ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΦΥΤΩΝ»

Ανάπτυξη μεθόδων καταπολέμησης εχθρών καλλιεργειών μέσω σίγησης μηχανισμών αποτοξικοποίησης με διαγονιδιακά φυτά

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: ΒΟΝΤΑΣ ΙΩΑΝΝΗΣ

Σανδρή Αναστασία

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2014

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα μου κ. Ιωάννη Βόντα για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε στην ανάθεση αυτής της εργασίας και για την καθοδήγηση του τόσο κατά την διάρκεια των πειραμάτων όσο και κατά τη συγγραφή αυτής της διατριβής.

Επίσης να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τα δύο μέλη της εξεταστικής επιτροπής, τον κ. Καλαντίδη Κρίτωνα και την κα. Τσαγρή Ευθυμία που δέχτηκαν να συμμετάσχουν στην επιτροπή και για τις πραγματικά πολύτιμες συμβουλές τους.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στην Ευαγγελία Μώρου για την στήριξη, τις συμβουλές, και το χρόνο που αφιέρωσε για να πραγματοποιηθεί αυτή η διατριβή. Θερμά να ευχαριστήσω τον Άρη Ηλία όχι μόνο για την καθοδήγηση και τη συμπαράσταση αλλά κυρίως για την υπομονή του στις χιλιάδες απορίες μου.

Επίσης, οφείλω ένα τεράστιο ευχαριστώ στα μέλη του εργαστηρίου Μοριακής Βιολογίας Φυτών, τη Νικολέτα, τη Ρίτα, τον Γιάννη και τον Τάσο για την πολύτιμη βοήθεια τους από την αρχή έως το τέλος αυτής της διατριβής.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλους τους συναδέλφους αλλά πάνω από όλα φίλους μου, τον Δημήτρη, την Εριέττα, την Ευγενία, τη Νατάσα, τον Αλέξη, την Ελένη και τον Μανώλη για όλα τα καλά που περάσαμε μαζί και που έκαναν την κάθε ημέρα στο εργαστήριο ξεχωριστή.

Επίσης να ευχαριστήσω και όλα τα μέλη του εργαστηρίου Μοριακής Εντομολογίας για το ευχάριστο και δημιουργικό περιβάλλον εργασίας.

Τέλος, το μεγαλύτερο ευχαριστώ το οφείλω στους γονείς μου για όσα έκαναν και κάνουν για μένα, και παρόλο που τα τελευταία δύο χρόνια μας χωρίζουν χιλιόμετρα εγώ τους ένιωθα πάντα δίπλα μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ 4

ABSTRACT 5

ΕΙΣΑΓΩΓΗ 6

1.Βιολογία και οικολογία των Bemisia tabaci και Tetranychus urticae 6

1.1 *Bemisia tabaci* 6

1.2 Tetranychus urticae 7

2. Ολοκληρωμένη καταπολέμηση επιβλαβών φυτοπαρασίτων 9

2.1 Καλλιεργητικές μέθοδοι, μηχανικά μέτρα 9

2.2 Βιολογική καταπολέμηση 9

2.3 Χημική καταπολέμηση 10

3. Βιοτεχνολογικές μέθοδοι – RNAi σαν μέθοδος καταπολέμησης παρασίτων 18

3.1 Ο μηχανισμός της RNA σίγησης 18

3.2 Εφαρμογή RNAi σαν μέθοδος καταπολέμησης παρασίτων 20

ΣΚΟΠΟΣ 23

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΩΝ ΦΥΤΩΝ 24

1.1 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ 24

Επιλογή γονιδίου – Κατασκευή cDNA - Πλασμιδιακές κατασκευές 24

Κατασκευή διαγονιδιακών φυτών 30

Απομόνωση γενωμικού DNA από φυτικό ιστό - Έλεγχος ενσωμάτωσης της ένθεσης στο φυτικό γονιδίωμα με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης 32

1.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 32

Πλασμιδιακές κατασκευές 32

Κατασκευή διαγονιδιακών φυτών 33

1.3 ΣΥΝΟΨΗ 35

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ dsRNAs ΣΤΑ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΑ ΦΥΤΑ 36

2.1 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ 36

Εξαγωγή ολικού RNA από φυτικό ιστό 37

Στύπωμα κατά Northern για μικρά RNAs 37

2.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 39

2.3 ΣΥΝΟΨΗ 41

ΣΥΖΗΤΗΣΗ 43

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 46

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 50

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο μηχανισμός της RNA σίγησης είναι ένας θεμελιώδης μηχανισμός ρύθμισης της έκφρασης γονιδίων συντηρημένος στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Τα τελευταία χρόνια μελετάται η χρήση του ως εργαλείο για την καταπολέμηση αγροτικών παρασίτων. Δύο πολύ σημαντικοί εχθροί των καλλιεργούμενων φυτών είναι ο αλευρώδης Bemisia tabaci και ο τετράνυχος Tetranychus urticae.

Στην παρούσα εργασία ο σκοπός είναι να διερευνήσουμε τους μηχανισμούς αποτοξικοποίησης αυτών των παρασίτων που οφείλονται στη δράση των οξειδασών P450 μέσω της χρήσης διαγονιδιακών φυτών καπνού *Nicotiana tabacum* και τομάτας *Solanum lycopersicum* τα οποία εκφράζουν δίκλωνο RNA για το γονίδιο CPR. Η CPR είναι η αναγωγάση των κυτοχρωμικών οξειδασών P450s που είναι υπεύθυνες για την ανθεκτικότητα σε εντομοκτόνα και φυτοτοξίνες.

Στο πρώτο κεφάλαιο παρουσιάζεται ο έλεγχος για την ενσωμάτωση των ενθέσεων του γονιδίου CPR του αλευρώδη και του τετράνυχου σε διαγονιδιακά φυτά τομάτας. Επίσης περιγράφεται η δημιουργία πλασμιδιακών κατασκευών και διαγονιδιακών φυτών τομάτας για το γονίδιο GFP σαν μάρτυρας χορήγησης του δίκλωνου RNA. Στο δεύτερο κεφάλαιο περιγράφεται ο έλεγχος της έκφρασης των μικρών δίκλωνων RNAs για το γονίδιο CPR σε διαγονιδιακά φυτά.

Τα μελλοντικά βήματα περιλαμβάνουν φαινοτυπικές παρατηρήσεις για την ανάπτυξη των παρασίτων στα διαγονιδιακά φυτά, ανάλυση των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου CPR με τη χρήση real time PCR και διεξαγωγή βιοδοκιμών με εντομοκτόνα ώστε να προσδιορίσουμε το αποτέλεσμα της καταστολής των πρωτεϊνών P450s στην βιωσιμότητα και ανθεκτικότητα των επιβλαβών παρασίτων.

ABSTRACT

The mechanism of RNA silencing is a fundamental mechanism for regulating the expression of genes conserved in eukaryotes. In recent years, RNA silencing is used to control agricultural pests. Two of the most damaging pests in agriculture are whitefly Bemisia tabaci and spider mite *Tetranychus urticae*.

Aim of this project is to determine the detoxification mechanisms of these two pests, which are caused by the effect of P450s, through transgenic plants *Nicotiana tabacum* and *Solanum lycopersicum*. These plants express double – stranded RNA for the CPR gene. CPR is the reductase of cytochrome P450 proteins which are responsible for resistance to insecticides and plant allelochemicals.

In the first chapter, the inserts of CPR gene in transgenic tomato plants were confirmed. Moreover, the constructions of plasmids and transgenic tomato plants for GFP as control gene are described. In the second chapter, the transgenic plants were checked for the expression of small dsRNAs of the CPR gene.

The next steps of this project are the phenotypic determinations of pests at the transgenic plants, the analysis of the expression levels of CPR gene with real time PCR and bioassays with insecticides in order to determine the effect of cytochrome P450 suppression in sustainability and resistance of these two harmful pests.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.Βιολογία και οικολογία των Bemisia tabaci και Tetranychus urticae

1.1 *Bemisia tabaci*

Ο αλευρώδης του καπνού *Bemisia tabaci* (Gennadius) είναι ένα από τα πιο σημαντικά αγροτικά παράσιτα παγκοσμίως. Ανήκει στην οικογένεια Aleyrodidae της τάξης Hemiptera και περιγράφηκε πρώτη φορά σε ελληνικά φυτά καπνού (Gennadius, 1889). Είναι ένα πολυφάγο είδος με ευρεία γεωγραφική εξάπλωση και αποτελεί ιδιαίτερα σημαντικό εχθρό κυρίως καλλιεργειών τομάτας, καπνού, βαμβακιού αλλά και ανθοκομικών και σιτηρών (De Barro et al., 2011; Mound and Halsey, 1978).

Οι εκτεταμένες ζημιές που μπορεί να προκαλέσει στις καλλιέργειες οφείλονται στην ικανότητά του να προσβάλλει άμεσα τα φυτά απομυζώντας φυτικούς χυμούς από το φλοίωμα (Campbell et al., 1994). Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε εξασθένιση των φυτών, προοδευτική μάρανση και τελικά καθολική ξήρανση. Έμμεσα ο αλευρώδης μπορεί να προσβάλλει τα φυτά παράγοντας κολλώδεις εκκρίσεις γνωστές ως μελιτώματα, οι οποίες γίνονται εστίες ανάπτυξης μυκήτων (Inbar and Gerling, 2008). Επίσης οι αλευρώδεις αποτελούν φορέα πάνω από 100 φυτικών ιώσεων οι οποίες προκαλούν σημαντικές απώλειες στην παραγωγή. Χαρακτηριστικά συμπτώματα προσβολής των ιώσεων είναι οι χλωρωτικές κηλίδες, οι κίτρινες νευρώσεις, το κύρτωμα των φύλλων, ο νανισμός και η πάχυνση των νευρώσεων (Jones, 2003).

Ο βιολογικός κύκλος του *B.tabaci* διαρκεί 2 με 3 εβδομάδες και ποικίλει ανάλογα με το φυτό-ξενιστή και τη θερμοκρασία. Ο τρόπος αναπαραγωγής του είναι απλοδιπλοειδής, που σημαίνει ότι τα απλοειδή αρσενικά άτομα προκύπτουν από αγονιμοποίητα ωά (αρρενοτόκος παρθενογένεση) ενώ τα διπλοειδή θηλυκά προέρχονται από γονιμοποιημένα ωά. Ο αλευρώδης είναι ημιμετάβολο έντομο και ο κύκλος ζωής του περιλαμβάνει τα στάδια του ωού, της προνύμφης (η οποία διέρχεται από τέσσερα στάδια και στο τελευταίο ονομάζεται πούπα) και του ενήλικου (Εικ.1) (Inbar and Gerling, 2008; Byrne and Bellows, 1991).

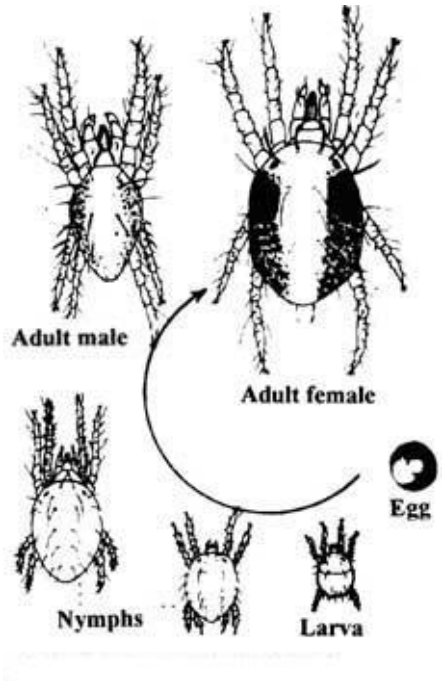
Εικόνα 1: Βιολογικός κύκλος του *B.tabaci* (http://www.daff.qld.gov.au)

Μέχρι τώρα έχουν προσδιοριστεί 24 μορφολογικά πανομοιότυπα είδη *B.tabaci* γνωστά ως βιότυποι. Οι διαφοροποιήσεις μεταξύ των βιοτύπων βασίζονται σε διάφορα χαρακτηριστικά, κάποια από τα οποία είναι το εύρος των ξενιστών και η ικανότητα προσαρμογής στα φυτά-ξενιστές, η ικανότητα να προκαλούν φυτοτοξικές αντιδράσεις και να μεταδίδουν ιώσεις και η ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα. Από τους βιότυπους αυτούς οι B και Q θεωρούνται αυτοί με τη μεγαλύτερη δυναμική μετάδοσης ιώσεων λόγω της γεωγραφικής εξάπλωσης και του εύρους των ξενιστών τους (De Barro et al., 2011).

1.2 Tetranychus urticae

Ο τετράνυχος ανήκει στην κλάση Arachnida στην τάξη Prostigmata και στην οικογένεια Tetranychidae. Είναι ένα εξαιρετικά πολυφάγο φυτοφάγο άκαρι με παγκόσμια εξάπλωση και μεγάλο εύρος ξενιστών. Ο *T.urticae* είναι γνωστός και ως τετράνυχος των θερμοκηπίων εξαιτίας των σημαντικών απωλειών που προκαλεί σε θερμοκηπιακές καλλιέργειες κυρίως της οικογένειας Solanaceae (πχ. τομάτες) και καλλωπιστικών φυτών. Επίσης αποτελεί κύριο εχθρό υπαίθριων καλλιεργειών όπως αράβοσιτο, σόγια και ζαχαρότευτλο (Zhang, 2003).

Ο βιολογικός κύκλος του τετράνυχου υπό ευνοϊκές συνθήκες ολοκληρώνεται σε 5 με 20 ημέρες και διακρίνεται σε πέντε στάδια: ωό, λάρβα, πρωτονύμφη, δευτερονύμφη και ακμαίο. Μεταξύ των κινητών σταδίων παρεμβάλλονται στάδια ηρεμίας (χρυσαλίδες) (Crooker, 1985). Ο τρόπος αναπαραγωγής του τετράνυχου είναι η αρρενοτόκος παρθενογένεση. . Τα αρσενικά είναι απλοειδή και προέρχονται από αγονιμοποίητα ωά, ενώ τα θηλυκά είναι διπλοειδή και προκύπτουν από γονιμοποιημένα ωά. Τα θηλυκά που δεν έχουν γονιμοποιηθεί παράγουν αρσενικά άτομα, ενώ τα γονιμοποιημένα μπορούν να δώσουν θηλυκούς και αρσενικούς απογόνους (Εικ.2) (Helle and Sabelis, 1985).



Εικόνα 2: Βιλογικός κύκλος του *T.urticae* (http://www.new.dpi.vic.gov.au)

Προκαλεί ζημιές στα φυτά απομυζώντας χυμούς από το δρυφακτοειδές παρέγχυμα των φύλλων με τη βοήθεια στιλέτων (Helle and Sabelis, 1985). Έτσι μειώνεται τόσο η διαδικασία της φωτοσύνθεσης όσο και της διαπνοής και αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την εμφάνιση λευκών στιγμάτων στα φύλλα. Καθώς η προσβολή γίνεται εντονότερη παρουσιάζονται χλωρώσεις, ξηράνσεις και πρόωρος θάνατος του φυτού (Devine et al., 2001).

2. Ολοκληρωμένη καταπολέμηση επιβλαβών φυτοπαρασίτων

Με την έννοια της καταπολέμησης εννοούμε την παρέμβαση του ανθρώπου με σκοπό τη μείωση του πληθυσμού ενός παρασίτου και των ζημιών που προκαλεί. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, ο αλευρώδης και ο τετράνυχος είναι από τα πιο επιβλαβή παράσιτα με παγκόσμια εξάπλωση και είναι μεγάλης οικονομικής σημασίας λόγω των εκτεταμένων ζημιών που προκαλούν στα καλλιεργούμενα φυτά. Για το λόγο αυτό αναζητούνται συνεχώς αποτελεσματικά μέτρα αντιμετώπισης. Οι μέθοδοι ολοκληρωμένης καταπολέμησης μπορούν να χωριστούν σε καλλιεργητικές, βιολογικές, χημικές και βιοτεχνολογικές.

2.1 Καλλιεργητικές μέθοδοι, μηχανικά μέτρα

Στα καλλιεργητικά μέτρα περιλαμβάνονται διάφορες εργασίες που γίνοται με γεωργικά μηχανήματα ή εργαλεία και έχουν στόχο τον περιορισμό των βλαβερών παρασίτων ή τον περιορισμό των ζημιών. Τέτοια μέτρα είναι η αμειψισπορά, η εναλλαγή καλλιεργειών, οι περίοδοι χωρίς φυτό-ξενιστή, η επιλογή συγκεκριμένων ημερομηνιών φύτευσης και ωρίμανσης, η δημιουργία ζωηρών φυτών με κατάλληλη άρδευση, αραίωση και κλάδεμα (Τζανακάκης, 1995). Συνήθως τα καλλιεργητικά μέτρα είναι επικουρικά άλλων μέτρων καταπολέμησης.

Τα μηχανικά μέτρα περιλαμβάνουν τη συλλογή, την παγίδευση ή την απομάκρυνση των επιζήμιων εντόμων. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με χρήση παγίδων που προσελκύουν τα έντομα με τροφικά, οπτικά ή οσφρητικά ερεθίσματα. Επιπλέον, άλλα μέτρα είναι η αχρήστευση του μέσου που ζουν και πολλαπλασιάζονται, η αλλαγή της υγρασίας, της θερμοκρασίας και του φωτός. Τα μέτρα αυτά μόνο σε σχετικά λίγες περιπτώσεις προκαλούν μεγάλη θνησιμότητα των εντόμων και είναι συνήθως δαπανηρά (Τζανακάκης, 1995).

2.2 Βιολογική καταπολέμηση

Η βιολογική καταπολέμηση των παρασίτων περιλαμβάνει φυσικούς εχθρούς οι οποίοι προσβάλλουν διάφορα στάδια της ζωής τους και αποτελεί μια μέθοδο που χρησιμοποιείται ευρεία στη γεωργία (Arno et al., 2010). Η χρήση φυσικών εχθρών

περιλαμβάνει την εξαπόλυση ωφέλιμων αρπακτικών, παρασιτοειδών και παθογόνων των επιβλαβών παρασίτων.

