ΕΛΛΗΝΙΚΟ ΜΕΣΟΓΕΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

«ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΤΑ ΕΝΤΟΜΟΚΤΟΝΑ, ΜΕ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΕΣ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΙΣ ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ»

ΛΕΙΒΑΔΑΡΑ ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών

"Εφαρμοσμένη Επιστήμη και Τεχνολογία στη Γεωπονία"

ΦΕΒΡΟΥΑΡΙΟΣ, 2022

ΚΑΘΗΓΗΤΕΣ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

1. ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ: ΡΟΔΙΤΑΚΗΣ ΕΜΜΑΝΟΥΗΛ

ΙΔΡΥΜΑ/ΦΟΡΕΑΣ: ΕΛΛΗΝΙΚΟ ΜΕΣΟΓΕΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

2. ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ: ΑΛΥΣΣΑΝΔΡΑΚΗΣ ΕΛΕΥΘΕΡΙΟΣ

ΙΔΡΥΜΑ/ΦΟΡΕΑΣ: ΕΛΛΗΝΙΚΟ ΜΕΣΟΓΕΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

3. ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ: ΒΟΝΤΑΣ ΙΩΑΝΝΗΣ

ΙΔΡΥΜΑ/ΦΟΡΕΑΣ: ΙΔΡΥΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΕΡΕΥΝΑΣ

ΤΟ ΕΡΓΟ ΑΥΤΟ ΥΛΟΠΟΙΗΘΗΚΕ ΣΤΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΕΝΤΟΜΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟΥ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ (ΙΜΒΒ) ΤΟΥ ΙΔΡΥΜΑΤΟΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΕΡΕΥΝΑΣ (ΙΤΕ) ΚΑΙ ΣΤΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΕΝΤΟΜΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΤΟΥ ΕΛΛΗΝΙΚΟΥ ΜΕΣΟΓΕΙΑΚΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ (ΕΛ.ΜΕ.ΠΑ.) ΥΠΟ ΤΗΝ ΕΠΙΒΛΕΨΗ ΤΩΝ ΡΟΔΙΤΑΚΗ ΕΜΜΑΝΟΥΛ ΚΑΙ ΒΟΝΤΑ ΙΩΑΝΝΗ.

<Αφιερώνω την παρούσα διατριβή στην οικογένεια μου για την ηθική και οικονομική στήριξη καθ’ όλη τη διάρκεια των σπουδών μου>

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα Μεταπτυχιακή Διατριβή ξεκίνησε και ολοκληρώθηκε στο Εργαστήριο Μοριακής Εντομολογίας του Τμήματος Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας (ΙΜΒΒ) του Ιδρύματος Τεχνολογίας και Έρευνας (ΙΤΕ). Αυτή τη στιγμή που το έργο έχει ολοκληρωθεί, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους καθηγητές μου Δρ. Εμμανουήλ Ροδιτάκη και Δρ. Ιωάννη Βόντα για την ευκαιρία που μου έδωσαν αμφότεροι να εργαστώ στα εργαστήρια τους και να προσπαθήσω να φέρω σε πέρας ένα, όπως αποδείχθηκε, δύσκολο έργο. Έπισης θα ήθελα να τους ευχαριστήσω για όλες τις υποδείξεις και συμβουλές τους καθώς και για τη προθυμία και για τις γνώσεις που αποκόμισα.

Επιπρόσθετα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ.Άρη Ηλία για τη μεγάλη βοήθεια που μου προσέφερε σχετικά με τη λήψη των απαραίτητων μετρήσεων και τις γνώσεις σε θέματα μοριακών αναλύσεων.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ ..... **VI**

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ..... **VII**

ΛΙΣΤΑ ΣΥΝΤΟΜΕΥΣΕΩΝ ..... **VIII**

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ..... **IX**

ABSTRACT ..... **X**

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ **11**

1.1 Το λεπιδοπτερο Spodoptera frugiperda 11

1.2 Ευρος ξενιστων 11

1.3 Γεωγραφικη εξαπλωση 12

1.4 Μορφολογια - Βιολογια 12

1.5 Διαχειριση του εντομου Spodoptera frugiperda 15

1.6 Η τεχνολογια CRISPR 17

1.7 Σκοποι της Πτυχιακης Εργασιας 20

2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ **20**

2.1 Καλλιεργεια εντομων 20

2.2 Σχεδιασμος sgRNAs ολιγονουκλεοτιδιων για το γονιδιο Scarlet 22

2.3 Παραγωγη του sgRNA εκμαγειου 23

2.4 In vitro μεταγραφη των sgRNA 24

2.5 Μικροενεσεις εμβρυων του Spodoptera frugiperda 25

3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ **26**

4 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ & ΣΥΖΗΤΗΣΗ **31**

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ **33**

ΛΙΣΤΑ ΣΥΝΤΟΜΕΥΣΕΩΝ

Πίνακας 1: *Οι συντομεύσεις που χρησιμοποιούνται μέσα στο κείμενο και στις Εικόνες / Σχήματα*

Σύντμηση	**Πλήρες όνομα**
DNA	Deoxyribonucleic Acid
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced short Palindromic Repeats
crRNA	CRISPR associated RNA
RNA	Ribonucleic Acid
sgRNA	self-targeting guide RNA
crRNA	CRISPR associated RNA
Cas9	CRISPR associated protein 9

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η γενετική μηχανική αποτελεί ένα απο τους πιο σημαντικούς κλάδους της μοριακής βιολογίας, που επιτρέπει την εις βάθος λειτουργική ανάλυση των βιολογικών μηχανισμών. Από τα πιο δημοφιλή μοριακά εργαλεία της γενετικής μηχανικής των τελευταίων ετών είναι το σύστημα CRISPR/Cas9, το οποίο επιτρέπει την ελεγχόμενη και στοχευμένη τροποποίηση του γονιδιώματος. Η τεχνολογία βασίζεται στην RNA-κατευθυνόμενη στόχευση και δημιουργία θραυσμάτων από την ενδονουκλεάση Cas9 στην επιθυμητή περιοχή του γονιδιώματος. Μέσω της ενεργοποίησης των μηχανισμών επιδιόρθωσης του κυττάρου είναι εφικτά η απαλοιφή μίας γενωμικής περιοχής ή αντικατάσταση αυτής με τεχνητά τμήματα DNA που φέρουν επιθυμητές σημειακές μεταλλαγές. Η μεθοδολογία CRISPR/Cas9 έχει χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα τα τελευταία χρόνια για την απόδειξη συσχέτισης γενότυπου-φαινότυπου. Χαρακτηριστικό παράδειγμα στο χώρο της εντομολογίας αποτελεί η χρήση της τεχνολογίας αυτής σε οργανισμούς μοντέλα (*Drosophila*) με σκοπό τη λειτουργική ανάλυση σημειακών μεταλλαγών σε γονίδια στόχους εντομοκτόνων και τη συνεισφοράς αυτών στο φαινότυπο της ανθεκτικότητας. Παρόλα αυτά, η χρήση του συστήματος CRISPR/Cas9 είναι αρκετά περιορισμένη σε οργανισμούς μη-μοντέλα. Αντικείμενο της παρούσας εργασίας είναι η ανάπτυξης και εφαρμογή της μεθοδολογίας CRISPR/Cas9 στο λεπιδόπτερο *S. frugiperda*, έναν από τους σημαντικότερους εχθρούς των καλλιεργούμενων φυτών. Για το σκοπό αυτό θα γίνει στόχευση του γονιδίου-μάρτυρα Scarlet, διατάραξη του οποίου δίνει φαινότυπο στα ακμαία στάδια των εντόμων. Στόχος της παρούσας εργασίας αποτελεί η ανάπτυξη της μεθοδολογίας της γενετικής τροποποίησης στο *S. frugiperda* (proof of concept) προκειμένου μελλοντικά να χρησιμοποιηθεί για τη διερεύνηση του ρόλου γονιδίων-στόχων στη φυσιολογία των εντόμων.

ABSTRACT

Genetic engineering is one of the most important branches of molecular biology, which allows in-depth functional analysis of biological mechanisms. One of the most popular molecular tools in genetic engineering in recent years is the CRISPR / Cas9 system, which allows controlled and targeted modification of the genome. The technology is based on RNA-directed targeting and generation of Cas9 endonuclease fragments in the desired region of the genome. By activating the cell repair mechanisms, it is possible to delete a genomic region or replace it with artificial DNA fragments that carry desired point mutations. The CRISPR / Cas9 methodology has been used extensively in recent years to demonstrate genotype-phenotype correlation. A typical example in the field of entomology is the use of this technology in model organisms (Drosophila) for the purpose of functional analysis of point mutations in genes of insecticide targets and their contribution to the phenotype of resistance. However, the use of the CRISPR / Cas9 system is quite limited in non-model organizations. The object of the present work is the development and application of the CRISPR / Cas9 methodology in the lepidoptera *Spodoptera frugiperda*, one of the most important enemies of cultivated plants. For this purpose, the Scarlet control gene will be targeted, the disruption of which gives phenotype in the prosperous stages of insects. The aim of the present study is to develop the methodology of genetic modification in *S. frugiperda* (proof of concept) in order to be used in the future to investigate the role of target genes in insect physiology.

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 *Το λεπιδόπτερο Spodoptera frugiperda*

Το λεπιδόπτερο *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith (fall armyworm, FAW) συν. *Laphygma frugiperda* ανήκει στην οικογένεια Noctuidae, στη τάξη Lepidoptera και στην κλάση Insecta (Εικόνα 1) (EPPO 2020). Το έντομο αυτό έχει χαρακτηριστεί ως εχθρός καραντίνας, βρίσκεται στην πρώτη θέση στη λίστα καραντίνας A1 σύμφωνα με τον Ευρωπαϊκό και Μεσογειακό Οργανισμό Φυτοπροστασίας (European and Mediterranean Plant Protection Organization, EPPO).

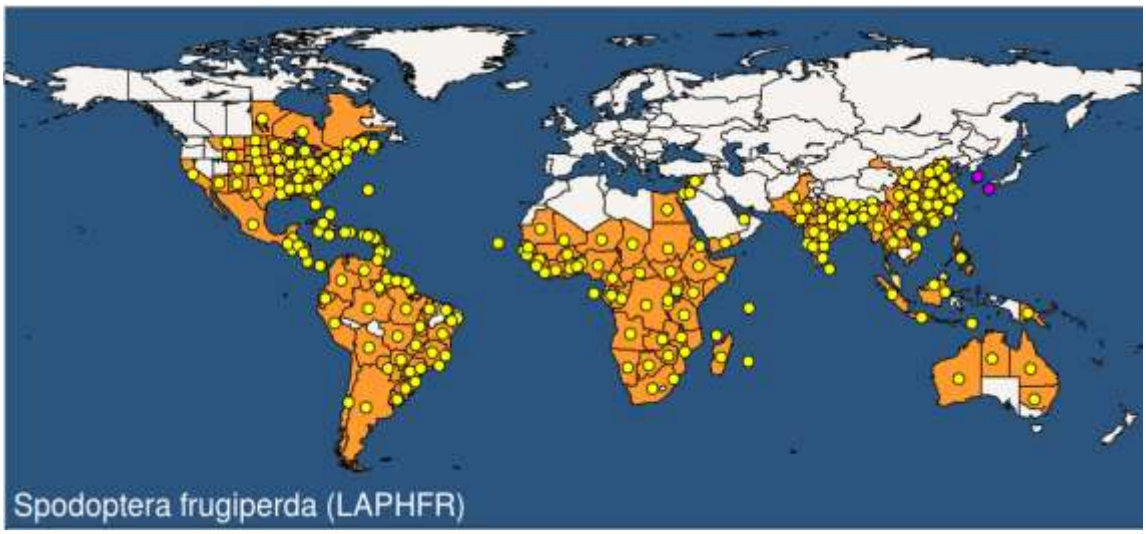
Εικόνα 1. Ακμαία άτομα του εντόμου *Spodoptera frugiperda*. Αριστερά: Θηλυκό άτομο Δεξιά: Αρσενικό άτομο.

