



## Καινοτόμες λύσεις για τη βιώσιμη και περιβαλλοντικά φιλική φυτοπροστασία των οπωροκηπευτικών της Ελλάδας, στην Ευρώπη του μέλλοντος

### Παραδοτέο Π.3.6.1: Αναφορά αποτελεσματικότητας επιλεγμένων dsRNA στη μύγα της μεσογείου

#### Πληροφορίες για το έγγραφο

Αριθμός παραδοτέου: Π.3.6.1

Ενότητα εργασίας: EE3

Επικεφαλής δικαιούχος: ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ

Συγγραφείς: Αθανάσιος Δαλακούρας

Έκδοση: 1.x

Είδος Παραδοτέου: Έκθεση

Ημερομηνία παράδοσης: 05.11.2025

#### Στοιχεία Πράξης

**Τίτλος:** Καινοτόμες λύσεις για τη βιώσιμη και περιβαλλοντικά φιλική φυτοπροστασία των οπωροκηπευτικών της Ελλάδας, στην Ευρώπη του μέλλοντος

**Τίτλος (EN):** InnoPP-Innovations in Plant Protection for sustainable and environmentally friendly pest control

**Κωδικός πράξης:** TAEDR-0535675

**Ακρωνύμιο έργου:** InnoPP

**Ημερομηνία έναρξης:** 15 Μαΐου 2023

**Διάρκεια:** 28 Μήνες

**Συντονιστής Φορέας:** Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

**Συντονιστής/ Επιστημονικός Υπεύθυνος:** Ιωάννης Βόντας

## Πίνακας Περιεχομένων

<b>1</b>	<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΣΤΟΧΟΙ</b> .....	<b>4</b>
<b>2</b>	<b>ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΩΝ ΕΡΓΑΣΙΩΝ</b> .....	<b>5</b>
2.1	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ .....	5
2.2	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	10
<b>3</b>	<b>ΣΥΝΟΨΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</b> .....	<b>17</b>

## Περίληψη του Έργου

Το έργο «Καινοτόμες λύσεις για τη βιώσιμη και περιβαλλοντικά φιλική φυτοπροστασία των οπωροκηπευτικών της Ελλάδας, στην Ευρώπη του μέλλοντος» στοχεύει στην ανάπτυξη σύγχρονων και καινοτόμων μεθόδων για την προστασία των καλλιεργειών όπως τα κηπευτικά, τα εσπεριδοειδή και το επιτραπέζιο σταφύλι. Περιλαμβάνει τη δημιουργία προηγμένων διαγνωστικών εργαλείων για την ανίχνευση εχθρών και παθογόνων με τεχνολογίες αιχμής, όπως ηλεκτρονικές παγίδες και βιοαισθητήρες, καθώς και πλατφόρμες αλληλούχισης για τον πλήρη προσδιορισμό των ιωμάτων. Επιπλέον, θα αναπτυχθούν μοντέλα πρόβλεψης επιδημιών και καινοτόμα βιοφυτοπροστατευτικά προϊόντα, τα οποία θα αξιολογηθούν για την ασφάλεια τους σε μη στόχους οργανισμούς. Τέλος, οι νέες τεχνολογίες θα ενσωματωθούν σε συστήματα ολοκληρωμένης διαχείρισης φυτοπροστασίας και θα δοκιμαστούν σε πραγματικές συνθήκες, ενώ θα αξιολογηθούν οι κοινωνικοοικονομικές και περιβαλλοντικές επιπτώσεις τους.

## Σύνοψη της ΕΕ3

Στην ΕΕ3 αναπτύσσονται καινοτόμες μεθοδολογίες και βιοφυτοπροστατευτικά προϊόντα φυτικής προέλευσης, νέας γενιάς εκλυστικά και απωθητικά, φερομόνες και παρεμποδιστές σύζευξης, βιοδραστικά μόρια ανάπτυξης αντοχής φυτών σε εχθρούς, μικροβιακά βιοεντομοκτόνα και βιοφυτοπροστατευτικά και, τέλος, μοριακά βιοφυτοπροστατευτικά βασισμένα σε δίκλινα RNA (dsRNA).

## Συνοπτική παρουσίαση του παραδοτέου Π.3.6.1.

Το Παραδοτέο Π.3.6.1. αφορά έκθεση αποτελεσματικότητας (σίγηση και θανάτωση) επιλεγμένων γονιδίων-στόχων, με βάση βιβλιογραφική και βιοπληροφορική ανάλυση (ζωτικά γονίδια-στόχοι με εξειδίκευση στον εχθρό και το στάδιο που στοχεύει η εφαρμογή και αποφυγή off-target effects) και εργαστηριακή χορήγηση μέσω τροφής ή εμποτισμού στα αρχικά προνυμφικά στάδια.

## 1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΣΤΟΧΟΙ

Ο μηχανισμός σίγησης ή ασποσιώπησης γονιδίων μέσω RNA (RNA interference, RNAi) έχει γίνει ένα σπουδαίο εργαλείο με εφαρμογές σε διάφορους τομείς, συμπεριλαμβανομένης της γεωργίας. Επιγραμματικά, σύμφωνα με τον μηχανισμό RNAi, όταν ένα δίκλωνο RNA μόριο (double stranded RNA, dsRNA) βρεθεί μέσα σε ένα ευκαρυωτικό κύτταρο, κόβεται από τις κυτταρικές ενδονουκλεάσες DICER σε μικρότερα δίκλινα RNA μόρια μεγέθους 21 νουκλεοτιδίων που λέγονται short interfering RNAs (siRNAs). Έν συνεχεία, η μια αλυσίδα/κλωνος των siRNAs φορτώνεται στις κυτταρικές πρωτεΐνες ARGONAUTE (AGO). Το σύμπλοκο AGO:siRNA εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα και μόλις ανιχνεύσει ένα αγγελιοφόρο RNA (messenger RNA, mRNA) που παρουσιάζει νουκλεοτιδική συμπληρωματικότητα, υβριδίζει μαζί του και το αποδομεί (Voinnet 2025; Vaucheret and Voinnet 2024). Τα siRNAs, κόβοντας συμπληρωματικά mRNAs, διακόπτουν τη ροή της γενετικής πληροφορίας, με αποτέλεσμα να μην παράγεται πρωτεΐνη και να καταστέλλεται η γονιδιακή έκφραση. Έτσι, το φαινόμενο RNAi ονομάζεται ευρέως και ως σίγηση γονιδίων (gene silencing). Τα τελευταία χρόνια έχει δοθεί μεγάλη έμφαση στην εφαρμογή στρατηγικών που εκμεταλλεύονται το RNAi ως εργαλείο μέσω της απευθείας εφαρμογής σε φυτά RNA μορίων (dsRNAs/siRNAs) εναντίον επιλεγμένων κάθε φορά στόχων. Αυτά τα dsRNA φυτοφάρμακα, τα οποία αποτελούν μέρος των βιολογικών μεθόδων καταπολέμησης παρασίτων, έχουν μελετηθεί ως ενισχυτικά της αντοχής των φυτών έναντι ιών, νηματωδών, εντόμων και μυκήτων (Dalakouras et al. 2020; Dalakouras et al. 2024).

Η οικογένεια Tephritidae των φρουτόμυγων περιλαμβάνει περίπου 4.300 αναγνωρισμένα είδη που εκτείνονται παγκοσμίως. Τα έντομα αυτά αποτελούν σημαντικούς γεωργικούς εχθρούς, καθώς είναι γνωστά για την προσβολή μιας μεγάλης ποικιλίας φρούτων και λαχανικών, στα οποία προκαλούν σημαντικές οικονομικές ζημιές. Ανάμεσά τους, η Μύγα της Μεσογείου (*Ceratitis capitata*, Wiedemann) ξεχωρίζει ως το πιο διαδεδομένο και καταστρεπτικό είδος (Rao et al. 2024). Στο πλαίσιο της ΕΕ3 (Καινοτόμες μεθοδολογίες και βιοφυτοπροστατευτικά προϊόντα) **επιχειρήσαμε να αναπτύξουμε μοριακά βιοφυτοπροστατευτικά προϊόντα βασισμένα σε dsRNA με σκοπό την καταπολέμηση της μύγας της Μεσογείου** μέσω της επαγωγής της σίγησης γονιδίων μέσω RNA παρεμβολής (RNA interference, RNAi). Επειδή η καταστολή της έκφρασης των διαφορετικών γονιδίων δεν επηρεάζει με τον ίδιο τρόπο τη φυσιολογική λειτουργία του εντόμου, θελήσαμε να διερευνήσουμε ποιο γονίδιο της μύγας της Μεσογείου αποτελεί τον πιο αποτελεσματικό στόχο για τα dsRNA. Για τον σκοπό αυτό, σχεδιάσαμε και συνθέσαμε 13 διαφορετικά dsRNA ικανά να στοχεύουν 13 διαφορετικά γονίδια της *C. capitata*. Έπειτα, εφαρμόσαμε αυτά τα 13 διαφορετικά dsRNA σε εργαστηριακές συνθήκες (μέσω χορήγησης τους στην τροφή) και καταλήξαμε με ανάλυση ποσοτικής αντίδρασης της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (RT-qPCR) **ότι τα γονίδια *sf3b1* και *eti3a* αποτελούν τους πιο υποσχόμενους στόχους για καταστολή έκφρασης μέσω dsRNA**. Επιπλέον, διαπιστώσαμε ότι η σύνθεση (formulation) των dsRNA με χιτοζάνη ενισχύει σημαντικά την δράση των dsRNA. Συνολικά, τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι με την κατάλληλη επιλογή γονιδίων-στόχων και την κατάλληλη σύνθεση (formulation), τα dsRNA θα μπορούσαν να αποτελέσουν ένα υποσχόμενο μοριακό εργαλείο στην καταπολέμηση της μύγας της Μεσογείου στο μέλλον.

