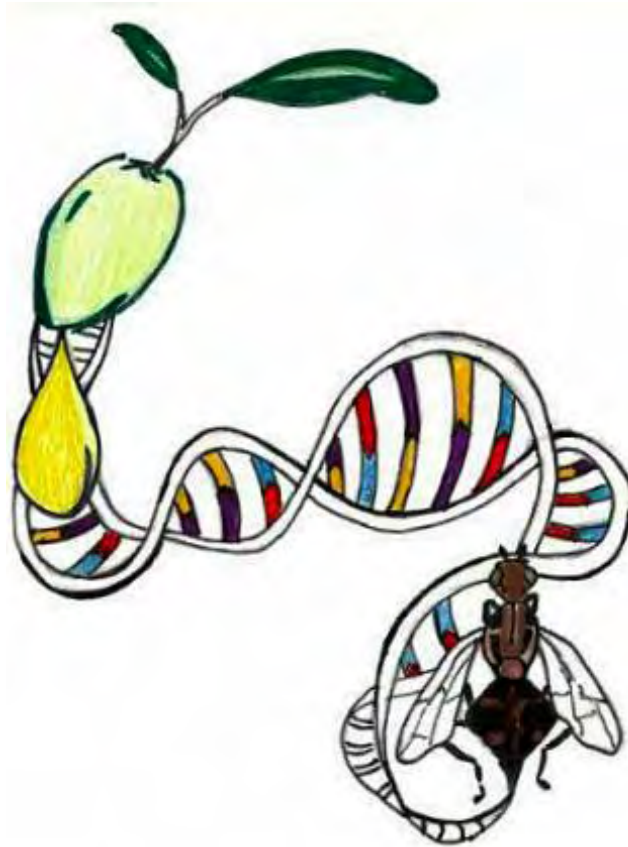




**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

**Θέμα διπλωματικής εργασίας:**

«Μελέτη έκφρασης των γονιδίων των γευστικών υποδοχέων του  
δακού της ελιάς, *Bactrocera oleae*, στην ολευρωπαϊνή.»



Μαράνου Ελευθερία

Λάρισα

2018

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ &  
ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΗΣ**

«Μελέτη έκφρασης των γονιδίων των γευστικών υποδοχέων του δακού της ελιάς, *Bactrocera oleae*, στην ολευρωπαΐνη.»

“Expression analysis of the genes that encode gustatory receptors in olive fly, *Bactrocera oleae*, as a response to the exposition in oleuropein.”

Μαράνου Ελευθερία

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κατά το ακαδημαϊκό έτος 2017-2018 υπό την επίβλεψη και καθοδήγηση του καθηγητή κ.Μαθθίοπουλου Κωνσταντίνου.

### **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:**

#### **1. Μαθθιόπουλος Κωνσταντίνος**

Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας

Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

#### **2. Καρπούζας Δημήτριος**

Αναπληρωτής καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας

Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

#### **3. Τσουμάνη Κωνσταντίνα**

Διδάσκουσα ΠΔ 407/80 του μαθήματος Μοριακή Βιολογία

Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Μετά την ολοκλήρωση της διπλωματικής μου διατριβής θα ήθελα αρχικά να ευχαριστήσω τον κ. Μαθθίοπουλο Κωνσταντίνο, ο οποίος από την διδασκαλία των ακαδημαϊκών του μαθημάτων μου προκάλεσε το ενδιαφέρον για την μοριακή βιολογία. Ακόμη, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντάς μου το συγκεκριμένο θέμα και την άδεια να το υλοποιήσω στο εργαστήριο της Μοριακής Βιολογίας και γονιδιωματικής. Καθώς επίσης για την βοήθεια και καθοδήγηση του κατά την διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής εργασίας.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την κα Τσουμάνη Κωνσταντίνα, η οποία αποτελεί για εμένα παράδειγμα προς μίμηση. Η αφοσίωση και ο χρόνος της αποτέλεσαν την σημαντικότερη βοήθεια για να επιτελέσω όλα τα βήματα αυτής της εργασίας. Ακόμη θέλω να την ευχαριστήσω για όλες τις πολύτιμες γνώσεις και συμβουλές που μου έδωσε, οι οποίες αποτελούν τα θεμέλια της συγκεκριμένης εργασίας αλλά και σημαντικά εφόδια για το μέλλον. Χωρίς την καθοδήγηση της καθ' όλη την διάρκεια της πτυχιακής μου εργασίας δεν θα ήταν δυνατή η ολοκλήρωση της.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Καρπούζα Δημήτριο ο οποίος αποτελεί μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής μου.

Θα ήθελα όμως να ευχαριστήσω και όλα τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου. Ειδικά την κ. Μαριλένα Γρηγορίου, Διδάκτορα του εργαστηρίου καθώς και τον Λευτέρη Ζορμπά, μεταπτυχιακό φοιτητή του εργαστηρίου γιατί ήταν εκεί όταν τους χρειαζόμουν για να μου λύσουν οποιαδήποτε απορία. Επιπρόσθετα, την Έλενα Αναστασίου, μεταπτυχιακή φοιτήτρια του εργαστηρίου για την άριστη συνεργασία μας. Τέλος, την οικογένεια μου για την υποστήριξή της όλο αυτό το διάστημα.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο δάκος της ελιάς, *Bactrocera oleae*, αποτελεί τον κύριο εχθρό των ελαιοκαλλιιεργειών. Το γευστικό του σύστημα, είναι υπεύθυνο για πολλές φυσιολογικές λειτουργίες του οργανισμού, όμως μέσω αυτού προσελκύεται και στην ελιά λόγω μη πτητικών ερεθισμάτων. Τα ερεθίσματα που διεγείρουν την ενεργοποίηση του συστήματος ποικίλουν, προκαλώντας την έκφραση πολλών υποδοχέων. Ένα από αυτά τα ερεθίσματα μπορεί να είναι και η κύρια φαινολική ένωση των ελαιοκάρπων, η ολευρωπαΐνη, υπεύθυνη για την πικρή γεύση των ελιών.