1.2 *Εύρος ξενιστών*

Το εν λόγω έντομο θεωρείται εξαιρετικά πολυφάγο φυτοπαράσιτο υψηλής οικονομικής σημασίας, ιδιαίτερα σε συστηματικές καλλιέργειες αραβοσίτου σε παγκόσμιο επίπεδο αφού προκαλεί απώλεια της παραγωγής της τάξεως του 70% όταν υπάρξει προσβολή στα αρχικά στάδια της καλλιέργειας (Guo κ.ά., 2020). Το έντομο παρουσιάζει μια προτίμηση για την οικογένεια Poaceae (Casmuz κ.ά., 2010). Η προσβολή από το έντομο προκαλεί σημαντική μείωση της παραγωγής και σε σημαντικές καλλιέργειες συμπεριλαμβανομένων του βαμβακιού, του ρυζιού, της σόγιας, της τομάτας, της πατάτας, του κρεμμυδιού, του φασολιού και άλλων αφού τρέφονται από διάφορα όργανα των φυτών (Day et al., 2017). Σε μια πρόσφατη εμπεριστατωμένη βιβλιογραφική επισκόπηση των Montezano και συνεργατών (2018) στην Βραζιλία, αναφέρθηκαν 353 είδη φυτών ξενιστών, προερχόμενα από 76 οικογένειες φυτών, κυρίως Poaceae (106), Asteraceae (31) και Fabaceae (31).

1.3 Γεωγραφική εξάπλωση

Το *S. frugiperda* θεωρείται ενδημικό έντομο προερχόμενο από περιοχές της Αμερικής και μέχρι το 2015 δεν είχε η αναφερθεί η παρουσία του σε άλλες περιοχές του κόσμου (Todd και Pool, 1980). Το εν λόγω παράσιτο, αναφέρθηκε για πρώτη φορά το 2016 σε διάφορες περιοχές της Αφρικής, προκαλώντας σοβαρές απώλειες σε φυτά αραβοσίτου (Goergen κ.ά., 2016). Σε λιγότερο από τρία χρόνια το έντομο εξαπλώθηκε σε 44 Αφρικανικές χώρες (Feldmann κ.ά., 2019) καθώς και σε αρκετές Ασιατικές χώρες (Guo κ.ά. 2018). Η γεωγραφική εξάπλωση του εντόμου *S. frugiperda* στη Κίνα καταγράφηκε για πρώτη φορά τον Ιανουάριο του 2019 στην επαρχία Γιουχάν (Zhang κ.ά., 2019). Μέχρι το φθινόπωρο του 2019, είχε εξαπλωθεί σε ολόκληρη τη χώρα και πλέον αποτελεί έναν από τους σοβαρότερους εχθρούς για την καλλιέργεια αραβοσίτου (Jiang κ.ά., 2019). Εκτός από τις χώρες της Αμερικής, της Αφρικής και της Ασίας, το έντομο έχει καταγραφεί και σε περιοχές της Ωκεανίας το 2020 και μέχρι σήμερα συνεχίζει να εξαπλώνεται σε όλη την ήπειρο (CABI 2021). Το έντομο δεν έχει αναφερθεί ποτέ στην Ευρώπη και θεωρείται έντομο καραντίνας υψηλής σημασίας (Εικόνα 2) (CABI 2021, EPPO 2021).



Εικόνα 2. Γεωγραφική εξάπλωση του *Spodoptera frugiperda* (https://gd.eppo.int/taxon/LAPHFR/distribution).

1.4 Μορφολογία - Βιολογία

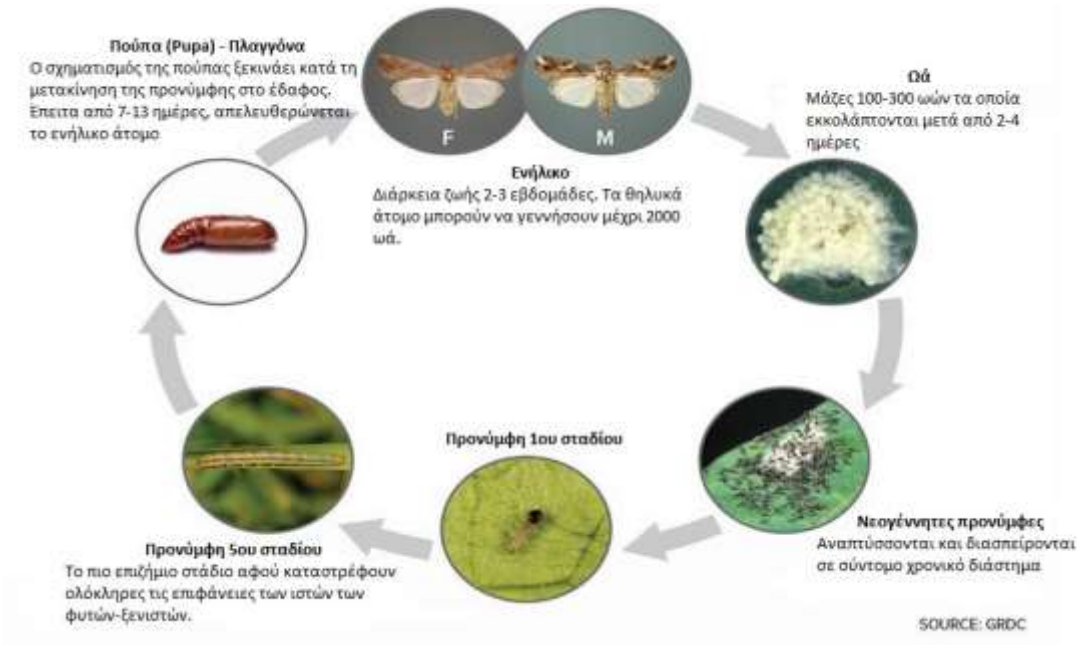
Το έντομο *S. frugiperda* θεωρείται αρκέτα γόνιμο είδος αφού τα θηλυκά άτομα

διαθέτουν την ικανότητα να γεννούν 900 έως 1000 ωά σε σωρούς. Οι σωροί αυτοί αποτελούνται από 100 έως 300 ωά τα οποία καλύπτονται από ένα προστατευτικό στρώμα κοιλιακών τριχιδίων (Johnson, 1987). Το έντομο συνήθως εναποθέτει τους σωρούς με τα ωά την κάτω επιφάνεια των φύλλων, όμως σε περιπτώσεις έντονων προσβολών, τα ωά τοποθετούν σε οποιοδήποτε σημείο επάνω στο εκάστοτε φυτό ξενιστή (Sparks, 1979). Οι προνύμφες προκαλούν ζημιές αφού μέσω των μασητικών στοματικών τους μορίων, τρέφονται με το φύλλωμα των φυτών. Αρχικά, οι νεαρές προνύμφες καταναλώνουν τους ιστούς των φύλλων από τη μία πλευρά, αφήνοντας το αντίθετο επιδερμικό στρώμα ανέπαφο. Στη συνέχεια από το 2^{ο} ή το 3^{ο} στάδιο τους οι προνύμφες αρχίζουν να δημιουργούν οπές στα φύλλα τρώγοντας τα από έξω προς τα μέσα. Καθώς αναπτύσσονται αποκτούν κανιβαλιστική συμπεριφορά με αποτέλεσμα τη μείωση του πληθυσμού τους. Οι παλαιότερες προνύμφες προκαλούν μέχρι και φυλλόπτωση, αφού απομένει μόνο ο μίσχος και τα νεύρα του φύλλου (Εικόνα 3). Επίσης, είναι ικανές να προσβάλλουν και το ακραίο μερίστωμα των φυτών, με αποτέλεσμα τον τερματισμό του αναπτυξιακού δυναμικού του φυτού. Το έντομο έχει την ικανότητα να προσβάλλει το σπάδικα του αραβόσιτου και να τραφεί με τα σπέρματα του με τον ίδιο τρόπο που το εν λόγω φυτό προσβάλλεται από το σκουλήκι του καλαμποκιού το *Helicoverpa zea.*

Εικόνα 3*:* **Αριστερά:** Φυτό αραβόσιτου και **Δεξιά:** Φυτό βαμβακιού προσβεβλημένα από το έντομο *Spodoptera frugiperda* (Paul Choate, Πανεπιστήμιο της Φλώριντα.

Τα ωά του εντόμου έχουν σχήμα θόλου και έχουν διάμετρο 0.4 mm ενώ το ύψος τους φτάνει τα 0.3mm. Το χρώμα τους είναι ανοιχτό κίτρινο έως κρεμώδης κατά τη στιγμή της ωοτοκίας και γίνονται ανοιχτό καφέ πριν από την εκκόλαψη. Τα ωά, σε εύρος θερμοκρασιών από 20° C έως 30° C, εκκολάπτονται έπειτα από 2-4 ημέρες. Οι προνύμφες χρώματος ανοιχτού πράσινου έως σκούρο καφέ με διαμήκεις ρίγες. Οι προνύμφες $6^{ου}$ σταδίου μπορούν να φθάσουν σε μήκος τα 4.5 cm και έχουν οκτώ ψευδοπόδια καθώς και ένα ζεύγος κοιλιακών ψευδοποδιών στο τελευταίο τμήμα. Κατά την εκκόλαψη, οι προνύμφες έχουν χρώμα πράσινο με μαύρες γραμμές και κηλίδες και καθώς αναπτύσσονται είτε παραμένουν πράσινες είτε γίνονται σκούρες καφέ με μαύρες γραμμές. Η πούπα χρώματος καφέ και λίγο πριν την εκκόλαψη του ακμαίου το χρώμα τους γίνεται σκούρο καφέ έως μαύρο. Το σχήμα της είναι οβάλ και το μήκος της φθάνει τα 20-30mm. Τα ενήλικα άτομα δραστηριοποιούνται έντονα κατά τη διάρκεια ζεστών και υγρών νυχτών, αφού θεωρούνται νυκτόβιοι οργανισμού, ενώ η διάρκεια ζωής ενός ενήλικου ατόμου *S. frugiperda* φτάνει έως και τις 21 ημέρες (Capinera, 2002).

Ο βιολογικός κύκλος του *S. frugiperda* ποικίλει ανάλογα την εποχή. Ο πιο σύντομος κύκλος λαμβάνει χώρα το καλοκαίρι, όπου ολοκληρώνεται σε 30 περίπου ημέρες, την άνοιξη και το φθινόπωρο σε 60 ημέρες ενώ φτάνει έως και 80 με 90 ημέρες κατά τη διάρκεια του χειμώνα (Εικόνα 4) (Capinera, 2002).