## 2 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΩΝ ΕΡΓΑΣΙΩΝ

### 2.1 Υλικά και Μέθοδοι

#### Εκτροφή πληθυσμού εντόμων

Ο πληθυσμός της Μεσογειακής Μύγας, *Ceratitis capitata* που χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη προέρχεται από το εργαστηριακό στέλεχος Egyrpt II (EGII), το οποίο εκτρέφεται στο εντομοτροφείο του Εργαστηρίου Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής, του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Οι ενήλικες μύγες διατηρήθηκαν σε κλουβιά διαστάσεων 40×40 cm μέσα στο θάλαμο, με ελεγχόμενες συνθήκες θερμοκρασίας  $23 \pm 2$  °C, σχετικής υγρασίας  $65 \pm 5\%$ , και φωτοπερίοδο 14:10 h (φως:σκοτάδι). Η διαίτα των ενηλίκων αποτελείται από μείγμα 20% Υδρολυμένης Μαγιάς (MP Biomedicals) και 80% κρυσταλλικής ζάχαρης. Η διαίτα των προνυμφών (500 ml) περιείχε: 450 ml νερό βρύσης, 30 g κρυσταλλικής ζάχαρης, 30 g Μαγιά Brewer (MP Biomedicals), 30 g χαρτοβάμβακο, 10 ml διαλύματος χοληστερόλης (5% w/v σε 23,8% v/v EtOH) (AppliChem), 10 ml διαλύματος υδροχλωρικού οξέος (5,4% w/v σε dH<sub>2</sub>O) (Chemlab), και 10 ml διαλύματος βενζοϊκού νατρίου (10% w/v Sodium Benzoate σε 57% v/v EtOH) (AppliChem).

#### Επιλογή γονιδίων στόχων και σχεδιασμών PCR εκκινήτων

Τα 13 υποψήφια γονίδια-στόχοι επιλέχθηκαν βάσει της μελέτης ευρέως κλίμακας RNAi που πραγματοποιήθηκε από τους Bucher et al. στο σκαθάρι *Tribolium castaneum* (Buer et al. 2025; Ulrich et al. 2015). Στις μελέτες αυτές, διερευνήθηκαν συνολικά 15.530 γονίδια, τα οποία στοχεύθηκαν μέσω ενέσεων, και με βάση τον επιθυμητό φαινότυπο και οδηγήθηκαν τελικά στην ταυτοποίηση 34 γονιδίων-στόχων τα οποία δοκιμάστηκαν ως στόχοι με χορήγηση δια του στόματος των dsRNA τόσο στο *Tribolium castaneum* αλλά και σε άλλο σκαθάρι. Από αυτά τα γονίδια βρέθηκαν τα ομόλογα στο γονιδίωμα της *Ceratitis capitata*. Στη συνέχεια, σχεδιάστηκαν dsRNAs ώστε να στοχεύουν τα γονίδια αυτά, με δύο βασικά κριτήρια: (i) την απουσία παράλογων γονιδίων στο γονιδίωμα της *Ceratitis capitata*, ώστε να ελαχιστοποιηθούν πιθανά off-target effects, και (ii) τα βασικά βιοχημικά και δομικά χαρακτηριστικά για τον σχεδιασμό και την κατασκευή των dsRNAs. Τα επιλεγμένα γονίδια και τα Gene IDs τους στην *Ceratitis capitata* και στο *Tribolium castaneum* παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.

	Gene name	<i>Ceratitis capitata</i> Gene ID (NCBI)	<i>Tribolium castaneum</i> Gene ID (iBeetle-Base)
1	<i>psbt4</i>	101455602	TC008617
2	<i>prs4</i>	101457730	TC009675
3	<i>prs10b</i>	101456446	TC010321
4	<i>psbt1</i>	101453980	TC000069
5	<i>srp54</i>	101461502	TC002574
6	<i>preb</i>	101455681	TC014725
7	<i>pnars6</i>	101452840	TC006375

8	<i>pnars1</i>	101450012	TC033036
9	<i>eti3a</i>	101450563	TC012303
10	<i>sf3b1</i>	101458592	TC034312
11	<i>csb</i>	101451892	TC000641
12	<i>prs7</i>	101453108	TC006492
13	<i>prs6b</i>	101455254	TC007999
14	<i>mase1</i>	101448568	-
15	<i>mase2</i>	101463362	-
16	<i>rpl19</i>	101460909	-

**Πίνακας 1:** Λίστα των 13 υποψήφιων γονιδίων που επιλέχθηκαν ως στόχοι για την από του στόματος χορήγηση μορίων dsRNA σε προνύμφες *Ceratitis capitata* 2ου σταδίου, μαζί με το NCBI gene ID τους για την *Ceratitis capitata* και τα IDs των ορθολόγων τους στο *Tribolium castaneum* από τη βάση δεδομένων iBeetle. Επίσης παρατίθενται τα NCBI gene IDs για τα δύο γονίδια εντερικών RNase της *Ceratitis capitata*, καθώς και το γονίδιο αναφοράς *rpl19*.

## Σύνθεση των δίκλωνων μορίων RNA (dsRNA)

Τα δίκλινα μόρια RNA (dsRNA) συντέθηκαν χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα προϊόντα PCR που περιλάμβαναν και στα δύο τους άκρα αλληλουχίες του υποκινητή της T7 RNA πολυμεράσης. Για την παραγωγή αυτών των υποστρωμάτων χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές (primers) που περιείχαν στο 5' άκρο την αλληλουχία του T7 υποκινητή (5'-TAATACGACTCACTATAGGGAGA-3'). Η ενίσχυση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας την DNA πολυμεράση Q5® High-Fidelity 2X Master Mix (New England Biolabs, M0492S) και με υπόστρωμα cDNA ώστε να αποφευχθούν πιθανά ιντρόνια. Οι αλληλουχίες των εκκινητών και οι συνθήκες PCR περιλαμβάνονται στον **Πίνακα 2**. Οι συνθήκες PCR προσαρμόστηκαν ανάλογα με το μήκος του προϊόντος (χρόνος επέκτασης), ενώ η θερμοκρασία προσκόλλησης των εκκινητών (annealing) υπολογίστηκε βάσει των πληροφοριών από την επίσημη ιστοσελίδα της NEB.

	Target gene	Primer type	PCR primer sequence (including T7 overhang) 5' → 3'
1	<i>psbt4</i>	Forward	TAATACGACTCACTATAGGGAGAGGTCCAAACGTTTCATCATCAC
		Reverse	TAATACGACTCACTATAGGGAGACCATTTGAAATTTGTTCCACGTACC
2	<i>prs4</i>	Forward	TAATACGACTCACTATAGGGAGAGCATGCTCCTTCTATTGTTT
		Reverse	TAATACGACTCACTATAGGGAGATAAATACAATCCCTCGACTGTG
3	<i>prs10b</i>	Forward	TAATACGACTCACTATAGGGAGACGACCATCAACCCTGCATAA
		Reverse	TAATACGACTCACTATAGGGAGATCTAATTTCTTATTGTCGGCTACCT
4	<i>psbt1</i>	Forward	TAATACGACTCACTATAGGGAGAACTGTGCTCGGTTCAACT
		Reverse	TAATACGACTCACTATAGGGAGACACCTCTTCCTCCGTGATG
5	<i>srp54</i>	Forward	TAATACGACTCACTATAGGGAGACTTAGTAAGGCCACGGTCATT
		Reverse	TAATACGACTCACTATAGGGAGACCACAATAAATTTCGAATCCTTCAC
6	<i>preb</i>	Forward	TAATACGACTCACTATAGGGAGACTTGTGGCAGGTGGTG
		Reverse	TAATACGACTCACTATAGGGAGAAAATCTGTTTGCCTGAATCTC
7	<i>pnars6</i>	Forward	TAATACGACTCACTATAGGGAGAGAGCCATCGAAGATGCC