Ο σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας ήταν ο εντοπισμός γευστικών υποδοχέων, μέσω βιοπληροφορικής ανάλυσης, που είτε ανταποκρίνονται στην πικρή γεύση είτε εμφανίζουν ειδο-ειδικότητα στο είδος του *Bactrocera oleae*. Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε η μελέτη των επιπέδων έκφρασης στα επιλεγμένα γονίδια των γευστικών υποδοχέων για τους ιστούς των θωράκων και των γναθικών προσαρτημάτων οι οποίοι απομονώθηκαν από συζευγμένα θηλυκά έντομα 12<sup>ης</sup> ημέρας του εργαστηριακού πληθυσμού του δάκου της ελιάς, μέσω Real Time PCR, ως απόκριση στην ολευρωπαΐνη.

Τα γονίδια τα οποία φαίνεται να συμμετέχουν στην διαδικασία αναγνώρισης των καρπών της ελιάς από τον δάκο μέσω της ολευρωπαΐνης μπορούν μελλοντικά να αποτελέσουν στόχους για την ανάπτυξη εξιδικευμένων παγίδων για τον έλεγχο του πληθυσμού του εντόμου.

## ABSTRACT

The olive fruit fly, *Bactrocera oleae*, is the main enemy of olive cultivation. The gustatory system of the insect is responsible for many physiological functions and it is liable with the attraction of dacus to the olive trees due to different stimuli. One of these stimuli can be oleuropein, the main phenolic component of the olive fruit, which produces the bitter taste of the fruit. These stimuli are able to activate a number of gustatory receptors.

Through bioinformatic analysis, we identified the nucleotide and amino acid sequences of the gustatory receptors, which respond to bitter taste or present species specific function within *Bactrocera oleae*. Furthermore, we performed expression analysis of the selected genes through Real Time PCR in the tissues of thorax and maxillary palps of 12<sup>th</sup> day adult mated female insect after exposure to oleuropein.

Olive fly genes expressed in the olive recognition pathway can be potentially used for the production of species-specific insect traps, for purposes of population control.

## Περιεχόμενα

1	ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	9
1.1	Η αίσθηση της γεύσης και οι κατηγορίες γεύσεων στα έντομα .....	9

1.1.1	Κατηγορίες γεύσεων που αντιλαμβάνονται τα έντομα .....	9
1.2	Το γευστικό σύστημα στα έντομα.....	10
1.2.1	Λειτουργίες του γευστικού συστήματος των εντόμων.....	10
1.2.2	Δομή του γευστικού συστήματος των εντόμων : Από τον εξωτερικό κόσμο στον μοριακό .....	11
1.3	Γευστικοί υποδοχείς Grs: αναπόσπαστο κομμάτι του μοριακού κόσμου της γεύσης. ....	13
1.3.1	Δομή των γευστικών υποδοχέων-Grs:.....	15
1.3.2	Σηματοδότηση μέσω υποδοχέων GPCR. ....	16
1.3.3	«Γλυκά» και «Πικρά» μονοπάτια μεταγωγής σήματος στις μύγες φρούτων. ....	16
1.4	Η ελιά, <i>Olea europaea</i> , και τα συστατικά του καρπού της.....	17
1.4.1	Ολευρωπαΐνη: Χημική δομή του πικρού θεμελιώδους συστατικού της ελιάς.....	18
1.4.2	Ολευρωπαΐνη: μεταβολισμός της ένωσης .....	19
1.5	Απόκριση των εντόμων στην πικρή γεύση .....	20
1.6	Ο δάκος της ελιάς, <i>Bactrocera oleae</i> .....	20
1.6.1	Κύκλος ζωής του δάκου .....	21
1.6.2	Συμβιωτικές σχέσεις του δάκου της ελιάς.....	22
1.6.3	Γιατί παρουσιάζει ενδιαφέρον η διερεύνηση του γονιδιώματος του δάκου	23
2	ΣΚΟΠΟΣ: .....	24
3	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	26
3.1	ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ- φυλογένεση και σχεδιασμός ομόλογων εκκινήτων.....	26
3.1.1	Βάση δεδομένων NCBI-nucleotide & NCBI-protein.....	26
3.1.2	Αλγοριθμός blast .....	26
3.1.3	Πολλαπλή στοίχιση και εύρεση επικρατειών των υποδοχέων .....	27
3.1.4	Κατασκευή φυλογενετικού δέντρου.....	28
3.1.5	OMIGA 2.0.....	29
3.1.6	Integrated DNA Technologies PrimerQuest tool - Oligoanalyzer tool / Primer-Blast.....	29
3.2	Πειραματική διαδικασία.....	31

3.2.1	Απομόνωση ιστών των ενήλικων θηλυκών εντόμων .....	31
3.2.2	Απομόνωση RNA των ιστών .....	32
3.2.3	Επεξεργασία/ καθαρισμός του RNA με DNase .....	32
3.2.4	Αντίστροφη μεταγραφή-RT PCR.....	33
3.2.5	Ποσοτική PCR πραγματικού με ενίσχυση από τους ομόλογους εκκινητές (qPCR).....	34
3.3	Στατιστική ανάλυση – GraphPad software .....	37
4	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	40
4.1	Επιλογή των γονιδίων των γευστικών υποδοχέων του <i>Bactrocera oleae</i> 40	
4.2	Σχεδιασμός εκκινητών για τα πέντε γονίδια που επιλέχθηκαν .....	47
4.3	Υπολογισμός της απόδοσης (Efficiency, E) των εκκινητών.....	48
4.4	Απομόνωση ιστών ενήλικων εντόμων .....	50
4.5	Αποτελέσματα real time PCR .....	51
5	Συζήτηση.....	60
6	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	65
7	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	72
7.1	ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΕΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΕΣ ΤΩΝ 53 ΥΠΟΨΗΦΙΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΠΟΥ ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΟΥΝ ΓΕΥΣΤΙΚΟΥΣ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΤΟΥ <i>B.oleae</i> .....	72
7.2	ΑΜΙΝΟΞΙΚΕΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΕΣ ΤΩΝ 53 ΥΠΟΨΗΦΙΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΠΟΥ ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΟΥΝ ΓΕΥΣΤΙΚΟΥΣ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΤΟΥ <i>B.oleae</i> .....	75
7.3	ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΟ ΔΕΝΤΡΟ <b>Σφάλμα!</b> Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.	