Ωφέλιμα αρπακτικά ακάρεα της οικογένειας Phytoseiidae καθώς και έντομα από τα γένη *Orius, Anthocoris,* και *Stethorus* έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για την καταπολέμηση του τετράνυχου. Επίσης θηρευτές σκαθάρια (Coccinellidae), ημίπτερα (Miridae, Anthocoridae), νευρόπτερα (Chrysopidae,Coniop terygidae) και αραχνοειδή (Araneae) διατίθενται για την καταπολέμηση του αλευρώδη (Gerling et al 2001).

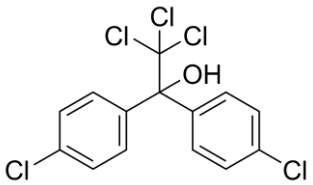
Όσον αφορά τα παρασιτοειδή σχετικά λίγα χρησιμοποιούνται για την καταπολέμηση λόγω της έλλειψης γνώσεων για την βιολογία και οικολογία τους, αλλά τα πιο γνωστά για την αντιμετώπιση του αλευρώδη ανήκουν στα γένη *Encarsia, Eretmocerus* και *Amitus* (Gerling et al., 2001).

Η χρήση παθογόνων μικροοργανισμών για τον έλεγχο του αλευρώδη και του τετράνυχου περιλαμβάνει την εφαρμογή σκευασμάτων με σπόρια εντομοπαθογόνων μυκήτων. Οι μύκητες αποδείχθηκαν αποτελεσματικοί στην καταπολέμηση καθώς προσβάλλουν τους ξενιστές τους διεισδύοντας στον εξωσκελετό. Τα γένη των μυκήτων που χρησιμοποιούνται είναι κυρίως τα *Paecilomyces, Verticillium* και *Beauveria* (Faria and Wraight, 2001).

2.3 Χημική καταπολέμηση

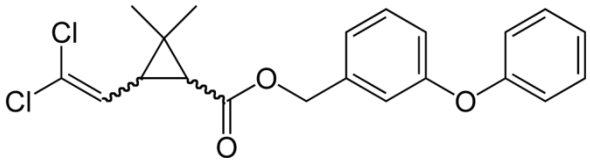
Σήμερα η χρήση χημικών εντομοκτόνων και ακαρεοκτόνων αποτελεί την κύρια μέθοδο για την καταπολέμηση των παρασίτων. Τα σκευάσματα που χρησιμοποιούνται εναντίων του αλευρώδη και του τετράνυχου διακρίνονται με βάση τον τρόπο δράσης τους σε διάφορες κατηγορίες μεταξύ των οποίων:

Τα οργανοχλωριωμένα στοχεύουν τον υποδοχεά του γ-αμινοβουτυρικού οξέος (GABA). Το GABA είναι κύριος ανασταλτικός νευροδιαβιβαστής και η δέσμευσή του προκαλεί το άνοιγμα του διαμεμβρανικού καναλιού χλωρίου επιτρέποντας την είσοδο ιόντων χλωρίου Cl^- και την έξοδο ιόντων K^+ από το κύτταρο (Buckingham SD, 2010).



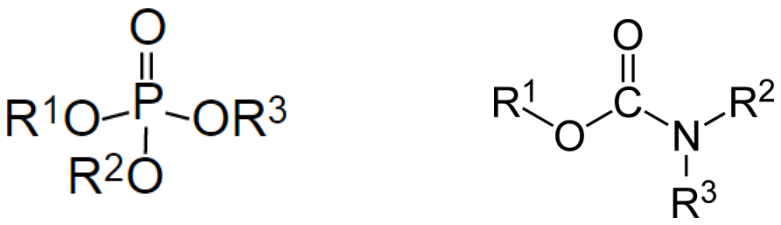
Εικόνα 3: Χημική δομή του οργανοχλωριωμένου dicofol (2,2,2-trichloro-1,1-bis(4-chlorophenyl)ethanol)

Τα συνθετικά πυρεθρινοειδή στοχεύουν τα κανάλια μεταφοράς ιόντων Na^+, προκαλώντας το παρατεταμένο άνοιγμα των διαύλων. Με αυτόν τον τρόπο διαταράσσεται η ισορροπία μεταξύ ιόντων Na^+ και K^+ στο περιβάλλον των νευρικών κυττάρων (Elliott and Janes, 1978).



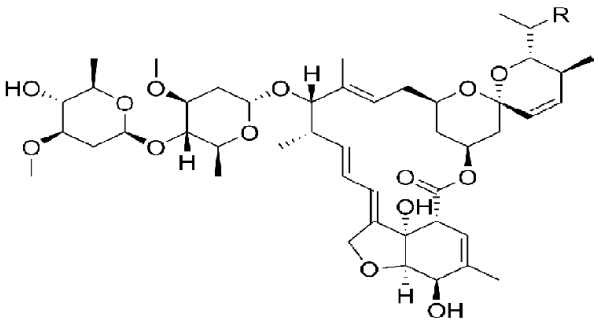
Εικόνα 4: Χημική δομή του πυρεθρινοειδούς permethrin (3-Phenoxybenzyl (1*RS*)-*cis*,*trans*-3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylate)

Τα οργανοφωσφορικά και καρβαμιδικά εντομοκτόνα στοχεύουν την ακετυλοχολινεστεράση, ένα ένζυμο του νευρικού συστήματος. Δεσμεύονται στο ενεργό της κέντρο με συνέπεια να αναστέλλεται η λειτουργία της. Η ακετυλοχολινεστεράση μετατρέπει την ακετυλοχολίνη σε χολίνη, διακόπτοντας την μεταφορά νευρικού σήματος και οδηγώντας το νευρικό σύστημα του οργανισμού στόχου σε αχρήστευση (Casida and Durkin, 2013).



Εικόνα 5: Αριστερά η χημική δομή των οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων. Δεξιά η χημική δομή των καρβαμιδικών εντομοκτόνων

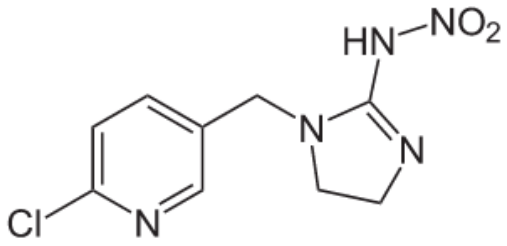
Οι αβερμεκτίνες είναι μακροκυκλικές λακτόνες που ανήκουν σε μια νέα γενιά εντομοκτόνων-ακαρεοκτόνων με εξειδικευμένη δράση. Προέρχονται φυσικά από τη ζύμωση του ακτινομύκητα Streptomyces avermitilis και δρουν κυρίως στο γ-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA) και στους διαύλους χλωρίου οδηγώντας σε ενεργοποίηση των καναλιών με αποτέλεσμα την παράλυση του οργανισμού στόχου (Van Leeuwen et al., 2009).



Εικόνα 6: Χημική δομή των αβερμεκτινών

Τα νεονικοτινοειδή σχεδιάστηκαν με βάση τις νικοτινικές ενώσεις που απαντώνται στη φύση και στοχεύουν το νικοτινικό υποδοχέα της ακετυλοχολίνης (nAchR). Οι nAchRs είναι χολινεργικοί υποδοχείς και ενεργοποιούνται από την πρόσδεση του νευροδιαβιβαστή ακετυλοχολίνη (Matsuda et al., 2009). Τα νεονικοτινοειδή μιμούνται τη δράση του νευροδιαβιβαστή, το νεύρο διεγείρεται συνεχώς, οδηγεί στην υπερδιέγερση του νευρικού συστήματος και τελικά στο θάνατο των εντόμων (Casida and Durkin, 2013). Εξαιτίας της χαμηλής τοξικότητας και της υψηλής απόδοσης θεωρούνται από τα πιο αποτελεσματικά ενάντια στον αλευρώδη

αλλά και σε άλλα παράσιτα. Το πρώτο νεονικοτινοειδές που αναπτύχθηκε ήταν το imidacloprid (1990) (Elbert et al., 1990).



Εικόνα 7: Χημική δομή του νεονικοτινοειδούς imidacloprid (*N*-{1-[(6-Chloro-3-pyridyl)methyl]-4,5-dihydroimidazol-2-yl}nitramide)

2.3.1 Ανθεκτικότητα

Η ανθεκτικότητα είναι ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα στην προσπάθεια καταπολέμησης των επιβλαβών φυτοπαρασίτων και προκαλείται από την επαναλαμβανόμενη χρήση εντομοκτόνων-ακαρεοκτόνων. Είναι μια κληρονομούμενη ιδιότητα και ορίζεται ως η ικανότητα ενός πληθυσμού να επιβιώνει μετά από έκθεση σε δόση δραστικής ουσίας που κανονικά θα ήταν θανατηφόρα για τα άτομα του πληθυσμού και αποτελεί παράδειγμα αντίδρασης και προσαρμογής σε περιβαλλοντικό στρες (Denholm et al., 2001). Ο παράγοντας επιλογής είναι το εντομοκτόνο το οποίο επιλέγει τα ανθεκτικά γονίδια που ήδη υπάρχουν και με την πάροδο των γενεών ο πληθυσμός από ευπαθής γίνεται ανθεκτικός.

Η ανάπτυξη ανθεκτικότητας στα έντομα και τα ακάρεα ευνοείται από το υψηλό δυναμικό αναπαραγωγής τους, το σύντομο βιολογικό τους κύκλο, το μεγάλο αριθμό γενεών ανά έτος και την εγγενή αναπαραγωγή που επιτρέπει τους ανασυνδυασμούς του γενετικού υλικού (Van Leeuwen et al., 2010).

2.3.2 Μηχανισμοί ανθεκτικότητας

Στην εμφάνιση ανθεκτικότητας εμπλέκονται πολλοί μηχανισμοί που μπορεί να αλληλεπιδρούν αλλά στις περισσότερες περιπτώσεις η ανθεκτικότητα προκαλείται

από δύο κύριους μηχανισμούς: α) την ανθεκτικότητα στόχου και β) τη βιοχημική ανθεκτικότητα.

α) Ανθεκτικότητα στόχου

Η ανθεκτικότητα στόχου προκαλείται από μεταλλαγές σε γονίδια που κωδικοποιούν τις πρωτεϊνες-στόχους των δραστικών ουσιών. Αυτές οι μεταλλαγές είναι σημειακές και αφορούν αντικατάσταση αμινοξέων στο ενεργό κέντρο της πρωτεϊνης-στόχου. Σαν αποτέλεσμα η δομή της πρωτεϊνης αλλάζει και το εντομοκτόνο δε μπορεί να προσδεθεί και να δράσει (Ffrench – Constant et al., 2000).

Σε ανθεκτικά στελέχη τετρανύχου έχουν βρεθεί μεταλλαγές στην ακετυλοχολινεστεράση που προσδίδουν ανθεκτικότητα σε οργανοφωσφορικά και καρβαμιδικά ακαρεοκτόνα (Khajehali et al., 2010; Kwon et al., 2010). Επίσης, τρεις μεταλλαγές έχουν εντοπιστεί στα κανάλια μεταφοράς ιόντων νατρίου που σχετίζονται με ανθεκτικότητα στα πυρεθρινοειδή (Tsagkarakou et al., 2009; Kwon et al., 2010b). Στο κυτόχρωμα β του μιτοχονδριακού DNA έχουν προσδιοριστεί πέντε μεταλλαγές που ευθύνονται για ανθεκτικότητα στο ακαρεοκτόνο bifenazate (Van Leeuwen et al., 2009) και τέλος δύο μεταλλαγές στους διαύλους χλωρίου έχουν συσχετιστεί με ανθεκτικότητα στο abamectin (Kwon et al., 2010c; Dermauw et al., 2012).

Στον αλευρώδη έχει βρεθεί επίσης μεταλλαγή στην ακετυλοχολινεστεράση που συσχετίζεται με ανθεκτικότητα σε οργανοφωσφορικά (Alon et al., 2008) και τρεις μεταλλαγές στα κανάλια μεταφοράς ιόντων νατρίου που προσδίδουν στα ανθεκτικά στελέχη ανθεκτικότητα σε πυρεθρινοειδή (Morin et al., 2002; Roditakis et al., 2006).

β) Βιοχημική ανθεκτικότητα

Η βιοχημική ανθεκτικότητα προκαλείται όταν υπάρχει αύξηση της παραγωγής ή της δραστικότητας συγκεκριμένων ενζύμων, τα οποία αποτοξικοποιούν ή δεσμεύουν τα εντομοκτόνα-ακαρεοκτόνα εμποδίζοντας τα να φτάσουν στο στόχο τους. Η αύξηση των επιπέδων αυτών των ενζύμων μπορεί να οφείλεται είτε σε αυξημένη έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν για αυτά τα ένζυμα, είτε σε αύξηση του αριθμού αντιγράφων των γονιδίων. Αυτές οι ομάδες ενζύμων είναι οι εστεράσες (CCEs), οι τρανσφεράσες της γλουταθειόνης (GSTs) και οι

μονοοξυγενάσες (P450s). Οι εστεράσες και οι τρανσφεράσες γλουταθειόνης περιγράφονται σύντομα παρακάτω και στη συνέχεια εκτενέστερα οι P450s.

Οι εστεράσες είναι μια ομάδα ενζύμων που μεταβολίζουν υποστρώματα με εστερικούς δεσμούς. Σε ανθεκτικά στελέχη εντόμων οι εστεράσες παράγονται σε τόσο μεγάλες ποσότητες ώστε μπορούν και απομακρύνουν το εντομοκτόνο από τον στόχο δεσμεύοντας το (Field et al., 1998). Όμως ανθεκτικότητα μπορούν να προσφέρουν και μέσω ποιοτικών αλλαγών στη δομή τους. Σε ανθεκτικά στελέχη τετρανύχου έχει βρεθεί να υπερεκφράζεται η εστεράση CCE04 (Demaeght et al., 2013) προσδίδοντας ανθεκτικότητα στο ακαρεοκτόνο spirodiclofen και στον αλευρώδη η υπερέκφραση της καρβοξυλεστεράσης COE1 βρέθηκε να τον καθιστά ανθεκτικό σε οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα (Alon et al., 2008).

Οι τρανσφεράσες γλουταθειόνης είναι μια οικογένεια ενζύμων που καταλύουν την προσθήκη γλουταθειόνης στα λιπόφιλα μόρια των εντομοκτόνων, αυξάνοντας τη διαλυτότητά τους και διευκολύνοντας την έξοδό τους από τον οργανισμό (Vontas et al., 2001). Σε στέλεχος αλευρώδη B βιοτύπου από την Κίνα εντοπίστηκε υπερέκφραση μια GST που το καθιστούσε ανθεκτικό στο νεονικοτινοειδές thiamethoxam (Yang et al., 2013a).

2.3.3 P450 μονοοξυγενάσες

Οι P450 μονοοξυγενάσες ή μικτής λειτουργίας οξειδάσες (γνωστές και ως κυτοχρωμικές P450s, CYPs) ανήκουν σε μια από τις μεγαλύτερες οικογένειες ενζύμων και έχουν βρεθεί σε όλους σχεδόν τους οργανισμούς. Στους προκαρυώτες, τα ένζυμα P450 είναι διαλυτές πρωτεΐνες, ενώ στους ευκαρυώτες συχνά συνδέονται με το ενδοπλασματικό δίκτυο ή με την εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων (Berge et al.,1998). Το ενεργό κέντρο των ενζύμων P450 περιέχει μια ομάδα αίμης στο εσωτερικό του, η οποία περικλείει ένα άτομο σιδήρου (κέντρο αιμικού σιδήρου) και για αυτό το λόγο τα ένζυμα αυτά ανήκουν στην υπεροικογένεια των αιμοπρωτεινών.

Οι P450s συμμετέχουν σε πληθώρα μηχανισμών τόσο σε αναπτυξιακά αλλά και ρυθμιστικά μονοπάτια των οργανισμών. Εμπλέκονται στη βιοσύνθεση και στο μεταβολισμό ενδογενών ουσιών όπως στεροειδείς ορμόνες και λίπη αλλά η δράση

τους σχετίζεται κυρίως με την αποτοξικοποίηση ξενοβιοτικών ουσιών. Καταλύουν μια μεγάλη ποικιλία αντιδράσεων αλλά η πιο κοινή είναι αυτή της μονοοξυγενάσης: δεσμεύουν το μοριακό οξυγόνο και εισάγουν ένα άτομο οξυγόνου στο οργανικό υπόστρωμα, ενώ το δεύτερο άτομο οξυγόνου ανάγεται σε νερό σύμφωνα με την αντίδραση:

υπόστρωμα (S) + (NADPH + H^+) + O_2 → S(O) + $NADP^+$ + H_2O

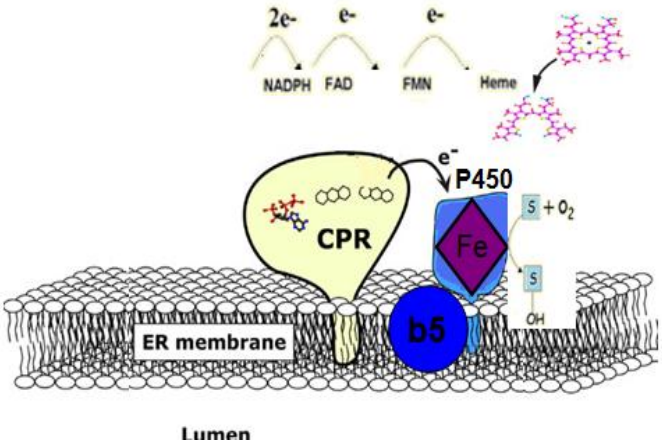
Αυτή η δραστικότητα μονοοξυγενάσης των P450 ενζύμων σχετίζεται με το μεταβολισμό των περισσότερων εντομοκτόνων, οδηγώντας κατά κύριο λόγο στην αποτοξικοποίηση τους και ως εκ τούτου στην ανθεκτικότητα των εντόμων (Scott et al., 1999). Για την μειωμένη ευαισθησία των εντόμων ευθύνονται ποσοτικές αλλαγές μελών της οικογένειας των P450s και λιγότερο συχνά ποιοτικές διαφοροποιήσεις (Van Leeuwen et al.,2005, Scott et al., 1999). Έχει βρεθεί ανθεκτικότητα σχεδόν σε όλες τις ομάδες εντομοκτόνων όπως οργανοφωσφορικά, πυρεθρινοειδή, οργανοχλωριωμένα, νεονικοτινοειδή και αβερμεκτίνες και συχνά έχουν ευρύ χαρακτήρα αφού ορισμένες P450 οξειδάσες έχουν την ικανότητα να τα αναγνωρίζουν ως υπόστρωμα και να μεταβολίζουν πολύ διαφορετικά τοξικά μόρια (Daborn et al., 2002).