		Reverse	TAATACGACTCACTATAGGGAGAGAATTTCTGCGCCTTTCCTACTAC
8	<i>pnars1</i>	Forward	TAATACGACTCACTATAGGGAGAGCGCACTCGCTTTCCTTA
		Reverse	TAATACGACTCACTATAGGGAGAAATCTCAAAGTTAGGCTCAGGTTTC
9	<i>eti3a</i>	Forward	TAATACGACTCACTATAGGGAGAGCTTACTCCGAAACT
		Reverse	TAATACGACTCACTATAGGGAGATACTCTTACATATATCTTCC
10	<i>sf3b1</i>	Forward	TAATACGACTCACTATAGGGAGAGGTAAGTAAACCTCTCTGGAAG
		Reverse	TAATACGACTCACTATAGGGAGAAATGTCTGCAGCTCCCAAT
11	<i>csb</i>	Forward	TAATACGACTCACTATAGGGAGACTAGCTGCTATATTGAGTTGATCGT
		Reverse	TAATACGACTCACTATAGGGAGAGTTACTTCCAATATCTGCTCCT
12	<i>prs7</i>	Forward	TAATACGACTCACTATAGGGAGACTGTAGCACCACAGATATTGAGG
		Reverse	TAATACGACTCACTATAGGGAGAAAACGAGCACCACCAATCG
13	<i>prs6b</i>	Forward	TAATACGACTCACTATAGGGAGACATTGGATGAGTTGGATATTG
		Reverse	TAATACGACTCACTATAGGGAGACAATTCGAAATGTGTCAGA
14	<i>mase1</i>	Forward	TAATACGACTCACTATAGGGAGAGAGCGCGTCCTGTGTAAG
		Reverse	TAATACGACTCACTATAGGGAGACTGCTCGGTGCCATAATCAA
15	<i>mase2</i>	Forward	TAATACGACTCACTATAGGGAGACCTACGCCACCATCACTAAT
		Reverse	TAATACGACTCACTATAGGGAGAAAGAAATACTGCTTCTGCAAAC
16	<i>gfp</i>	Forward	TAATACGACTCACTATAGGGAGAGTCAGTGGAGAGGGTGAAGGTG
		Reverse	TAATACGACTCACTATAGGGAGACTTTTGCTTGTGCGCCATG

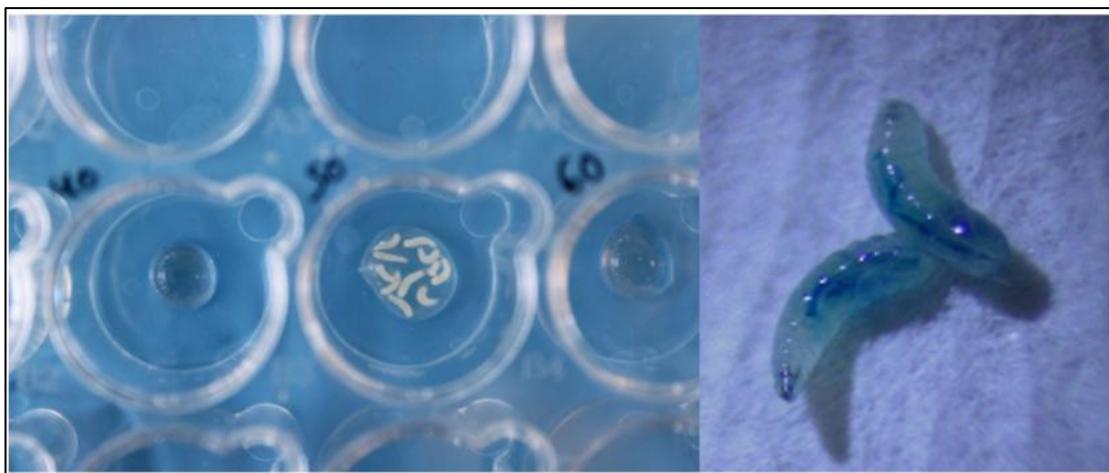
**Πίνακας 2:** Αλληλουχίες εκκινήτων (primers), συμπεριλαμβανομένης της αλληλουχίας του υποκινητή T7 (με κόκκινο χρώμα), που χρησιμοποιήθηκαν για τη σύνθεση των dsRNA.

Τα προϊόντα PCR οπτικοποιήθηκαν σε τζελ αгарόζης 1%, και οι επιθυμητές μπάντες κόπηκαν. Τα προϊόντα PCR ανακτήθηκαν από τα κομμάτια του τζελ και καθαρίστηκαν χρησιμοποιώντας το NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit (Macherey-Nagel), σύμφωνα με τις οδηγίες του kit. Η συγκέντρωση του καθαρισμένου DNA μετρήθηκε με το Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen) χρησιμοποιώντας το Qubit dsDNA BR Assay Kit (Invitrogen, Q32850). Τα dsRNA που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα συντέθηκαν με τη χρήση του MEGAscript® RNAi Kit (Thermo Scientific, AM1626), ακολουθώντας τις οδηγίες του kit. Μετά τη σύνθεση και τον καθαρισμό, τα dsRNA ποσοτικοποιήθηκαν με Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen) χρησιμοποιώντας το Qubit RNA BR Assay Kit (Invitrogen), ενώ η ακεραιότητά τους αξιολογήθηκε μέσω ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αгарόζης 1,7%.

## Μέθοδος χορήγησης των dsRNA μέσω του πεπτικού σωλήνα

Η μέθοδος droplet feeding αποτελεί μια μέθοδο με την οποία τα dsRNA μπορούν να χορηγηθούν εύκολα στις προνύμφες μέσω του πεπτικού σωλήνα. Έχει εφαρμοστεί με επιτυχία σε Coleoptera τα οποία ήταν ικανά να καταναλώσουν το περιεχόμενο των σταγόνων. Στα πειράματά μας, αξιολογήθηκε η αποτελεσματικότητα αυτής της μεθόδου πρώτου χρησιμοποιηθεί, τοποθετώντας τις προνύμφες σε σταγόνες που περιείχαν χυμό μήλου καθώς και μπλε χρώμα ζαχαροπλαστικής. Η επιτυχημένη κατανάλωση επιβεβαιώθηκε με την οπτικοποίηση της μπλε χρωστικής μέσα στις προνύμφες, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 1**. Στην ίδια εικόνα

παρουσιάζεται επίσης ένα παράδειγμα χορήγησης σταγόνας σε προνύμφες 2ου σταδίου.



**Εικόνα 1:** Επιτυχής δοκιμή της μεθόδου πρόσληψης dsRNA μέσω εμβάπτισης των προνυμφών σε σταγόνα που περιέχει χρώμα ζαχαροπλαστικής και χυμό μήλου.

### Ενέσεις σε ενήλικες Μύγες

Οι ενέσεις πραγματοποιήθηκαν σε ενήλικες μύγες ηλικίας 8 ημερών, χρησιμοποιώντας μικτό πληθυσμό αρσενικών και θηλυκών ατόμων, με τη συσκευή Nanoject II Injector (Drummond Scientific Company), ενώ οι μύγες ακινητοποιήθηκαν με χρήση διοξειδίου του άνθρακα (CO<sub>2</sub>). Σε κάθε μύγα ενέθηκαν 64,4 nL dsRNA σε συγκέντρωση 5 μg/μL, που αντιστοιχεί σε συνολική ποσότητα 322 ng dsRNA ανά άτομο. Συνολικά, χρησιμοποιήθηκαν 20 μύγες ανά συνθήκη. Κάθε μύγα αντιπροσώπευε μία ανεξάρτητη βιολογική επανάληψη. Μετά την ένεση, οι μύγες μεταφέρθηκαν σε κλουβιά διαστάσεων 19x19 cm για ανάρρωση και διατηρήθηκαν εκεί μέχρι τη δειγματοληψία.