*Εισαγωγή*



## 1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι αισθήσεις των οργανισμών αποτελούν την κύρια πηγή των γνώσεων για την πολυδιάστατη σύσταση του εξωτερικού τους περιβάλλοντος, μέσω του οποίου παρέχεται σε αυτούς μια πληθώρα ερεθισμάτων που πρέπει να ερμηνευτούν κατάλληλα, έτσι ώστε ο κάθε οργανισμός να δράσει με τρόπο τέτοιο που θα του εξασφαλίσει την επιβίωση του. Αναπόσπαστο κομμάτι της διαδικασίας μεταφοράς του εξωτερικού ερεθίσματος είναι η μοριακή σηματοδότηση καθώς και η διακυτταρική επικοινωνία. Συνεπώς, κυρίαρχο ρόλο διακατέχουν οι διαφορετικοί τύποι υποδοχέων, που βρίσκονται στα διάφορα όργανα αντίληψης. Το σύστημα που τελικά θα λάβει το σήμα δεν είναι άλλο από το νευρικό.

### 1.1 Η αίσθηση της γεύσης και οι κατηγορίες γεύσεων στα έντομα

Η γεύση είναι μία από τις βασικές αισθήσεις. Όλοι οι ζωικοί οργανισμοί, έτσι και τα έντομα, έχουν αναπτύξει εξειδικευμένους μηχανισμούς με σκοπό να αναγνωρίζουν τα ερεθίσματα που τα βοηθούν να επικοινωνούν με το εξωτερικό τους περιβάλλον μέσω των χημικών συστατικών της τροφής (Dethier, 1976). Κάποια από αυτά τα χημικά ερεθίσματα υποδηλώνουν την παρουσία θρεπτικών συστατικών, ενώ άλλα προειδοποιούν το έντομο για την ύπαρξη κάποιου κινδύνου (Joseph and Carlson, 2015). Αυτό επιτυγχάνεται με τη βοήθεια του γευστικού συστήματος, το οποίο θα αναλυθεί παρακάτω και έχει μελετηθεί εκτενώς στη φρουτόμυγα *Drosophila melanogaster*.

#### 1.1.1 Κατηγορίες γεύσεων που αντιλαμβάνονται τα έντομα

Τα έντομα μπορούν να ανιχνεύσουν ποιοτικά τρεις τύπους γεύσεων στο περιβάλλον τους, τη γλυκιά, την πικρή καθώς και την αλμυρή γεύση (Fujishiroetal, 1984; Singh, 1997; Meunieretal., 2003). Αυτοί οι χαρακτηρισμοί αποδίδονται στις τροφές ανάλογα με τη χημική τους σύσταση.

Ακόμη, είναι σημαντικό να αναφερθεί πως η γεύση δεν έχει μόνο ποιοτική αλλά έχει και ποσοτική υπόσταση. Εκτός από τη χημική ταυτότητα της τροφής, η χημική της ένταση μπορεί να είναι κρίσιμη για τον οργανισμό που πρόκειται να τη λάβει. Είναι σαν ένα άλλο σύστημα δόσης-απόκρισης με επαγωγικό ή ανασταλτικό χαρακτήρα, όπου ο οργανισμός πρέπει να αποφασίσει με τι είναι καλό να τραφεί. Η περιεκτικότητα μίας τροφής σε ένα σάκχαρο για παράδειγμα, σκιαγραφεί τη θρεπτικότητα της, όπως ακριβώς και η αυξημένη συγκέντρωση μίας πικρής ένωσης μπορεί να επηρεάσει την τοξικότητα του τροφίμου. Επιπλέον, ορισμένα ερεθίσματα είναι ελκυστικά σε χαμηλές συγκεντρώσεις και απωθητικά σε υψηλότερες.

Έτσι αναδύεται το εξής πρόβλημα. Όλα αυτά τα χημικά συστατικά, που αποτελούν πηγές ερεθισμάτων, δημιουργούν ένα χημικό θόρυβο στο περιβάλλον. Τα ερεθίσματα, που αποτελούν το εναρκτήριο σήμα, εμφανίζουν τεράστια ποικιλία και ετερογένεια, ενώ παράλληλα η ικανότητα ταυτοποίησης και ποσοτικοποίησής τους αποτελεί για τους οργανισμούς ζήτημα ζωής ή θανάτου (Joseph and Carlson, 2015).

Όπως σε όλες τις αισθήσεις χημειοαντίληψης, έτσι και γύρω από την αίσθηση της γεύσης σχηματίζεται μια αλυσίδα, από το ερέθισμα μέχρι την τελική αντίδραση του οργανισμού, που είναι η συμπεριφορά του. Θεμελιώδες κομμάτι της συγκεκριμένης αλυσίδας είναι το γευστικό σύστημα.

## 1.2 Το γευστικό σύστημα στα έντομα

Αν θα μπορούσε να δοθεί μία γενική εικόνα για το γευστικό σύστημα, θα μπορούσαμε να πούμε ότι αποτελείται από ανιχνευτές που εντοπίζουν διάφορες κατηγορίες προσδετών μέσω των οποίων επάγονται ή παρεμποδίζονται συμπεριφορές (French et al., 2015).

Το γευστικό σύστημα επιτελεί συγκεκριμένες λειτουργίες, έχει μια χαρακτηριστική δομή και χαρακτηρίζεται από πολυπλοκότητα. Σαν σύστημα επιτυγχάνει χημειοαντίληψη μέσω επαφής, καθώς μέσω αυτού τα έντομα ανιχνεύουν μη πτητικές ενώσεις, σε αντίθεση με το οσφρητικό σύστημα. Σημαντικό είναι το γεγονός ότι αρχίζει να υπάρχει από το προνυμφικό στάδιο και δεν εμφανίζεται μόνο στα ενήλικα έντομα (Joseph and Carlson, 2015).

### 1.2.1 Λειτουργίες του γευστικού συστήματος των εντόμων

Ο ρόλος του γευστικού συστήματος είναι κομβικός, επειδή όλες οι λειτουργίες που επιτελεί αφορούν την επιβίωση του εντόμου.