Εικόνα 4. Βιολογικός κύκλος του εντόμου *Spodoptera frugiperda*.

1.5 Διαχείριση του εντόμου Spodoptera frugiperda

Για το εν λόγω έντομο η διαθέσιμη βιβλιογραφία για τη διαχείριση του είναι εκτεταμένη λόγω της οικονομικής βαρύτητας που προκαλεί η προσβολή του σε φυτά με οικονομική βαρύτητα, όπως ο αραβόσιτος, και λόγω της ανάπτυξης ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα που εμφανίστηκε από την αλόγιστη χρήση χημικών ενώσεων. Όμως, το κλειδί για την επιτυχημένη διαχείριση για μεταναστευτικά έντομα εισβολείς, είναι η παρακολούθηση του πληθυσμού τους για την πρόληψη της ενδεχόμενης προσβολής της καλλιέργειας. Οι ενέργειες αυτές θα πρέπει να ληφθούν βάσει παραμέτρων ελαχίστου κόστους, έτσι ώστε ο πληθυσμός του εντόμου να διατηρηθεί κάτω από το επίπεδο οικονομικού κατωφλίου (Wan Jing κ. ά., 2021). Αυτό μπορεί να επιτευχθεί διαμέσου προγραμμάτων επιτήρησης για έντομα καραντίνας, εφαρμόζοντας κατάλληλα προγράμματα εκρίζωσης (eradication) σε ενδεχόμενη είσοδο του εντόμου σε μια νέα χώρα (Watson και Mifsud, 2017). Παρακάτω, ενδείκνυνται τρόποι διαχείρισης σε περιπτώσεις που το έντομο αποτελεί ήδη πρόβλημα για μια γεωγραφική περιοχή.

Καλλιεργητικές τεχνικές

Για τους μικροκαλλιεργητές, μια σειρά καλλιεργητικών μέτρων αποτελούν μια πολύ αποτελεσματική και οικονομική στρατηγική στα πλαίσια της ολοκληρωμένης διαχείρισης του *S. frugiperda*. Αυτές οι γεωργικές προσεγγίσεις βασίζονται στις πολύπλοκες αλληλεπιδράσεις μεταξύ οργανισμών και περιβάλλοντος για την ανάπτυξη τεχνικών για την ελαχιστοποίηση της ζημίας των παρασίτων στις καλλιέργειες. Κατά τη παραδοσιακή προφύτευση, το βαθύ όργωμα μπορεί να μπορεί να μειώσει τον πληθυσμό του εντόμου αφού οι πλαγγόνες εκτίθενται στην ηλιακή ακτινοβολία και τα πτηνά (Prasanna κ.ά., 2018). Επίσης, η φύτευση διαγονιδιακών – ανθεκτικών ποικιλιών αποτελεί αποτελεσματικό μέτρο για την μείωση των ζημιών που προκαλεί το *S. frugiperda* και αποτελεί και εναλλακτική μέθοδο για την αποφυγή χημικών σκευασμάτων. Από το 2013, ο πιο αποτελεσματικός τρόπος για την αντιμετώπιση του εντόμου ήταν και είναι η χρήση διαγονιακών φυτών που εκφράζουν βακτηριακές πρωτεΐνες Bt (π.χ. Cry1F) (Sieber κ.ά, 2008), όμως η πρώτη αναφορά ανθεκτικότητας του *S. frugiperda*, στην τοξίνη Cry1F, αναφέρθηκε το 2010 στο Πουέρτο Ρίκο (Storer κ.ά., 2010). Άλλοι μηχανικοί ή φυσικοί μέθοδοι συνιστώνται ως επιλογές διαχείρισης

του εντόμου, όπως η καταστροφή των μαζών από ωά και των προνυμφών ή η χρήση στάχτης, άμμου ή πριονιδιού στις θέσεις ανάπτυξης των προνυμφών. Η στρατηγική 'Push & Pull' ('Ωθηση και Έλκυση) αποτελεί μια πολύ χρήσιμη αγροοικολογική μέθοδο για τον έλεγχο εχθρών, όπου τα φυτά ξενιστές αναγνωρίζονται από τα παράσιτα ως ακατάλληλα ή μη ελκυστικά (Push) ενώ παράλληλα έλκονται σε μια μορφή παγίδευσης (Pull), μέσω της χρήση μη τοξικών προϊόντων που επηρεάζουν τα ερεθίσματα των παρασίτων (Cook κ.ά., 2007). Επίσης, η φύτευση φυτών παγίδων ή απωθητικών σε μεγάλες καλλιέργειες μπορεί να μειώσει σημαντικά την προσβολή. Σε πειράματα αγρού, όπου ο αραβόσιτος συγκαλλιεργήθηκε με άλλα φυτά όπως φασόλι, σόγια και αραχίδα, ο πληθυσμός του *S. frugiperda* ήταν μειωμένος έως και 40% (Hailu κ.ά., 2018).

Παρεμπόδιση σύζευξης και φερομόνες φύλου

Η χρήση φερομονών παρουσιάζει πλεονεκτήματα σε σχέση με τα παραδοσιακά εντομοκτόνα, όπως η μη τοξικότητα, η υψηλή εξειδίκευση και η δυνατότητα εφαρμογής ελαχίστων δόσεων. Η πρώτη σημαντική φερομόνη που χρησιμοποιήθηκε έναντι του *S. frugiperda* είναι η (Z)-9-tetradecenyl acetate (Z9-14:OAc), η οποία αναγνωρίστηκε πρώτη φορά το 1967 από τους Sekul και Sparks (1967).

Βιολογική αντιμετώπιση

Το έντομο *S. frugiperda* αποτελεί θήραμα για μεγάλο αριθμό φυσικών εχθρών αφού προσβάλλεται από περισσότερα από 150 είδη παρασιτοειδών (π.χ. *Telonomus* sp., *Chelonus* sp., *Campoletis flavicincta, Winthemia trinitalis, Trichogramma* sp.) (Sisay κ.ά., 2018), από νηματώδεις (Sun κ.ά., 2020), από αρπακτικά έντομα διαφορετικών κατηγοριών (Koffi κ.ά., 2020), από διάφορα είδη ακάρεων (Firake και Behere, 2020) και από εντομοπαθογόνους οργανισμούς, όπως μύκητες (π.χ. *Metarhizium anisopliae, Metarhizium rileyi, Beauveria bassiana*), βακτήρια (π.χ. *Bacillus thuringiensis*) και ιούς (π.χ. *Spodoptera frugiperda* Multicapsid Nucleopolyhedrovirus (SfMNPV) *Spodoptera frugiperda* Nuclear Polyhydrosis Virus (SpfrNPV)) (Shylesha κ.ά., 2018). Οι φυσικοί εχθροί του ευθύνονται για τη σημαντική μείωση του πληθυσμού του έως και 42% στη χώρα προέλευσης του την Αμερική. Στην Αφρική, η απελευθέρωση φυσικών εχθρών μπορεί να επιφέρει καλύτερα αποτελέσματα, αφού η χρήση χημικών εντομοκτόνων ήταν σπάνια σε καλλιέργειες αραβόσιτου πριν την άφιξη του εν λόγω εντόμου και οι φυσικοί εχθροί δεν απειλούνταν από αυτά (Soul-kifouly κ.ά, 2016).

Βιολογικά εντομοκτόνα

Από αρκετά είδη φυτών παράγονται δευτερογενείς μεταβολίτες οι οποίοι είναι απωθητικοί ή τοξικοί για το έντομο *S. frugiperda* και προέρχονται από τα φύλλα, τα άνθη, τους καρπούς, τους σπόρους, το φλοιό και τις ρίζες. Θεωρούνται φιλικά για το περιβάλλον αφού είναι αποτελεσματικά σε χαμηλές συγκεντρώσεις και διαφέρουν στο μηχανισμό δράσης (Bhusal και Chapagain, 2020). Στον Πίνακα 1 παρουσιάζονται φυτά από τα οποία λαμβάνονται αυτές οι ουσίες.

Πίνακας 1. Φυτά από τα οποία προκύπτουν ουσίες που είναι τοξικές για το έντομο *Spodoptera frugiperda* σε συνθήκες αγρού και/ή εργαστηρίου (Yarou κ.ά., 2017).

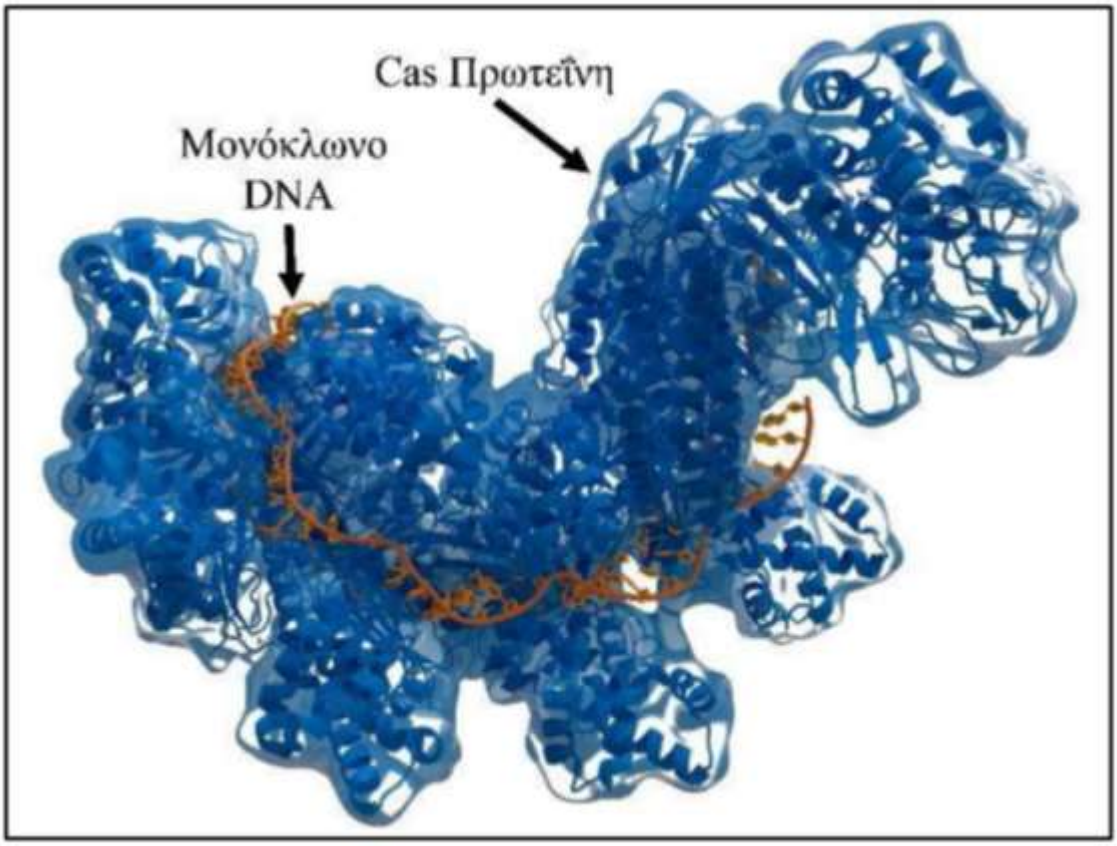
Pesticidal plants	Mortality (%)	Efficacy	Countries
Aloe vera (L.) Burm.f.	23	Lab & field	Malawi
Azadirachta indica A.Juss.	60-98	Lab & field	Ethiopia, Malawi, Benin
Capsicum annuum L.	Unknown	Field	Burkina Faso
Cassia nigricans Vahl	Unknown	Field	Burkina Faso
Chenopodium ambrosioides L.	21	Lab	Ethiopia
Cleome viscosa L.	Unknown	Field	Burkina Faso
Croton macrostachyus Hochst. ex Delile	75	Lab	Ethiopia
Cymbopogon citratus (DC.) Stapf	50	Lab & field	Malawi
Eucalyptus globulus Labill.	8	Lab	Ethiopia
Jatropha curcas L.	91	Lab	Ethiopia
Lantana camara L.	10-40	Lab & field	Ethiopia, Malawi
Lippia javanica (Burm.f.) Spreng.	66	Lab & field	Malawi
Melia abyssinica L.	90	Lab	Ethiopia
Millettia ferruginea (Hochst.) Baker	78	Lab	Ethiopia
Nicotiana tabacum L.	50-66	Lab & field	Ethiopia, Malawi
Ocimum basilicum L.	26	Lab & field	Malawi
Parkia biglobosa (Jacq.) G.Don	Unknown	Field	Burkina Faso
Phytolacca dodecandra L'Her.	96	Lab	Ethiopia
Schinus molle L.	96	Lab	Ethiopia
Tephrosia vogelii Hook.f.	< 10	Lab & field	Malawi
Trichilia emetica Vahl	20	Lab & field	Malawi
Vernonia amygdalina Delile	38	Lab & field	Malawi