Στον τετράνυχο έχει χαρακτηριστεί ο ρόλος της κυτοχρωμικής CYP392E10 στην αποτοξικοποίηση του ακαρεοκτόνου spirodiclofen (Demaeght et al., 2013). Επίσης, πειράματα μικροσυστοιχιών που πραγματοποιήθηκαν σε ανθεκτικό στέλεχος τετρανύχου από το Μαραθώνα Αττικής υπέδειξαν υψηλό αριθμό γονιδίων αποτοξικοποίησης που πιθανά σχετίζονται με τον φαινότυπο της ανθεκτικότητας στο abamectin. Εντοπίστηκαν υψηλά επίπεδα έκφρασης σε αρκετές P450s (CYP392D2, CYP392D8, CYP392D10, CYP392A16 και CYP392A11) από τις οποίες η CYP392A16 βρέθηκε in vitro ότι μπορούσε να μεταβολίσει το abamectin, συμμετέχοντας ενεργά στον φαινότυπο της ανθεκτικότητας (Riga et al., 2014).

Στον αλευρώδη χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η CYP6CM1 και η συσχέτισή της με την ανθεκτικότητα του *B.tabaci* στο νικοτινοειδές imidacloprid. Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι η υπερέκφραση της κυτοχρωμικής P450 CYP6CM1 σχετίζεται άμεσα με το φαινότυπο σε διάφορα εργαστηριακά στελέχη *B.tabaci* βιοτύπων B και Q που είχαν επιλεγεί με imidacloprid (Karunker et al., 2008). Επόμενη μελέτη στην οποία έγινε ανασύσταση ενός λειτουργικού συμπλόκου

μονοοξυγενάσης έδειξε ότι το ανασυνδυασμένο ένζυμο CYP6CM1vQ έχει τη δυνατότητα να μεταβολίζει το imidacloprid με σχετικά υψηλούς ρυθμούς (Karunker et al. 2009).

Για να καταλύσουν την αντίδραση προσθήκης οξυγόνου στα οργανικά υποστρώματα οι P450s αντλούν ηλεκτρόνια από ενεργοποιημένους φορείς ηλεκτρονίων όπως το NADPH. Αυτή η μεταφορά ηλεκτρονίων γίνεται είτε από το κυτόχρωμα b_5 είτε από ένα ένζυμο, την αναγωγάση των κυτοχρωμικών P450 (NADPH-cytochrome P450 reductase-**CPR**) (Berge et al., 1998). Η CPR είναι μια πρωτεϊνη προσδεδεμένη στις μεμβράνες του ενδοπλασματικού δικτύου μέσω του αμινοτελικού της άκρου ή προσδεδεμένη στις μεμβράνες των μιτοχονδρίων (Kida et al., 1998). Έχει μια FAD υπομονάδα με ικανότητα αναγνώρισης του NADPH και μια FMN υπομονάδα. Τα ηλεκτρόνια από το NADPH μεταφέρονται μέσω της FAD και έπειτα της FMN υπομονάδας στο σύμπλοκο των P450s. (Εικ.8) (Hannemann et al., 2007; Wang et al., 1997).



Εικόνα 8: Σύστημα μεταφοράς ηλεκτρονίων από τη CPR στις P450s

3. Βιοτεχνολογικές μέθοδοι – RNAi σαν μέθοδος καταπολέμησης παρασίτων

3.1 Ο μηχανισμός της RNA σίγησης

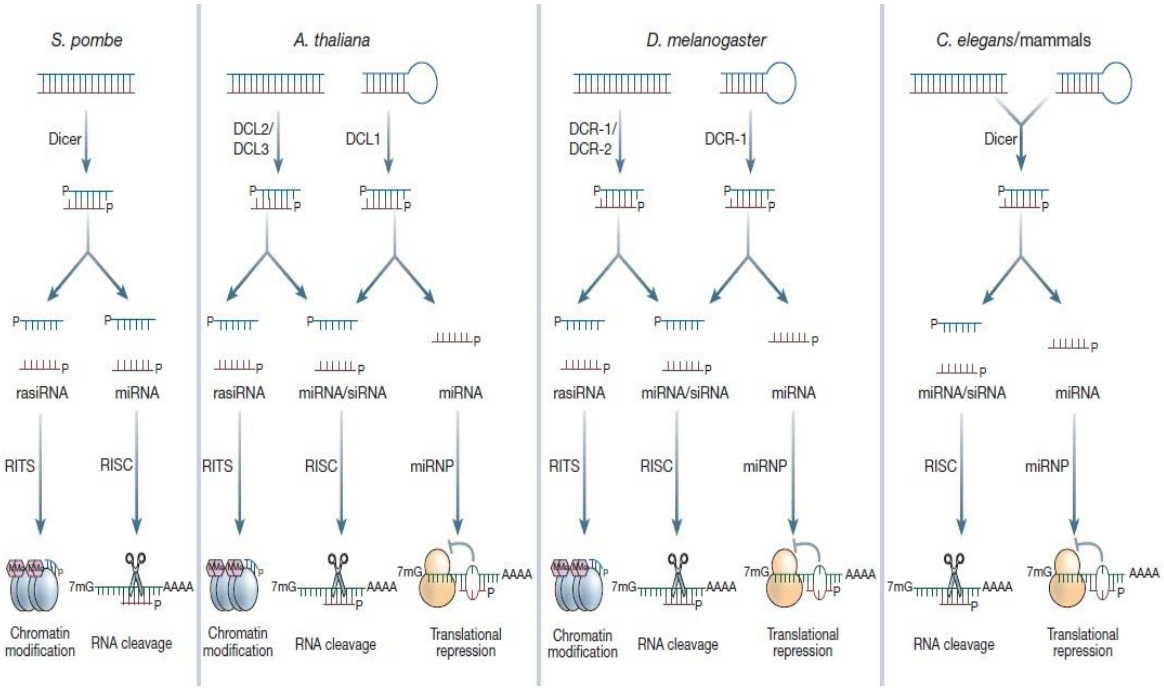
Η χρήση χημικών ουσιών είναι ο κύριος τρόπος αντιμετώπισης των παρασίτων αλλά τα τελευταία χρόνια το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας έχει στραφεί στον μηχανισμό της RNA σίγησης ως εναλλακτική μέθοδο για την καταπολέμησή τους.

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). Πρώτα ανακαλύφθηκε στα φυτά όμως στη συνέχεια διαπιστώθηκε ότι είναι ένας θεμελιώδης μηχανισμός συντηρημένος στους περισσότερους ευκαρυώτες με αξιοσημείωτη εξαίρεση τον σακχαρομύκητα (*Saccharomyces cerevisiae*) στον οποίο απουσιάζει. Για τα φυτά χρησιμοποιείται ο όρος RNA σίγηση (RNA silencing), στα ζώα συναντάται ως RNA interference (RNAi) ενώ στους μύκητες λέγεται Quelling (Agrawal et al., 2003).

Έχει καθοριστικό ρόλο στην άμυνα του οργανισμού απέναντι σε εισβολές ξένου γενετικού υλικού όπως από ιούς, βακτήρια και μεταθετά στοιχεία. Επίσης ελέγγχει την έκφραση γονιδίων που συμμετέχουν σε αναπτυξιακά μονοπάτια, σε μηχανισμούς κυτταρικής διαφοροποίησης και μορφογένεσης (Du and Zamore, 2005). Η ενεργοποίηση του μηχανισμού προκαλείται από πρόδρομα δίκλωνα μόρια RNA (dsRNA) που μπορεί να έχουν διαφορετικό μέγεθος και προέλευση. Αυτά τα dsRNAs μετατρέπονται σε μικρά δίκλωνα RNA μήκους 21-28 νουκλεοτιδίων τα οποία οδηγούν σε αναγνώριση και καταστολή των συμπληρωματικών αλληλουχιών στόχων. Η καταστολή επιτυγχάνεται με κοπή του mRNA στόχου, αναστολή της μετάφρασής του ή μεθυλίωση και μεταγραφική απενεργοποίηση του γονιδίου που παράγει τον στόχο (Carthew and Sontheimer, 2009).

Τα τρία μεγάλα μονοπάτια της RNA σίγησης είναι αυτά των short interfering RNAs (siRNAs), των micro RNAs (miRNAs) και αυτό της DNA μεθυλίωσης (Melnyk et al., 2011). . Στη φύση τα dsRNA μπορούν να παραχθούν μέσω

πολυμερισμού μονόκλωνου RNA όπως για παράδειγμα RNA ιών, ή από υβριδοποίηση αλληλοεπικαλυπτόμενων μεταγραφημάτων όπως για παράδειγμα επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (μεταθετά στοιχεία). Τέτοια dsRNA είναι πρόδρομοι των siRNA και rasiRNA τα οποία οδηγούν σε αποικοδόμηση του mRNA στόχου και τροποποιήσεις της χρωματίνης αντίστοιχα. Επιπλέον, ενδογενή μετάγραφα που περιέχουν εσωτερική συμπληρωματικότητα ή μερική συμπληρωματικότητα 20-50 νουκλεοτιδίων αναδιπλώνονται σχηματίζοντας δομή φουρκέτας (hairpin). Αυτού του τύπου δίκλωνα RNA είναι πρόδρομα μόρια των miRNAs και είναι υπεύθυνα για την καταστολή της μετάφρασης των mRNA στόχων καθώς επίσης σε μερικές περιπτώσεις και της αποικοδόμησης του mRNA (Εικ.9). Παρακάτω αναλύεται το μονοπάτι των siRNAs καθώς είναι αυτό που ενεργοποιείται με την είσοδο εξωγενών RNA στο κύτταρο.



Εικόνα 9: Το μονοπάτι RNA σίγησης σε διάφορους οργανισμούς. Το μακρύ dsRNA μετατρέπεται σε μικρά RNA (siRNA και miRNA) από το ένζυμο Dicer. Τα μικρά dsRNA στη συνέχεια προσδένονται στα σύμπλοκα RISC, RITS (RNA-induced transcriptional silencing) ή miRNP. Το σύμπλοκο RISC μεσολαβεί στη αποικοδόμηση του mRNA στόχου, το σύμπλοκο miRNP οδηγεί στην καταστολή της μετάφρασης του mRNA στόχου, και το σύμπλοκο RITS εμπλέκεται στην συμπύκνωση της ετεροχρωματίνης (Meister and Tuschl, 2004).

Η ωρίμανση των siRNA καταλύεται από ένα ένζυμο της οικογένειας των RNase-III-type ενδονουκλεασών που ονομάζεται Dicer και περιέχει μια καταλυτική υπομονάδα RNase-III και μια υπομονάδα για την πρόσδεση δίκλωνου RNA (Bernstein et al., 2001). Η επεξεργασία του dsRNA από τη Dicer οδηγεί στη δημιουργία μικρών δίκλωνων RNA μήκους περίπου 21 νουκλεοτιδίων. Τα δίκλωνα αυτά μόρια έχουν ένα 5΄φωσφορικό άκρο και δύο 3΄προεξέχοντα νουκλεοτίδια.

Στη συνέχεια τα μικρά αυτά RNA αναγνωρίζονται και προσδένονται σε ένα ειδικό πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο, το RNA- Induced Silencing Complex (RISC). Κύρια πρωτεΐνη αυτού του συμπλόκου είναι η πρωτεΐνη Αργοναύτης (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. Έτσι, η μια αλυσίδα των μικρών RNA ενσωματώνεται στο RISC για να λειτουργήσει σαν οδηγός προς όλες τις συμπληρωματικές προς αυτήν αλληλουχίες για να καταστείλει την έκφρασή τους. Η επιλογή της αλυσίδας που θα λειτουργήσει σαν αλληλουχία οδηγός 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 (Meister and Tuschl, 2004).

3.2 Εφαρμογή RNAi σαν μέθοδος καταπολέμησης παρασίτων

Ο μηχανισμός του RNAi όντας συντηρημένος στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς μπορεί να λειτουργήσει σαν εργαλείο για την καταπολέμηση των επιβλαβών παρασίτων. Μπορούν να στοχευθούν αλληλουχίες παρασιτικών οργανισμών οι οποίες θα καταστέλλονται όταν θα υπάρξει προσβολή. Επίσης, είναι δυνατόν να στοχευθούν θεμελιώδη γονίδια για την επιβίωση του παθογόνου παρασίτου ή γονίδια που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα του σε παρασιτοκτόνα.

Όσον αφορά τον τετράνυχο, η αλληλούχιση του γονιδιώματός του που έγινε πρόσφατα (Grbic et al., 2011) έδειξε ότι διαθέτει όλα τα απαραίτητα πρωτεϊνικά σύμπλοκα (πρωτεϊνες Dicer, σύμπλοκο RISC, πρωτεϊνη Αργοναύτης) ώστε να λειτουργήσει ο μηχανισμός της RNA σίγησης. Επίσης, στον τετράνυχο έχει βρεθεί η παρουσία της RNA – κατευθυνόμενης RNA πολυμεράσης (RNA – directed RNA polymerase, RdRP), ένα ένζυμο που δεν έχει χαρακτηρισθεί ακόμα στα έντομα αλλά

όπως φαίνεται από πειράματα στο νηματώδη *C.elegans* διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αποτελεσματικότητα του μηχανισμού RNAi (Van Leeuwen et al., 2012).

Η μεγαλύτερη πρόκληση για την χρήση της RNA σίγησης ως εργαλείο για την καταπολέμηση εντόμων – παρασίτων είναι να βρεθούν εύκολες μέθοδοι για την χορήγηση dsRNA. Μέχρι τώρα έχει μελετηθεί η πρόσληψη dsRNA μέσω μικροενέσεων και μέσω τροφής που γίνεται είτε σε ανάμειξη με τη δίαιτα είτε μέσω διαγονιδιακών φυτών. Παρακάτω θα αναφερθούν χαρακτηριστικά παραδείγματα επιτυχημένης σίγησης που έγιναν μέσω τροφής.

Χορήγηση dsRNA μέσω τροφής-έκφραση σε βακτήρια ή ανάμειξη με τη δίαιτα

Δύο κύριες στρατηγικές έχουν χρησιμοποιηθεί σε πειράματα χορήγησης dsRNA μέσω τροφής: α) το dsRNA εκφράζεται σε βακτήρια, β) συντίθεται *in vitro* και χορηγείται στα έντομα αναμιγνύοντας το με τη δίαιτα.

Το 1998, οι Timmon και Fire ανέφεραν ότι νηματώδεις *C.elegans* οι οποίοι είχαν τραφεί με βακτήρια *E.coli* που εξέφραζαν dsRNA εμφάνισαν τον ίδιο φαινότυπο με τα αντίστοιχα μεταλλάγματα στα όποια έχουν γίνει μεταλλάξεις παρεμπόδισης λειτουργίας (loss-of-function mutants) (Timmon and Fire, 2001). Αυτό το εύρημα είχε ως αποτέλεσμα την ανακάλυψη μιας νέας μεθόδου εισαγωγής dsRNA στους οργανισμούς ώστε να επαχθεί η σίγηση. Μετά την ανακάλυψη της μεθόδου στο *C.elegans*, έγινε εφαρμογή της σε διάφορα έντομα όπως *Spodoptera exigua, Diabrotica virgifera virgifera*, και *Epiphyas postvittana* (Turner et al., 2006; Baum et al., 2007; Tian et al., 2009; Surakasi et al., 2011).

Η σύνθεση dsRNA *in vitro* και χορήγησή τους μέσω τροφής οδήγησε σε σίγηση του γονιδίου της Ε-υπομονάδας vATPase των εντόμων *T. castaneum, A. pisum*, και *M.sexta* (Whyard et al., 2009). Το 2011 οι Upadhyay et al. κατάφεραν να σιγήσουν τα γονίδια ακτίνης, ADP/ATP translocase, α-tubulin, ριβοσωμικής πρωτεΐνης L9 (RPL9) και της Α υπομονάδας της V-ATPase στον αλευρώδη *B.tabaci* παράγοντας dsRNA και siRNA *in vitro* και αναμιγνύοντάς το με τεχνητή δίαιτα

(Upadhyay et al., 2011). Επίσης στον τετράνυχο η σίγηση μέσω χορήγησης dsRNA με φυλλικούς δίσκους ήταν επιτυχής για τέσσερα γονίδια που δοκιμάστηκαν, μεταξύ των οποίων και η VATP-ase. Στην συγκεκριμένη εργασία επιτεύχθηκε τόσο αυξημένη θνησιμότητα των ατόμων όσο και μειωμένα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων στόχων (Kwon et al., 2013). Τέλος, σε πρόσφατη μελέτη έχει επιτευχθεί σίγηση της P450 CYP6CM1 σε στελέχη *B.tabaci* B και Q βιότυπου με χορήγηση dsRNA στη δίαιτα. Η σίγηση του γονιδίου μείωσε την ανθεκτικότητα των εντόμων στο imidacloprid (Li et al., 2014). Ωστόσο, σε άλλα πειράματα δεν επιβεβαιώθηκε η σίγηση της CYP6CM1 μέσω τεχνητής δίαιτας πιθανόν λόγω της μικρής διάρκειας χορήγησης του δίκλωνου RNA (Διδακτορική διατριβή Ηλία Άρη, «Διερεύνηση των μηχανισμών ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα και της διασποράς των υπεύθυνων γονιδίων σε πληθυσμούς των *Bemisia tabaci* (αλευρώδη) και *Tetranychus urticae* (τετράνυχου)», 2014).

Η πρόσληψη dsRNA από τα έντομα μέσω τροφής παρέχει πολλά πλεονεκτήματα. Είναι χαμηλή σε κόστος και έχει εύκολη εφαρμογή. Ένα ακόμη πλεονέκτημα της μεθόδου είναι το γεγονός ότι είναι λιγότερο επεμβατική και επίσης είναι πιο πρακτική μέθοδος για μικρότερα έντομα όπως αφίδες και λάρβες πρώτου ή δευτέρου σταδίου ή νύμφες (Yu et al., 2012). Ωστόσο, η πρόσληψη dsRNA μέσω τροφής έχει και κάποια μειονεκτήματα: η αποτελεσματικότητα της μεθόδου ποικίλει μεταξύ διαφορετικών ειδών πιθανών λόγω του διαφορετικού περιβάλλοντος του εντέρου. Ένας ακόμη περιορισμός της μεθόδου είναι το γεγονός ότι ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης που προσλαμβάνουν τα έντομα είναι δύσκολος (Yu et al., 2012).