Πρώτη και κύρια δραστηριότητα που πραγματοποιείται από τα έντομα χάρη στο σύστημα αυτό είναι η εύρεση της τροφής. Ακόμη, μέσω της χημειοαντίληψης τα άτομα μπορούν να αποφύγουν την κατανάλωση δηλητηριωδών ουσιών, γεγονός που τα προφυλάσσει από θάνατο. Επιπλέον, αποτελεί ένα σύστημα το οποίο βοηθάει και στην άμυνα έναντι θηρευτών του εντόμου. Κρίσιμος όμως είναι και ο ρόλος που παίζει στην εύρεση συντρόφου για σύζευξη, άρα παρέχει την ευκαιρία για αναπαραγωγή. Η ευκαιρία για επιβίωση και αναπαραγωγή αποτελούν θεμέλια για την εξέλιξη των ειδών.

Συνεπώς αποτελεί και ένα σύστημα το οποίο βοηθάει και στην προσαρμογή του εντόμου στο φυσικό του περιβάλλον. Όμως οι συνθήκες του περιβάλλοντος είναι μεταβλητές, και τα ερεθίσματα στα οποία καλείται να ανταποκριθεί ο κάθε οργανισμός επίσης. Για αυτό το λόγο το γευστικό σύστημα προτείνεται να αναδιαμορφώνεται εκ νέου, είτε αυξάνοντας είτε μειώνοντας τις αποκρίσεις του στα νέα περιβαλλοντικά ερεθίσματα και κινδύνους. Ακόμη μπορεί να μεταβάλλονται οι αποκρίσεις, με στόχο την εγκαθίδρυση των εξωτερικών αλλαγών στο εσωτερικό των εντόμων (Delventhal and Carlson, 2016).

Πιθανόν όλες αυτές οι λειτουργίες, που έχουν αντίκτυπο στη συμπεριφορά του εντόμου, να οφείλονται στη δομή του γευστικού συστήματος.

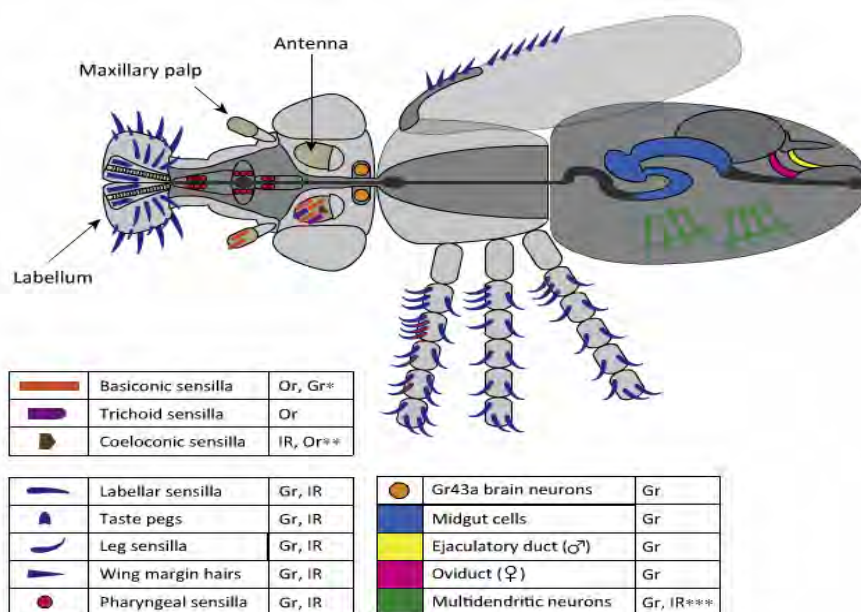
## 1.2.2 Δομή του γευστικού συστήματος των εντόμων : Από τον εξωτερικό κόσμο στον μοριακό

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, το γευστικό είναι ένα σύστημα το οποίο έχει μελετηθεί εκτενώς στην *Drosophila*, έτσι μπορούμε να ανακτήσουμε πολλές πληροφορίες για τη δομή του στα διάφορα αναπτυξιακά στάδια του εντόμου.

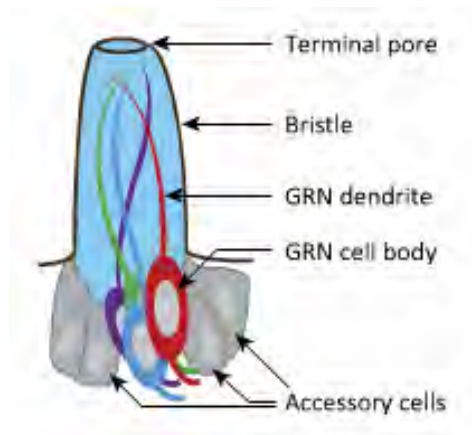
### ➤ Το γευστικό σύστημα των ενήλικων ατόμων:

Η *Drosophila*, στο στάδιο του ενήλικου εντόμου, έχει ένα δίκτυο αισθητήριων ιστών κατά μήκος του σώματος της, όπως επίσης και στο κεφάλι της (Εικ. 1). Αυτοί οι ιστοί διαθέτουν γευστικούς νευρώνες (GRNs) (Vosshall and Stocker, 2007; Liman, 2014), οι οποίοι είναι είτε κοντοί, είτε μακριοί ή και μεσαίου μεγέθους (L2; Meunier et al., 2003; Siddiqi and Rodrigues, 1980; Thorne et al., 2005). Οι νευρώνες αυτοί περικλείονται από το τοίχωμα (Bristle) των αισθητήριων γευστικών τριχιδίων (gustatory sensilla) τα οποία διαθέτουν ένα μεγάλο πόρο στην κορυφή τους. Το κάθε ένα από αυτά τα τριχίδια περιλαμβάνει συνήθως 4 γευστικούς νευρώνες (Εικ. 1). Στις περισσότερες περιπτώσεις ο ένας νευρώνας είναι ευαίσθητος στην πικρή γεύση και σε υψηλές συγκεντρώσεις αλάτων, ο δεύτερος στη γλυκιά, ο τρίτος σε χαμηλές συγκεντρώσεις αλάτων και ο τελευταίος στο νερό.

Επιπρόσθετα, υπάρχουν και μικρότερες δομές που αποκαλούνται taste pegs και διαθέτουν ένα μονό GRN, ο οποίος είναι ευαίσθητος στη γλυκιά γεύση. Τα πόδια, ακόμη, διαθέτουν και αυτά αισθητήρια τριχίδια γεύσης παρέχοντας στη μύγα ένα δείγμα της πιθανής τροφής προτού εναποθέσει πάνω της κάποιος μέρος της μουσούδας (Labellum) (Liman et al.2014; Meunier, et al.2003; Ling et al.2014), αυτό συμβαίνει διότι η μύγα έχει σε αντίθεση με άλλους οργανισμούς μικρότερο μέγεθος σε σχέση με την τροφή της (Yarmolinsky et al.2009)



Εικ. 1. Θέσεις εντοπισμού των γευστικών υποδοχέων (GRs) στο σώμα του ενήλικου εντόμου ανάλογα με το υπόμημα.