1.6 Η τεχνολογία CRISPR

Ο όρος *Clustered regularly interspaced short palindromic repeats* (CRISPR) αναφέρεται σε τμήματα προκαρυωτικού DNA τα οποία περιέχουν μικρές, επαναλαμβανόμενες νουκλεοτιδικές αλληλουχίες. Ο μηχανισμός άμυνας των βακτηρίων αποτελείται από αυτές τις αλληλουχίες έναντι σε άλλους μικροοργανισμούς

(Sontheimer και Barrangou, 2015). Όμως, εκτός από αυτή τη λειτουργία τους, αποτελούν τη βάση μιας νέας τεχνολογίας επεξεργασίας του γενώματος, η οποία είναι γνωστή με τον όρο CRISPR/Cas9. Η χρήση αυτής της τεχνολογίας επιτρέπει τη μόνιμη τροποποίηση τμημάτων του γενώματος διαφόρων οργανισμών, συμπεριλαμβανομένου του ανθρώπινου (Zhang κ.ά., 2014) όμως έπειτα από πειράματα που έλαβαν μέρος στο πλαίσιο της γονιδιακής προώθησης (gene drives) με τη χρήση του συστήματος CRISPR/Cas9 ήταν αδύνατη η εγκαθίδρυση της μετάλλαξης σε ποσοστό 100% σε διαδοχικές γενεές (Hammond κ.ά., 2016) καταλήγοντας στο συμπέρασμα πως η τεχνολογία CRISPR/Cas9 προκαλεί στοχευμένη αλλαγή του γενώματος. Οι αλληλουχίες αυτές όντας παλίνδρομες, έχουν την ίδια σειρά νουκλεοτιδίων και από τις δύο πλευρές, δηλαδή κάθε επανάληψη ακολουθείται από μικρά τμήματα DNA, τα οποία ονομάζονται spacer-DNA και προέρχονται από την έκθεση του μικροοργανισμού σε προγενέστερες επιθέσεις άλλων οργανισμών. Επιπλέον, κοντά στις αλληλουχίες CRISPR παρεβρίσκονται μικρές συστάδες CAS γονιδίων.

Η ανακάλυψη των CRISPR αλληλουχιών έγινε στην Οσάκα το 1987 και μεταγενέστερα στην Ολλανδία και την Ισπανία το 1993. Μια βασική ανακάλυψη αφορούσε στην παρουσία γονιδίων CAS, τα οποία έδειξαν ότι κωδικοποιούσαν πρωτεΐνες με δομή προσομοιάζουσα τις ελικάσες και νουκλεάσες. Η βασική λειτουργία του μηχανισμού ανοσίας σε ξένο γενωμικό υλικό αρχίζει όταν το ξένο γενωμικό υλικό (π.χ. ενός ιού) εισέρχεται σε ένα βακτήριο. Κομμάτια των CAS πρωτεϊνών (CAS1 και CAS2) προσκολλώνται στο ξένο γένωμα με στόχο να το περιορίσουν και να το τοποθετήσουν εντός της περιοχής των CRISPR αλληλουχιών. Έπειτα, τμήματα RNA μεταγράφονται από αυτές τις περιοχές, τα οποία παρουσιάζουν συμπληρωματικότητα ως προς το ξένο γένωμα και ονομάζονται crRNAs. Τα crRNAs θεωρούνται ο οδηγός των άλλων μελών της οικογένειας των CAS πρωτεϊνών, αφού τα μόρια αυτά σχηματίζουν ένα τεταρτοταγές σύμπλοκο προς δέσμευση του ξένου γονιδιώματος. Κατά την ανίχνευση του ξένου γονιδιώματος, οι πρωτεΐνες CAS το περιορίζουν και κατά συνέπεια να το αδρανοποιούν ως προς το βακτήριο φορέα (Εικόνα 5). Παρόμοια, χρησιμοποιώντας αυτόν το μηχανισμό, ευκαρυωτικά κύτταρα μπορούν να επιμολυνθούν με το επιθυμητό ή ανεπιθύμητο γονίδιο και έτσι να οδηγηθούμε στις επιθυμούμενες αλλαγές στο γένωμα του ξενιστή (Shalem κ.ά., 2014).



Εικόνα 5. Σύμπλοκο CRISPR που μετέχει στη βακτηριακή αντιϊκή άμυνα. Παρουσιάζεται η δομή του συμπλόκου crRNA-«οδηγού» με τη νουκλεάση Cas (μπλε χρώμα) προσδεμένη σε μονόκλωνο DNA (καφέ αλυσίδα) (https://en.wikipedia.org/wiki/CRISPR).

Αυτή η νέα τεχνολογία επεξεργασίας του γονιδιώματος, αρχίζει δυναμικά να εφαρμόζεται σε αρκετούς έμβιους οργανισμούς και κατ' επέκταση σε μεγάλο εύρος επιστημονικών πεδίων, όπως η φαρμακογενωμική, η κτηνοτροφία, η γεωργία, η γονιδιακή θεραπεία κ.ά. Αυτό το γονιδιακό σύστημα επεξεργασίας ξεκίνησε να χρησιμοποιείται για την ακριβή επεξεργασία του γονιδιώματος πολλών ευκαρυωτικών οργανισμών (Cong κ.ά, 2014), συμπεριλαμβανομένων και των εντόμων των τάξεων των Κολεόπτερων (Gilles κ.ά, 2014), Δίπτερων (Basset κ.ά., 2013), Λεπιδόπτερων (Khan κ.ά., 2017) και Ημίπτερων (Xue κ.ά, 2018). Έτσι, με όπλο αυτή τη τεχνική, πραγματοποιούνται γονιδιωματικές μελέτες ειδών μοντέλου και μη για την ανάπτυξη νέων προσεγγίσεων διαχείρισης παρασίτων που βασίζεται στη γενετική (Tanning κ.ά., 2017).

1.7 Σκοποί της Πτυχιακής Εργασίας

Με την ανακάλυψη των προγραμματισμένων νουκλεασών, η γονιδιωματική επεξεργασία αναβαθμίστηκε και ανοίχθηκαν δρόμοι για ευρύτερη εφαρμογή της σε πεδία όπως η πράσινη Βιοτεχνολογία με την παραγωγή διαγονιδιακών οργανισμών με επιθυμητά χαρακτηριστικά (ζώων και φυτών). Ειδικά η ανακάλυψη της τεχνολογίας CRISPR αποτέλεσε σταθμό κεντρίζοντας το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας.

Στόχος της παρούσας εργασίας αποτελεί η ανάπτυξη της μεθοδολογίας της γενετικής τροποποίησης στο έντομο *S. frugiperda,* έναν από τους σημαντικότερους εχθρούς των καλλιεργούμενων φυτών, (proof of concept) προκειμένου μελλοντικά να χρησιμοποιηθεί για τη διερεύνηση του ρόλου γονιδίων-στόχων στη φυσιολογία των εντόμων. Για να το πετύχουμε αυτό θα πρέπει να στοχεύσουμε σε γονίδια στόχους, και θα πραγματοποιηθεί αξιολόγηση για το ρόλο των εν λόγω γονιδίων στη φυσιολογία των εντόμων τα οποία θα μπορούν εν δυνάμει να χρησιμοποιηθούν ως προϊόντα νέων δραστικών ουσιών για την διαχείριση των εντόμων.

2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Εκτροφή εντόμων

Η εκτροφή του πληθυσμού προήλθε από εργαστηριακό πληθυσμό *S. frugiperda* από την Bayer CropScience (Γερμανία). Η εκτροφή ξεκίνησε από αυγά και προνύμφες 1^{ου} σταδίου (Εικόνα 6) του πληθυσμού που διατηρήθηκαν σε δοχεία μαζικά. Τα δοχεία περιείχαν τεχνητή τροφή για λεπιδόπτερα η οποία αποτελούνταν από απεσταγμένο νερό, αγαρόζη, Nipagin (Sigma-Aldrich), σορβικό κάλιο, καλαμποκάλευρο, φύτρο, μαγιά, ασκορβικό οξύ, βιταμίνη και φορμαλδεϋδη.

Εικόνα 6. Προνύμφη 1^{ου} σταδίου του *S. frugiperda*

Η διαδικασίας παραγωγής της τεχνητής τροφής παρουσιάζεται εν συντομία στην συνέχεια: σε σκεύος με 450 ml απεσταγμένο νερό και έως ότου φθάσει το σημείο

βρασμού, προστίθενται 37,5 gr αγαρόζης με συνεχής ανάδευση έως ότου το μείγμα να αρχίζει να πήζει. Εν συνεχεία και συνεχίζοντας την ανάδευση, προστίθενται 2,3 gr Nipagen, 2,8 gr σορβικό κάλιο, 6 gr ασκορβικό οξύ. Όταν το μίγμα είχε ομογενοποιηθεί συνεχίζαμε με την προσθήκη 5 gr βιταμινών και 0,5 ml φορμαλδεϋδη. Τέλος, προστίθενται 50 gr μαγιά, 50 gr φύτρο, 200 gr καλαμποκάλευρο και 500 ml απεσταγμένου νερού. Η ανάδευση συνεχιζόταν μέχρι να ομογενοποιηθούν τα υλικά και το μείγμα να αρχίζει να πήζει. Κατόπιν μεταφέρονταν είτε σε τριβλία Petri διαμέτρου 35 mm μέχρις ότου καλυφθεί η επιφάνεια τους με το υλικό, είτε σε πλαστικά δοχεία μιας χρήσης όγκου 500 ml (Εικόνα 6). Η αποθήκευση της τροφής γίνονταν σε θάλαμο ψύξης 6° C μέχρι να χρησιμοποιηθεί.