Χορήγηση dsRNA μέσω διαγονιδιακών φυτών

Μελέτες έδειξαν ότι η πρόσληψη dsRNA με αυτή τη μέθοδο έχει οδηγήσει σε σίγηση γονιδίων σε έντομα της οικογένειας των Λεπιδόπτερων, των Κολεόπτερων και των Ημίπτερων. Οι Mao et al. κατασκεύασαν φυτά καλαμποκιού, καπνού *Nicotiana tabaccum* και *Arabidopsis thaliana* ανθεκτικά στο λεπιδόπτερο *Helicoverpa armigera.* Τα φυτά αυτά εκφράζουν dsRNA για το γονίδιο CYPAE14 το οποίο έχει δειχτεί ότι συμβάλει στην αποτοξικοποίηση της φυτοτοξίνης gossypol με αποτέλεσμα τα έντομα να είναι ευάλωτα στην ουσία αυτή (Mao et al., 2007; Mao et

al., 2011). Οι Baum et al., εφάρμοσαν την τεχνική της RNA σίγησης μέσω διαγονιδιακών φυτών σε κολεόπτερα (Western corn rootworm). Στόχευσαν με δίκλωνο RNA παραγόμενο από φυτά καλαμποκιού μια V-ATPάση. Οι προνύμφες έδειξαν πολύ μειωμένη ανάπτυξη κ θνησιμότητα (Baum et al., 2007).

Ακολούθησε η εφαρμογή της μεθόδου σε ημίπτερα (Zha et al., 2010; Pitino et al., 2011). Οι Zha et al κατέστειλαν τρία γονίδια του εντόμου *Nilaparvata lugens* , το NIHT1, το Nlcar και το Nltry μέσω διαγονιδιακών φυτών ρυζιού που παρήγαγαν τα αντίστοιχα dsRNA για τα γονίδια αυτά. 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 διαγονιδιακά φυτά για την παραγωγή dsRNA των παραπάνω γονιδίων, έδειξαν μέχρι και 60% καταστολή τους. Στον αλευρώδη, η πιο πρόσφατη μελέτη αφορά τη σίγηση του γονιδίου v-ATPaseA μέσω διαγονιδιακών φυτών *Nicotiana tabacum* που οδήγησε σε μείωση των μεταγράφων του γονιδίου στο έντομο και τελικά σε θνησιμότητα (Thakur et al., 2014).

ΣΚΟΠΟΣ

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας είναι να διερευνήσουμε τη δυνατότητα παρεμπόδισης της ικανότητας του αλευρώδη και του τετράνυχου να αποτοξικοποιούν εντομοκτόνα και φυτοτοξίνες, αναστέλλοντας την ανθεκτικότητά τους στα εντομοκτόνα ή την ανάπτυξή τους σε συγκεκριμένα φυτά μέσω της απενεργοποίησης των οξειδασών τους. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε είναι η κατασκευή διαγονιδιακών φυτών που παράγουν dsRNA για το γονίδιο CPR του αλευρώδη και του τετράνυχου, ώστε μέσω της σίγησης αυτού του γονιδίου να μπλοκαριστεί το μεταβολικό μονοπάτι των P450s που ευθύνεται για την ανθεκτικότητα τους.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΩΝ ΦΥΤΩΝ

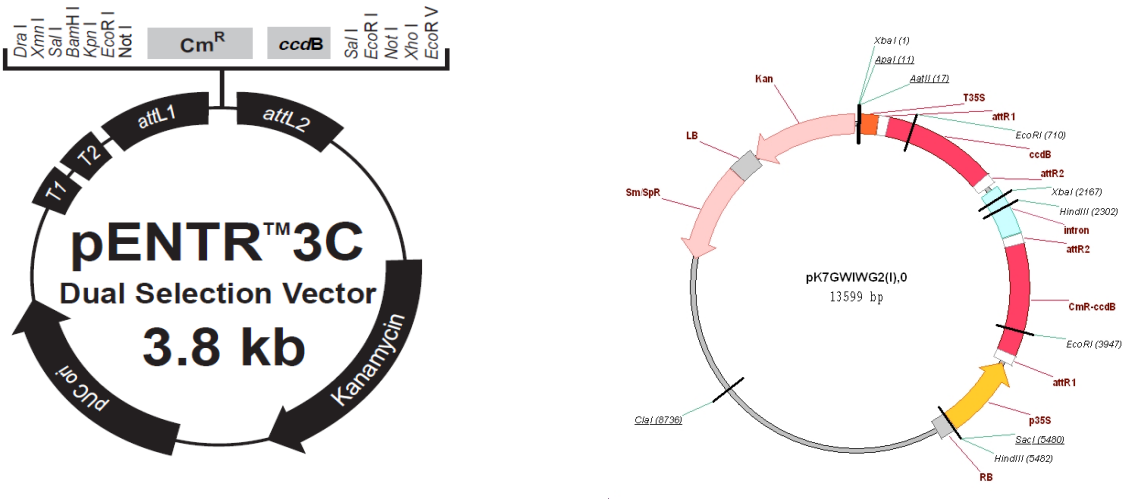
Στο συγκεκριμένο κεφάλαιο: α) περιγράφεται η διαδικασία κατασκευής διαγονιδιακών φυτών τομάτας που παράγουν dsRNA για ένα τμήμα του γονιδίου GFP (hairpin mGFP4) και β) παρουσιάζεται ο έλεγχος για την ενσωμάτωση των ενθέσεων της CPR του αλευρώδη και του τετράνυχου σε διαγονιδιακά φυτά τομάτας.

1.1 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Επιλογή γονιδίου – Κατασκευή cDNA - Πλασμιδιακές κατασκευές

Η αλληλουχία που χρησιμοποιήθηκε είναι ένα τμήμα του γονιδίου GFP (green fluorescent protein) μήκους 743 bp (GenBank: U87624.1). Από αυτό επιλέχθηκε κομμάτι μήκους 429 bp για την παραγωγή dsRNA (Παράρτημα).

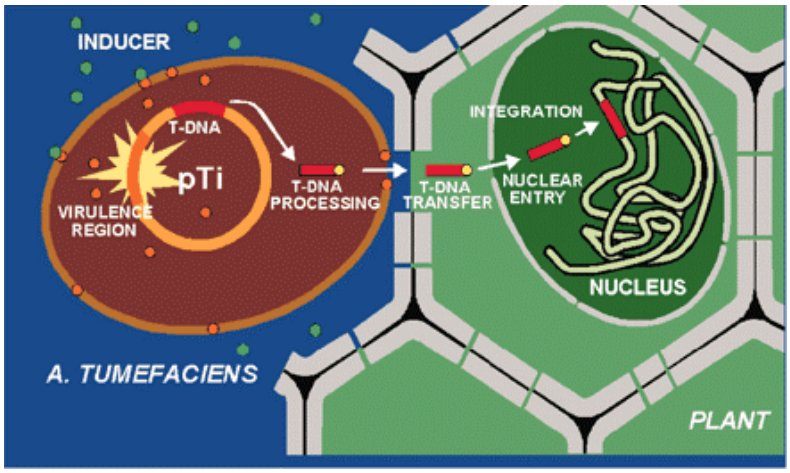
Χρησιμοποιήθηκαν δυαδικοί φορείς στους οποίους κλωνοποιήθηκε η επιλεγμένη αλληλουχία για την ενσωμάτωσή της στο φυτικό γονιδίωμα και την έκφρασή της από τους κυτταρικούς μηχανισμούς του φυτού. Η έκφραση ρυθμίζεται από τον υποκινητή p35S. Οι δυαδικοί φορείς που επιλέχτηκαν ήταν ο pENTR3C και ο pK7GWIWG2(I),0 (Εικ.10).



Εικόνα 10: Δυαδικοί φορείς για τη δημιουργία πλασμιδιακών κατασκευών που παράγουν dsRNA. Αριστερά: pENTR3C Δεξιά: pK7GWIWG2(I),0

Με τη χρήση αυτών των πλασμιδιακών κατασκευών μετασχηματίστηκαν αγροβακτήρια τα οποία φέρουν το πλασμίδιο Ti. Το πλασμίδιο Ti δεν μεταφέρεται

ολόκληρο στα φυτικά κύτταρα αλλά μόνο μια περιοχή του (μήκους περίπου 20 kb), που ονομάζεται T-DNA (Transfer DNA). Η επιτυχής μεταφορά του T-DNA εξασφαλίζεται από την παρουσία δύο συνοριακών αλληλουχιών που περιέχει. Η περιοχή αυτή είναι υπεύθυνη για την δημιουργία κορονωτού κάλλου. Επομένως το πλασμίδιο Ti μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μεταφορά και έκφραση ξένων γονιδίων σε φυτικά κύτταρα (Εικ.11).



Εικόνα 11: Μεταφορά του T-DNA από το αγροβακτήριο στον πυρήνα του φυτικού κυττάρου (Valentine, 2003)

Για την κλωνοποίηση του κομματιού του mGFP4 στο φορέα pENTR3C σχεδιάστηκαν εκκινητές για τμήμα μεγέθους 429 βάσεων. Στα άκρα των εκκινητών προστέθηκαν αλληλουχίες αναγνώρισης περιοριστικών ενζύμων, των ίδιων περιοριστικών ενζύμων με τα οποία θα κόψουμε και το πλασμίδιο φορέα. Στον forward εκκινητή mGFP4 προστέθηκε αλληλουχία αναγνώρισης του ενζύμου BamHI ενώ στον reverse του XhoI. Επίσης και στους δυο primers προστέθηκε στο 5΄ άκρο, πριν από την αλληλουχία των περιοριστικών ενζύμων, μια αλληλουχία τριών τυχαίων νουκλεοτιδίων (gga) ώστε να μπορούν να προσδεθούν τα περιοριστικά ένζυμα (Πίνακας 1).

Πίνακας 1: Αλληλουχίες εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση τμήματος του γονιδίου mGFP4

Forward primer	GGAGGATCCCAACATACGGAAAACTTACCCT
Reverse primer	GGACTCGAGCTGCTAGTTGAACGCTTCCA

Για την ενίσχυση της ένθεσης mGFP4 χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα cDNA το οποίο συνθέσαμε από ολικό RNA διαγονιδιακού καπνού *Nicotiana benthamiana* που περιείχε το γονίδιο mGFP4 των 743bp.

Σύνθεση cDNA

Έγινε σύνθεση cDNA με το kit SuperScript III της Invitrogen χρησιμοποιώντας ως εκκινητή oligo-dT_{20}. Ως υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε 1,5μg RNA. Προστέθηκαν 1μl oligodT_{20} και H_2O μέχρι τελικού όγκου 11μl. Ακολούθησε επώαση στους 65°C για 10min και 1min στον πάγο. Στη συνέχεια προστέθηκαν τα παρακάτω αντιδραστήρια:

5X FSB	4μl
0,1M DTT	2μl
10mM DNPs	1μl
RNase OUT	1μl

Ακολούθησε επώαση στους 50°C για 2min. Προστέθηκε 1μl (200u) SuperScript III και ακολούθησε επώαση στους 50°C για 50min και στη συνέχεια 70°C για 15min.

Ενίσχυση της ένθεσης mGFP4

Στη συνέχεια με υπόστρωμα το cDNA που κατασκευάστηκε έγινε ενίσχυση της ένθεσης mGFP4 των 429bp. Η πολυμεράση που χρησιμοποιήθηκε ήταν η KapaTaq DNA Polymerase της εταιρείας Kapa Biosystems. Οι συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν στην αντίδραση PCR είναι: 10ng cDNA, 1x

buffer with Mg^{2+}, 0,4mM dNTPs, 0,4μM forward primer, 0,4μM reverse primer, 0,6 units KapaTaq Polymerase. Οι συνθήκες της αντίδρασης ήταν στους 95°C για 2min, στη συνέχεια για 35 κύκλους 95°C για 30sec, 56°C για 30sec, 72°C για 1min και ακολούθησαν 72°C για 2min. Το προϊόν της αντίδρασης αναλύθηκε σε πηκτή αγαρόζης 1,2% και στη συνέχεια η ζώνη του προϊόντος κόπηκε ώστε να καθαριστεί με το NucleoSpin Extract II της εταιρίας Macherey-Nagel. Η επαναδιάλυση έγινε σε 30 ul ddH_2O.

Ακολούθησε κλωνοποίηση του προϊόντος της PCR στους δυαδικούς φορείς.

Πέψη του φορέα pENTR3C και του προϊόντος mGFP4

Το προϊόν της PCR mGFP4 χρησιμοποιήθηκε για πέψη με τα ένζυμα BamHI και XhoI της Minotech ενώ παράλληλα με τα ίδια ένζυμα έγινε πέψη του φορέα pENTR3C. Οι αντιδράσεις που πραγματοποιήθηκαν δίνονται στους πίνακες 2 και 3.

Πίνακας 2: Πέψη της ένθεσης mGFP4 με τα περιοριστικά ένζυμα BamHI και XhoI

Αντιδραστήριο	Ποσότητα
mGFP4	3 μg
10x buffer	1x
XhoI	3 units
BamHI	3 units
ddH_2O	Up to 100 ul

Πίνακας 3: Πέψη του φορέα pENTR3C με τα περιοριστικά ένζυμα BamHI και XhoI

Αντιδραστήριο	Ποσότητα
pENTR3C	4 μg
10x buffer	1x
XhoI	4 units
BamHI	4 units
ddH_2O	Up to 100 ul

Τα προϊόντα των παραπάνω πέψεων αναλύθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 1,2 %. Ακολούθησε το κόψιμο των επιθυμητών ζωνών και καθαρισμός τους με το NucleoSpin Extract II της εταιρίας Macherey-Nagel. Η επαναδιάλυση έγινε στα 30 ul ddH_20.

Αντίδραση ενοποίησης του φορέα pENTR3C με την ένθεση mGFP4

Τα προϊόντα που πήραμε μετά τις πέψεις και τον καθαρισμό χρησιμοποιήθηκαν μαζί σε αντίδραση λιγάσης η οποία δίνεται στον πίνακα 4 παρακάτω.

Πίνακας 4: Αντίδραση λιγάσης του φορέα pENTR3C με την ένθεση mGFP4

Αντιδραστήριο	Ποσότητα
pENTR3C	50 ng
mGFP4	~30 ng
2x ligase buffer	1x
T4 DNA ligase	3 units
ddH_2O	Up to 15 ul

Μετασχηματισμός επιδεκτικών κυττάρων stellar με το προϊόν pENTR3C-mGFP4

Από την αντίδραση λιγάσης χρησιμοποιήθηκαν 10ul για το μετασχηματισμό βακτηριακών κυττάρων stellar (Clontech). Το πρωτόκολλο που ακολουθήσαμε ήταν:

- Σε 100ul κύτταρα stellar προστίθενται 10ul από την αντίδραση λιγάσης και επωάζονται στον πάγο για 30min
- Ακολουθεί heat shock βάζοντας τα κύτταρα στους 42^oC για 1min και αμέσως στον πάγο για 2min
- Προστίθεται LB medium μέχρι το 1ml και επωάζουμε στους 37^oC με ταυτόχρονη ανάδευση για 1h
- Σε τρυβλίο με LB medium και 50mg/lt kanamycin στρώνουμε 100ul από τα κύτταρα
- Ακολούθησε επώαση για 16h στους 37^oC

Οι αποικίες που αναπτύχθηκαν ελέγχθηκαν με colony PCR. Οι συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων είναι: 1X buffer with Mg^{2+},0,4mM dNTPs, 0,4μM forward primer, 0,4μM reverse primer, 1 unit KapaTaq Polymerase, ως υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκαν 10μl νερού στο οποίο είχε βυθιστεί ένα tip με βακτήρια της κάθε αποικίας αντίστοιχα. Οι συνθήκες της αντίδρασης ήταν οι εξής: 95^0C for 2 min, στη συνέχεια για 25 κύκλους 94 ^{o}C για 30 sec, 49 ^{o}C για 30 sec, 72 oC για 2min και ακολούθησαν 72 ^{o}C για 5 min. Τα προϊόντα της αντίδρασης αναλύθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 1,2 %.

Από τις θετικές αποικίες έγινε απομόνωση πλασμιδίου με το kit QIAprep Spin Miniprep της εταιρίας Qiagen.

Μεταφορά της ένθεσης από το φορέα pENTR3C στον pK7GWIWG2(I),0

Η μεταφορά της ένθεσης από τον pENTR3C στον pK7GWIWG2(I),0 έγινε με το kit Gateway LR Clonase II Enzyme Mix της Invitrogen που βασίζεται στην ιδιότητα ανασυνδυασμού του βακτηριοφάγου λ. Έτσι, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, αρχικά η ένθεση κλωνοποιήθηκε στο φορέα δότη pENTR3C με τα ένζυμα BamHI και XhoI ανάμεσα στις θέσεις attL1 και attL2 για να πραγματοποιηθεί ο ανασυνδυασμός. Σαν φορέας δέκτης με θέσεις attR1 και attR2 επιλέχθηκε ο pK7GWIWG2(I) (Karimi et al. 2002) (βλ. εικόνα 5). Ακολούθησε μετασχηματισμός επιδεκτικών κυττάρων stellar και οι θετικές αποικίες ελέγχθηκαν με περιοριστική κοπή του πλασμιδίου με XhoI. Επίσης, από τις θετικές αποικίες έγινε απομόνωση πλασμιδίου με το kit QIAprep Spin Miniprep της εταιρίας Qiagen και στάλθηκε για αλληλούχιση στην εταιρία Macrogen.

Μετασχηματισμός αγροβακτηρίων

Χρησιμοποιώντας την πλασμιδιακή κατασκευή pk7-hairpin mGFP4 μετασχηματίστηκαν αγροβακτήρια στελέχους LBA4404 σύμφωνα με το παρακάτω πρωτόκολλο:

- Αρχικά ξεπαγώνουμε τα κύτταρα στον πάγο.