### Απομόνωση ολικού RNA και ποσοτικοποίηση της έκφρασης των γονιδίων στόχων

Το ολικό RNA απομονώθηκε από τα δείγματα ολόκληρων μυγών χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο TRIzol G™ (AppliChem, A4051), σύμφωνα με τις προτεινόμενες οδηγίες. Η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε στις 24, 48 και 72 ώρες μετά τη χορήγηση του dsRNA, με εξαίρεση το πείραμα σίτισης με χιτοζάνη/dsRNases, όπου τα δείγματα συλλέχθηκαν μόνο στις 24 και 48 ώρες μετά τη χορήγηση του dsRNA. Οι ενήλικες μύγες που είχαν υποστεί ένεση μεταφέρθηκαν σε 200 μL TRIzol G™, ενώ οι προνύμφες 2ου σταδίου σε 50 μL TRIzol G™, και αποθηκεύτηκαν στους -20 °C μέχρι την απομόνωση του RNA. Τα έντομα και των δύο σταδίων ζωής ομογενοποιήθηκαν με τη χρήση πεστλ ενώ προστέθηκε επιπλέον TRIzol G™, ώστε να επιτευχθούν τελικοί όγκοι 500 μL για τις ενήλικες μύγες και 200 μL για τις προνύμφες. Μετά την ομογενοποίηση, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 12.000 g για 5 λεπτά στους 4 °C, για την απομάκρυνση των υπολειμμάτων ιστών. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέο tube και προστέθηκε όγκος χλωροφορμίου ίσος με το 1/5 του αρχικού όγκου. Μετά από φυγοκέντρηση στις 12.000 g για 15 λεπτά στους 4 °C, η πάνω φάση (υδατική) συλλέχθηκε σε νέο σωληνάκι. Στη συνέχεια, προστέθηκε ίσος όγκος ισοπροπανόλης και τα δείγματα επώαστηκαν στους -20 °C για 1 ώρα. Το RNA καταβυθίστηκε με φυγοκέντρηση στη μέγιστη ταχύτητα για 30 λεπτά στους 4 °C. Η πελέτα καθαρίστηκε δύο φορές με αιθανόλη 75%, στέγνωσε πλήρως

και τελικά επαναδιαλύθηκε σε αποστειρωμένο ddH<sub>2</sub>O. Η ποσοτικοποίηση του RNA πραγματοποιήθηκε με φασματοφωτόμετρο Quawell (Q3000). Για την απομάκρυνση του εναπομείναντος DNA, 500 ng ολικού RNA υποβλήθηκαν σε κατεργασία με DNase I, όπως περιγράφεται προηγουμένως. Στη συνέχεια, 10 ng RNA χρησιμοποιήθηκαν ως υπόστρωμα για αντίστροφη μεταγραφή και ποσοτική PCR, με το kit Luna® Universal One-Step RT-qPCR Kit (New England Biolabs, E3005S). Οι αντιδράσεις RT-qPCR που στόχευαν τα 13 γονίδια ενδιαφέροντος καθώς και το γονίδιο αναφοράς *rpl19* (Sagri et al., 2017), πραγματοποιήθηκαν στο μηχάνημα Bio-Rad CFX. Η ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης έγινε με τη μέθοδο Livak (2<sup>-ΔΔCt</sup>). Συνοπτικά, οι τιμές Ct κανονικοποιήθηκαν ως προς την έκφραση του γονιδίου αναφοράς *rpl19*, ώστε να υπολογιστούν οι τιμές ΔCt. Στη συνέχεια, οι τιμές αυτές συγκρίθηκαν με τις τιμές ΔCt των δειγμάτων ελέγχου, για να προκύψουν οι τιμές ΔΔCt και τελικά οι τιμές σχετικής έκφρασης (fold change). Οι αλληλουχίες εκκινητών (primers) παρατίθενται στον **Πίνακα 3**. Οι εκκινητές για την ποσοτικοποίηση των μεταγράφων δεν βρίσκονται στην περιοχή των dsRNA, αλλά εκτός αυτής.

	Target gene	Primer type	qPCR primer sequence 5' → 3'
1	<i>psbt4</i>	Forward	CCAAATATTCCGTGGCAGTTTC
		Reverse	GCCCTTAATCATAGTAGCGAGTG
2	<i>prs4</i>	Forward	AGCGCCTCAGGAACTTATG
		Reverse	GCGGTAATTCGACGGATTCT
3	<i>prs10b</i>	Forward	GACGTTATTAGCCAGAGCAGTAG
		Reverse	CGTGCACTCTCACCAATGTA
4	<i>psbt1</i>	Forward	TCAAACGGAGGATCTATTGTGG
		Reverse	TGTGGATTGTGTAACCACTACTC
5	<i>srp54</i>	Forward	TTATGACTAAGGGTGGTGAACAG
		Reverse	TCTAATTCGCCATCGGACATAC
6	<i>preb</i>	Forward	GTGCAGCGTAGTGATGTAGAAG
		Reverse	GGCCATCTTTTCGAGATTGTGA
7	<i>pnars6</i>	Forward	GGCTGATGTAGAGCTGGTATTG
		Reverse	GCAGTTGAGTGTAAGCAAGAATG
8	<i>pnars1</i>	Forward	GTGCCCTTCAGTTGTTAGTTTG
		Reverse	CAAGCAATACCCAAAGCCATAG
9	<i>eti3a</i>	Forward	AAGGAGCGAGCTTCGTTATAC
		Reverse	AGTGCTAATAGGCGCTTACG
10	<i>sf3b1</i>	Forward	CTCCTTCAATGACACCCTCTTC
		Reverse	GTAATGTGACCTGGAGTGGTATG
11	<i>csb</i>	Forward	TGCACGGACACTGAGTTTAG
		Reverse	GCAAATCGGTGAAGGTTGTG
12	<i>prs7</i>	Forward	CCCGATTTAGAAGGACGTACAC
		Reverse	CACAGTCGTGCAAGCAATTC
13	<i>prs6b</i>	Forward	TTCCCACTGCCTGATAGAAG
		Reverse	GTGCTACGAAATCCTCCAATC

14	<i>RNase1</i>	Forward	GTGCAGACGCCCTTATATTTG
		Reverse	CAATCACGACGCGGAAATAC
15	<i>RNase2</i>	Forward	AACCTCGCGAATGGTACTC
		Reverse	GACCGGTTGTGTGCAAATTC
16	<i>RPL19</i>	Forward	AACAAACGTGTACTGATGG
		Reverse	CACGTACTTTATGTCGTCTG

**Πίνακας 3:** Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τις αντιδράσεις qPCR με σκοπό την ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων-στόχων. Οι εκκινητές για το γονίδιο αναφοράς RPL19 πάρθηκαν από τους Sagri et al. (2017).

### Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων

Για τον προσδιορισμό της στατιστικής σημαντικότητας των διαφορών στα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης, κάθε πειραματική ομάδα συγκρίθηκε με την αντίστοιχη ομάδα ελέγχου (dsGFP). Αρχικά, η κανονικότητα των δεδομένων εξετάστηκε με τη δοκιμή Shapiro–Wilk. Για τα δεδομένα που δεν ακολουθούσαν κανονική κατανομή, οι συγκρίσεις πραγματοποιήθηκαν με τη δοκιμή Wilcoxon rank-sum. Εάν τα δεδομένα και των δύο ομάδων παρουσίαζαν κανονική κατανομή, διενεργήθηκε αρχικά F-test για τον έλεγχο ισότητας των διακυμάνσεων. Στις περιπτώσεις ίσων διακυμάνσεων εφαρμόστηκε το Student's t-test, ενώ σε περιπτώσεις άνισης διακύμανσης εφαρμόστηκε το Welch's t-test.

### Ανίχνευση του dsGFP στο ολικό RNA μετά την ένεση

Για να εξεταστεί εάν το dsGFP μπορεί να ανιχνευθεί σε ενήλικες μύγες στις 24, 48 και 72 ώρες μετά την ένεση, χρησιμοποιήθηκαν ως υπόστρωμα τα δείγματα ολικού RNA που είχαν εξαχθεί από το πείραμα ένεσης. Με χρήση του kit Luna® και εκκινητών qPCR που υβριδίζουν εντός της αλληλουχίας του dsGFP, ανιχνεύτηκε dsGFP το οποίο είχε παραμείνει στις μύγες. Χρησιμοποιήθηκαν τρεις βιολογικές επαναλήψεις και δύο τεχνικές για κάθε αντίδραση. Στην **Εικόνα 2** παρατίθεται η αλληλουχία του dsGFP με τους εκκινητές για την ανίχνευσή του.