Εικόνα 6. Μείγμα τροφής σε πλαστικό δοχείο όγκου 500 ml.

Οι προνύμφες σε ηλικίας 3^{ου} σταδίου μεταφέρονταν μεμονωμένα σε τρυβλία Petri (διαμέτρου 35 mm) με τεχνητή τροφή (Εικόνα 7) για αποφυγή κανιβαλισμού έως ότου φτάσουν στο στάδιο της πούπας. Ακολούθως, οι πούπες συλλέγονταν μαζικά, γινόταν ταυτοποίηση του φύλου, και τοποθετούνταν σε πλαστικά δοχεία που καλύπτοταν με χαρτί κουζίνας προκειμένου να εξέλθουν τα ακμαία και να ξεκινήσει η επόμενη γενιά. Σε κάθε πλαστικά δοχεία τοποθετούνταν 50 αρσενικά και 50 θηλυκά άτομα και χορηγούνταν βαμβάκι εμποτισμένο με 10% ζάχαρη ως πηγή τροφής. Τα ακμαία άτομα μετά την σύζευξη εναποθέτανε ωά μαζικά στο χαρτί (Εικόνα 8) το οποίο ανά δύο μέρες συλλεγόταν και αντικαθίσταντο με καινούριο. Τα ωά τοποθετούνταν σε δοχείο με τροφή προκειμένου να αποτελέσουν την επόμενη γενιά.

Εικόνα 7. Προνύμφη 3^{ου} σταδιού του εντόμου *Spodoptera frugiperda*

Εικόνα 8. Ωά του εντόμου *Spodoptera frugiperda* εναποθετημένα σε σωρό επάνω σε χαρτί.

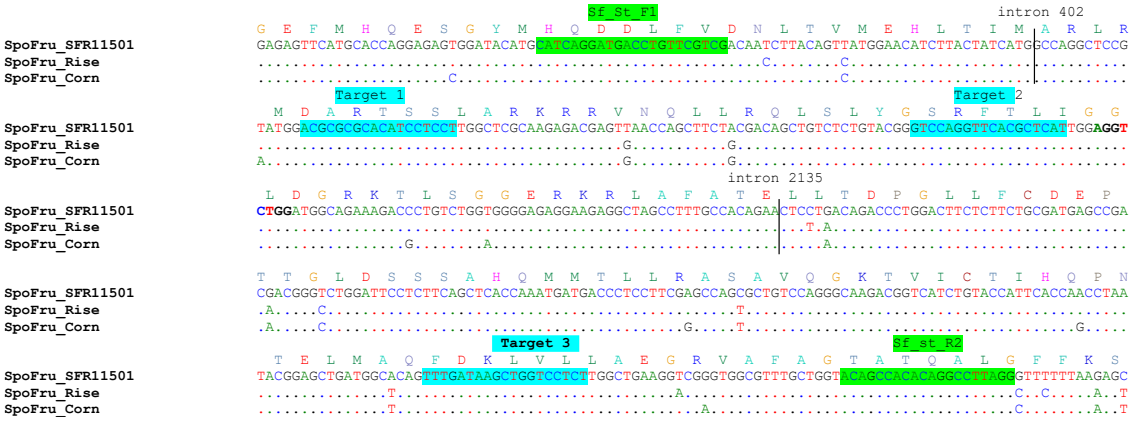
2.2 Σχεδιασμός sgRNAs ολιγονουκλεοτιδίων για το γονίδιο Scarlet

Το εκμαγείο για την sgRNA μεταγραφή πραγματοποιήθηκε μέσω PCR των ολιγονουκλεοτιδίων ειδικού στόχου (CRISPR F) που περιέχει την θέση δέσμευσης της T7 πολυμεράσης, την αλληλουχία στόχου (Target) αλληλουχία συμπληρωματική με τον κοινό reverse εκκινητή (CRISPR_sgR) όπως φαίνεται στον Πίνακα 1. Επιλέχθηκαν συνολικά 3 θέσεις στόχων μέσω της σελίδας (http://targetfinder.flycrispr.neuro.brown.edu/index.php) λαμβάνοντας υπόψιν την παρουσία NGG (PAM) αλληλουχίας και 1 ή δύο G στο 3’ και στο 5’ του γονιδίου πέριξ της ολιγονουκλεοτιδικής αλληλουχίας στόχου (Εικόνα 9). Επιπλέον, σχεδιάστηκαν και εκκινητές που ενισχύουν τμήμα του γονιδίου 455bp και 2992bp χρησιμοποιώντας cDNA και gDNA αντίστοιχα (πίνακας 1).

Πίνακας 1. Εκκινητές που σχεδιάστηκαν για την ενίσχυση του τμήματος του γονιδίου 455 bp και 2992 bp χρησιμοποιώντας cDNA και gDNA.

Κωδικός εκκινητή	**Αλληλουχία 5' – 3'**
Sf_St_F1	CATCAGGATGACCTGTTCGTCG
Sf_St_R2	CCTAAGGCCTGTGTGGCTGT
CRISPR_F1	GAAATTAATACGACTCACTATAGGACGCGCGCACATCCTCCT*GTTTTAGAGCTAGAAATAGC*
CRISPR_F2	GAAATTAATACGACTCACTATAGGGTCCAGGTTCACGCTCAT*GTTTTAGAGCTAGAAATAGC*
CRISPR_F3	GAAATTAATACGACTCACTATAGGTTTGATAAGCTGGTCCTCT*GTTTTAGAGCTAGAAATAGC*
CRISPR sgR	AAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAACGGACTAGCCTTATTTTAACTT*GCTATTT CTAGCTCTAAAAC*

Για τον σχεδιασμό των εκκινητών και την επιλογή των στόχων του CRISPR χρησιμοποιήθηκαν αλληλουχίες του γονιδίου για το είδος από RNAseq δεδομένα που ήταν διαθέσιμα στην βάση δεδομένων του NCBI (Εικόνα 9).

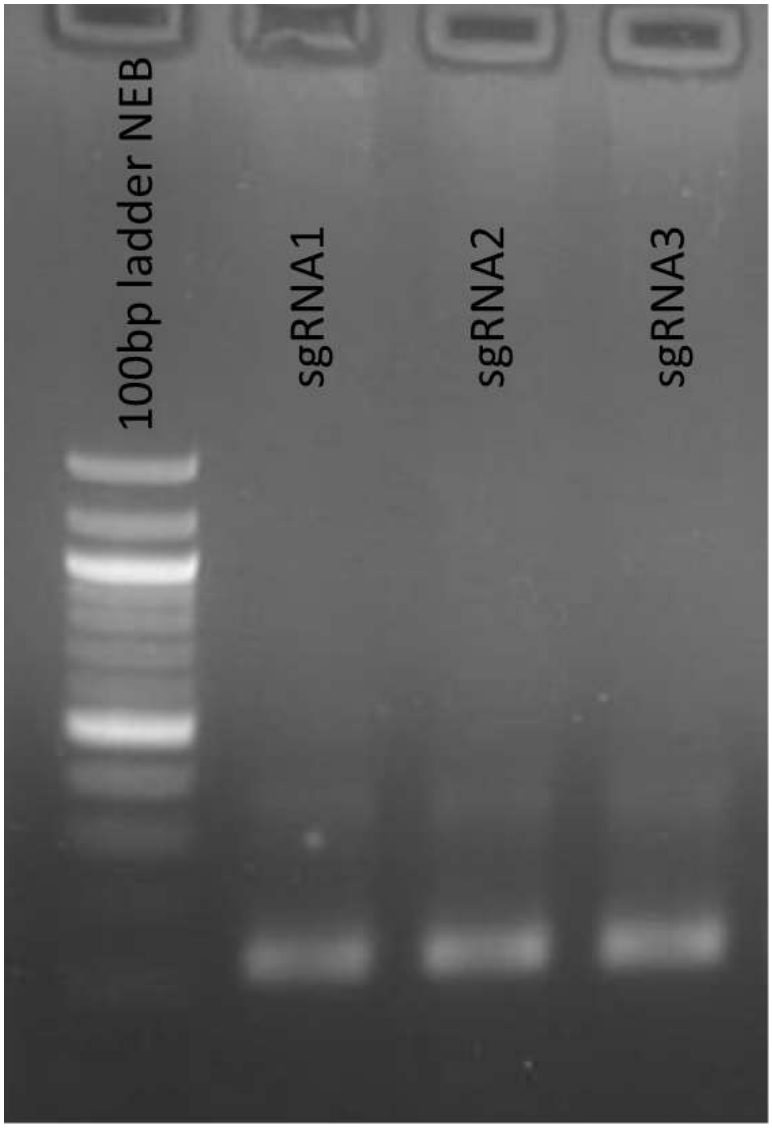


Εικόνα 9. Αλληλουχίες του γονιδίου για το είδος από RNAseq που χρησιμοποιήθηκαν από τη βάση δεδομένων του NCBI (National Center for Biotechogy Information).

2.3 Παραγωγή του sgRNA εκμαγείου

Αρχικά πραγματοποιήθηκαν PCR αντιδράσεις χρησιμοποιώντας την Phusion πολυμεράση (NEB) συνολικού όγκου 100 μl. Οι αντιδράσεις περιλάμβαναν 20μl 5x Phusion HF buffer, 67 μl ddH2O, 2 μl dNTPs, 5 μl 10μM από κάθε CRISPR F εκκινητή, 5 μl 10μM CRISPR sgR εκκινητή και 1μl Phusion DNA πολυμεράση. Οι συνθήκες της αντίδρασης ήταν 98°C για 30 sec, ακολούθως 35 κύκλοι στους 98°C για 30 sec, 60°C για 30 sec και 72°C για 10 sec, και 72°C για 10 min. 5 μl των προϊόντων αντιδράσεων οπτικοποιήθηκαν σε 2% πήκτωμα αγαρόζης, προκειμένου να ελεγχθεί η καθαρότητα και η ποιότητα των 100bp προϊόντων (εικόνα 10). Ακολούθησε

καθαρισμός του υπόλοιπου προϊόντος των αντιδράσεων (95 μl) χρησιμοποιώντας το PCR purification kit (MACHEREY NAGEL) σύμφωνα με τις οδηγίες του προμηθευτή με τελικό όγκο επαναδιάλυσης στα 30μl EB. Η συγκέντρωση των προϊόντων μετρήθηκε σε Nanodrop σπεκτροφωτόμετρο.



Εικόνα 10. Έλεγχος καθαρότητας και ποιότητας των 100bp προϊόντων της PCR

2.4 In vitro μεταγραφή των sgRNA

Για την *in vitro* μεταγραφή των 3 sgRNAs πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις (20μl), σύμφωνα με τις οδηγίες του Hiscribe T7 Kit (NEB). Πιο συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν 6μl ddH2O, 2μl ATP, 2 μl CTP, 2μl GTP, 2 μl UTP, 2μl 10x

Buffer,2 μl (300ng) PCR προϊόν (που παράχθηκε στην ενότητα 3), και 2μl enzyme mix που περιέχει T7 RNA πολυμεράση και RNAse παρεμποδιστή. Οι αντιδράσεις επωάστηκαν στους 37°C για 4 ώρες. Στην συνέχεια προστέθηκε 1μl turbo DNAse (Ambion) και ακολούθησε επώαση στους 37 για 15 λεπτά. Η αντίδραση σταμάτησε με την προσθήκη 115μl ddH2O και 15μl διαλύματος ammonium acetate.