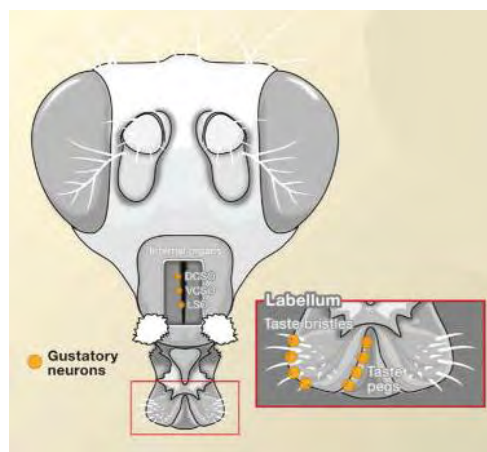


Εικ. 2. Δομή και εσωτερική διάταξη των αισθητήριων τριχιδίων του γευστικού συστήματος.

Ορισμένα αισθητήρια τριχίδια των ποδιών έχουν ένα γευστικό νευρώνα που είναι ευαίσθητος στην γλυκιά γεύση, αλλά όχι στην πικρή, ενώ σε άλλα ισχύει το αντίθετο. Διαθέτουν ένα νευρώνα που αποκρίνεται στην πικρή αλλά όχι στην γλυκιά γεύση. Παρόλα αυτά υπάρχουν και αισθητήρια τριχίδια που έχουν και τους δύο τύπους νευρώνων στο εσωτερικό τους.

Σημαντικός είναι όμως και ο εντοπισμός τέτοιου τύπου τριχιδίων στον ωοθήτη μεγαλύτερων μυγών, που μέσω ηλεκτροφυσιολογίας φαίνεται να έχουν γευστικές λειτουργίες (Wolbarsht and Dethier, 1958; Rice, 1977).

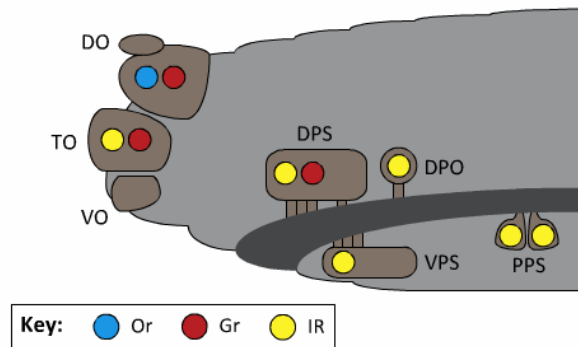
Η γεύση παρόλα αυτά δεν γίνεται αντιληπτή μονάχα από όργανα και εξαρτήματα που εντοπίζονται στο εξωτερικό μέρος του σώματος. Οι μύγες έχουν αναπτύξει ένα δίκτυο εσωτερικών γευστικών κυττάρων (Nayak and Singh, 1983). Για παράδειγμα, στον φάρυγγα του εντόμου υπάρχουν τα labral, ventral και cibarial αισθητήρια όργανα (LSO, VCSO, DCSO) (Εικ. 3) τα οποία περιέχουν αισθητήρες που διαθέτουν έως και οχτώ νευρώνες (Meunier, et al. 2003). Οι δενδρίτες των συγκεκριμένων νευρώνων καταλήγουν στον οισοφαγικό σωλήνα (Miyamoto, et al. 2012; Dus, et al. 2015). Ο έλεγχος μετά την πρόσληψη των θρεπτικών συμβαίνει στον εγκέφαλο και πιθανώς στα ενδοκρινή κύτταρα του εντέρου (Park and Kwon, 2011).



Εικ. 3. Τα γευστικά όργανα LSO, VCSO, DCSO στο κεφάλι της *Drosophila melanogaster*.

### ➤ Το γευστικό σύστημα της προνύμφης:

Η χημειοαντίληψη είναι μία ιδιότητα που δεν διαθέτουν μόνο τα ενήλικα άτομα. Τα έντομα διαθέτουν γευστικό και οσφρητικό σύστημα ακόμα και στο προνυμφικό στάδιο ανάπτυξής τους. Κατά το στάδιο αυτό, τα χημικά ερεθίσματα γίνονται αντιληπτά από την προνύμφη (larva) κυρίως μέσω υγρής και όχι τόσο αέριας μορφής. Για αυτό το λόγο πέρα από τα οσφρητικά όργανα που έχουν αναπτύξει οι προνύμφες, έχουν και δύο γευστικά όργανα. Αυτά είναι το terminal (TO) και το ventral (VO) τα οποία διαθέτουν γευστικούς νευρώνες (Εικ. 4) (Kwon, et al.2011; Gerber and Stocker, 2007). Ακόμα, οι προνύμφες έχουν και εσωτερικά όργανα χημειοαντίληψης που εντοπίζονται στο φάρυγγα και περιέχουν μικρό αριθμό GRNs. Είναι σημαντικό να αναφερθεί πως οι γευστικοί νευρώνες του φάρυγγα των προνυμφών της *D. melanogaster* ανήκουν στους ελάχιστους αισθητήριους νευρώνες που παραμένουν κατά τη μεταμόρφωση του εντόμου ενσωματωμένοι σε μερικά από τα φαρυγγικά αισθητήρια όργανα του ενήλικου (Gendre, et al. 2004).



Εικ. 4. Θέσεις εντοπισμού των γευστικών υποδοχέων και των γευστικών οργάνων στην προνύμφη (Joseph & Carlson, 2015).

Συμπερασματικά, η αντίληψη της γεύσης συμβαίνει κατά μήκος όλου του σώματος της μύγας, όπως και κατά το προνυμφικό στάδιο ανάπτυξης, με τη βοήθεια των αισθητήριων τριχιδίων, των γευστικών οργάνων και των γευστικών νευρώνων, καθώς και μέσω εσωτερικών οργάνων. Το ερώτημα που γεννάται παρόλα αυτά είναι ποια είναι τα υπεύθυνα μόρια που συνδέουν το ερέθισμα με τους GRNs και προκαλούν την διέγερση τους.