- Στη συνέχεια προσθέτουμε 5μg πλασμιδίου και τα παγώνουμε αμέσως σε υγρό άζωτο
- Επωάζουμε για 30min στους 37°C
- Προσθέτουμε 1ml θρεπτικού LB και επωάζουμε για 2h στους 28°C με ταυτόχρονη ανάδευση
- Φυγοκεντρούμε τα αγροβακτήρια και τα επαναδυαλύουμε σε 100μl LB
- Τα στρώνουμε σε στερεό θρεπτικό LB με αντιβιοτικά rifampicin 100 μg/ml και spectinomycin 100μg/ml
- Επώαση στους 28°C για 24 έως 48 ώρες

Με την ίδια μεθοδολογία που αναλύθηκε παραπάνω έγιναν οι πλασμιδιακές κατασκευές για τμήμα του γονιδίου CPR του *B.tabaci* και *T.urticae* στον φορέα pK7GWIWG2(I),0, pk7*Bt*CPR και pk7*Tu*CPR (Πτυχιακή εργασία Μαρίας Σαματά, «Προς την δημιουργία διαγονιδιακών φυτών ανθεκτικών στα αγροτικά παράσιτα *Tetranychus urticae* και *Bemisia tabaci* μέσω RNAi», 2012).

Κατασκευή διαγονιδιακών φυτών

Πραγματοποιήθηκε κατασκευή διαγονιδιακών φυτών τομάτας ποικιλίας Red Setter που εκφράζει τμήμα του γονιδίου mGFP4 σε φορέα pK7GWIWG2(I),0. Η μέθοδος που ακολουθήσαμε είναι ο μετασχηματισμός κοτυληδόνων μέσω τροποποιημένων αγροβακτηρίων LBA4404. Το πρωτόκολλο που ακολουθήσαμε είναι το εξής:

- Καλλιέργεια μετασχηματισμένων αγροβακτηρίων επωάζεται σε θρεπτικό AB παρουσία των αντιβιοτικών rifampicin (500mg/lt) και streptomycin (500mg/lt) στους 28°C υπό ανάδευση για 24-48 ώρες περίπου
- Όταν η οπτική απορρόφηση στα 600nm είναι 0,6-1 η καλλιέργεια φυγοκεντρείται και επαναδιαλύεται σε θρεπτικό MSO

Σε αποστειρωμένη εστία:

- Σε τριβλίο με υγρό θρεπτικό MSO τοποθετούνται οι κοτυληδόνες οι οποίες προηγουμένως έχουν εκβλαστήσει από σπόρους που τοποθετήθηκαν σε θρεπτικό TRI1
- Οι κοτυληδόνες κόβονται με αποστειρωμένο νυστέρι σε μικρά τμήματα και «τραυματίζονται» με την άκρη του νυστεριού
- Επωάζονται για 10 λεπτά με την καλλιέργεια αγροβακτηρίου
- Τοποθετούνται σε τριβλία με θρεπτικό GCF10 το οποίο περιέχει 375uM ακετοσυριγκόνη
- Μεταφέρονται για 2 μέρες στο σκοτάδι σε θάλαμο ανάπτυξης στους 24-26°C
- Μετά από τις 2 μέρες μεταφέρονται σε θρεπτικά GCF10 που περιέχουν αντιβιοτικά επιλογής carbenicillin 500mg/lt και kanamycin 50μg/lt για την επιλογή των μετασχηματισμένων φυτών
- Σαν θετικό control λειτουργούν μη μετασχηματισμένες κοτυληδόνες σε GCF10 θρεπτικό χωρίς αντιβιοτικά
- Σαν αρνητικό control λειτουργούν μη μετασχηματισμένες κοτυληδόνες σε GCF10 θρεπτικό με αντιβιοτικά
- Οι κοτυληδόνες μεταφέρονται σε φρέσκο θρεπτικό ανά 7 μέρες μέχρι να επέλθει καλλογένεση μετά από περίπου 3-4 εβδομάδες οπότε και μεταφέρονται σε μεγαλύτερα δοχεία για να αναπτυχθεί βλαστός.
- Μόλις αναπτυχθεί βλαστός (περίπου 5 εβδομάδες μετά το μετασχηματισμό των φυλλικών δίσκων) το φυτάριο μεταφέρεται σε θρεπτικό GCF11
- Όταν σχηματιστεί καλά το αναγεννημένο φυτάριο, ο βλαστός κόβεται και μεταφέρεται σε θρεπτικό TRI2 (carbenicillin 250mg/lt και kanamycin 25mg/lt)
- Μόλις αναπτυχθούν ρίζες το φυτό μεταφέρεται σε χώμα στο θερμοκήπιο

Με την ίδια μεθοδολογία κατασκευάστηκαν δύο στελέχη διαγονιδιακών φυτών τομάτας Red Setter, ένα που εκφράζει dsRNA για τη CPR του αλευρώδη (hp*Bt*CPR) και ένα για τη CPR του τετράνυχου (hp*Tu*CPR) (σε συνεργασία με Νικολέτα Κρυοβρυσανάκη, Caterina D'Ambrosio)

Απομόνωση γενωμικού DNA από φυτικό ιστό - Έλεγχος ενσωμάτωσης της ένθεσης στο φυτικό γονιδίωμα με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

Τα διαγονιδιακά φυτά τομάτας hp*Bt*CPR και hp*Tu*CPR μετά τη μεταφορά τους στο χώμα ελέγχθηκαν για την ενσωμάτωση της ένθεσης με PCR. Το γενωμικό DNA απομονώθηκε με kit και χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα για την PCR. Τα ζέυγη των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν δίνονται στον πίνακα 5. Τα τμήματα των γονιδίων που ενισχύουν είναι 314bp για την *Bt*CPR και 214bp για την *Tu*CPR. Η πολυμεράση που χρησιμοποιήθηκε ήταν η Taq polymerase από την Finnzymes. Οι συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων ήταν: 1x polymerase buffer, 200uM dNTPs, 200nM forward primer, 200nM reverse primer, 0,5 units Taq polymerase και 60ng γενωμικό DNA. Οι συνθήκες των αντιδράσεων ήταν: 94°C για 2min, 94°C για 20sec, 52°C για 30sec, 72°C για 30sec και ακολούθησαν 72°C για 30sec. Τα προϊόντα των αντιδράσεων αναλύθηκαν σε 1,5% πήκτωμα αγαρόζης.

Πίνακας 5: : Αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των κομματιών *Tu*CPR και *Bt*CPR

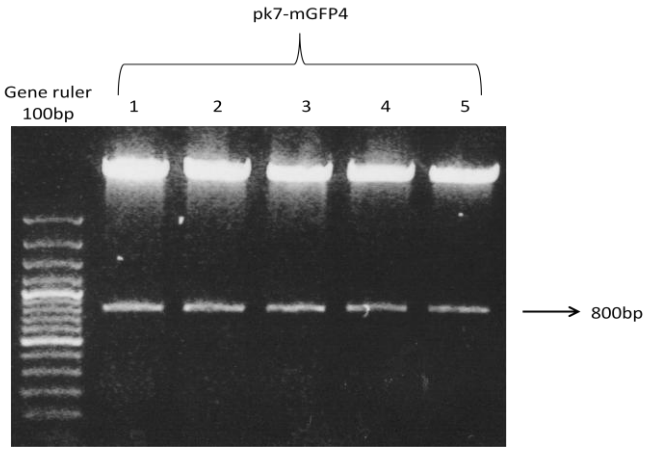
***Tu*CPR**	**Forward**	GGGATCCTTATGCAGCTTTCTCTCGT
	Reverse	GCTCGAGCTTGACTTGTTTTGCCACT
***Bt*CPR**	**Forward**	TCGAATTCCTCAGAAGCGTTGTACACAC
	Reverse	CTCTCGAGGAGTATGCCACGGATCCAAA

1.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Πλασμιδιακές κατασκευές

Για τη γενετική τροποποίηση των φυτών τομάτας που θα έχουν το ρόλο του μάρτυρα απαραίτητη ήταν η δημιουργία πλασμιδιακής κατασκευής που οδηγεί στην παραγωγή dsRNA του γονιδίου mGFP4 στο φυτικό κύτταρο. Το τμήμα του γονιδίου mGFP4 κλωνοποιήθηκε αρχικά στο φορέα pENTR3C. Στη συνέχεια το ένθεμα κλωνοποιήθηκε στο φορέα pK7GWIWG2(I). Στον φορέα αυτό τα γραμμικά τμήματα DNA εισάγονται δύο φορές με αντίθετη πάντα φορά. Έτσι, εκφράζεται μετάγραφο με εσωτερική συμπληρωματικότητα που διπλώνει σε δομή φουρκέτας (hairpin). Η επιτυχία της κλωνοποίησης του ενθέματος στο φορέα ελέγχθηκε αρχικά με

περιοριστική κοπή του φορέα με το ένζυμο XhoI που και είχε σχεδιαστεί να υπάρχει στον Forward εκκινητή του ενθέματος, 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 (Εικόνα 12).

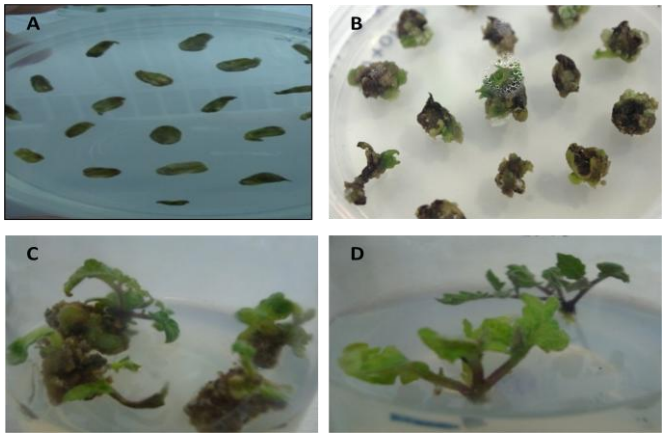


Εικόνα 12: Αναγνωριστική πέψη πέντε αποικιών pk7 – mGFP4 με το ένζυμο XhoI

Παρατηρούμε στην εικόνα 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. Εκτός από την επαλήθευση με το XhoI η αλληλουχία του ενθέματος που κλωνοποιήθηκε επαληθεύτηκε και με αλληλούχιση (Macrogen).

Κατασκευή διαγονιδιακών φυτών

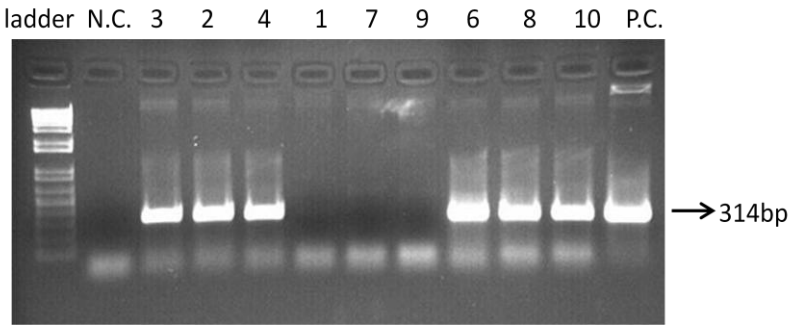
Για να χρησιμοποιηθούν διαγονιδιακά φυτά ως control για τα περαιτέρω πειράματα κατασκευάστηκαν διαγονιδιακά φυτά τομάτας που εκφράζουν dsRNA για ένα τμήμα του γονιδίου mGFP4. Στην εικόνα 13 παρουσιάζονται κάποια από τα στάδια ανάπτυξης του διαγονιδιακού φυτού.

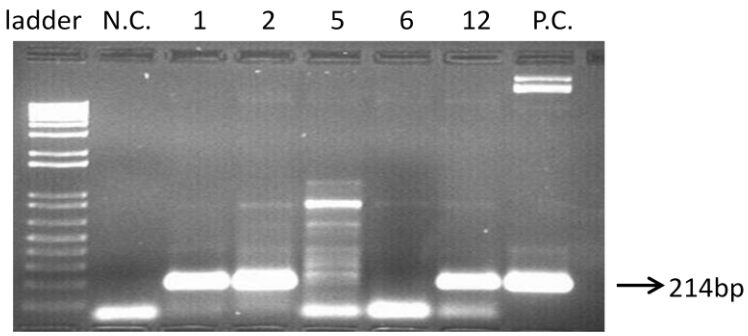


Εικόνα 13: Στάδια ανάπτυξης διαγονιδιακού φυτού. A) Κοτυληδόνες τομάτας μετά το μετασχηματισμό με αγροβακτήριο. B) Κάλλοι που προέκυψαν από μετασχηματισμένες κοτυληδόνες. C) Ανάπτυξη βλαστικού τμήματος. D) Αναγεννημένα φυτάρια σε θρεπτικό μέσο ριζοβολίας

Τα διαγονιδιακά φυτά τομάτας hpmGFP4 όταν μεταφερθούν στο χώμα θα ελεγχθούν με PCR για την ενσωμάτωση της ένθεσης. Θα γίνει απομόνωση γενωμικού DNA και με το ζεύγος εκκινητών που δίνονται στον πίνακα 1 θα ταυτοποιηθεί αν έχουν μετασχηματιστεί (πείραμα σε εξέλιξη).

Τα δύο στελέχη διαγονιδιακών φυτών τομάτας hp*Bt*CPR και hp*Tu*CPR όταν μεταφέρθηκαν στο χώμα ελέχθηκε η ενσωμάτωση της ένθεσης στο γονιδίωμα τους με PCR. Στην εικόνα 14 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ανάλυσης των προϊόντων σε 1,5% gel αγαρόζης. Οι αναμενόμενες ζώνες των μετασχηματισμένων φυτών είναι 314bp για τα φυτά hp*Bt*CPR και 214bp για τα φυτά hp*Tu*CPR.

A.


B. 

Εικόνα 14: Έλεγχος ενσωμάτωσης της ένθεσης στο φυτικό γονιδίωμα. Α) 3-10: T_0 διαγονιδιακές σειρές φυτών τομάτας hp*Bt*CPR, θετικές οι σειρές που εμφανίζουν ζώνη στα 314bp. Β) 1-12: T_0 διαγονιδιακές σειρές φυτών τομάτας hp*Tu*CPR, θετικές οι σειρές που εμφανίζουν ζώνη στα 214bp. N.C: αρνητικό control, P.C: θετικό control

1.3 ΣΥΝΟΨΗ

Ένας από τους τρόπους χορήγησης των δίκλωνων RNAs στον αλευρώδη και τον τετράνυχο είναι μέσω διατροφής με διαγονιδιακά φυτά. Για τον λόγο αυτό κατασκευάστηκαν διαγονιδιακά φυτά τομάτας που στοχεύουν το γονίδιο της CPR των δύο παρασίτων. Μετά τη μεταφορά τους στο χώμα τα φυτά T_0 γενιάς ελέγχθηκαν με PCR για την ενσωμάτωση της ένθεσης. Όπως φαίνεται στην εικόνα 8 έχουν ταυτοποιηθεί οι θετικές σειρές των φυτών T_0 που έχουν την ένθεση στο γονιδίωμα τους. Επόμενο βήμα είναι να ελεγχθεί η παραγωγή των μικρών δίκλωνων RNAs που σχηματίζονται από το μηχανισμό σίγησης των φυτών, καθώς είναι αυτά που θα επάγουν τη σίγηση του γονιδίου στον αλευρώδη και τον τετράνυχο (Κεφάλαιο 2).

Απαραίτητο βήμα στο να αξιολογηθεί ότι η σίγηση του γονιδίου CPR οφείλεται εξειδικευμένα στα δίκλωνα RNAs που παράγουν τα φυτά είναι να υπάρχουν και φυτά που θα δράσουν σαν μάρτυρες και θα παράγουν δίκλωνα RNAs για ένα γονίδιο που δεν αποτελεί ενδογενή στόχο ούτε στο φυτό ούτε στα συγκεκριμένα παράσιτα. Για το λόγο αυτό, επιλέχθηκε ένα τμήμα του γονιδίου GFP και κατασκευάστηκε πλασμιδιακός φορέας που περιέχει αυτό το τμήμα δύο φορές ώστε να εκφράζεται μετάγραφο – hairpin. Με αυτή την πλασμιδιακή κατασκευή έγινε μετασχηματισμός κοτυληδόνων για να δημιουργηθούν φυτά τομάτας που εκφράζουν dsRNA για το γονίδιο mGFP4. Τα φυτά αυτά θα πρέπει επίσης να ελεγχθούν για την ενσωμάτωση της ένθεσης και την παραγωγή των μικρών δίκλωνων RNAs.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ dsRNAs ΣΤΑ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΑ ΦΥΤΑ

Στο συγκεκριμένο κεφάλαιο περιγράφεται η διαδικασία που ακολουθήσαμε για τον έλεγχο της έκφρασης των μικρών δίκλωνων RNAs σε διαγονιδιακά φυτά καπνού και τομάτας.

2.1 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Τα φυτά που ελέγχθηκαν ήταν διαγονιδιακά φυτά τομάτας που εκφράζουν dsRNA για τμήμα του γονιδίου CPR του αλευρώδη και του τετράνυχου, hp*Bt*CPR και hp*Tu*CPR αντίστοιχα (Κεφάλαιο 1). Επίσης, η ανάλυση για τα μικρά δίκλωνα RNAs έγινε και σε διαγονιδιακά φυτά καπνού *Nicotiana tabacum* μετασχηματισμένα ώστε να εκφράζουν dsRNA για το γονίδιο CPR του αλευρώδη (Μεταπτυχιακή εργασία Σιώζιου Ελένης, «Ανάπτυξη μεθόδων καταπολέμησης εχθρών των καλλιεργειών με RNA σίγηση (πειράματα με αλευρώδη και σίγηση μονοπατιού για αποτοξικοποίηση)», 2013.)

Όλα τα φυτά που μελετήθηκαν ήταν T_1 γενιάς και νεαρά σε ηλικία. Έγινε εξαγωγή ολικού RNA από τα φύλλα των φυτών και στη συνέχεια με αποτύπωση κατά Northern ελέγθηκε η παραγωγή των μικρών δίκλωνων RNAs.