Ακολούθησε καθαρισμός των αντιδράσεων με προσθήκη 150μl διαλύματος phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1) (Sigma). Το διάλυμα αναμίχθηκε για 30sec και ο διαχωρισμός των φάσεων πραγματοποιήθηκε μετά από φυγοκέντρηση στα 10000 g για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Συλλέχθηκε η υπερκείμενη φάση σε νέο Ependorf tube και προστέθηκε και ακολούθησε κατακρήμνιση του RNA με προσθήκη ίσου όγκου 2-propanol (150μl). Τα δείγματα επωάστηκαν στους -20° C για 16 ώρες. Η RNA συλλέχθηκε μετά από φυγοκέντρηση σε 17000g για 30 λεπτά στους 4°C. Εν συνεχεία, η RNA πελέτα ξεπλύθηκε με 0,5μl 70% αιθανόλη μετά από φυγοκέντρηση στα 17000g για 3 λεπτά στους 4°C. Η τελευταία διαδικασία πραγματοποιήθηκε 2 φορές. Τέλος, η RNA πελέτα επαναδιαλύθηκε σε 30μl RNAse-free ddH2O. Η συγκέντρωση ποσοτικοποιήθηκε σε σπεκτροφωτόμετρο Nanodrop και ακολούθως αραιώθηκε σε τελική συγκέντρωση 1μg/μl.

2.5 Μικροενέσεις εμβρύων του Spodoptera frugiperda

Στα πλαίσια της εργασίας αναπτύχθηκε και εφαρμόστηκε η μεθοδολογία γενετικής τροποποίησης στο λεπιδόπτερο *S. frugiperda* (proof of concept) στοχεύοντας στο γονίδιο-μάρτυρα Scarlet, όπου η διατάραξη του συγκεκριμένου γονιδίου δίνει φαινότυπο στον οφθαλμό των ακμαίων σταδίων των εντόμων στην G0 γενιά που ενέθηκε.

Για τις μικροενέσεις των εμβρύων των λεπιδοπτέρων προετοιμάστηκε μείγμα 10μl όγκου που περιλάμβανε 300ng/μl Cas9 protein (NEB), 100ng/μl από τα παραχθέντα sgRNA1 και sgRNA3 και 1x injection buffer (0.1 mM sodium phosphate buffer pH 6.8, 5 mM KCl) σε τελικό όγκο 10μl.

Για την συλλογή το εμβρύων των ενέσεων είναι ιδιαίτερα σημαντικό να είναι νεαρής ηλικίας (μέγιστο 2 ωρών από την ωοτοκία). Προκειμένου να επιτευχθεί αυτό μεγάλος αριθμός αρσενικών και θηλυκών ενήλικων ατόμων νεαρής ηλικίας είχαν τοποθετηθεί σε κλουβιά (τάπερ) καλυμμένα με χαρτί κουζίνας σε συνθήκες σκότους.

Την ημέρα των ενέσεων το χαρτί κουζίνας αντικαθίστατο με νέο και τα ωά που εναποτίθονταν από τα θηλυκά άτομα συλλέγονταν κάθε 1 ώρα προκειμένου να πραγματοποιηθούν ενέσεις με το παραπάνω μείγμα. Τα ωά τοποθετούνταν σε ειδικά σχεδιασμένη αντικειμενοφόρο (60 περίπου ωά) και ακολούθως σε κάθε ωό γινόταν ένεση μείγματος μέσω συσκευής μικροϊντζέκτορα. Για αποφυγή θανάτωσης των εμβρύων λόγω της μηχανικής πίεσης των ενέσεων, τα ωά είχαν διαβραχεί με νερό. Μετά το πέρας των ενέσεων οι αντικειμενοφόροι με τα ενεμένα έμβυα τοποθετούνταν σε δοχεία με προσθήκη τεχνητής τροφής. Συνολικά ενέθηκαν 600 έμβρυα. Μετά την πάροδο 3-4 ημερών οι λάρβες πρώτου σταδίου (L1) εκκολάπτονταν και στο 3ο στάδιο μεταφέρονταν μεμονωμένα σε τρυβλία Petri, με παροχή τεχνητής τροφής, στα οποία παρέμεναν μέχρι το στάδιο της πούπας. Ακολούθως, μετά την ταυτοποίηση του φύλου οι πούπες (G0) μεταφέρονταν μεμονωμένα σε πλαστικά διαφανή ποτήρια μίας χρήσης.

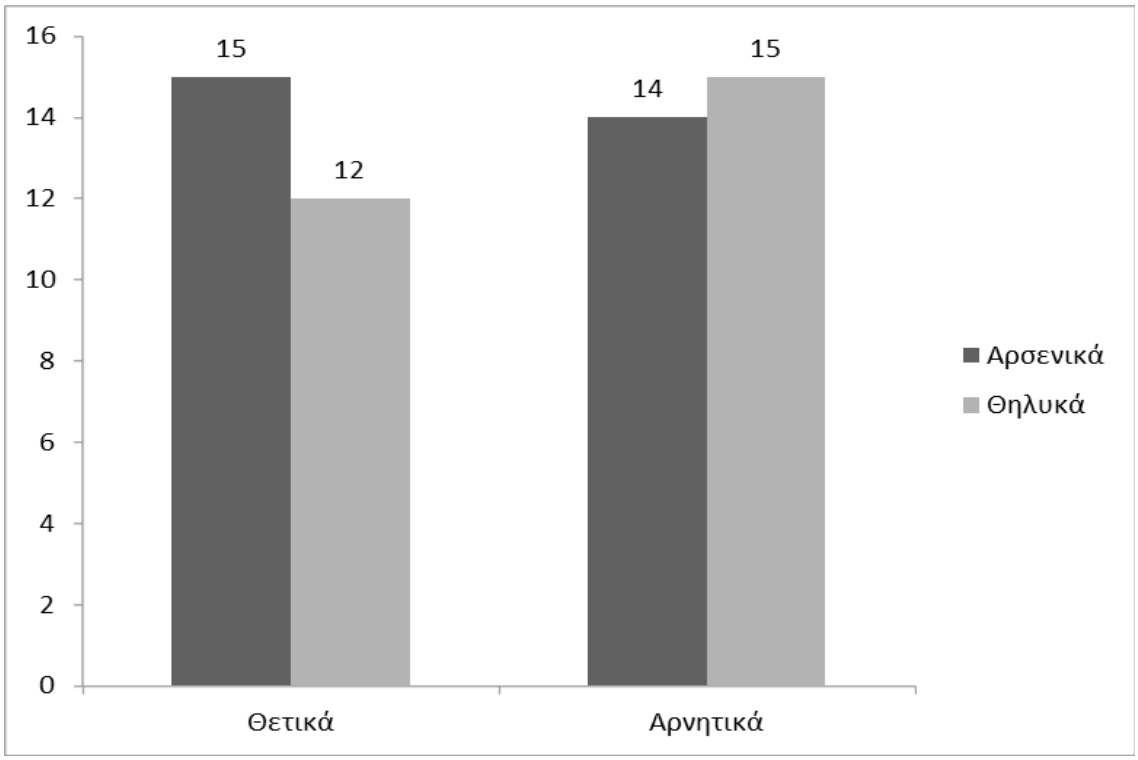
2.6 Διασταυρώσεις

Μετά από περίπου 10 ημέρες εμφανίζονταν τα ακμαία άτομα και γινόταν έλεγχος τη ύπαρξης μωσαϊκού οφθαλμού. Στην συνέχεια τα άτομα που ήταν θετικά για μωσαϊκισμό διασταυρώνονταν μεμονωμένα με άτομα του αντίθετου φύλου, σε νέα ποτήρια, προκειμένου να παράγουν άτομα της επόμενης γενιάς (G1) με προσθήκη βαμβακιού εμποτισμένου με 10% ζάχαρη ως πηγή τροφής. Στην συνέχεια τα ωά κάθε G1 ζεύγος τοποθετούνταν σε τριβλία Petri και ακολουθούνταν η ίδια διαδικασία που περιγράφηκε μέχρι την εμφάνιση των ακμαίων της G1 γενιάς. Τα ομόζυγα θετικά (αρσενικά και θηλυκά άτομα) για τα CRISPR άτομα (με κίτρινα μάτια) τοποθετούνταν μαζικά σε κλουβιά αποτελώντας τον Scarlet πληθυσμό.

3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Από τα 600 έμβρυα στα οποία διενεργήθηκαν ενέσεις, εκκολάφθηκαν 143 προνύμφες 1^{ου} σταδίου (ποσοστό εκκόλαψης 23,83%). Από τις 143 λάρβες συλλέχθηκαν 40 άτομα τα οποία διατηρήθηκαν στους -80 ^{o}C για μετέπειτα μοριακές αναλύσεις. Από τις εναπομείναντες 103 προνύμφες, 75 άτομα αναπτύχθηκαν επιτυχώς

σε λάρβες 3ου σταδίου οι οποίες και διαχωρίστηκαν μεμονωμένα σε τριβλία Petri με παροχή τεχνητής τροφής για την αποφυγή κανιβαλισμού. Συνολικά 65 (από τα 75) άτομα αναπτυχθήκαν στο στάδιο της πούπας, εκ των οποίων προέκυψαν συνολικά 56 G0 ακμαία άτομα (29 αρσενικά και 27 θηλυκά). Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε καταμέτρηση των ακμαίων ατόμων που εμφάνισαν μωσαϊκούς οφθαλμούς στην G0 γενιά. Συνολικά παρατηρήθηκαν 27 θετικά (15 αρσενικά και 12 θηλυκά αντίστοιχα) και 29 αρνητικά (14 αρσενικά και 15 θηλυκά αντίστοιχα) για μωσαϊκισμό άτομα όπως φαίνεται στην Εικόνα 11, με ποσοστό θετικών ατόμων 51,79%. Ενδεικτική εικόνα θετικών μωσαϊκών ακμαίων παρουσιάζεται στην Εικόνα 12.



Εικόνα 11. Αριθμός ακμαίων ατόμων που εμφάνισαν μωσαϊκούς οφθαλμούς στη G0 γενιά.

Εικόνα 12. Οφθαλμοί ακμαίων εντόμων του *Spodoptera frugiperda*, που παρουσιάζουν μωσαικισμό στη G0 γενιά. Με μαύρο οφθαλμό παρουσιάζεται ο μάρτυρας.

Ακολούθως, πραγματοποιήθηκαν διασταυρώσεις μεμονωμένων G0 θετικών για τον μωσαϊκισμό, αρσενικών και θηλυκών ατόμων, προκειμένου να προκύψουν ομόζυγα για το CRISPR G1 άτομα. Συνολικά, πραγματοποιήθηκαν 12 διασταυρώσεις εκ των οποίων οι 4 έδωσαν ωά (συνολικά συλλέχθηκαν 452 G1 ωά). Ο αριθμός εκκόλαψης ανά διασταύρωση παρουσιάζεται στον πίνακα 2. Όπως φαίνεται και στον παρακάτω πίνακα οι διασταυρώσεις 1, 4, 7 και 11 έδωσαν 123, 250, 6 και 83 ωά αντίστοιχα.

Πίνακας 2. Αριθμός εκκόλαψης ανά διασταύρωση του εντόμου *Spodoptera frugiperda*.

