ποσοτικοποίηση της έκφρασης της TuCPR

Την 7<sup>η</sup> ημέρα μετά την τοποθέτηση των τετρανύχων στα αγροεμποτισμένα φύλλα, αρσενικά και θηλυκά επιζήσαντα άτομα συλλέχτηκαν και χωρίστηκαν στα 3, τις οποίες ορίσαμε σαν 3 βιολογικές επαναλήψεις. Εξήχθη συνολικό RNA από 50 άτομα τετρανύχων σε κάθε δείγμα, έγινε DNase treatment και σε 1ug αυτού, έγινε αντίστροφη μεταγραφή για την παραγωγή cDNA. Ακολούθησε Real-Time PCR για την ποσοτικοποίηση της έκφρασης της CPR στους δυο πληθυσμούς, με γονίδια μάρτυρες τη ριβοσωμική πρωτεΐνη Rp49 και την Ακτίνη. Η επεξεργασία των δεδομένων έγινε με τη σουίτα REST-MCS©- version 1. (Pfaffl and Horgan 2002)

Στο διάγραμμα της εικόνας 11, παρουσιάζεται ο λόγος των επιπέδων έκφρασης της CPR στα άτομα που τράφηκαν με φύλλα που παρήγαγαν δίκλωνο RNA για τη CPR προς αυτών του πληθυσμού control.



**Εικόνα 11** Επίπεδα έκφρασης CPR στον πληθυσμό τετρανύχων από τα αγροεμποτισμένα φύλλα για το hr\TuCPR συγκρινόμενο με τον πληθυσμό από τα φύλλα hr\GFP

Παρατηρούμε πως τα επίπεδα της CPR δεν έχουν μειωθεί. Η αύξηση της έκφρασης που φαίνεται δεν είναι στατιστικά σημαντική, οπότε καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι δεν επετεύχθη η καταστολή στο διάστημα των 7 ημερών.

#### 4. Συζήτηση

Σύγχρονες μελέτες αποδεικνύουν τη λειτουργικότητα της τεχνικής του RNAi προερχόμενο από διαγονιδιακά φυτά σαν μέθοδο ανθεκτικότητας προς έντομα: κολεόπτερα, λεπιδόπτερα και ημίπτερα (Baum et al. 2007; Mao et al. 2007; Zha et al. 2010; Pitino et al. 2011). Παρ' όλα αυτά, οι μηχανισμοί του RNAi μέσω της τροφής, ακόμα και στους παραπάνω οργανισμούς που αποδείχθηκε ότι λειτουργεί επιτυχώς, δεν είναι κατανοητοί. Αυτό μας εμποδίζει από το να γνωρίζουμε τις επιμέρους διαδικασίες και τα μονοπάτια ώστε να μπορέσουμε να βελτιστοποιήσουμε τη μέθοδο και σε άλλους οργανισμούς.

Στην παρούσα επιστημονική εργασία, έγινε προσπάθεια εφαρμογής της τεχνικής του RNAi μέσω της τροφής σε άτομα τετρανύχων (*Tetranychus urticae*) στοχεύοντας με dsRNA παραγόμενο από το φυτό, το γονίδιο της CPR. Μέσω της καταστολής αυτού, θα μειώνονταν με ένα βήμα η πολύπλευρη δράση των ενζύμων αποτοξικοποίησης της οικογένειας των μονοοξυγενασών r450s, για τα οποία η CPR είναι η μοναδική αναγωγή. Τα ακάρεα, έτσι, θα γίνονταν πιο ευάλωτα στα εντομοκτόνα. Σημειώνεται πως οι τετράνυχοι ανήκουν στην κλάση των αραχνιδίων, όχι στα έντομα, στα οποία μέχρι τώρα δεν υπάρχει καταγεγραμμένη σχετική βιβλιογραφική αναφορά.

Αναλυτικότερα, φύλλα τομάτας ποικιλίας Moneymaker, είχαν μετασχηματιστεί παροδικά με αγροεμποτισμό ώστε να εκφράζουν dsRNA για το γονίδιο της CPR. Για 7 ημέρες τα άτομα τρέφονταν από τα φύλλα και έπειτα έγινε ανάλυση των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου στόχου με Real- Time PCR. Στο χρονικό διάστημα των 7 ημερών που ελέγχθηκε, δεν παρατηρήθηκε διαφορά στα επίπεδα έκφρασης της CPR. Δεδομένου ότι είχε αποδειχθεί ότι τα φυτά μετά από αγροεμποτισμό παρήγαγαν επιτυχώς μικρά RNA, άρα και δίκλωνο RNA για τη CPR, πολλές μπορεί να είναι οι αιτίες για το αποτέλεσμα.