Οι διαγονιδιακές σειρές που αναλύθηκαν ήταν:

- Για τα διαγονιδιακά φυτά τομάτας hp*Bt*CPR οι σειρές: hp*Bt*CPR3.2, hp*Bt*CPR3.4, hp*Bt*CPR3.7, hp*Bt*CPR3.8, hp*Bt*CPR3.12, hp*Bt*CPR3.16
- Για τα διαγονιδιακά φυτά τομάτας hp*Tu*CPR οι σειρές: hp*Tu*CPR1.4, hp*Tu*CPR1.5, hp*Tu*CPR1.6, hp*Tu*CPR1.9, hp*Tu*CPR1.10, hp*Tu*CPR1.11, hp*Tu*CPR1.12
- Για τα διαγονιδιακά φυτά καπνού hp*Bt*CPR οι σειρές: hp*Bt*CPR1, hp*Bt*CPR2, hp*Bt*CPR3, hp*Bt*CPR4, hp*Bt*CPR5, hp*Bt*CPR6, hp*Bt*CPR7, hp*Bt*CPR8, hp*Bt*CPR9, hp*Bt*CPR10, hp*Bt*CPR12, hp*Bt*CPR13, hp*Bt*CPR17, hp*Bt*CPR21

Εξαγωγή ολικού RNA από φυτικό ιστό

Συλλέχθηκαν φύλλα νεαρά σε ηλικία και στη συνέχεια:

- Λειοτριβούνται και ζυγίζονται 100mg φυτικού ιστού παρουσία υγρού αζώτου
- Προστίθεται 1ml TRI Reagent (Sigma)
- Ισχυρή ανάδευση και επώαση για 10min σε θερμοκρασία δωματίου
- Φυγοκέντρηση στις 12000 στροφές για 10min σε θερμοκρασία δωματίου
- Το υπερκείμενο μεταφέρεται και προστίθενται 150ul χλωροφόρμιο
- Ισχυρή ανάδευση και επώαση για 10min σε θερμοκρασία δωματίου
- Φυγοκέντρηση στις 12000 στροφές για 10min σε θερμοκρασία δωματίου
- Το υπερκείμενο μεταφέρεται και προστίθενται 500ul ισοπροπανόλη
- Ισχυρή ανάδευση και επώαση για 1h στους -80°C
- Φυγοκέντρηση στις 12000 στροφές για 15min στους 4°C
- Το υπερκείμενο αφαιρείται και γίνεται 2 φορές έκπλυση της πελλέτας με 70% αιθανόλη
- Απομάκρυνση υπερκείμενου και επαναδιάλυση σε 35ul ddH_2O

Στύπωμα κατά Northern για μικρά RNAs

Το στύπωμα κατά Northern χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση των μικρών RNAs στα δείγματα των φυτικών ιστών. Η διαδικασία που ακολουθήσαμε περιλαμβάνει τα παρακάτω βήματα.

Ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτικό gel ακρυλαμίδης

Σε αποδιατακτικό gel ακρυλαμίδης (acrylamide 15% 38:2, Urea 7M, TBE 1x) διαχωρίζονται 50ng ολικού RNA. Η ηλεκτροφόρηση γίνεται στα 40mA σε διάλυμα TBE 1x. Στη συνέχεια το gel βάφεται με βρωμιούχο αιθίδιο και φωτογραφίζεται υπό υπεριώδες φως για να ελεγχθεί αν τα δείγματα είναι ισοφορτωμένα. Γίνεται μεταφορά των RNAs σε μεμβράνη NYTRAN®N (Whatman) με μέγεθος πόρων 0,2μm μέσω του συστήματος Pierce Fast Semi-Dry Blotter (Thermoscientific) και τέλος μονιμοποίηση των RNAs στη μεμβράνη (crosslink) μετά από έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία.

Προϋβριδοποίηση της μεμβράνης

Το διάλυμα προϋβριδοποίησης (πίνακας 6) προθερμαίνεται στους 50°C. Η μεμβράνη με τα RNAs τοποθετείται σε ειδικό κύλινδρο, προστίθεται το διάλυμα προϋβριδοποίησης και ακολουθεί επώαση υπό περιστροφή για 1h στους 50°C.

Πίνακας 9: Σύσταση διαλύματος προϋβριδοποίησης

SSC	5x
SDS	7%
Denhardt's (Invitrogen)	1x
Na_2HPO_4 pH 7.2	20mM

Σύνθεση ραδιενεργού DNA ανιχνευτή (probe) με τη μέθοδο random priming

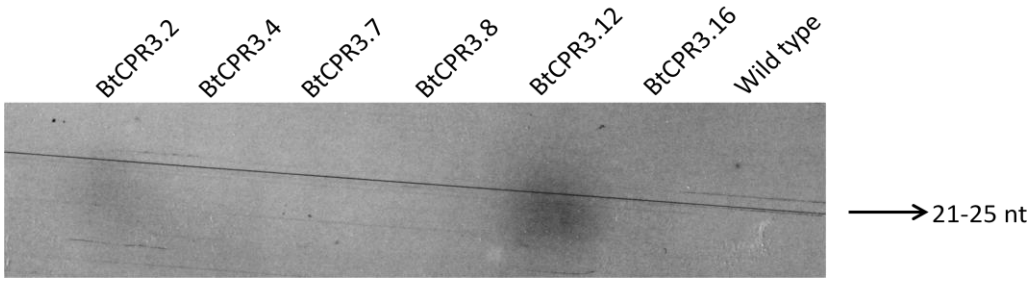
- DNA template 100ng παρουσία random primers (3μg) θερμαίνονται στους 95°C για 5min
- Επώαση στον πάγο για 5min
- Προσθήκη 10mM dTTP, 10mM dGTP, 10mM dATP, 1x random priming buffer (Invitrogen), 20 units Klenow (Invitrogen)
- Προσθήκη 10mM ραδιενεργού (α-^{32}P) dCTP
- Επώαση στους 37°C για 1h
- Καθαρισμός 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 προϋβριδοποίησης και επωάζεται με τη μεμβράνη στους 50°C υπό περιστροφή για τουλάχιστον 12h
- Έκπλυση της μεμβράνης με SDS 0,3%, SSC 2x για 30min (3 φορές)
- Έκθεση και εμφάνιση της μεμβράνης σε φιλμ

2.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Για την ύπαρξη των μικρών δίκλωνων RNAs που σχηματίζονται μέσω του μηχανισμού σίγησης των φυτών, παραγματοποιήθηκε η μέθοδος της αποτύπωσης κατά Nothern σε διαγονιδιακές σειρές φυτών τομάτας και καπνού. Όλα τα φυτά που μελετήθηκαν ήταν T_1 γενιάς και η εξαγωγή ολικού RNA έγινε από φυλλικό ιστό.

Διαγονιδιακά φυτά τομάτας hp*Bt*CPR

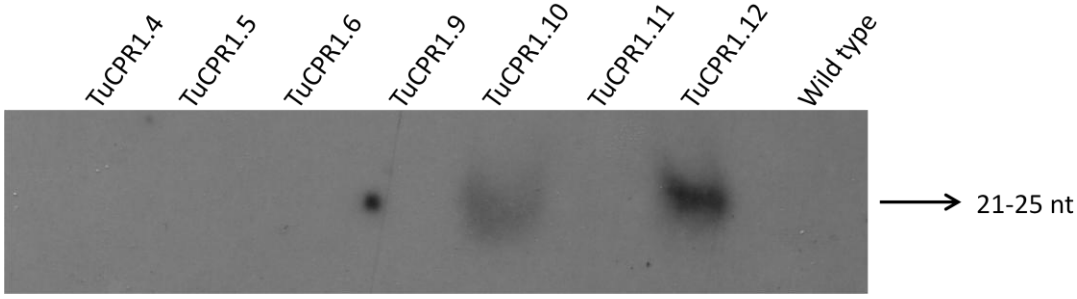
Ως DNA template για τη σύνθεση του ραδιενεργού DNA ανιχνευτή (probe) χρησιμοποιήθηκε το κομμάτι του γονιδίου CPR του αλευρώδη μήκους 314bp. Για τον έλεγχο της έκφρασης μικρών RNAs χρησιμοποιήθηκε ένα φυτό από κάθε διαγονιδιακή σειρά. Όπως παρουσιάζεται στην εικόνα 15 τα φυτά από τις διαγονιδιακές σειρές hp*Bt*CPR3.2 και hp*Bt*CPR3.12 φαίνεται να παράγουν τα μικρά dsRNAs.



Εικόνα 15: Northern blot για την ανίχνευση μικρών RNAs σε διαγονιδιακά φυτά τομάτας μετασχηματισμένα ώστε να εκφράζουν dsRNA για το γονίδιο CPR του αλευρώδη

Διαγονιδιακά φυτά τομάτας hp*Tu*CPR

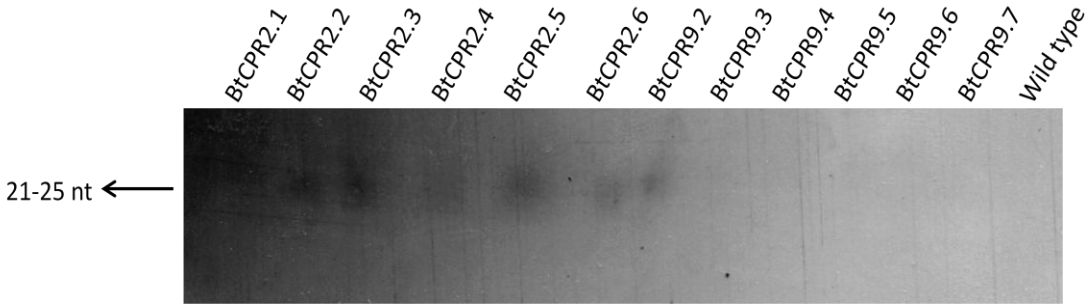
Για τη σύνθεση του ραδιενεργού probe χρησιμοποιήθηκε το κομμάτι του γονιδίου CPR του τετράνυχου μήκους 214bp. Για την ανίχνευση των μικρών δίκλωνων RNAs χρησιμοποιήθηκε ένα φυτό από κάθε γονιδιακή σειρά. Όπως παρουσιάζεται στην εικόνα 16 τα φυτά από τις διαγονιδιακές σειρές hp*Tu*CPR1.10 και hp*Tu*CPR1.12 παράγουν τα μικρά dsRNAs.



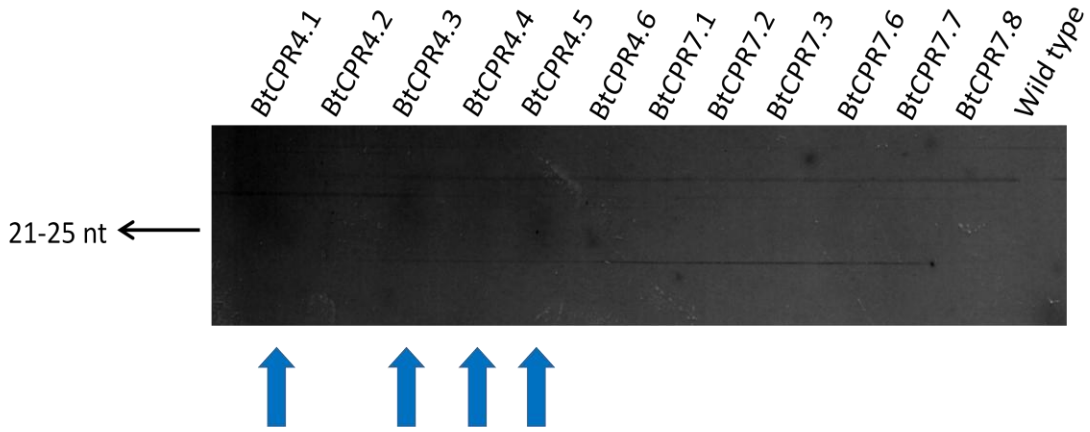
Εικόνα 16: Northern blot για την ανίχνευση μικρών RNAs σε διαγονιδιακά φυτά τομάτας μετασχηματισμένα ώστε να εκφράζουν dsRNA για το γονίδιο CPR του τετράνυχου

Διαγονιδιακά φυτά καπνού hp*Bt*CPR

Ως DNA template για τη σύνθεση του ραδιενεργού probe χρησιμοποιήθηκε το κομμάτι του γονιδίου CPR του αλευρώδη μήκους 314bp. Από κάθε γονιδιακή σειρά αναλύθηκαν 6 φυτά. Όπως φαίνεται παρακάτω, τα 6 φυτά της σειράς hp*Bt*CPR2 (2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6) και το ένα φυτό από τη σειρά hp*Bt*CPR9 (9.2) εκφράζουν τα μικρά δίκλωνα RNAs (Εικόνα 17), ομοίως και 4 φυτά της σειράς hp*Bt*CPR4 (4.1, 4.3, 4.4, 4.5) (Εικόνα 18). Οι αναλύσεις των υπόλοιπων γονιδιακών σειρών είναι σε εξέλιξη.



Εικόνα 17: Northern blot για την ανίχνευση μικρών RNAs σε διαγονιδιακά φυτά καπνού μετασχηματισμένα ώστε να εκφράζουν dsRNA για το γονίδιο CPR του αλευρώδη



Εικόνα 18: Northern blot για την ανίχνευση μικρών RNAs σε διαγονιδιακά φυτά καπνού μετασχηματισμένα ώστε να εκφράζουν dsRNA για το γονίδιο CPR του αλευρώδη

2.3 ΣΥΝΟΨΗ

Στο συγκεκριμένο κεφάλαιο παρουσιάστηκε η διαδικασία που ακολουθήσαμε για την ανάλυση των διαγονιδιακών σειρών φυτών καπνού και τομάτας ώστε να εξακριβώσουμε ποιες από αυτές εκφράζουν τα μικρά δίκλωνα RNAs. Χρησιμοποιήθηκαν φυτά T_1 γενιάς και έγινε εξαγωγή ολικού RNA από τα φύλλα. Στη συνέχεια στα δείγματα RNA έγινε στύπωμα κατά Northern με κατάλληλο DNA ανιχνευτή για τον εντοπισμό των μικρών δίκλωνων RNAs. Από τις 6 σειρές διαγονιδιακών φυτών τομάτας hp*Bt*CPR βρήκαμε 2 σειρές που εκφράζουν τα μικρά dsRNAs. Από τις 7 σειρές διαγονιδιακών φυτών τομάτας hp*Tu*CPR βρήκαμε επίσης 2 σειρές θετικές για τα μικρά dsRNAs. Επίσης, από τις 4 σειρές διαγονιδιακών φυτών καπνού hp*Bt*CPR βρήκαμε 3 σειρές που εκφράζουν τα μικρά dsRNAs.

Στα φυτά το αγγειακό σύστημα και ειδικότερα το φλοίωμα είναι υπεύθυνο για τη συστηματική μεταφορά των μικρών RNAs σε όλα τα όργανα του φυτού. Συγκεκριμένα στο φλοίωμα έχει βρεθεί μια πρωτεΐνη (phloem small-rna binding protein1, PSRBP1) η οποία συνδέεται με τα μικρά RNAs και το ριβονουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο που σχηματίζεται μεταφέρεται μέσω του αγγειακού συστήματος σε όλο το φυτό (Ham et al., 2014). Με δεδομένο ότι τόσο ο αλευρώδης όσο και ο τετράνυχος τρέφονται απομυζώντας φυτικούς χυμούς

(Campbell et al., 1994; Helle and Sabelis, 1985) αναμένουμε ότι η χορήγηση των μικρών dsRNAs μέσω των διαγονιδιακών φυτών θα είναι επιτυχής.

Επόμενο βήμα είναι να εξεταστεί αν αυτά τα μικρά RNAs που παράγονται από το μηχανισμό σίγησης του διαγονιδιακού φυτού είναι ικανά να καταστείλλουν το γονίδιο CPR όταν προσληφθούν από τα παράσιτα και τι αποτέλεσμα θα έχει η πιθανή καταστολή στην ανάπτυξη τους πάνω στα φυτά ή στην ανθεκτικότητα που έχουν δείξει σε συγκεκριμένα εντομοκτόνα.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η εφαρμογή της RNA σίγησης για την καταπολέμηση των επιβλαβών παρασίτων αποτελεί αντικείμενο σε πολλές πρόσφατες μελέτες. Οι Mao et al.(2007) και Baum et al. (2007) αναφέρουν ότι χορήγηση siRNA οδήγησε σε μειωμένη ανάπτυξη λαρβών, ακόμη και σε θάνατο. Παρόλο που ο μηχανισμός της σίγησης έχει μελετηθεί σε οργανισμούς μοντέλα (Huvenne and Smagghe, 2009), σε έντομα που αποτελούν αγροτικά παράσιτα δεν έχει μελετηθεί πλήρως.

Στην παρούσα εργασία στόχος ήταν η ανάπτυξη μεθόδων βασιζόμενων στην RNA σίγηση για την παρεμπόδιση των μηχανισμών αποτοξικοποίησης στα παράσιτα *Bemisia tabaci* και *Tetranychus urticae*. Αυτό έγινε με τη χρήση διαγονιδιακών φυτών τομάτας και καπνού μετασχηματισμένα ώστε να εκφράζουν dsRNA για το γονίδιο CPR των δύο παρασίτων. Στοχεύοντας το γονίδιο της CPR που είναι η μοναδική αναγωγάση για όλες τις πρωτεΐνες της οικογένειας των P450s, στόχος είναι να μπλοκαριστεί το μεταβολικό μονοπάτι των οξειδασών που ευθύνεται για την ανθεκτικότητα τους σε εντομοκτόνα και φυτοτοξίνες.

Αναλυτικότερα, μελετήθηκαν διαγονιδιακές σειρές φυτών τομάτας που εκφράζουν dsRNA για το γονίδιο CPR του αλευρώδη (hp*Bt*CPR) και του τετράνυχου (hp*Tu*CPR) και διαγονιδιακά φυτά καπνού για τη CPR του αλευρώδη (hp*Bt*CPR). Για τα φυτά τομάτας hp*Bt*CPR και hp*Tu*CPR βρέθηκαν 2 σειρές που εκφράζουν τα μικρά δίκλωνα RNAs CPR και για τα φυτά καπνού hp*Bt*CPR 3 θετικές σειρές. Για τις διαγονιδιακές σειρές που δεν εκφράζουν τα μικρά dsRNAs μπορούμε να υποθέσουμε ότι κατά τον μετασχηματισμό η ένθεση έχει ενσωματωθεί στο φυτικό γονιδίωμα σε θέση που δεν ενεργοποιείται η μεταγραφή, ίσως σε περιοχή ετεροχρωματίνης. Επίσης, κατασκευάστηκαν διαγονιδιακά φυτά τομάτας για να εκφράζουν dsRNA ενός τμήματος του γονιδίου GFP (mGFP4). Τα φυτά αυτά θα χρησιμοποιηθούν σαν μάρτυρες χορήγησης των δίκλωνων RNAs στα περαιτέρω πειράματα.