### 1.3 Γευστικοί υποδοχείς Grs: αναπόσπαστο κομμάτι του μοριακού κόσμου της γεύσης.

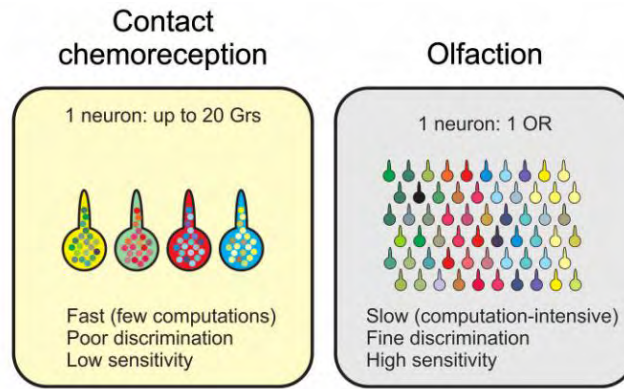
Μοριακά αυτό το σύστημα δεν θα μπορούσε να υποστηριχτεί καλύτερα από την ύπαρξη υποδοχέων, οι οποίοι είναι πιθανόν ότι έρχονται σε επαφή με τον προσδέτη-ερέθισμα και μεταδίδουν το μήνυμα στο κέντρο αντίληψης της γεύσης του εγκεφάλου. Οι υποδοχείς αυτοί ονομάζονται γευστικοί υποδοχείς (Gustatory receptors, Grs). Η *D. melanogaster* συμπεριλαμβάνει 60 Gr γονίδια στο γονιδίωμα της, τα οποία φαίνεται να εκφράζονται σε 68 πρωτεΐνες-υποδοχείς λόγω του

εναλλακτικού ματίσματος των μεταγράφων (Robertson, et al. 2003). Μεταξύ τους οι πρωτεΐνες αυτές διαφέρουν σημαντικά, καθώς περιέχουν μόνο ένα 8% αμινοξέων ταυτότητας. Επίσης, οι γευστικοί υποδοχείς δεν συνδέονται με τους οσφρητικούς υποδοχείς, γεγονός το οποίο θα μπορούσε να θεωρηθεί ως ένα φαινόμενο γενεαλογίας εντός μίας μεγάλης υπεροικογένειας χημειουποδοχέων στα έντομα (Robertson, et al. 2006). Η τοπολογία, ακόμη, των γευστικών υποδοχέων των εντόμων δεν είναι τόσο ξεκάθαρη σε σύγκριση με τους οσφρητικούς υποδοχείς (Zhang, et al. 2011).

Σε ότι αφορά την ιστοειδική έκφραση των γευστικών υποδοχέων της μύγας, αυτοί φαίνεται να εκφράζονται στη μουςούδα, τα πόδια, τον φάρυγγα (Ling, et al. 2014; Dupirace, et al. 2001), όπως και σε διάφορους ακόμη ιστούς του ενήλικου εντόμου. Τέτοιοι ιστοί είναι, για παράδειγμα, οι κεραίες, οι γναθικές προσακτρίδες, τα ενδοκρινή κύτταρα του εντέρου, πολυδενδριτικά κύτταρα του κοιλιακού σωματικού τοιχώματος, νευρώνες που νευρώνουν τα αναπαραγωγικά όργανα, καθώς έχουμε έκφραση και στον εγκέφαλο (Myamoto, et al. 2012; Park and Kwon, 2011). Ακόμα, έκφραση γευστικών υποδοχέων έχουμε και στα γευστικά όργανα της προνύμφης.

Μια πολύ σημαντική πληροφορία για τους γευστικούς υποδοχείς-Grs είναι ότι σε αντίθεση με τους οσφρητικούς υποδοχείς συνεκφράζονται στους γευστικούς νευρώνες, GRNs. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί μία οικογένεια γευστικών νευρώνων της μουςούδας που φαίνεται να αποκρίνονται στην πικρή γεύση στους οποίους φαίνεται να εκφράζονται 29 γευστικοί υποδοχείς (Weiss, et al. 2011). Όπως επίσης συμβαίνει και με γευστικούς νευρώνες που εμφανίζουν απόκριση στο πικρό και εντοπίζονται στα πόδια και συνεκφράζουν 18 υποδοχείς, αλλά και στην προνύμφη που έχουμε την συνέκφραση 17 γευστικών υποδοχέων. Ακόμη και οι νευρώνες που αποκρίνονται στην γλυκιά γεύση συνεκφράζουν γευστικούς υποδοχείς (Dahanukar, et al. 2007; Jiao, et al. 2007).

[Εντυπωσιακή, επίσης, είναι η σύγκριση για το πώς επιδέχεται επεξεργασία η πληροφορία που είναι το ερέθισμα μέσω της εξ επαφής χημειοαντίληψης και της όσφρησης. Τα δύο αυτά συστήματα είναι αφοσιωμένα στο να εντοπίζουν μόρια του εξωτερικού περιβάλλοντος, χρησιμοποιώντας τους υποδοχείς με πολύ παρόμοιο τρόπο. Παρόλα αυτά, η μοριακή λογική και η λειτουργία των δύο συστημάτων είναι τελείως διαφορετική. Στο γευστικό σύστημα παρατηρούμε ένα μωσαϊκό έκφρασης γευστικών υποδοχέων που ρυθμίζεται από προσδέτες που άπτονται σε μία από τις δύο κατηγορίες (γλυκό ή πικρό), κάτι το οποίο δεν εντοπίζεται στο οσφρητικό σύστημα (Knaden et al., 2012). Αυτή η δομική διαφορά ίσως να σκιαγραφεί περιορισμούς στη λειτουργία του συστήματος, στη διακριτική του ικανότητα, στην ταχύτητα της απόκρισης, στο κατώφλι ευαισθησίας καθώς και στην πλαστικότητα του (Εικ. 5). Το γευστικό σύστημα φαίνεται πιο αυστηρό στην αναγνώριση της γλυκιάς και πικρής γεύσης μέσω μίας ομάδας υποδοχέων που εκφράζονται σε διαφορετικούς τύπους κυττάρων (Zhang et al., 2013b).]