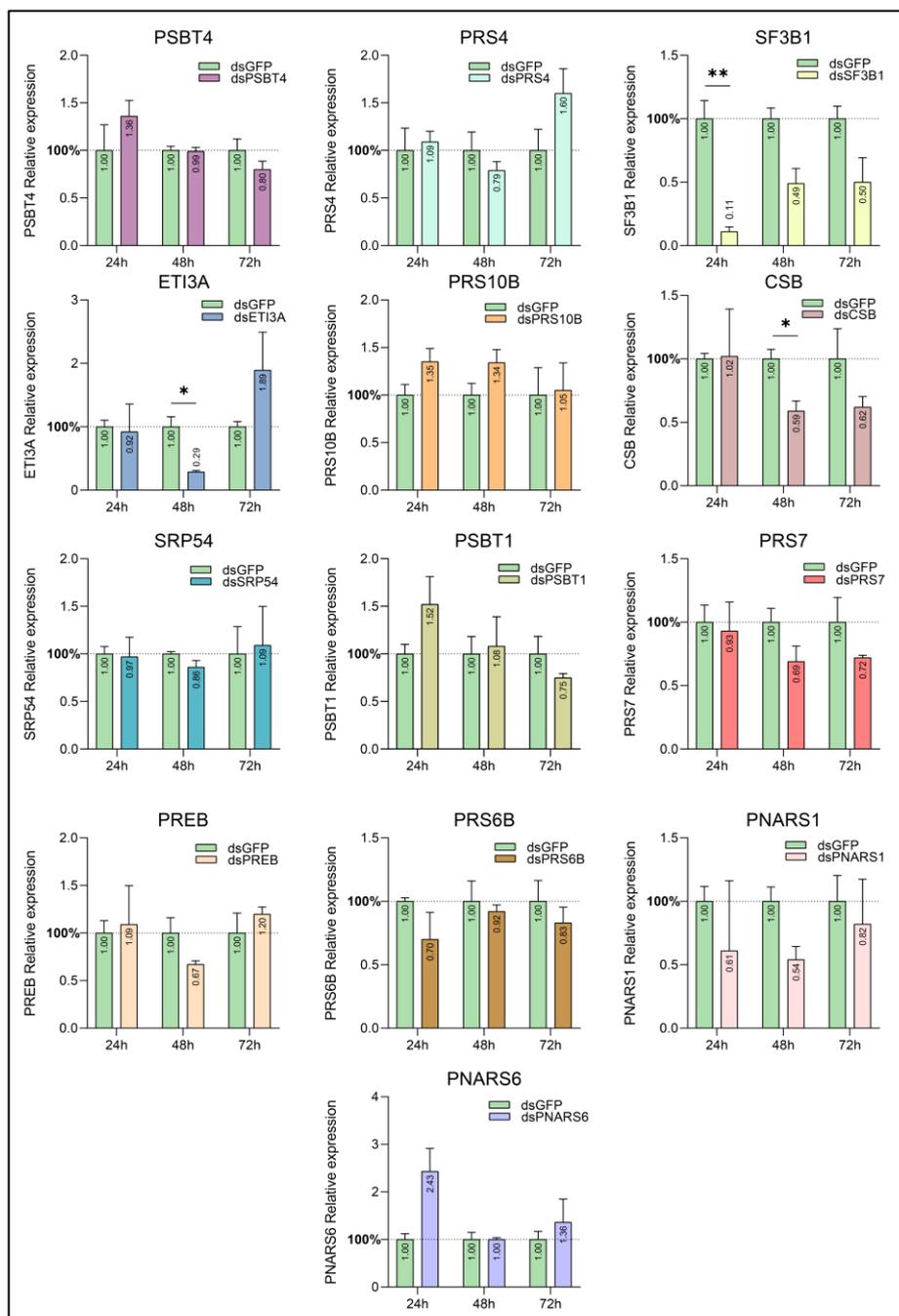
**GFP sequence**  
 TTTTCTGTCAGTGGAGAGGGTGAAGGTGATGCAACATACGGAAAACCTTACCCTTAAATTTATTTGCACTACTGG  
 AAAA**CTACCTGTTCCATGGCCAAC**ACTTGTCACTACTTTCTCTTATGGTGTTCATGCTTTTCAAGATACCCAGA  
 TCATATGAAGCGGCACGACTTCTTCAAGAGCGCCATGCCCTGAGGGA**TACGTGCAGGAGAGGACCAT**CCTTCTT  
 CAAGGACGACGGGAAC TACAAGACACGTGCTGAAGTCAAGTTTGAGGGAGACACCCTCGTCAACAGGATCGAG  
 CTTAAGGGAATCGATTTCAAGGAGGACGGAAACATCCTCGGCCACAAGTTGGAATACAAC TACAAC TCCACAA  
 CGTATACAT**CATGGCCGACAAGCAAAG**AACG

**Εικόνα 2:** Αλληλουχία GFP (αρνητικός μάρτυρας) όπου με σκούρο μαύρο φαίνονται οι εκκινητές για τη σύνθεση του dsGFP και με πράσινο οι εκκινητές για της ποσοτικοποίησή του.

## Αποτελέσματα

### Έλεγχος 13 γονιδίων στόχων

Τα παρακάτω γραφήματα (Εικόνα 3) παρουσιάζουν τα αποτελέσματα του πειράματος για την μελέτη των

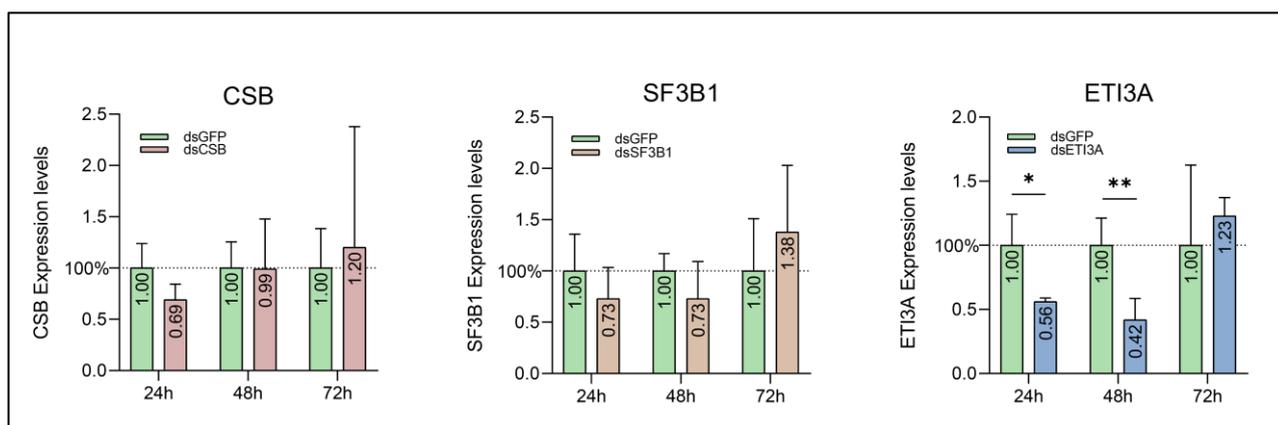


**Εικόνα 3:** Επίπεδα έκφρασης 13 υποψήφιων γονιδίων στόχων μετά από χορήγηση 1 μg dsRNA για 5 ώρες με τη μέθοδο σίτισης μέσω σταγονιδίων (droplet feeding assay). Τα γραφήματα δείχνουν τις μέσες τιμές των επιπέδων της έκφρασης (fold-change) ± τυπικό σφάλμα (Standard Error) από τρεις βιολογικές επαναλήψεις. Η έκφραση των γονιδίων στόχων κανονικοποιήθηκε ως προς το ιδιοσύστατο γονίδιο (housekeeping gene) RPL19. Οι στατιστικές συγκρίσεις πραγματοποιήθηκαν έναντι των αντίστοιχων ομάδων ελέγχου· το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας υποδεικνύεται ως  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*),  $p < 0.001$  (\*\*\*)

επιπέδων έκφρασης για 13 υποψήφια γονίδια-στόχους σε τρεις χρονικές στιγμές δειγματοληψιών: 24, 48 και 72 ώρες μετά τη χορήγηση dsRNA. Οι τιμές της σχετικής έκφρασης (fold change) παρουσιάζονται σε σχέση με την έκφραση των γονιδίων-στόχων στη συνθήκη αρνητικού μάρτυρα dsGFP, για κάθε αντίστοιχο χρονική στιγμή δειγματοληψίας. Κάθε ομάδα αποτελείται από 3 βιολογικές επαναλήψεις, και στα γραφήματα παρουσιάζονται οι μέσες τιμές των τριών επαναλήψεων με το τυπικό τους σφάλμα (Standard Error). Από τα γονίδια που εξετάστηκαν, μόνο τρία εμφάνισαν στατιστικά σημαντική μείωση στα επίπεδα έκφρασης: το *SF3B1* στις 24 ώρες με μείωση κατά 89%, το *ET13A* στις 48 ώρες με μείωση κατά 71% και το *CSB* στις 48 ώρες με μείωση κατά 41%, σε σχέση με την έκφραση τους στην αντίστοιχη dsGFP συνθήκη control, η οποία ορίζεται ως 100%. Όλες οι τιμές Ct των γονιδίων-στόχων κανονικοποιήθηκαν εξ' αρχής ως προς την έκφραση του ιδιοσυστατου γονιδίου (housekeeping gene) *RPL19*.