Η σίγηση γονιδίων στον τετράνυχο, μεταξύ των οποίων και η VATP-ase, έχει γίνει με επιτυχία χορηγώντας siRNA με φυλλικούς δίσκους (Kwon et al., 2013) και στον αλευρώδη έχουν σιγηθεί τέσσερα γονίδια μέσω τεχνητής δίαιτας (Upadhyay et al., 2011). Όμως, το πλεονέκτημα της χρήσης διαγονιδιακών φυτών για τη χορήγηση δίκλωνων RNAs είναι ότι τα φυτά εξασφαλίζουν τη συνεχή παραγωγή δίκλωνου

RNA, δομικά σταθερού και τη δυνατότητα διατροφής για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. . Η μέθοδος αυτή έχει ήδη εφαρμοστεί με επιτυχία σε ημίπτερα από τους Zha et al. το 2010 και από τους Pitino et al. το 2011.

Παρ'όλα αυτά οι προσπάθειες σίγησης γονιδίων των P450s οξειδασών μέσω διαγονιδιακών φυτών δεν είναι πολλές μέχρι τώρα και ο μηχανισμός δράσης τους δεν έχει κατανοηθεί πλήρως. Οι Mao et al. κατασκεύασαν φυτά καλαμποκιού, καπνού *Nicotiana tabaccum* και *Arabidopsis thaliana* ανθεκτικά στο λεπιδόπτερο *Helicoverpa armigera.* Τα φυτά αυτά εκφράζουν dsRNA για το γονίδιο της οξειδάσης CYPAE14 το οποίο έχει φανεί ότι συμβάλει στην αποτοξικοποίηση της φυτοτοξίνης gossypol με αποτέλεσμα τα έντομα να είναι ευάλωτα στην ουσία αυτή (Mao et al., 2007; Mao et al., 2011). Με τη χρήση όμως διαγονιδιακών φυτών που εκφράζουν dsRNA για τη CPR, τη μοναδική αναγωγάση των οξειδασών, θα μπορέσουμε να έχουμε μια παραπάνω πληροφορία για την ανάπτυξη των μηχανισμών αποτοξικοποίησης στα έντομα. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί χρησιμοποιώντας τα διαγονιδιακά φυτά CPR σαν εργαλεία – συνεργιστές για την εξακρίβωση της δράσης των P450s. Οι συνεργιστές είναι ουσίες που δρουν παρεμποδίζοντας ενζυμικά συστήματα αποτοξικοποίησης και τα φυτά που στοχεύουν τη CPR ώστε να μπλοκαριστούν οι μηχανισμοί αποτοξικοποίησης των P450s μπορούν κατά μία έννοια να δράσουν σαν συνεργιστές. Έτσι, βάζοντας ανθεκτικούς πληθυσμούς εντόμων να τραφούν στα διαγονιδιακά φυτά CPR και στη συνέχεια κάνοντας βιοδοκιμές με τα εντομοκτόνα στα οποία παρουσιάζουν ανθεκτικότητα θα μπορέσουμε να δούμε αν η πιθανή ευαισθησία που θα εμφανίσουν σε αυτά οφείλεται στην καταστολή των P450s.

Επιπλέον, η χρήση των διαγονιδιακών φυτών hpBtCPR μπορεί να προσθέσει μια επιπλέον πληροφορία για τη λειτουργία των P450s του αλευρώδη, καθώς το γονιδίωμα του δεν είναι ακόμη γνωστό.

Μακροπρόθεσμα, αν η σίγηση του γονιδίου της CPR είναι επιτυχής και το μονοπάτι των οξειδασών κατασταλεί με αποτέλεσμα την μείωση της ανθεκτικότητας σε εντομοκτόνα αλλά και σε φυτοτοξίνες, η μέθοδος αυτή θα μπορούσε να εφαρμοστεί για την αναστολή ανάπτυξης των παρασίτων στα φυτά αν και τα ερωτήματα που αφορούν οικολογικούς κινδύνους και πρέπει να απαντηθούν πριν καλλιεργηθεί ένα φυτό στον αγρό είναι πολλά.

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, τα μελλοντικά βήματα περιλαμβάνουν την ανάλυση περισσότερων διαγονιδιακών σειρών της T_1 γενιάς για την ύπαρξη των μικρών δίκλωνων RNAs. Από αυτές τις σειρές θα γίνει συλλογή σπόρων για τη μεταφύτευση της T_2 γενιάς στην οποία θα ελεγχθεί η ομοζυγωτία ή ετεροζυγωτία σχετικά με την ένθεση μέσω ανάλυσης κατά Southern.

Στα φυτά των ομοζύγωτων διαγονιδιακών σειρών θα τοποθετηθούν ενήλικα άτομα από ανθεκτικούς πληθυσμούς εντόμων και θα γίνει φαινοτυπική παρατήρηση της ωογέννησης και του βιολογικού κύκλου των νεαρών ατόμων. Στα πειράματα αυτά θα χρησιμοποιηθεί πληθυσμός αλευρώδη στον οποίο έχουν παρατηρηθεί υψηλά επίπεδα έκφρασης της οξειδάσης CYP6CM1 και έχει εντοπιστεί ανθεκτικότητα στο νεονικοτινοειδές imidacloprid (Διδακτορική διατριβή Ηλία Άρη, «Διερεύνηση των μηχανισμών ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα και της διασποράς των υπεύθυνων γονιδίων σε πληθυσμούς των *Bemisia tabaci* (αλευρώδη) και *Tetranychus urticae* (τετράνυχου)», 2014). Επιπλέον, θα εξεταστεί ανθεκτικό στέλεχος τετρανύχου στο οποίο έχει βρεθεί ότι λόγω αυξημένης έκφρασης της CYP392A16 είναι ικανό να μεταβολίσει το ακαρεοκτόνο abamectin (Riga et al., 2014).

Εφόσον τα άτομα από κάθε πληθυσμό τραφούν με τα διαγονιδιακά φυτά, θα πραγματοποιηθούν βιοδοκιμές με τα εντομοκτόνα στα οποία εμφανίζουν ανθεκτικότητα. Θα παρατηρηθεί η πιθανή εμφάνιση ευαισθησίας στα χημικά σκευάσματα και στη συνέχεια θα γίνει συλλογή των ακμαίων ατόμων στα οποία θα ελεγθούν τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου CPR με real time PCR. Επίσης μπορεί να γίνει εκτίμηση των επιπέδων έκφρασης της πρωτεϊνης CPR στα άτομα αυτά με western blot. Σκοπός είναι να διερευνήσουμε το ρόλο των οξειδασών P450s στην πιθανή εμφάνιση ευαισθησίας των πληθυσμών λόγω σίγησης του γονιδίου CPR.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Agrawal, N., Dasaradhi, PV., Mohmmed, A., Malhotra, P., Bhatnagar, RK., and Mukherjee SK. (2003). RNA Interference: Biology, Mechanism, and Applications. Microbiology and Molecular Biology reviews *67*, 657–685.

Alon, M., Alon, F., Nauen, R., and Morin, S. (2008). Organophosphates' resistance in the B-biotype of Bemisia tabaci (Hemiptera: Aleyrodidae) is associated with a point mutation in an ace1-type acetylcholinesterase and overexpression of carboxylesterase. Insect Biochemistry and Molecular Biology *38*, 940-949.

Arnó, J., Gabarra, R., Liu, T.-X., Simmons, A., and Gerling, D. (2010). Natural Enemies of Bemisia tabaci: Predators and Parasitoids. In Bemisia: Bionomics and Management of a Global Pest, P.A. Stansly, and S.E. Naranjo, eds. (Springer Netherlands), pp. 385-421.

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*, 1322-6.

Berge, JB., Feyereisen, R., Amichot, M., (1998). Cytochrome P450 monooxygenases and insecticide resistance in insects. Philosophical Transactions of The Royal Society *353*, 1701-1705. London.

Buckingham, S.D., and Sattelle, D.B. (2010). GABAreceptors of insects. In Insect Pharmacology: Channels, Receptors, Toxins and Enzymes, ed. LI Gilbert, SS Gill, pp. 29–64. London: Academic.

Byrne, D.N. and Bellows, T.S. (1991). Whitefly biology. Annual Review of Entomology *36*, 431-457.

Campbell, B.C., Steffen-Campbell, J.D., and Gill, R.J. (1994). Evolutionary origin of whiteflies (Hemiptera: Sternorrhyncha: Aleyrodidae) inferred from 18S rDNA sequences. Insect Molecular Biology *3*, 73-88.

Carthew, RW., and Sontheimer, EJ. (2009). Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. Cell *136*, 642-55.

Casida, J.E., and Durkin, K.A. (2013). Neuroactive Insecticides: Targets, Selectivity, Resistance, and Secondary Effects. Annual Review of Entomology *58*, 99-117.

Crooker, A. (1985). Embryonic and juvenile development, pp. 149-163. In: Helle W, Sabelis MW [eds.], Spider Mites: Their Biology, Natural Enemies and Control. Elsevier, Amsterdam.

Daborn, P.J., Yen, J.L., Bogwitz, M.R., Le Goff, G., Feil, E., Jeffers, S., Tijet, N., Perry, T., Heckel, D., Batterham, P., *et al.* (2002). A Single P450 Allele Associated with Insecticide Resistance in Drosophila. Science *297*, 2253-2256.

Davies, TGE, Field, LM, Usherwood, PNR and Williamson, MS (2007). DDT, pyrethrins, pyrethroids and Insect sodium channels. lubmb Life *59*, 151-162.

De Barro, P.J., Liu, S.-S., Boykin, L.M., and Dinsdale, A.B. (2011). Bemisia tabaci: A Statement of Species Status. Annual Review of Entomology *56*, 1-19.

Denholm, I. and Devine, G. (2001) Insecticide resistance. In: Levin SA [ed.], Encyclopedia of Biodiversity. Academic Press, San Diego, pp. 465–477.

Demaeght, P., Dermauw, W., Tsakireli, D., Khajehali, J., Nauen, R., Tirry, L., Vontas, J., Lümmen, P., and Van Leeuwen, T. (2013). Molecular analysis of resistance to acaricidal spirocyclic tetronic acids in Tetranychus urticae: CYP392E10 metabolizes spirodiclofen, but not its corresponding enol. Insect Biochemistry and Molecular Biology *43*, 544-554.

Dermauw, W., Ilias, A., Riga, M., Tsagkarakou, A., Grbić, M., Tirry, L., Van Leeuwen, T., and Vontas, J. (2012). The cys-loop ligand-gated ion channel gene family of Tetranychus urticae: Implications for acaricide toxicology and a novel mutation associated with abamectin resistance. Insect Biochemistry and Molecular Biology *42*, 455-465.

Devine, G.J., Barber, M., and Denholm, I. (2001). Incidence and inheritance of resistance to METI-acaricides in European strains of the two-spotted spider mite (Tetranychus urticae) (Acari: Tetranychidae). Pest Management Science *57*, 443-448.

Du, T., and Zamore, PD. (2005). microPrimer: the biogenesis and function of microRNA. Development *132*, 4645-52.

Elbert, A., Overbeck, H., Iwaya, H., and Tsuboi, S. (1990). Imidacloprid, a novel systemic nitromethylene analogue insecticide for crop protection. In: Proceedings, Brighton Crop Protection Conference, Pests and Diseases. Brighton, England, pp. 21–28.

Elliott, M., and Janes, N.F. (1978). Synthetic pyrethroids – a new class of insecticide. Chemical Society Reviews *7*, 473-705.

Faria M., and Wraight, S. P. (2001). Biological control of Bemisia tabaci with fungi. Crop Protection *20*, 767–778.

Ffrench-Constant, R.H., Anthony, N., Aronstein, K., Rocheleau, T., and Stilwell, G. (2000). Cyclodiene Insecticide Resistance: From Molecular to Population Genetics. Annual Review of Entomology *45*, 449-466.

Field, L.M., Devonshire, A.L., and Forde, B.G. (1988). Molecular evidence that insecticide resistance in peach-potato aphids (*Myzus persicae* Sulz.) results from amplification of an esterase gene. Biochemical Journal. 251: 309–312.

Gennadius, P. (1889). Disease of tobacco plantations in the Trikonia. The aleurodid of tobacco. [In Greek]. Ellenike Georgia, 5: 1-3.

Gerling D., Alomar O., and Arno J. (2001). Biological control of Bemisia tabaci using predators and parasitoids. Crop Protection *20*, 779–799.

Grbic, M., Van Leeuwen, T., Clark, R.M., Rombauts, S., Rouze, P., Grbic, V., Osborne, E.J., Dermauw, W., Thi Ngoc, P.C., Ortego, F., *et al.* (2011). The genome of Tetranychus urticae reveals herbivorous pest adaptations. Nature *479*, 487-492.

Hannemann, F., Bichet, A., Ewen, K.M., and Bernhardt, R. (2007). Cytochrome P450 systems - biological variations of electron transport chains. Biochimica et Biophysica Acta *1770*: 330–344

Helle, W., and Sabelis, M.W. (1985). World Crop Pests, 1A-B: Spider mites, their biology, natural enemies and control. Elsevier, Amsterdam.

Huvenne, H., and Smagghe, G. (2009). Mechanisms of dsRNA uptake in insects and potential of RNAi for pest control: a review. Journal of Insect Physiology *56*, 227-35.

Inbar, M., and Gerling, D. (2008). Plant-Mediated Interactions Between Whiteflies, Herbivores, and Natural Enemies. Annual Review of Entomology *53*, 431-448.

Jones, D. (2003). Plant Viruses Transmitted by Whiteflies. European Journal of Plant Pathology *109*, 195-219.

Karunker, I., Morou, E., Nikou, D., Nauen, R., Sertchook, R., Stevenson, B.J., Paine, M.J.I., Morin, S., and Vontas, J. (2009). Structural model and functional characterization of the Bemisia tabaci CYP6CM1vQ, a cytochrome P450 associated with high levels of imidacloprid resistance. Insect Biochemistry and Molecular Biology *39*, 697-706.

Karunker, I., Benting, J., Lueke, B., Ponge, T., Nauen, R., Roditakis, E., Vontas, J., Gorman, K., Denholm, I., and Morin, S. (2008). Over-expression of cytochrome P450 CYP6CM1 is associated with high resistance to imidacloprid in the B and Q biotypes of Bemisia tabaci (Hemiptera: Aleyrodidae). Insect Biochemistry and Molecular Biology *38*, 634-644.

Khajehali, J., Van Leeuwen, T., Grispou, M., Morou, E., Alout, H., Weill, M., Tirry, L., Vontas, J., and Tsagkarakou, A. (2010). Acetylcholinesterase point mutations in European strains of Tetranychus urticae (Acari: Tetranychidae) resistant to organophosphates. Pest Management Science *66*, 220-228.

Kida, Y., Ohgiya, S., Mihara, K., Sakaguchi, M. (1998) Membrane topology of NADPH-cytochrome P450 reductase on the endoplasmic reticulum. Archives of Biochemistry and Biophysics *351*:175-9

Kwon, D.H., Park, J.H., and Lee, S.H. (2013). Screening of lethal genes for feeding RNAi by leaf disc-mediated systematic delivery of dsRNA in Tetranychus urticae. Pesticide Biochemistry and Physiology *105*, 69-75.

Kwon, D.H., Im, J.S., Ahn, J.J., Lee, J.-H., Marshall Clark, J., and Lee, S.H. (2010a). Acetylcholinesterase point mutations putatively associated with monocrotophos resistance in the two-spotted spider mite. Pesticide Biochemistry and Physiology *96*, 36-42.

Kwon, D.H., Clark, J.M., and Lee, S.H. (2010b). Cloning of a sodium channel gene and identification of mutations putatively associated with fenpropathrin resistance in Tetranychus urticae. Pesticide Biochemistry and Physiology *97*, 93-100.

Kwon, D.H., Yoon, K.S., Clark, J.M., and Lee, S.H. (2010c). A point mutation in a glutamate-gated chloride channel confers abamectin resistance in the two-spotted spider mite, Tetranychus urticae Koch. Insect Molecular Biology *19*, 583-591.

Li, J., Li, X., Bai, R., Shi, Y., Tang, Q., An, S., Song, Q., and Fengming, Y. (2014). RNA interference of P450 *CYP6CM1* gene has different efficacy in B and Q biotypes of *Bemisia tabaci.* Pest Management Science, accepted article

Mao, Y.B., Tao, X.Y., Xue, X.Y., Wang, L.J. and Chen, X.Y. (2011) Cotton plants expressing CYP6AE14 double-stranded RNA show enhanced resistance to bollworms. Transgenic Research *20*, 665–673.

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. Nature Biotechnology *25*, 1307-13.

Matsuda, K., Kanaoka, S., Akamatsu, M., and Sattelle, D.B. (2009). Diverse Actions and Target-Site Selectivity of Neonicotinoids: Structural Insights. Molecular Pharmacology *76*, 1-10.

Meister, G., and Tuschl, T. (2004). Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. Nature *431*, 343-349.

Melnyk, C.W., Molnar, A., and Baulcombe, D.C. (2011). Intercellular and systemic movement of RNA silencing signals. The Embo Journal *30*, 3553-63.

Morin, S., Williamson, M.S., Goodson, S.J., Brown, J.K., Tabashnik, B.E., and Dennehy, T.J. (2002). Mutations in the Bemisia tabaci para sodium channel gene associated with resistance to a pyrethroid plus organophosphate mixture. Insect Biochemistry and Molecular Biology *32*, 1781-1791.

Mound, L.A., and Halsey, S.H. (1978). Whiteflies of the World: A Systematic Catalogue of the Aleyrodidae (Homoptera) with Host Plant and Natural Enemy Data. British Museum (Natural History), London, UK, John Wiley & Sons, Chichester, 329 pp.