Ο μηχανισμός της σίγησης, γενικά, έχει καταγραφεί πως λειτουργεί και στον τετράνυχο. Έγιναν πειράματα με μικροενέσεις τόσο dsRNA όσο και siRNAs και ενεργοποίησαν το

μηχανισμό, με τα επίπεδα της καταστολής να είναι εξαρτώμενα της δόσης του dsRNA. (Khila and Grbic 2007). Επίσης, μετά τη δημοσίευση της πλήρους αλληλούχιας του γονιδιώματος του τετράνυχου (Grbic et al. 2011) επιβεβαιώνεται η ύπαρξη πρωτεϊνών ομόλογων των Dicer και AGO που αρχικά μπορούσε μόνο υποθεθεί (Khila and Grbic 2007).

Οι Pitino et al 2011, δουλεύοντας με αφίδες, εκτός από πειράματα με διαγονιδιακά φυτά, καταγράφουν και τα αντίστοιχα πειράματα με αγροεμποτισμένα φύλλα. Συγκρίνοντας αγροεμποτισμένα, δηλαδή παροδικά μετασχηματισμένα φύλλα με τα διαγονιδιακά φυτά δεν παρατήρησαν διαφορά στην αποδοτικότητα της καταστολής ή κάποια χρονική καθυστέρησή της. Και στις δύο περιπτώσεις παρατηρούν την καταστολή του γονιδίου στόχου μετά από 17 ημέρες τροφής. Αντίστοιχες δημοσιεύσεις που αφορούν κολεόπτερα και λεπιδόπτερα (Baum et al. 2007; Mao et al. 2007) καταγράφουν πολύ πιο γρήγορα την καταστολή των γονιδίων στόχων. Οι Pitino et al 2011 σχετικά με αυτό σημειώνουν πως, λόγω του μικρού μεγέθους του εντόμου (6mm), πολύ μικρές είναι οι ποσότητες που απομυζούνται ανά μέρα. Σ' αυτό αποδίδουν την σχετική καθυστέρηση στην καταστολή σε σχέση με τα μεγαλύτερου μεγέθους έντομα, δεδομένου πως η καταστολή μέσω RNAi στα έντομα είναι δοσο-εξαρτώμενη. (Huvienne and Smagghie 2009) Με βάση τα παραπάνω, μπορούμε να προτείνουμε να επαναληφθεί η πειραματική διαδικασία στον τετράνυχου και να ελεγχθεί η επιτυχία της καταστολής μετά από τροφή για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, μετά από 12 ή 15 ημέρες τουλάχιστον. Φυσικά, δεδομένου ότι πρόκειται για διαφορετικής κλάσης οργανισμό, τέτοιου είδους αναλογίες δεν είναι ασφαλείς.

Κάτι παράδοξο που παρατηρήσαμε είναι τα αυξημένα επίπεδα θνησιμότητας του πληθυσμού control dsGFP. Μη μπορώντας να ερμηνεύσουμε το φαινόμενο, προτείνουμε την επανάληψη της διαδικασίας με τη χρήση πλασμιδιακού φορέα οδηγεί και πάλι στη δημιουργία hr\GFP, όμως διαφορετικής κατασκευής.

Τελειώνοντας, πλασμιδιακή κατασκευή hr\BtCPR δημιουργήθηκε για την καταστολή της CPR του αλευρώδη. Κατασκευάστηκαν διαγονιδιακά φυτά καπνού *Nicotiana tabacum* των οποίων η ανάπτυξή είναι υπό εξέλιξη. Βέβαια, η αντίστοιχη πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε στον τετράνυχου μέσω αγροεμποτισμού φύλλων αγρίου τύπου και περιγράφηκε παραπάνω, μπορεί να ακολουθηθεί και στην περίπτωση του αλευρώδη. Με

αυτόν τον τρόπο μπορούν εκ των προτέρων να ελεγχθούν οι παράμετροι του πειράματος και να βελτιστοποιηθούν οι συνθήκες κερδίζοντας χρόνο μέχρις ότου αναπτυχθούν επαρκώς τα διαγονιδιακά φυτά.