## Ενέσεις σε ενήλικα

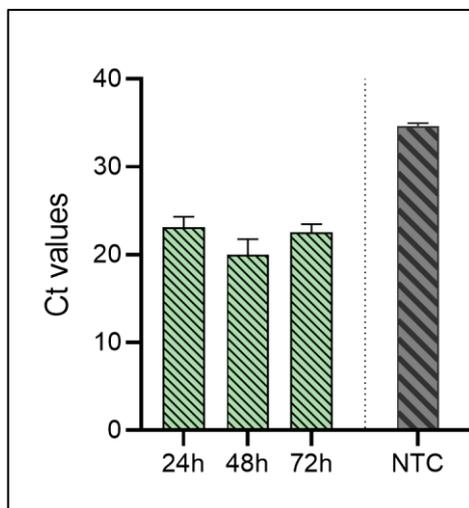
Στη συνέχεια, τα τρία υποσχόμενα γονίδια-στόχοι στοχεύθηκαν με την έγχυση των dsRNA. Στην **Εικόνα 4** παρουσιάζονται τα επίπεδα έκφρασης στα ίδια 3 χρονικά σημεία όπως και προηγουμένως.



**Εικόνα 4.** Αποτελέσματα σίγησης των τριών υποψήφιων γονιδίων-στόχων ύστερα από ένεση 322ng dsRNA σε ενήλικες μύγες *Ceratitis capitata*. Κάθε ράβδος αντιπροσωπεύει τις μέσες τιμές των 3 βιολογικών επαναλήψεων με τα αντίστοιχα error bars. Στατιστική ανάλυση κάθε μεταχείρισης σε σύγκριση με τον αντίστοιχο μάρτυρα, με τα αστέρια να υποδηλώνουν τη στατιστική σημαντικότητα (\* p-value < 0,05, \*\* p-value < 0,01, \*\*\* p-value < 0,001). Οι τιμές Ct των γονιδίων-στόχων κανονικοποιήθηκαν ως προς το ιδιοσυστατο γονίδιο *RPL19*.

Τα γραφήματα δείχνουν τις μέσες τιμές 4 βιολογικών επαναλήψεων και το τυπικό σφάλμα τους. Όλες οι τιμές Ct των γονιδίων-στόχων κανονικοποιήθηκαν ως προς το γονίδιο *RPL19*. Στατιστικά σημαντική μείωση στα επίπεδα έκφρασης παρατηρείται για το γονίδιο-στόχο *ET13A* 24 και 48 ώρες μετά την ένεση, με μείωση 44% και 58% αντίστοιχα, σε σχέση με την έκφραση στις ομάδες ελέγχου dsGFP. Ωστόσο, η μείωση στα επίπεδα έκφρασης αποκαθίσταται 72 ώρες μετά την ένεση. Μια τάση προς μείωση της έκφρασης παρατηρείται επίσης για τα άλλα δύο γονίδια στα πρώτα χρονικά σημεία, χωρίς όμως να είναι στατιστικά σημαντική. Προσπαθήσαμε επίσης να ανιχνεύσουμε με qPCR το dsGFP στα δείγματα που αυτό εφαρμόστηκε προκειμένου να διαπιστώσουμε εάν ανιχνεύεται και στα τρία χρονικά σημεία μετά την ένεση. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήσαμε το συνολικό RNA του σώματος των μυγών στις οποίες έγινε η ένεση, και το οποίο χρησιμοποιήθηκε νωρίτερα για τον προσδιορισμό των επιπέδων έκφρασης. Στην Εικόνα μπορούν να

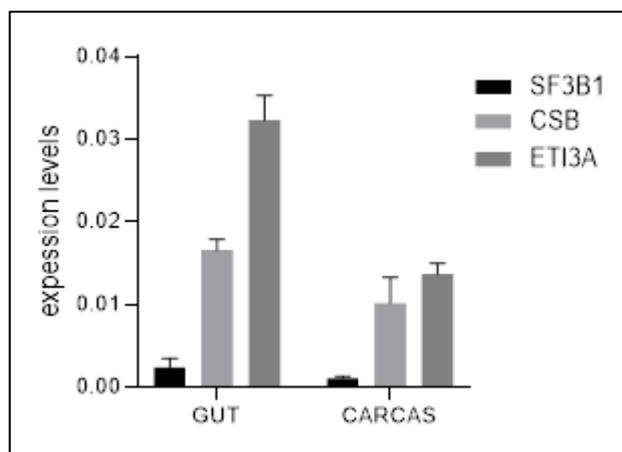
παρατηρηθούν οι τιμές Ct της qPCR χρησιμοποιώντας το Luna® Universal One-Step RT-qPCR Kit (New England Biolabs, E3005S). Παρατηρούμε τους κύκλους της qPCR να παραμένουν σταθεροί- 20 έως 23 κύκλοι- από 24 έως 72 ώρες μετά την ένεση (**Εικόνα 5**).



**Εικόνα 5:** Τιμές κύκλων qPCR (Ct) που προκύπτουν από το συνολικό RNA των ενεμένων μυγών, 24, 48 και 72 ώρες μετά την ένεση. Οι ράβδοι δείχνουν το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου.

### Έκφραση των τριών γονιδίων στόχων στο έντερο προνυμφών της Μύγας

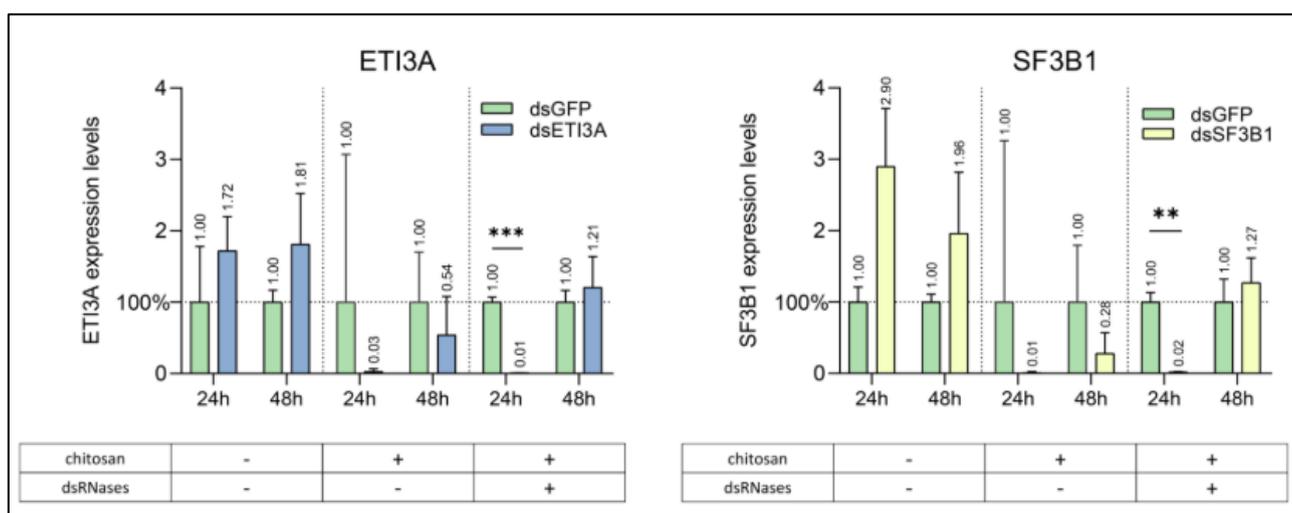
Για να καταλάβουμε καλύτερα το πώς δρουν τα 3 αυτά dsRNA που χρησιμοποιήσαμε, ελέγξαμε με qPCR αν εκφράζονται στο έντερο των προνυμφών καθώς και στο υπόλοιπο σώμα. Όπως φαίνεται στο γράφημα (**Εικόνα 6**), το γονίδιο *SF3B1* έχει τα χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης στο έντερο, ακολουθούμενο από το *CSB* και το *ET13A*, που έχουν υψηλότερη έκφραση. Για το συγκεκριμένο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν 3 βιολογικές επαναλήψεις και η έκφραση κανονικοποιήθηκε ως προς το ιδιοσύστατο γονίδιο *RPL19*.



**Εικόνα 6:** Επίπεδα έκφρασης των 3 γονιδίων-στόχων της *Ceratitis capitata*, σε δείγματα εντέρου και του υπόλοιπου σώματος (carcas). Χρησιμοποιήθηκαν 3 βιολογικές επαναλήψεις και οι τιμές Ct κανονικοποιήθηκαν ως προς την έκφραση του ιδιοσύστατου γονιδίου *RPL19*. Κάθε βιολογική επανάληψη περιέχει τα έντερα και το υπόλοιπο σώμα (carcas) από 2 προνύμφες.