G0	Διασταύρωση	G1 Ωά	G1 Πούπες	G1 Ακμαία Θετικά	G1 Ακμαία Αρνητικά	Θετικά %	Αρνητικά %
1	**1 ♂ - 1 ♀**	123	123	1	122	0,81	99,19
2	**1 ♂ - 1 ♀**	0	0	0	0	0,00	0,00
3	**1 ♂ - 1 ♀**	0	0	0	0	0,00	0,00
4	**1 ♂ - 1 ♀**	250	250	85	165	34,00	66,00
5	**1 ♂ - 1 ♀**	0	0	0	0	0,00	0,00
6	**1 ♂ - 1 ♀**	0	0	0	0	0,00	0,00
7	**1 ♂ - 1 ♀**	6	6	1	5	16,67	83,33
8	**1 ♂ - 1 ♀**	0	0	0	0	0,00	0,00
9	**1 ♂ - 1 ♀**	0	0	0	0	0,00	0,00
10	**1 ♂ - 1 ♀**	0	0	0	0	0,00	0,00
11	**1 ♂ - 1 ♀**	83	83	5	78	6,02	93,92
12	**1 ♂ - 1 ♀**	0	0	0	0	0,00	0,00

Από τα συνολικά 452 G1 ωά όλα αναπτυχθήκαν στο στάδιο της πούπας και του ακμαίου εντόμου. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την διατήρηση των εντόμων έχει περιγραφεί προηγουμένως. Στο στάδιο του ακμαίου έγινε καταμέτρηση των ατόμων θετικών και αρνητικών για το CRISPR ατόμων. Τα θετικά άτομα εμφανίζουν φαινοτυπικά ευδιάκριτους κίτρινους οφθαλμούς σε σύγκριση με τα αρνητικά άτομα που εμφανίζουν μαύρους οφθαλμούς. Σε σύνολο 452 ενήλικων G1 ατόμων εντοπίστηκαν 92 θετικά άτομα (19,91%) από τις 4 διασταυρώσεις που έδωσαν απογόνους. Πιο συγκεκριμένα τα ποσοστά θετικών για τις διασταυρώσεις 1, 4, 7 και 11 ήταν 0,81, 34, 16,67 και 6,02 % αντίστοιχα (με συνολικό μέσο όρο θετικών ατόμων 14,38%), όπως φαίνεται στην παραπάνω εικόνα. Ενδεικτική εικόνα θετικού ομόζυγου G1 για το CRISPR παρουσιάζεται στην Εικόνα 13.

Εικόνα 13. Οφθαλμοί του εντόμου *Spodoptera frugiperda.* Αριστερά: μάρτυρας δεξιά θετικό ομόζυγο στη γενιά G1.

Στη συνέχεια, ακολούθησαν διασταυρώσεις αρσενικών και θηλυκών θετικών ομόζυγων για το CRISPR ακμαίων G1 ατόμων προκειμένου να αποτελέσουν τον πληθυσμό SCARLET. Συνολικά πραγματοποιήθηκαν 17 διασταυρώσεις από ακμαία θετικά άτομα των διασταυρώσεων 4 και 11. Οι περισσότερες G1 διασταυρώσεις έδωσαν υψηλούς αριθμούς G2 ωών εκ των οποίων απο την πλειονότητα των ωών προέκυψαν ακμαία άτομα όπου όλα είχαν θετικό για τον οφθαλμό φαινότυπο (Πίνακας 3). Συνολικά παρήχθησαν 501 ακμαία άτομα τα οποία και συλλέχθηκαν για να αποτελέσουν τον SCARLET πληθυσμό.

Πίνακας 3. Αποτελέσματα διασταυρώσεων της G1 γενιάς.

Α/Α Διασταυρώσεων	Διασταύρωση	G2 Ωά	G2 Πούπες	Θνησιμότητα	Ακμαία	Θετικά
G1(4)_1	**1** ♂ **- 2** ♀	18	17	1	17	17
G1(4)_2	**1** ♂ **- 2** ♀	47	43	4	43	43
G1(4)_3	**1** ♂ **- 1** ♀	39	37	2	37	37
G1(4)_4	**1** ♂ **- 1** ♀	43	36	7	36	36
G1(4)_5	**1** ♂ **- 1** ♀	36	30	6	30	30
G1(4)_6	**1** ♂ **- 1** ♀	25	20	5	20	20
G1(4)_7	**1** ♂ **- 1** ♀	69	67	2	67	67
G1(4)_8	**1** ♂ **- 1** ♀	82	69	13	69	69
G1(4)_9	**1** ♂ **- 1** ♀	34	29	5	29	29
G1(4)_10	**1** ♂ **- 1** ♀	20	19	1	19	19
G1(4)_11	**1** ♂ **- 1** ♀	17	16	1	16	16
G1(4)_12	**1** ♂ **- 1** ♀	10	8	2	8	8
G1(4)_13	**1** ♂ **- 1** ♀	8	7	1	7	7
G1(4)_14	**1** ♂ **- 1** ♀	16	14	2	14	14
G1(4)_15	**1** ♂ **- 1** ♀	0	0	0	0	0
G1(4)_16	**1** ♂ **- 1** ♀	12	7	5	7	7
G1(11)_1	**4** ♂ **- 1** ♀	82	82	0	82	82

4 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ & ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το λεπιδόπτερο *S. frugiperda* αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους εχθρούς των καλλιεργούμενων φυτών παγκοσμίως καθώς προσβάλει ένα πολύ σημαντικό αριθμό καλλιεργούμενων φυτών ύψιστης γεωργικής σημασίας. Ως εκ τούτου είναι ιδιαίτερης σημασίας η γνώση της βιολογίας και της φυσιολογίας του συγκεκριμένου είδους για την πιθανή εξάπλωση σε άλλες χώρες.

Η γενετική μηχανική αποτελεί έναν από τους πιο σημαντικούς κλάδους της μοριακής βιολογίας, που επιτρέπει την εις βάθος λειτουργική ανάλυση των βιολογικών μηχανισμών. Από τα πιο δημοφιλή μοριακά εργαλεία της γενετικής μηχανικής των τελευταίων ετών είναι το σύστημα CRISPR/Cas9, το οποίο επιτρέπει την ελεγχόμενη και στοχευμένη τροποποίηση του γονιδιώματος. Η τεχνολογία βασίζεται στην RNA-κατευθυνόμενη στόχευση και δημιουργία θραυσμάτων από την ενδονουκλεάση Cas9 στην επιθυμητή περιοχή του γονιδιώματος. Μέσω της ενεργοποίησης των μηχανισμών επιδιόρθωσης του κυττάρου είναι εφικτή η απαλοιφή μίας γενωμικής περιοχής ή αντικατάσταση αυτής με τεχνητά τμήματα DNA που φέρουν επιθυμητές σημειακές

μεταλλαγές. Η μεθοδολογία CRISPR/Cas9 έχει χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα τα τελευταία χρόνια για την απόδειξη της συσχέτισης γενοτύπου-φαινοτύπου. Χαρακτηριστικό παράδειγμα στο χώρο της εντομολογίας αποτελεί η χρήση της τεχνολογίας αυτής σε οργανισμούς μοντέλα (Drosophila) με σκοπό τη λειτουργική ανάλυση σημειακών μεταλλαγών σε γονίδια στόχους εντομοκτόνων και τη συνεισφοράς αυτών στο φαινότυπο της ανθεκτικότητας (Wu κ.ά., 2018). Παρόλα αυτά, η χρήση του συστήματος CRISPR/Cas9 είναι αρκετά περιορισμένη σε οργανισμούς μη-μοντέλα (Wu κ.ά., 2018, Jin κ.ά, 2021, Zhu κ.ά, 2020, Han κ.ά., 2021, Abdelgaffar κ.ά., 2021, Boaventura κ.ά., 2020). Αντικείμενο της εργασίας ήταν η ανάπτυξη και η εφαρμογή της μεθοδολογίας CRISPR/Cas9 στο συγκεκριμένο είδος. Στην παρούσα εργασία αναπτύχθηκε και εφαρμόστηκε η μεθοδολογία γενετικής τροποποίησης μέσω CRISPR/Cas9, στοχεύοντας το γονίδιο-μάρτυρα Scarlet διατάραξη του οποίου δίνει φαινότυπο στα ακμαία στάδια των εντόμων. Τα αποτελέσματα υπέδειξαν υψηλό ποσοστό επιτυχίας στην G0 γενιά (περισσότερο από 50%) το οποίο ήταν και κληρονομήσιμο σε απογόνους επόμενων γενεών. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν παρατηρηθεί στα είδη όπως το *Helicoverpa armigera* (Khan κ.ά., 2017), *Bactrocera oleae* (Koidou κ.ά., 2020), *Nilaparvata lugens* (Xue κ.ά., 2018), *Tetranychus urticae* (Dermauw κ.ά., 2020), *Oncopeltus fasciatus* (Reding και Pick, 2020), *Daphnia magna* (Ismail κ.ά., 2018), *Bactrocera dorsalis* (Bai κ.ά, 2019), *Papilio Xuthus* (Liu κ.ά., 2021), *Bombyx mori* (Khan κ.ά., 2017) και *Plutella xylostella* (Huang κ.ά., 2016).

Η συγκεκριμένη μεθοδολογία μπορεί να χρησιμοποιηθεί τόσο για τη διερεύνηση του ρόλου γονιδίων-στόχων στην φυσιολογία των εντόμων συμβάλλοντας στην πιθανή εύρεση γονιδίων-στόχων για ανάπτυξη νέων δραστικών ουσιών όσο και για αξιολόγηση του ρόλου γονιδίων ή/και μεταλλαγών στην ανθεκτικότητα έναντι φυτοπροστατευτικών προϊόντων. Απώτερος στόχος είναι η καλύτερη γνώση του συγκεκριμένου εχθρού που ενδεχομένως θα συμβάλει στο πιο αποτελεσματικό έλεγχο των πληθυσμών του εντόμου στο πεδίο.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Abdelgaffar, H., Perera, O. P., & Jurat-Fuentes, J. L. (2021). ABC transporter mutations in C ry 1F-resistant fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*) do not result in altered susceptibility to selected small molecule pesticides. *Pest Management Science*, *77*(2), 949-955.

Bai, X., Zeng, T., Ni, X. Y., Su, H. A., Huang, J., Ye, G. Y., & Qi, Y. X. (2019). CRISPR/Cas9-mediated knockout of the eye pigmentation gene white leads to alterations in colour of head spots in the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis*. *Insect molecular biology*, *28*(6), 837-849.

Bassett, A. R., Tibbit, C., Ponting, C. P., & Liu, J. L. (2013). Highly efficient targeted mutagenesis of Drosophila with the CRISPR/Cas9 system. *Cell reports*, *4*(1), 220-228.

Bhusal, S., & Chapagain, E. (2020). Threats of fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*) incidence in Nepal and it's integrated management-A review. *Journal of Agriculture and Natural Resources*, *3*(1), 345-359.

Boaventura, D., Bolzan, A., Padovez, F. E., Okuma, D. M., Omoto, C., & Nauen, R. (2020). Detection of a ryanodine receptor target-site mutation in diamide insecticide resistant fall armyworm, Spodoptera frugiperda. *Pest management science*, *76*(1), 47-54.