## Βιβλιογραφία

- Akhurst R J, James W, Bird L J, Beard C (2003) **Resistance to the Cry1Ac delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae).** J Econ Entomol 96:1290-9
- Arif M, Azhar U, Arshad M, Zafar Y, Mansoor S, Asad S (2010) **Engineering broad-spectrum resistance against RNA viruses in potato.** Transgenic Res 21:303-11
- Axtell M J, Westholm J O, Lai E C (2011) **Vive la difference: biogenesis and evolution of microRNAs in plants and animals.** Genome Biol 12:221
- Baum J A, Bogaert T, Clinton W, Heck G R, Feldmann P, Ilagan O, Johnson S, Plaetinck G, Munyikwa T, Pleau M, Vaughn T, Roberts J (2007) **Control of coleopteran insect pests through RNA interference.** Nat Biotechnol 25:1322-6
- Bernstein E, Caudy A A, Hammond S M, Hannon G J (2001) **Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference.** Nature 409:363-6
- Boutla A, Kalantidis K, Tavernarakis N, Tsagris M, Tabler M (2002) **Induction of RNA interference in *Caenorhabditis elegans* by RNAs derived from plants exhibiting post-transcriptional gene silencing.** Nucleic Acids Res 30:1688-94
- Brookes G, Barfoot P (2006) **GM crops: the first ten years - global socio-economic and environmental impacts.**
- Carthew R W, Sontheimer E J (2009) **Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs.** Cell 136:642-55
- Du T, Zamore P D (2005) **microPrimer: the biogenesis and function of microRNA.** Development 132:4645-52
- Elliott L J, Sokolow R, Heumann M, Elefant S L (1988) **An Exposure Characterization of a Large Scale Application of a Biological Insecticide, *Bacillus Thuringiensis*.** Applied Industrial Hygiene 3:119-122
- Escobar M A, Civerolo E L, Summerfelt K R, Dandekar A M (2001) **RNAi-mediated oncogene silencing confers resistance to crown gall tumorigenesis.** Proc Natl Acad Sci U S A 98:13437-42
- Feyereisen R (2005) **Insect cytochrome P450.** Comprehensive Molecular Insect Science, L. Gilbert, K. Iatrou, S. Gill Oxford; Elsevier
- Fire A, Xu S, Montgomery M K, Kostas S A, Driver S E, Mello C C (1998) **Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*.** Nature 391:806-11
- Foster S P, Harris M O (1997) **Behavioral Manipulation methods for insect pest-management.** Annual Review of Entomology 42:123-146
- Grbic M, Van Leeuwen T, Clark R M, Rombauts S, Rouze P, Grbic V, Osborne E J, Dermauw W, Ngoc P C, Ortego F, Hernandez-Crespo P, Diaz I, Martinez M, Navajas M, Sucena E, Magalhaes S, Nagy L, Pace R M, Djuranovic S, Smagghe G, Iga M, Christiaens O, Veenstra J A, Ewer J, Villalobos R M, Hutter J L, Hudson S D, Velez M, Yi S V, Zeng J, Pires-daSilva A, Roch F, Cazaux M, Navarro M, Zhurov V, Acevedo G, Bjelica A, Fawcett J A, Bonnet E, Martens C, Baele G, Wissler L, Sanchez-Rodriguez A, Tirry L, Blais C, Demeestere K, Henz S R, Gregory T R, Mathieu J, Verdon L, Farinelli L, Schmutz J, Lindquist E, Feyereisen R, Van de Peer Y (2011) **The genome of *Tetranychus urticae* reveals herbivorous pest adaptations.** Nature 479:487-92