## Χρήση χιτοζάνης και ταυτόχρονη σίγηση RNAsών του εντέρου

Από τα τρία γονίδια-στόχους που παρουσίασαν στατιστικά σημαντική μείωση στα επίπεδα έκφρασης, τα δύο που παρουσίασαν τη μεγαλύτερη μείωση (*ETI3A* και *SF3B1*) επιλέχθηκαν για να στοχευθούν εκ νέου χρησιμοποιώντας χιτοζάνη καθώς και ταυτόχρονη σίγηση των εντερικών RNAsών. Στα παρακάτω γραφήματα (**Εικόνα 7**) παρατηρούμε μια στατιστικά σημαντική μείωση στα επίπεδα έκφρασης, όταν οι προνύμφες τρέφονται ταυτόχρονα με dsRNases και χιτοζάνη. Αυτή η σίγηση παρατηρείται όμως μόνο 24 ώρες μετά τη χορήγηση dsRNA και τα επίπεδα έκφρασης φαίνεται να επανέρχονται στα φυσιολογικά επίπεδα 48 ώρες μετά τη χορήγηση. Είναι ενδιαφέρον ότι το ίδιο αποτέλεσμα παρατηρείται και για τα δύο γονίδια-στόχους.



**Εικόνα 7:** Αποτελέσματα πειράματος σίγησης 2 γονιδίων στόχων με ταυτόχρονη σίγηση των εντερικών RNAsών καθώς και χρήση χιτοζάνης.

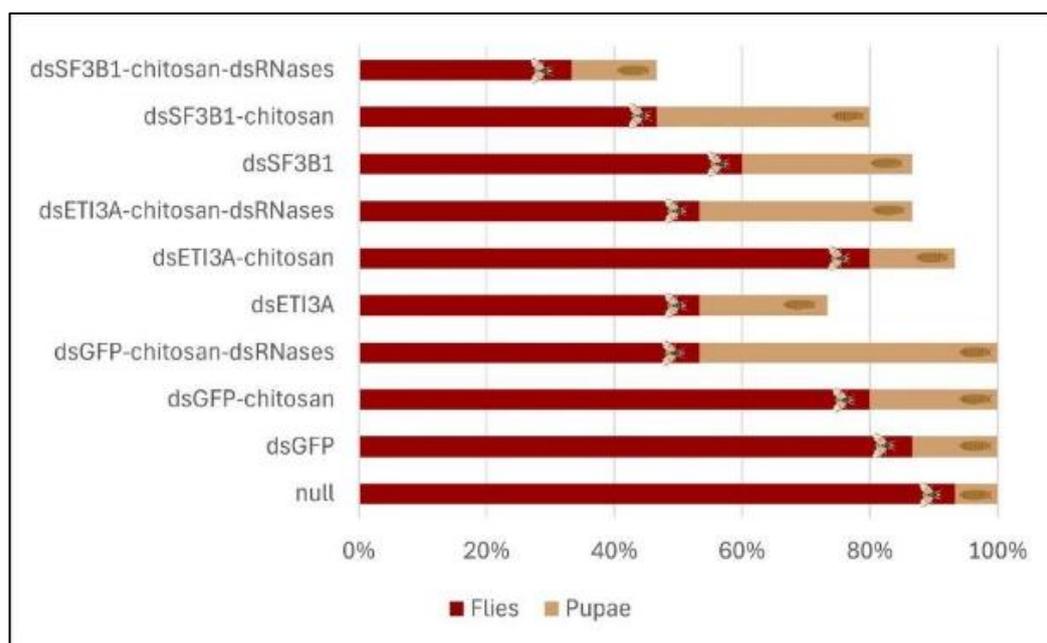
Στο αρχικό πείραμα στόχευσης των 13 γονιδίων, κάθε σταγόνα περιείχε 1 μg dsRNA αραιωμένο σε φρεσκοπαρασκευασμένο χυμό μήλου, σε τελικό όγκο 50 μL. Για τα πειράματα με χιτοζάνη-dsRNases, οι ποσότητες dsRNA και χιτοζάνης που χρησιμοποιήθηκαν ανά σταγονίδιο αναφέρονται στον **Πίνακα 4**. Κάθε σταγονίδιο περιείχε 15 προνύμφες. Η χιτοζάνη (Sigma-Aldrich, C3646, ≥75% αποακετυλιωμένη) διαλύθηκε σε 0,1 M ρυθμιστικό διάλυμα οξικού νατρίου για την παρασκευή διαλύματος συγκέντρωσης 0,02% (w/v), σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται από Katas & Alpar (2006). Παράλληλα, το dsRNA αραιώθηκε σε ίσο όγκο 0,1 M θεικού νατρίου. Τα δύο διαλύματα αναμίχθηκαν, ώστε να επιτευχθεί αναλογία μάζας χιτοζάνης:dsRNA 5:1. Το μείγμα επωάστηκε στους 55 °C για 2 λεπτά και στη συνέχεια υποβλήθηκε σε έντονο vortexing για 1 λεπτό, προκειμένου να διευκολυνθεί ο σχηματισμός νανοσωματιδίων χιτοζάνης/dsRNA. Για την απόκτηση των προνυμφών, τα αυγά συλλέχθηκαν την ημέρα 0 και μεταφέρθηκαν στη κλασική προνυμφική διαίτα. Μετά από τέσσερις ημέρες ανάπτυξης, οι προνύμφες δεύτερου σταδίου υποβλήθηκαν σε περίοδο πείνας 1 ώρας πριν από το πείραμα σίπησης dsRNA. Μετά από 5 ώρες έκθεσης στα dsRNA σταγονίδια, οι προνύμφες μεταφέρθηκαν πίσω στη φυσιολογική τους διαίτα, όπου παρέμειναν έως τη δειγματοληψία. Κάθε σταγονίδιο (50 μL ή 100 μL) περιείχε 15 προνύμφες 2ου σταδίου. Όταν απαιτήθηκε μεγαλύτερος αριθμός προνυμφών, χρησιμοποιήθηκαν περισσότερα σταγονίδια υπό ίδιες συνθήκες. Για το πείραμα φαινοτύπου, μετά τη σίπηση με σταγονίδια, οι προνύμφες επανήλθαν στην κανονική τους διαίτα και

εκτράφηκαν μέχρι τη νύμφωση. Καταγράφηκε ο αριθμός των νυμφών, οι οποίες στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε μικρά κλουβιά. Μετά την εμφάνιση των ακμαίων, καταγράφηκε και ο αριθμός των ενήλικων μυγών.

		μg dsRNA in sodium sulfate 0,1M	μl dsRNA in sodium sulfate 0,1M	μg chitosan in 0,02% in sodium acetate 0,1M	μl chitosan in 0,02% in sodium acetate 0,1M	μl apple juice	Final ul
conditions	dsTARGET	1	7,8	-	-	42,2	50
	dsTARGET + chitosan	1	7,8	5	25	17,2	50
	dsTARGET + chitosan + dsRNases	1+1	24,2	10	50	25,8	100
	NULL	-	-	-	-	50	50

**Πίνακας 4:** Ποσότητες και όγκοι που χρησιμοποιήθηκαν για την χρήση χιτοζάνης και dsRNA έναντι των εντερικών RNάσων μαζί με τα dsRNA των γονιδίων στόχων.

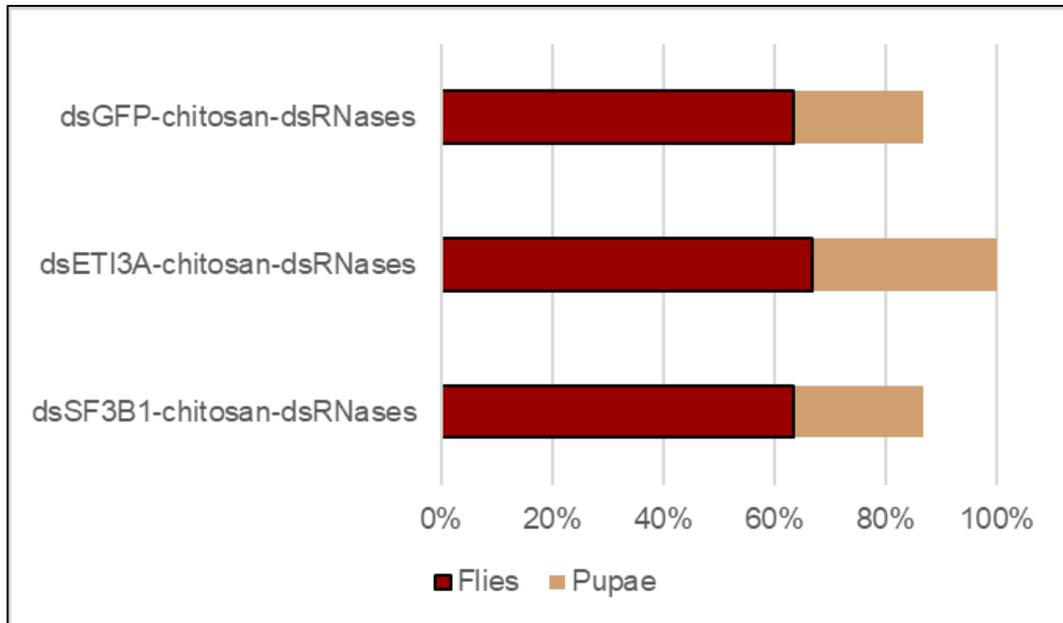
Όσον αφορά τη φαινοτυπική ανάλυση, μετρήθηκαν δύο παράμετροι: ο αριθμός των νυμφών που δημιουργήθηκαν επιτυχώς από τις προνύμφες και ο αριθμός των ενήλικων μυγών που εκκολάφθηκαν επιτυχώς από τις νύμφες αυτές. Παρατηρούμε μείωση στον αριθμό τόσο των προνυμφών που έγιναν νύμφες όσο και των ενήλικων που προέκυψαν από αυτές, σε σχέση με τη συνθήκη αρνητικού μάρτυρα (dsGFP) (**Εικόνα 8**). Συγκεκριμένα, από τις 15 προνύμφες, όλες κατάφεραν να γίνουν νύμφες σε όλες τις συνθήκες control (null/untrated, dsGFP-chitosan, dsGFP-chitosan-dsRNases), ενώ παρατηρείται μείωση σε όλες τις συνθήκες όπου στοχεύονται γονίδια, με και χωρίς χιτοζάνη, με και χωρίς dsRNases. Παρατηρείται ακόμη μείωση στον αριθμό των εκκολαπτόμενων μυγών σε σχέση με τους μάρτυρες (**Εικόνα 8**).