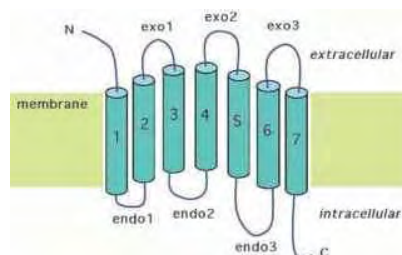


Εικ. 5. Διαφορές του οσφρητικού και γευστικού συστήματος. (Zhang et al., 2013b).

### 1.3.1 Δομή των γευστικών υποδοχέων-Grs:

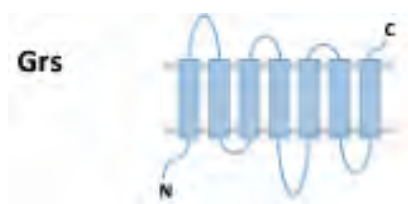
Κατά την εξέλιξη συνέβησαν ποικίλες αλλαγές μέχρι να επιλεγθεί η καταλληλότερη δομή για τους συγκεκριμένους υποδοχείς, ιονοτροπικοί ή μεταβοτροπικοί. Οι GPCRs (G Protein Coupled Receptors) με τη χαρακτηριστική δομή τους αντιπροσωπεύουν το πιο επιτυχημένο μοντέλο εξέλιξης και αποτελούν μία από τις μεγαλύτερες οικογένειες γονιδίων και πρωτεϊνών. Στο ανθρώπινο γονιδίωμα έχουν αναγνωριστεί 865 γονίδια που κωδικοποιούν GPCRs, εκ των οποίων οι 400 είναι λειτουργικοί οσφρητικοί υποδοχείς (Fredriksson et al., 2003). Παρόλα αυτά η φυσιολογική λειτουργία 800 GPCRs παραμένει άγνωστη και για αυτό και αποκαλούνται «ορφανοί» υποδοχείς που ενεργοποιούν μία ετεροτριμερή G-πρωτεΐνη (Howard et al., 2001). Γενικότερα είναι γνωστό πως φωτόνια, οσμές, νευροδιαβιβαστές, ορμόνες, χημειοκίνες, λιπίδια, νουκλεοτίδια καθώς και ιόντα ενεργοποιούν τους υποδοχείς αυτούς και επάγουν μία πληθώρα φυσιολογικών λειτουργιών και συμπεριφορών. Ωστόσο, το συγκεκριμένο μοντέλο λειτουργίας των υποδοχέων συναντάται μόνο στους ζωικούς οργανισμούς.

Οι υποδοχείς που ενεργοποιούν μία  $G_{\alpha\beta\gamma}$ -πρωτεΐνη μοιράζονται κοινά χαρακτηριστικά στη δομή τους. Αποτελούνται από 7 υδρόφοβες διαμεμβρανικές υπομονάδες (7TM) με ένα εξωκυτταρικό αμινοτελικό άκρο και ένα ενδοκυτταρικό καρβοξυτελικό άκρο (Εικ. 6). Αυτή η σταθερότητα στη δομή αυτών των υποδοχέων βρίσκεται σε αντιδιαστολή με την δομική ποικιλομορφία των προσδετών τους (Ji et al., 1998).



Εικ. 6. Δομή των GPCR υποδοχέων στους ζωϊκούς οργανισμούς (Flower, D. R., 1999).

Παρά το γεγονός ότι το γευστικό σύστημα των εντόμων εξελίχθηκε ανεξάρτητα από αυτό των θηλαστικών (Yarmolinsky et al. 2009), η χημειοαντίληψη στο επίπεδο των υποδοχέων εμφανίζει ομοιότητες. Έτσι και στα έντομα, τελικά, το μοντέλο που επικράτησε τόσο για τους οσφρητικούς όσο και για τους γευστικούς υποδοχείς τους φαίνεται να ανήκει στην οικογένεια των υποδοχέων με τις 7 διαμεμβρανικές υπομονάδες (7-TM). Η διαφορά που εντοπίζεται σε σχέση με τη δομή των κλασικών υποδοχέων GPCR είναι ότι οι συγκεκριμένοι υποδοχείς εμφανίζουν ανάστροφη δομή. Δηλαδή το N- τελικό τους άκρο εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα, ενώ το C- τελικό τους άκρο εξωκυτταρικά (Ji et al., 2006; Lundin et al.2007) (Εικ. 7).



Εικ. 7. Δομή των γευστικών υποδοχέων.

### 1.3.2 Σηματοδότηση μέσω υποδοχέων GPCR.

Οι λειτουργίες που επιτελούνται από τους υποδοχείς της οικογένειας των GPCRs κατευθύνονται μέσω μεταγωγικών μονοπατιών, που παρά την ποικιλομορφία τους βασίζονται σε κοινό μοντέλο μεταγωγής σήματος. Ο υποδοχέας ενεργοποιεί μία ετεροτριμερή G πρωτεΐνη ( $\alpha$ ,  $\beta\gamma$  υπομονάδες), η οποία με τη σειρά της θα ενεργοποιήσει κάποιο τελεστή. Ο τελεστής μπορεί να είναι είτε κάποιο ένζυμο (αδενυλική κυκλάση, φωσφολιπάση C και  $A_2$ ) ή ένα κανάλι ιόντων. Ο τελεστής αυτός στη συνέχεια συνθέτει τον δεύτερο διαβιβαστή (cAMP, cGMP,  $IP_3$ ,  $Ca^{2+}$ ) προκαλώντας την ενίσχυση του σήματος. Έτσι οι δεύτεροι διαβιβαστές ενεργοποιούν άμεσα ή έμμεσα πρωτεϊνικές κινάσες, που θα φωσφορυλιώσουν πρωτεΐνες – στόχους.