- Huang G, Allen R, Davis E L, Baum T J, Hussey R S (2006) **Engineering broad root-knot resistance in transgenic plants by RNAi silencing of a conserved and essential root-knot nematode parasitism gene.** Proc Natl Acad Sci U S A 103:14302-6
- Huvenne H, Smagghe G (2009) **Mechanisms of dsRNA uptake in insects and potential of RNAi for pest control: a review.** J Insect Physiol 56:227-35
- ISSG Global Invasive Species Database. **100 of the World's Worst Invasive Species.** Retrieved:10-03-12,  
<http://www.issg.org/database/species/search.asp?st=100ss&fr=1&str=&lang=EN>
- Jeppson L R, Keifer H H, Baker E W (1975) **Mites Injurious to Economic Plants.** University California Press
- Kalantidis K, Psaradakis S, Tabler M, Tsagris M (2002) **The occurrence of CMV-specific short RNAs in transgenic tobacco expressing virus-derived double-stranded RNA is indicative of resistance to the virus.** Mol Plant Microbe Interact 15:826-33
- Karimi M, Inze D, Depicker A (2002) **GATEWAY vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation.** Trends Plant Sci 7:193-5
- Khila A, Grbic M (2007) **Gene silencing in the spider mite Tetranychus urticae: dsRNA and siRNA parental silencing of the Distal-less gene.** Dev Genes Evol 217:241-51
- Kida Y, Ohgiya S, Mihara K, Sakaguchi M (1998) **Membrane topology of NADPH-cytochrome P450 reductase on the endoplasmic reticulum.** Arch Biochem Biophys 351:175-9
- Koscianska E, Kalantidis K, Wypijewski K, Sadowski J, Tabler M (2005) **Analysis of RNA silencing in agroinfiltrated leaves of Nicotiana benthamiana and Nicotiana tabacum.** Plant Mol Biol 59:647-61
- Li J, Yang Z, Yu B, Liu J, Chen X (2005) **Methylation protects miRNAs and siRNAs from a 3'-end uridylation activity in Arabidopsis.** Curr Biol 15:1501-7
- Lycett G J, McLaughlin L A, Ranson H, Hemingway J, Kafatos F C, Loukeris T G, Paine M J (2006) **Anopheles gambiae P450 reductase is highly expressed in oenocytes and in vivo knockdown increases permethrin susceptibility.** Insect Mol Biol 15:321-7
- Mao Y B, Cai W J, Wang J W, Hong G J, Tao X Y, Wang L J, Huang Y P, Chen X Y (2007) **Silencing a cotton bollworm P450 monooxygenase gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol.** Nat Biotechnol 25:1307-13
- Melnyk C W, Molnar A, Baulcombe D C (2011) **Intercellular and systemic movement of RNA silencing signals.** Embo J 30:3553-63
- Murashige T, Skoog F (1962) **A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures.** Psysiol Plant 15:473-497
- Nilsen T W (2007) **Mechanisms of microRNA-mediated gene regulation in animal cells.** Trends Genet 23:243-9
- Niu J-H, Jian H, Xu J-M, Guo Y-D, Liu Q (2010) **RNAi technology extends its reach: Engineering plant resistance against harmful eukaryotes.** African Journal of Biotechnology 9(45):7573-7582
- Pfaffl M W, Horgan G W (2002) **Calculation Software for the Relative Expression in Real-Time PCR - REST-MSC using Pair-Wise Fixed Reallocation Randomisation Test.** Nucleic Acids Res 29:e36

- Pitino M, Coleman A D, Maffei M E, Ridout C J, Hogenhout S A (2011) **Silencing of aphid genes by dsRNA feeding from plants.** PLoS One 6:e25709
- Preall J B, Sontheimer E J (2005) **RNAi: RISC gets loaded.** Cell 123:543-5
- Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T (1989) **Molecular Cloning: A laboratory Manual** Cold Spring Harbour, CSH
- Smith N A, Singh S P, Wang M B, Stoutjesdijk P A, Green A G, Waterhouse P M (2000) **Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs.** Nature 407:319-20
- Tabashnik B E, Carriere Y, Dennehy T J, Morin S, Sisterson M S, Roush R T, Shelton A M, Zhao J Z (2003) **Insect resistance to transgenic Bt crops: lessons from the laboratory and field.** J Econ Entomol 96:1031-8
- Turner C T, Davy M W, MacDiarmid R M, Plummer K M, Birch N P, Newcomb R D (2006) **RNA interference in the light brown apple moth, *Epiphyas postvittana* (Walker) induced by double-stranded RNA feeding.** Insect Molecular Biology 15:383-91
- Van Leeuwen T, Van Pottelberge S, Tirry L (2005) **Comparative acaricide susceptibility and detoxifying enzyme activities in field-collected resistant and susceptible strains of *Tetranychus urticae*.** Pest Manag Sci 61:499-507
- Van Leeuwen T, Vontas J, Tsagkarakou A, Dermauw W, Tirry L (2010) **Acaricide resistance mechanisms in the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* and other important Acari: a review.** Insect Biochem Mol Biol 40:563-72
- Vermilion J L, Ballou D P, Massey V, Coon M J (1981) **Separate roles for FMN and FAD in catalysis by liver microsomal NADPH-cytochrome P-450 reductase.** J Biol Chem 256:266-77
- Wang M B, Abbott D C, Waterhouse P M (2000) **A single copy of a virus-derived transgene encoding hairpin RNA gives immunity to barley yellow dwarf virus.** Mol Plant Pathol 1:347-56
- Arthropods Resistant to Pesticides Database (ARDP) <http://www.pesticideresistance.org>**
- Whalon M E, Wingerd B A (2003) **Bt: mode of action and use.** Arch Insect Biochem Physiol 54:200-11
- Yadav B C, Veluthambi K, Subramaniam K (2006) **Host-generated double stranded RNA induces RNAi in plant-parasitic nematodes and protects the host from infection.** Mol Biochem Parasitol 148:219-22
- Zha W, Peng X, Chen R, Du B, Zhu L, He G (2010) **Knockdown of midgut genes by dsRNA-transgenic plant-mediated RNA interference in the hemipteran insect *Nilaparvata lugens*.** PLoS One 6:e20504
- Zhu F, Sams S, Moural T, Haynes K F, Potter M F, Palli S R (2012) **RNA interference of NADPH-cytochrome P450 reductase results in reduced insecticide resistance in the bed bug, *Cimex lectularius*.** PLoS One 7:e31037
- Κωβαίος Δ, Κατσόγιαννος Β (2006) **Ολοκληρωμένη Καταπολέμηση Εχθρών των Καλλιεργειών, Γενικές Αρχές, Υφιστάμενη Κατάσταση και Προοπτικές.** Εντομολογική Εταιρεία Ελλάδος, AGROTICA, Θεσσαλονίκη