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

Riga, M., Tsakireli, D., Ilias, A., Morou, E., Myridakis, A., Stephanou, E.G., Nauen, R., Van Leeuwen, T., Paine, M., and Vontas, J. (2014). Abamectin is metabolized by the CYP392A16, a cytochrome P450 associated with high levels of acaricide resistance in Tetranychus urticae. Insect Biochemistry and Molecular Biology *46*, 43-53

Roditakis, E., Tsagkarakou, A., and Vontas, J. (2006). Identification of mutations in the para sodium channel of Bemisia tabaci from Crete, associated with resistance to pyrethroids. Pesticide Biochemistry and Physiology *85*, 161-166.

Scott, J.G. (1999). Cytochromes P450 and insecticide resistance. Insect Biochemistry and Molecular Biology *29*, 757-777.

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.

Thakur, N., Upadhyay, S.K., Verma, P.C., Chandrashekar, K., Tuli, R., and Singh, P.K. (2014) Enhanced whitefly resistance in transgenic tobacco plants expressing double stranded RNA of v-ATPase A gene. PLoS One 6 e87235

Tian, H., Peng, H., Yao, Q., Chen, H., Xie, Q., Tang, B. and Zhang, W. (2009) Developmental control of a Lepidopteran pest Spodoptera exigua by ingestion of bacterial expressing dsRNA of a non-midgut gene. PLoS ONE, 4, e6225

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.

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.

Tsagkarakou, A., Van Leeuwen, T., Khajehali, J., Ilias, A., Grispou, M., Williamson, M.S., Tirry, L., and Vontas, J. (2009b). Identification of pyrethroid resistance associated mutations in the para sodium channel of the two-spotted spider mite Tetranychus urticae (Acari: Tetranychidae). Insect Molecular Biology *18*, 583-593.

Upadhyay, S., Chandrashekar, K., Thakur, N., Verma, P., Borgio, J., Singh, P., and Tuli, R. (2011). RNA interference for the control of whiteflies (Bemisia tabaci) by oral route. Journal of Biosciences *36*, 153–161.

Van Leeuwen, T., Dermauw, W., Grbic, M., Tirry, L., and Feyereisen, R. (2012). Spider mite control and resistance management: does a genome help? Pest Management Science *69*, 156-159.

Van Leeuwen, T., Vontas, J., Tsagkarakou, A., Dermauw, W., and Tirry, L. (2010). Acaricide resistance mechanisms in the two-spotted spider mite Tetranychus urticae and other important Acari: A review. Insect Biochemistry and Molecular Biology *40*, 563-572.

Van Leeuwen, T., Vontas, J., Tsagkarakou, A., and Tirry, L. (2009). Mechanisms of acaricide resistance in the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* pp. 347-393. In: Ishaaya I, Horowitz AR [eds.], Biorational Control of Arthropod Pests. Springer Netherlands.

Van Leeuwen, T., Van Pottelberge, S., and Tirry, L. (2005). Comparative acaricide susceptibility and detoxifying enzyme activities in field-collected resistant and susceptible strains of Tetranychus urticae. Pest Management Science *61*, 499-507.

Vontas, J.G., Small, G.J., and Hemingway, J. (2001). Glutathione S-transferases as antioxidant defence agents confer pyrethroid resistance in Nilaparvata lugens. Biochem J *357*, 65-72.

Wang, M., Roberts, D.L., Paschke, R., Shea, T.M., Masters, BSS., and Kim, JJP. (1997). Three-dimensional structure of NADPH–cytochrome P450 reductase: Prototype for FMN- and FAD-containing enzymes. Proceedings og the National Academy of Science *94*, 8411–8416. USA

Whyard, S., Singh, A.D. and Wong, S. (2009). Ingested doublestranded RNAs can act as species-specific insecticides. Insect Biochemistry and Molecular Biology *39*, 824–832.

Yang, N., Xie, W., Jones, C.M., Bass, C., Jiao, X., Yang, X., Liu, B., Li, R., and Zhang, Y. (2013a). Transcriptome profiling of the whitefly Bemisia tabaci reveals stage-specific gene expression signatures for thiamethoxam resistance. Insect Molecular Biology *22*, 485-496.

Yu, N., Christiaens, O., Liu, J., Niu, J., Cappelle, K., Caccia, S., Huvenne, H., and Smagghe, G. (2012). Delivery of dsRNA for RNAi in insects: an overview and future directions. Insect Science *20*, 4–14.

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

Zhang, Z. (2003). Mites of greenhouses: identification, biology and control. CABI International, Wallingford, United Kingdom.

Ηλίας, Α. (2014). Διερεύνηση των μηχανισμών ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα και της διασποράς των υπεύθυνων γονιδίων σε πληθυσμούς των *Bemisia tabaci* (αλευρώδη) και *Tetranychus urticae* (τετράνυχου). Διδακτορική διατριβή, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα Βιολογίας.

Σαματά, Μ. (2012). Προς την δημιουργία διαγονιδιακών φυτών ανθεκτικών στα αγροτικά παράσιτα *Tetranychus urticae* και *Bemisia tabaci* μέσω RNAi. Πτυχιακή εργασία, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα Βιολογίας.

Σιώζιου, Ε. (2013). Ανάπτυξη μεθόδων καταπολέμησης εχθρών των καλλιεργειών με RNA σίγηση (πειράματα με αλευρώδη και σίγηση μονοπατιού για αποτοξικοποίηση). Μεταπτυχιακή εργασία, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα Βιολογίας.

Τζανακακης, Μ. Ε. (1995). Εντομολογία eds. Τζανακακης, Μ. Ε.. Ελληνικής έκδοσης.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

1. Αλληλουχίες των γονιδίων mGFP4, *Bt*CPR και *Tu*CPR

Synthetic construct green fluorescent protein – mGFP4

Accession number: U87624

GGATCCAAGGAGATATAACAATGAGTAAAGGAGAAGAACTTTTCACTGGAGTTGTCCCAATTCTTGTTG
AATTAGATGGTGATGTTAATGGGCACAAATTTTCTGTCAGTGGAGAGGGTGAAGGTGATGCAACATACG
GAAAACTTACCCTTAAATTTATTTGCACTACTGGAAAACTACCTGTTCCATGGCCAACACTTGTCACTA
CTTTCTCTTATGGTGTTCAATGCTTTTCAAGATACCCAGATCATATGAAGCGGCACGACTTCTTCAAGA
GCGCCATGCCTGAGGGATACGTGCAGGAGAGGACCATCTTCTTCAAGGACGACGGGAACTACAAGACAC
GTGCTGAAGTCAAGTTTGAGGGAGACACCCTCGTCAACAGGATCGAGCTTAAGGGAATCGATTTCAAGG
AGGACGGAAACATCCTCGGCCACAAGTTGGAATACAACTACAACTCCCACAACGTATACATCATGGCAG
ACAAACAAAAGAATGGAATCAAAGTTAACTTCAAAATTAGACACAACATTGAAGATGGAAGCGTTCAAC
TAGCAGACCATTATCAACAAAATACTCCAATTGGCGATGGCCCTGTCCTTTTACCAGACAACCATTACC
TGTCCACACAATCTGCCCTTTCGAAAGATCCCAACGAAAAGAGAGACCACATGGTCCTTCTTGAGTTTG
TAACAGCTGCTGGGATTACACATGGCATGGATGAACTATACAAATAAGAGCTC

Με κίτρινο χρώμα υποδεικνύονται οι αλληλουχίες των εκκινητών mGFP4_F/R (429bp)

Bemisia tabaci CPR

Accession number: KF439723

AGATAATTAAGTAATCGAGTATTTTCCACTAATTTGGATTTTGTGAGTCTCGTGAAGATTCCTACTCTT
TCCTTGGATTATTGCTGGTTTATGATAAGAGCTCAAGAATGGAGGCGAAGGAGGTAGTAGCGGAAAACA
TCAACGATGACGCGCCTATGTTCGGTCTTGTTGACACCGTCCTATTGGCTGCCATCGTTGGTTTCGGTG
AGATAATTAAGTAATCGAGTATTTTCCACTAATTTGGATTTTGTGAGTCTCGTGAAGATTCCTACTCTT
TCCTTGGATTATTGCTGGTTTATGATAAGAGCTCAAGAATGGAGGCGAAGGAGGTAGTAGCGGAAAACA
TCAACGATGACGCGCCTATGTTCGGTCTTGTTGACACCGTCCTATTGGCTGCCATCGTTGGTTTCGGTG
CCTGGTACTTCTTCTTCAACAAAAAGTCAGAGACTACAAAAAAGACATATCAAATCCAACCCACCACAC
TGAACACAACGACGACGAGCGAAGACAACTCGTTCATCAAGAAACTCAAAAGCTCCGGGCGGAGTCTGG
TCGTGTTCTACGGTAGCCAGACGGGTACCGGGGAGGAGTTCGCCGGGCGGATAGCCAAAGAAGGGCGCA
ACTATGGTATGAAAGGCATGGTCGCCGATCCCGAAGAGTACGAAATGGTAAGGGAAGAACTAGTCAATT
TGAAAGAAATACCCAACTCCTTGGCCGTTTTTTGCCTCGCCACCTATGGTGAAGGCGACCCCACCGATA
ACGCCATGGACTTCTATGAATGGCTTCAAAACGGAGATGCCAATCTCGCCGGACTGAATTATGCTGTGT
TCGGGTTGGGAAACAAAACTTATGAACACTACAACGAAGTTGGTATTTATGTAGACAGGCGTCTGGAAG
AGCTTGGCGCTACCAGAGTATGTGAACTGGGTCTTGGAGATGACGACGCGAACATCGAGGATGATTTCA
TTACTTGGAAAGACAAATTATGGCCAGCTGTCTGTGACTACTATGGAATTGAAGCAACTGGAGAGGAAG
GTAGTGTGCGTCAGTATAAGTTAACGGAACATACGGATATCTCTCCTGACAGAGTCTACACCGGAGAAG
TCGTCAGGTTGCATTCACTCATCAACCAGAGACCGCAATTTGACATGAAGAACCCTTACCTGGCGCCTA

TTCGAGTGAACAGAGAACTTCATAAAGGCGATAGTGACCGTTCCTGCATGCACATTGAATTTGATATAG
ATGGATCCAAGATGAAATATGATACAGGTGACCATTTAGGAGTCTATCCACACAATGATCCAGCTCTGG
TCCAGAAAATAGGTGATATGGTGGGTGTCAATCTAGACGTGGTGTTTACTCTTACCAACACTGATGAGG
AATCAAGTAAGAAGCACCCTTTTCCGTGCCCATGTTCTTATAGAACAGCGCTCACCCATTATCTTGATA
TTGGCTCTAATCCCCGTACTCACATTCTGAAGGAATTGGCCGAGTATGCCACGGATCCAAAGGAACAAG
AACAGTTGAGACAAATGGCCATGACCTCAGTTGAAGGAAAGCAACTGTATAACAAATGGATAATTGAAG
ACAACCGTAATATCGTTCATATTTTGGAAGATTTTTCATCCTGCAAGCCTGCAATAGACCACCTCTGTG
AACTTCTCCCACGGTTACAGGCCCGATACTATTCAATTTCATCATCACCAAAGCTGCATCCAACATCAG
TTCACATTACAGCTGTAAAAGTAGAATACACAACACCTACTAACAGAGTGAACAAGGGTGTGTGTACAA
CGCTTCTGAGTCAGAAAGTTCCATCGCCGAACCCTAATGAACCCATTCCCAGGATGCCAATCTTCGTCA
GGAAGTCGCAGTT

Με πράσινο χρώμα υποδεικνύονται οι αλληλουχίες των εκκινητών *Bt*CPR_F/R (314bp)

Tetranychus urticae CPR

http://bioinformatics.psb.ugent.be/orcae/annotation/Tetur/current/tetur18g03390

ATGGAAGAATCGCCTAATCAAGGATCAATTATTAGTTTTGAAGTTTTCTTAACCCTGGTTATATGTGG
TCTTGGTGCATATTATTATTTAACCAAACGTAAATCAAATGAATTTGATACTAAATCAATCAAGAGTTT
CACCGTAGATACTCAACCCAATCGAAGTAACAGTATTAGTGATTCTGGTTTCGTTAACAAAATGAAAT
CAACTGGTAGAAACATTGTTGTCTTCTATGGATCACAAACCGGTACTGCAGAGGAATTTGCTGTTCG
ATTAGCTAAAGAGTCAGCTCGCTATGGGATGAAGGCCTTAGTTGCAGACCCTGAAGAATGTGATATT
GAAGAATTGACTAACTTGAATACACTGCCGAACTCTTTGGCCATTTTCTGTGTGGCCACTTACGGTGA
AGGTGACCCTACGGATAATGCTTTAGATCTCAATGAATGGCTTCAAAATACAACTGTAGACCTCAATG
GATTAAATTATGCCGTTTTTGGATTGGGTAACAAAACTTATGAACACTTCAATGCTTTTGGTAAATAT
ATTGACAAAAGACTTGCAGAGTTAGGTGCAAATAGAGTTCATGAATTGGGCATGGGTGATGATGAT
GCAAACATCGAAGAAGATTTTATCACATGGAAAGAACAGCTTTGGTCTTCTGTTTGTTCCCTTTTCAA
TGTCCAATTATCTGGAGAAGACATTAATCTGCGACAATATGAATTAGAAGTGCACAATGATTTACCTA
AAGAAGCAATTTACGTTGGAGAAATCGCCAGACTTGGATCATACAGAAAGCAAAGACCACCATTTGA
TGCTAAAAATCCATTCTTGGCACCTATCGTAGTGAACCGAGAACTATACAAAGGAGACCGTTCGTGT
ATGCATGTTGAATTTGATCTAGTTGGCTCTAAAATAAGATATGAAGCTGGAGATCACCTTGCCATCTA
TCCTCAGAATGATTCTTCAATTGTCAACAAACTTGGAGAATTATTAAAAGTTGATTTGGATACTGTTAT
TTCTTTGAAAAATGTTGACGAGGATAGTTCCAAGAAAAACCCATTCCCATGTCCTTGCAGCTATCGAA
CAGCGTTAACTCATTACGTGGATATCTGCCATACCCCAAGAACTCACGTACTTAAAGAATTGGCAGAT
TATGCAACCAATGAAGCAGATAAAGAAATGTTGAAAAAGATGAGCAGCTCTACGGATGAAGGAAAA
GCCTTGTACTCTGAATGGATAATAAAGAGTGCCCGTAGTATTGTTCATGTGCTTGAAGATTTACCTTC
TTGTAAAATTCCATTGGATCATCTGCTTGAATTTATGCCTCGACTTCAGCCACGTTATTATTCAATTTCA
TCTTCACCCAAGATTAATCCAGAGCGTGTTAGTATCACTGCTGTTTTAGTTGAATATAAATCATTTACC
GGTCGAATTGTTCGTGGTGTTACTACTGGTTGGCTAAAAACAATGGATCCAAATGGCAACCACGTTG
CTCCTTGTTTTGTCCGTCGATCTCAATTCAAGTTACCAACTAAATCTCAGGTTCCCATTTTGATGATTG

GTCCTGGAACTGGTTTAGCTCCGTTTATGGGTTTCATCCAAGAACGCCAATGGATGTTAGATCAAGG
AAAACCTTTAGGTGAAGCCATTCTCTATTACGGGTGTAGGAAACAAGCTGAAGATTATCTTTACGAA
CAAGAATTGGCTGCAAGTCTGAAATCTGGTGCTCTCACCAAGCTTTATGCAGCTTTCTCTCGTGATCA
ACCCGAGAAGGTTTATGTTACTCACCTTCTTAAGCAGAATAAGAAAGAGCTTTGGAATCTTATCGAG
GAGAAGAAAGGTCACATTTATATTTGCGGTGATGCCAGGAACATGGCTCGGGATGTTCGAGATATC
ATTCTATCTACTATTATGGAAGAAAGTGGCAAAACAAGTCAAGAAGCTGATGCTTATATTAAGAGAA
TGGAAGTTCAAAGAAGATATTCTGCTGATGTGTGGAGTTAG

Με μπλε χρώμα υποδεικνύονται οι αλληλουχίες των εκκινητών *Tu*CPR_F/R (214bp)

2. Κατασκευή διαγονιδιακών φυτών τομάτας – Διαλύματα

MEDIUM	**MSO**	**TRI1**	**GCF10**	**GCF11**	**TRI2**
Ms Salts	4,3 g/l	2,2 g/l	4,3 g/l	4,3 g/l	2,2 g/l
Thiamine	0,4mg/l	0,2mg/l	0,4mg/l	0,5 mg/l	0,2 mg/l
Myoinositol	100mg/l	50mg/l	100 mg/l	100 mg/l	50 mg/l
Glycine	-	-	-	2 mg/l	-
Pyridoxine	-	-	0,5 mg/l	0,5 mg/l	-
Folic acid	-	-	-	0,5 mg/l	-
Biotin	-	-	-	0,05 mg/l	-
Zeatin riboside	-	-	1,5 mg/l	1,9 mg/l	-
NAA	-	-	-	-	0,1mg/l
IAA	-	0,2 mg/l	0,2 mg/l	-	-
Amcymidol	-	-	-	-	0,5 mg/l
Nicotinic acid	-	-	0,5 mg/l	4,9 mg/l	-
Sucrose	30g/l	15g/l	30 g/l	30 g/l	15 g/l
Carbenicillin	-	-	500 mg/l	500 mg/l	250 mg/l
Kanamycin	-	-	50 mg/l	50 mg/l	25 mg/l
Agar	-	8 g/l	8 g/l	8 g/l	8 g/l
pH	5,8	5,9	5,9	5,9	5,9

3. Στύπωμα κατά Northern – Διαλύματα

- **Acrylamide 38:2, 40%, 1lt**

  Σε 600ml dH_2O

  - 380gr acrylamide
  - 20gr N,N-bisacrylamide
  - dH_2O μέχρι τελικό όγκο 1lt

- **TBE 5x, 1lt**
  - 54gr Tris
  - 27,5gr boric acid
  - 20ml EDTA 0,5M pH8

- **SSC 20x, 1lt**
  - 175,32gr sodium chloride (NaCl)
  - 88,23gr sodium citrate (Na-citrate)
  - pH7 με HCl