Capinera, J. L. (2002). Fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae). *EDIS*, 2002(7).

Casmuz, A., Juárez, M. L., Socías, M. G., Murúa, M. G., Prieto, S., Medina, S., & Gastaminza, G. (2010). Revisión de los hospederos del gusano cogollero del maíz, Spodoptera frugiperda (Lepidoptera: Noctuidae). *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, *69*(3-4), 209-231.

Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., & Zhang, F. (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, *339*(6121), 819-823.

Cook, S. M., Khan, Z. R., & Pickett, J. A. (2007). The use of push-pull strategies in

integrated pest management. *Annu. Rev. Entomol.*, *52*, 375-400.

Day, R., Abrahams, P., Bateman, M., Beale, T., Clottey, V., Cock, M., & Gomez, J. (2017). Fall Armyworm: Impacts and Implications for Africa. Outlooks on Pest Management 28: 196–201.

Dermauw, W., Jonckheere, W., Riga, M., Livadaras, I., Vontas, J., & Van Leeuwen, T. (2020). Targeted mutagenesis using CRISPR-Cas9 in the chelicerate herbivore *Tetranychus urticae*. *Insect biochemistry and molecular biology*, *120*, 103347.

Feldmann, F., Rieckmann, U., & Winter, S. (2019). The spread of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* in Africa—What should be done next? *Journal of Plant Diseases and Protection*, *126*(2), 97-101.

Firake, D. M., & Behere, G. T. (2020). Natural mortality of invasive fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) in maize agroecosystems of northeast India. *Biological Control*, *148*, 104303.

Gilles, A. F., Schinko, J. B., & Averof, M. (2015). Efficient CRISPR-mediated gene targeting and transgene replacement in the beetle Tribolium castaneum. *Development*, *142*(16), 2832-2839.

Goergen, G., Kumar, P. L., Sankung, S. B., Togola, A., & Tamò, M. (2016). First report of outbreaks of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera, Noctuidae), a new alien invasive pest in West and Central Africa. *PloS one*, *11*(10).

Guo, J., Wu, S., Zhang, F., Huang, C., He, K., Babendreier, D., & Wang, Z. (2020). Prospects for microbial control of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda:* a review. *BioControl*, 1-16.

Guo, J., Zhao, J., He, K., Zhang, F., & Wang, Z. (2018). Potential invasion of the crop-devastating insect pest fall armyworm *Spodoptera frugiperda* to China. *Plant Protection*, *44*(6), 1-10.

Hailu, G., Niassy, S., Khan, Z. R., Ochatum, N., & Subramanian, S. (2018). Maize–legume intercropping and push–pull for management of fall armyworm, stemborers, and striga in Uganda.

Hammond, A., Galizi, R., Kyrou, K., Simoni, A., Siniscalchi, C., Katsanos, D., & Nolan, T. (2016). A CRISPR-Cas9 gene drive system targeting female

reproduction in the malaria mosquito vector *Anopheles gambiae*. *Nature biotechnology*, *34*(1), 78-83.

Han, W., Tang, F., Zhong, Y., Zhang, J., & Liu, Z. (2021). Identification of yellow gene family and functional analysis of *Spodoptera frugiperda* yellow-y by CRISPR/Cas9. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, *178*, 104937.

Huang, Y., Chen, Y., Zeng, B., Wang, Y., James, A. A., Gurr, G. M., & You, M. (2016). CRISPR/Cas9 mediated knockout of the abdominal-A homeotic gene in the global pest, diamondback moth (*Plutella xylostella*). *Insect biochemistry and molecular biology*, *75*, 98-106.

Ismail, N. I. B., Kato, Y., Matsuura, T., & Watanabe, H. (2018). Generation of white-eyed *Daphnia magna* mutants lacking scarlet function. *PloS one*, *13*(11), e0205609.

Jiang, Y. Y., Liu, J., Xie, M. C., Li, Y. H., Yang, J. J., Zhang, M. L., & Qiu, K. (2019). Observation on law of diffusion damage of *Spodoptera frugiperda* in China in 2019. *Plant Protection*, *45*(6), 10-19.

Jin, M. H., Tao, J. H., Qi, L. I., Cheng, Y., Sun, X. X., Wu, K. M., & Xiao, Y. T. (2021). Genome editing of the SfABCC2 gene confers resistance to Cry1F toxin from *Bacillus thuringiensis* in *Spodoptera frugiperda*. *Journal of Integrative Agriculture*, *20*(3), 815-820.

Jing, W. A. N., Huang, C., Li, C. Y., Zhou, H. X., Ren, Y. L., Li, Z. Y., & Wan, F. H. (2021). Biology, invasion and management of the agricultural invader: Fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Integrative Agriculture*, *20*(3), 646-663.

Johnson, S. J. (1987). Migration and the life history strategy of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* in the Western Hemisphere. *International Journal of Tropical Insect Science*, *8*(4), 543-549.

Khan, S. A., Reichelt, M., & Heckel, D. G. (2017). Functional analysis of the ABCs of eye color in *Helicoverpa armigera* with CRISPR/Cas9-induced mutations. *Scientific Reports*, *7*(1),1-14.

Koffi, D., Kyerematen, R., Eziah, V. Y., Agboka, K., Adom, M., Goergen, G., & Meagher, R. L. (2020). Natural enemies of the fall armyworm, *Spodoptera*

frugiperda (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) in Ghana. *Florida Entomologist*, *103*(1), 85-90.

Koidou, V., Denecke, S., Ioannidis, P., Vlatakis, I., Livadaras, I., & Vontas, J. (2020). Efficient genome editing in the olive fruit fly, *Bactrocera oleae*. *Insect molecular biology*, *29*(4), 363-372.

Liu, G., Liu, W., Zhao, R., He, J., Dong, Z., Chen, L., & Li, X. (2021). Genome-wide identification and gene-editing of pigment transporter genes in the swallowtail butterfly *Papilio xuthus*. *BMC genomics*, *22*(1), 1-18.

Montezano, D. G., Specht, A., Sosa-Gómez, D. R., Roque-Specht, V. F., Sousa-Silva, J. C., Paula-Moraes, S. D., & Hunt, T. E. (2018). Host plants of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in the Americas. *African Entomology*, *26*(2), 286-300.

Reding, K., & Pick, L. (2020). High-Efficiency CRISPR/Cas9 Mutagenesis of the white Gene in the Milkweed Bug *Oncopeltus fasciatus*. *Genetics*, *215*(4), 1027-1037.

Sekul, A. A., & Sparks, A. N. (1967). Sex pheromone of the fall armyworm moth: isolation, identification, and synthesis. *Journal of Economic Entomology*, *60*(5), 1270-1272.

Shalem, O., Sanjana, N. E., Hartenian, E., Shi, X., Scott, D. A., Mikkelsen, T. S., & Zhang, F. (2014). Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. *Science*, *343*(6166), 84-87.

Shylesha, A. N., & Sravika, A. (2018). Natural occurrence of predatory bugs, *Eocanthecona furcellata* (Wolff) and *Andrallus spinidens* (Fabr.) on *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Hemiptera: Pentatomidae) in maize and their potential in management of fall army worm. *Journal of Biological Control*, *32*(3), 209-211.

Sisay, B., Simiyu, J., Malusi, P., Likhayo, P., Mendesil, E., Elibariki, N., ... & Tefera, T. (2018). First report of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), natural enemies from Africa. *Journal of Applied Entomology*, *142*(8), 800-804.

Sontheimer, E. J., & Barrangou, R. (2015). The bacterial origins of the CRISPR genome-editing revolution. *Human gene therapy*, *26*(7), 413-424.

Soul-kifouly, G. M., Affognon, H. D., Macharia, I., Ong'amo, G., Abonyo, E., Ogola,

G., & LeRu, B. (2016). Assessing the long-term welfare effects of the biological control of cereal stemborer pests in East and Southern Africa: Evidence from Kenya, Mozambique and Zambia. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, *230*, 10-23.

Sparks, A. N. (1979). A review of the biology of the fall armyworm. *Florida Entomologist*, *62*(2), 82-87.

Storer, N. P., Babcock, J. M., Schlenz, M., Meade, T., Thompson, G. D., Bing, J. W., & Huckaba, R. M. (2010). Discovery and characterization of field resistance to Bt maize: *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Puerto Rico. *Journal of economic entomology*, *103*(4), 1031-1038.

Sun, B., Li, F., He, X., Cao, F., Bandason, E., Shapiro-Ilan, D., & Wu, S. (2020). First report of *Ovomermis sinensis* (Nematoda: Mermithidae) parasitizing fall armyworm Spodoptera frugiperda (Lepidoptera: Noctuidae) in China. *Journal of Nematology*, *52*, 1.

Taning, C. N. T., Van Eynde, B., Yu, N., Ma, S., & Smagghe, G. (2017). CRISPR/Cas9 in insects: Applications, best practices and biosafety concerns. *Journal of insect physiology*, *98*, 245-257.

Todd, E. L., & Poole, R. W. (1980). Keys and illustrations for the armyworm moths of the noctuid genus Spodoptera Guenée from the Western Hemisphere. *Annals of the Entomological Society of America*, *73*(6), 722-738.

Watson, G. W., & Mifsud, D. (2017). Invasive mealybugs (Hemiptera: Pseudococcidae) and the threats they present to Mediterranean countries.

Wu, K., Shirk, P. D., Taylor, C. E., Furlong, R. B., Shirk, B. D., Pinheiro, D. H., & Siegfried, B. D. (2018). CRISPR/Cas9 mediated knockout of the abdominal-A homeotic gene in fall armyworm moth *(Spodoptera frugiperda*). *PloS one*, *13*(12), e0208647.

Xue, W. H., Xu, N., Yuan, X. B., Chen, H. H., Zhang, J. L., Fu, S. J., & Xu, H. J. (2018). CRISPR/Cas9-mediated knockout of two eye pigmentation genes in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae). *Insect biochemistry and molecular biology*, *93*, 19-26.

Yarou, B. B., Silvie, P., Assogba Komlan, F., Mensah, A., Alabi, T., Verheggen, F., &

Francis, F. (2017). Plantes pesticides et protection des cultures maraichères en Afrique de l'Ouest (synthèse bibliographique). *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, *21*(4), 288-304.

Zhang, F., Wen, Y., & Guo, X. (2014). CRISPR/Cas9 for genome editing: progress, implications and challenges. *Human molecular genetics*, *23*(R1), R40-R46.

Zhang, L., Jin, M. H., Zhang, D. D., Jinag, Y. Y., Liu, J., Wu, K. M., & Xiao, Y. T. (2019). Molecular identification of invasive fall armyworm *Spodoptera frugiperda* in Yunnan Province. *Plant protection*, *45*(2), 19-24.

Zhu, G. H., Chereddy, S. C., Howell, J. L., & Palli, S. R. (2020). Genome editing in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*: Multiple sgRNA/Cas9 method for identification of knockouts in one generation. *Insect biochemistry and molecular biology*, *122*, 103373.

ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΑ ΒΙΒΛΙΑ

Prasanna, B. M., Huesing, J. E., Eddy, R., & Peschke, V. M. (2018). Fall armyworm in Africa: a guide for integrated pest management.

ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

https://gd.eppo.int/taxon/LAPHFR/distribution

https://www.eppo.int/ACTIVITIES/plant_quarantine/shortnotes_qps/fall_armyworm