## Παράρτημα

F teturl8g03390 length:2004 (scaffold\_18) (mRNA) (CPR) (NADPH cytochrome P450 reductase)  
Length=2004

Score = 329 bits (364), Expect = 1e-89  
Identities = 193/200 (97%), Gaps = 0/200 (0%)  
Strand=Plus/Plus

```

Query 138  CTTTATGCAGCTTTCTCTCGTGATCAACCCGAGAAGGTTTATGTTACTCACCTTCTTAAA 197
          |||
Sbjct 1738  CTTTATGCAGCTTTCTCTCGTGATCAACCCGAGAAGGTTTATGTTACTCACCTTCTTAAG 1797

Query 198  CAGAATAATGAAGAGCTTTGGAATCTTATCGAGGAGAAGAAAGGTCACATTATATTGC 257
          |||
Sbjct 1798  CAGAATAAGAAAGAGCTTTGGAATCTTATCGAGGAGAAGAAAGGTCACATTATATTGC 1857

Query 258  GGTGATGCCATGAACATGGCTCGGGATGTTTCGAGATAICATTCTATCTACTATTATGGAA 317
          |||
Sbjct 1858  GGTGATGCCAGGAACATGGCTCGGGATGTTTCGAGATAICATTCTATCTACTATTATGGAA 1917

Query 318  GAAAGTGACCAACAAGACA 337
          |||
Sbjct 1918  GAAAGTGGCAAAACAAGTCA 1937

```

Εικόνα 12 Αποτελέσματα αλληλούχισης πλασμιδίου pK7GWIWG2(II)-TuCPR214. BLAST®



```

>lcl|53713
Length=1669

Score = 580 bits (314), Expect = 1e-169
Identities = 314/314 (100%), Gaps = 0/314 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 166 CTCAGAAGCGTTGTACACACACCCTTGTTCACTCTGTTAGTAGGIGTTGTGTATTCTACT 225
      |||
Sbjct 73 CTCAGAAGCGTTGTACACACACCCTTGTTCACTCTGTTAGTAGGIGTTGTGTATTCTACT 132

Query 226 TTTACAGCTGTAATGTGAACCTGATGTTGGATGCAGCTTTGGTGATGATGAAATTGAATAG 285
      |||
Sbjct 133 TTTACAGCTGTAATGTGAACCTGATGTTGGATGCAGCTTTGGTGATGATGAAATTGAATAG 192

Query 286 TATCGGGCCTGTAACCGTGGGAGAAGTTCACAGAGGTGGTCTATTGCAGGCTTGCAGGAT 345
      |||
Sbjct 193 TATCGGGCCTGTAACCGTGGGAGAAGTTCACAGAGGTGGTCTATTGCAGGCTTGCAGGAT 252

Query 346 GAAAAATCTTCCAAAATATGAACGATATTACGGTTGCTTCAATTATCCATTTGTTATAC 405
      |||
Sbjct 253 GAAAAATCTTCCAAAATATGAACGATATTACGGTTGCTTCAATTATCCATTTGTTATAC 312

Query 406 AGTTGCTTTCCTTCAACTGAGGTCATGGCCATTTGTCTCAACTGTTCTTGTTCCTTTGGA 465
      |||
Sbjct 313 AGTTGCTTTCCTTCAACTGAGGTCATGGCCATTTGTCTCAACTGTTCTTGTTCCTTTGGA 372

Query 466 TCCGTGGCATACTC 479
      |||
Sbjct 373 TCCGTGGCATACTC 386

```

Εικόνα 13 Αποτελέσματα αλληλούχισης πλασμιδίου ρκ7GWIWG2(II)-BtCPR314. BLAST®