**Εικόνα 8:** Μέτρηση φαινοτύπου στα αναπτυξιακά στάδια της Μύγας της Μεσογείου, *Ceratitis capitata*, ύστερα από χορήγηση dsRNA για τα 2 γονίδια στόχους και για τις εντερικές RNάσες καθώς και με χρήση χιτοζάνης.

Το πείραμα επαναλήφθηκε με διπλάσιο αριθμό προνυμφών (30 άτομα) για τις ακόλουθες συνθήκες: dsGFP-

chitosan-dsRNases (αρνητικός μάρτυρας), dsETI3A chitosan-dsRNases , dsSF3B1 chitosan-dsRNases. Στο συγκεκριμένο πείραμα δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στον αριθμό των νυμφών και των ενήλικων μυγών σε σχέση με το control (**Εικόνα 9**).



Εικόνα 9: Επανάληψη του πειράματος για τις συνθήκες χιτοζάνη + dsRNases

### 3 ΣΥΝΟΨΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στο πλαίσιο του έργου και συγκεκριμένα στην ΕΕ3 και για το παραδοτέο **Π.3.6.1** διερευνήσαμε την αποτελεσματικότητα της εξωγενούς εφαρμογής dsRNA στην *Ceratitis capitata*, ένα δίπτερο στο οποίο η εφαρμογή της τεχνολογίας αυτής παραμένει ιδιαίτερα δύσκολη κυρίως λόγω των νουκλεασών που αποδομούν το χορηγούμενο dsRNA (Volpe et al. 2024; Ortolá et al. 2024). **Από τα 13 υποψήφια γονίδια που στοχεύτηκαν, μόνο τρία (*sf3b1*, *eti3a*, *csb*) εμφάνισαν στατιστικά σημαντική μείωση στην έκφρασή τους**, γεγονός που επιβεβαιώνει ότι η σίγηση μέσω στοματικής χορήγησης dsRNA είναι περιορισμένη και παροδική. Επιπλέον, οι ενέσεις σε ενήλικα επιβεβαίωσαν τη δυνατότητα σίγησης των γονιδίων. Ιδιαίτερα το γονίδιο *eti3a* φαίνεται να παρουσιάζει τα υψηλότερα ποσοστά σίγησης, τα οποία όμως όπως και στην περίπτωση της στοματικής χορήγησης επανέρχονται στις 72 ώρες μετά την ένεση. Η χαμηλή αποτελεσματικότητα που παρατηρείται στα δίπτερα στα λεπιδόπτερα συγκριτικά με τα κολεόπτερα, όπου η RNAi έχει εφαρμοστεί με επιτυχία, αποδίδεται κυρίως στη δράση RNAσών. **Η χρήση χιτοζάνης και ταυτόχρονη σίγηση RNAσών βελτίωσαν τη σίγηση μόνο βραχυπρόθεσμα (24 ώρες μετά τη χορήγηση)** υποδηλώνοντας ότι το αντίξοο εντερικό περιβάλλον εξακολουθεί να αποτελεί σημαντικό εμπόδιο. Σε φαινοτυπικό επίπεδο, καταγράφηκε **μείωση στον αριθμό νυμφών και ενηλίκων σε σχέση με τις συνθήκες control**, ωστόσο τα αποτελέσματα αυτά δεν επιβεβαιώθηκαν όταν συγκεκριμένες συνθήκες επαναλήφθηκαν σε μεγαλύτερη κλίμακα. Συνολικά, η μελέτη αναδεικνύει τόσο τις προοπτικές όσο και τους περιορισμούς των RNAi εντομοκτόνων στην *C. capitata*. Η επιτυχία παραμένει χαμηλότερη σε σχέση με τα κολεόπτερα, πιθανώς λόγω εντερικών RNAσών, ενώ η διάρκεια χορήγησης (μόλις 5 ώρες στη δική μας περίπτωση) ενδέχεται να μην ήταν επαρκής για πιο σταθερή σίγηση. Μελλοντικές μελέτες θα μπορούσαν να εστιάσουν στη παρατεταμένη χορήγηση dsRNA και στη χρήση πιο αποδοτικών φορέων προστασίας για τη διαχείριση της μύγας της Μεσογείου με φιλικό προς το περιβάλλον τρόπο.

## Βιβλιογραφία

- Buer B, Dönitz J, Milner M, Mehlhorn S, Hinners C, Siemanowski-Hrach J, Ulrich JK, Großmann D, Cedden D, Nauen R, Geibel S, Bucher G (2025) Superior target genes and pathways for RNAi-mediated pest control revealed by genome-wide analysis in the beetle *Tribolium castaneum*. *Pest Management Science* 81 (2):1026-1036. doi:<https://doi.org/10.1002/ps.8505>
- Dalakouras A, Koidou V, Papadopoulou K (2024) DsRNA-based pesticides: Considerations for efficiency and risk assessment. *Chemosphere* 352:141530. doi:10.1016/j.chemosphere.2024.141530
- Dalakouras A, Wassenegger M, Dadami E, Ganopoulos I, Pappas ML, Papadopoulou K (2020) Genetically Modified Organism-Free RNA Interference: Exogenous Application of RNA Molecules in Plants. *Plant Physiol* 182 (1):38-50. doi:10.1104/pp.19.00570
- Ortolá B, Urbaneja A, Eiras M, Pérez-Hedo M, Daròs J-A (2024) RNAi-mediated silencing of Mediterranean fruit fly (*Ceratitis capitata*) endogenous genes using orally-supplied double-stranded RNAs produced in *Escherichia coli*. *Pest Management Science* 80 (3):1087-1098. doi:<https://doi.org/10.1002/ps.7839>
- Rao J, Zhang Y, Zhao H, Guo J, Wan F, Xian X, Yang N, Liu W (2024) Projecting the Global Potential Geographical Distribution of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) under Current and Future Climates. *Biology* 13 (3):177
- Ulrich J, Dao VA, Majumdar U, Schmitt-Engel C, Schwirz J, Schultheis D, Ströhlein N, Troelenberg N, Grossmann D, Richter T, Dönitz J, Gerischer L, Leboulle G, Vilcinskas A, Stanke M, Bucher G (2015) Large scale RNAi screen in *Tribolium* reveals novel target genes for pest control and the proteasome as prime target. *BMC Genomics* 16 (1):674. doi:10.1186/s12864-015-1880-y
- Vaucheret H, Voinnet O (2024) The plant siRNA landscape. *Plant Cell* 36 (2):246-275. doi:10.1093/plcell/koad253
- Voinnet O (2025) Three decades of mobile RNA silencing within plants: what have we learnt? *Journal of Experimental Botany*. doi:10.1093/jxb/eraf312
- Volpe G, Mazzucchiello SM, Rosati N, Lucibelli F, Varone M, Baccaro D, Mattei I, Di Lelio I, Becchimanzi A, Giordano E, Salvemini M, Aceto S, Pennacchio F, Saccone G (2024) Simultaneous Silencing of Gut Nucleases and a Vital Target Gene by Adult dsRNA Feeding Enhances RNAi Efficiency and Mortality in *Ceratitis capitata*. *Insects* 15 (9):717