### 1.3.3 «Γλυκά» και «Πικρά» μονοπάτια μεταγωγής σήματος στις μύγες φρούτων.

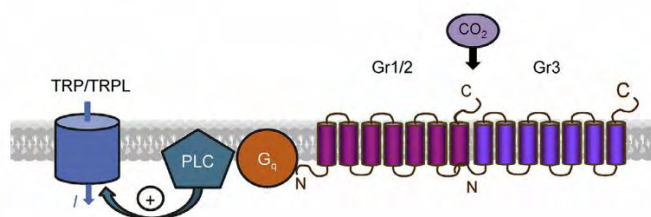
Προς το παρόν, δεν είναι σαφές εάν μετά την ενεργοποίηση της G-πρωτεΐνης από τον υποδοχέα Gr ακολουθεί ένας καταρράκτης σηματοδότησης μέσω ενός δεύτερου διαβιβαστή ή εάν λειτουργεί ως κανάλι ιόντων, αντιθέτως για τη σηματοδότηση μέσω των συγγενικών τους οσφρητικών υποδοχέων, έχει προταθεί η λειτουργία καναλιών ιόντων (Sato et al., 2008; Wicher et al., 2008).

Στη *Drosophila melanogaster*, ο γευστικός υποδοχέας Gr5a ευαισθητοποιείται από την τρεχαλόζη ή αλλιώς τρεαλόζη (Chyb et al., 2003), που είναι ένας άλφα-συνδεδεμένος δισακχαρίτης ο οποίος ανήκει στην κατηγορία των γλυκαντικών. Επίσης στη *Drosophila* φαίνεται να μην υπάρχει αλληλοεπικάλυψη της έκφρασης του με τον γευστικό υποδοχέα Gr66a και του Gr5a στους γευστικούς νευρώνες (GRNs) (Thorne et al., 2004; Wang et al., 2004). Παράλληλα, γνωρίζουμε πως ο Gr66a είναι υποδοχέας που αποκρίνεται σε συστατικά με πικρή γεύση (Moon et al., 2006). Κάθε



ένας από αυτούς τους υποδοχείς σχηματίζει ένα ετεροδιμερές με έναν ξεχωριστό γευστικό υποδοχέα, συνεπώς θα μπορούσε να θεωρηθεί ότι έχουν ρόλο συνυποδοχέα. Επιπλέον, οι απολήξεις αυτών των νευρώνων καταλήγουν σε πολύ διακριτές δομές του γαγγλίου SOG. Έτσι η λειτουργία του Gr5a είναι άμεσα συνυφασμένη με μία σειρά γλυκών συστατικών, σε αντίθεση με τους νευρώνες που εκφράζουν τον Gr66a οι οποίοι φαίνεται να αποκρίνονται μόνο σε πικρά συστατικά. Όντως παρατηρήθηκε πως σύμπλοκα που ενεργοποιούν τον Gr5a είναι ελκυστικά στη μύγα ενώ αυτά που ευαισθητοποιούν τον Gr66a είναι απωθητικά (Thorne et al., 2004; Wangetal., 2004; Marellaetal., 2006). Συνεπώς, αυτά τα δύο μονοπάτια λειτουργούν ως κατευθυντήριες γραμμές για την «γλυκιά» (Gr5a) και την «πικρή» (Gr66a) γεύση (David et al., 2009).

Ακόμη, στη *D. melanogaster* το διοξείδιο του άνθρακα CO<sub>2</sub>, ανιχνεύεται από το διμερές των υποδοχέων Gr21a και Gr63a, οι οποίοι συζεύγγονται με μία Gα<sub>q</sub> πρωτεΐνη που ενεργοποιεί την φωσφολιπάση C (PLC) προκαλώντας έτσι το άνοιγμα καναλιών ιόντων της οικογένειας των TRP μέσω άγνωστου μηχανισμού ( Badsha F, et al.,2010) (Εικ. 8).



Εικ. 8 Μοριακή σηματοδότηση μέσω υποδοχέων Gr (Wicher, 2015)

Επιγραμματικά, ανάλογα με το γευστικό ερέθισμα που παρέχεται στο έντομο έχουμε έκφραση ή και συνέκφραση συγκεκριμένων γευστικών υποδοχέων, Grs, που μέσω των γευστικών νευρώνων «ταξιδεύουν» το μήνυμα στον κέντρο γεύσης του εγκεφάλου και οδηγούν στην εκδήλωση συμπεριφοράς.

Οι καρποί των φρούτων δεν αποτελούν αποκλειστικά και μόνο πηγή τροφής για τις μύγες φρούτων, αλλά και σημεία εναπόθεσης των αυγών τους. Ο καρπός του φυτικού οργανισμού που θα μας απασχολήσει στην παρούσα πτυχιακή εργασία είναι ο ελαιόκαρπος, καθώς προσβάλλεται μόνο από τη μύγα της ελιάς, *Bactrocera oleae*.

#### 1.4 Η ελιά, *Olea europaea*, και τα συστατικά του καρπού της

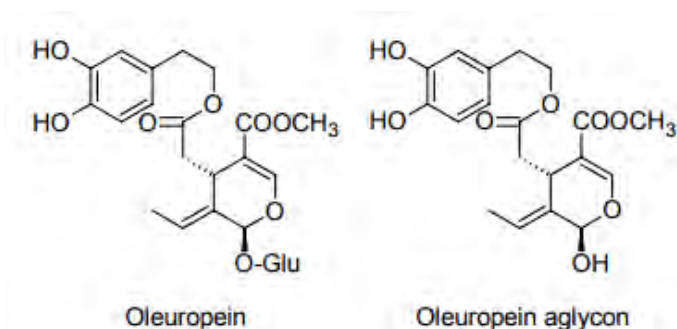
Πολλά είδη της οικογένειας των ελιών, όπως αυτό της *Olea europaea*, παρέχουν παγκοσμίως διάφορα προϊόντα, για παράδειγμα τρόφιμα. Ακόμη το λάδι που προέρχεται από την ελιά αποτελεί τη βάση της μεσογειακής διατροφής και περιέχει πληθώρα από τριακυλογλυκερόλες καθώς και μικρές ποσότητες ελεύθερων λιπαρών οξέων, γλυκερόλης, χρωστικές ουσίες, αρωματικές ενώσεις, στερόλες, τοκοφερόλες, φαινολικές ενώσεις και μη αναγνωρισμένα ρητινώδη συστατικά κ.α. (Kiritsakis A., 1998).

Οι φαινολικές ενώσεις βρίσκονται σε όλα τα μέρη του φυτού της ελιάς, αλλά τόσο η φύση τους όσο και η συγκέντρωσή τους ποικίλλει σημαντικά μεταξύ των διαφόρων ιστών. Στην *O. europaea*, η ολευρωπαΐνη και η διμέθυλο-ολευρωπαΐνη αντιπροσωπεύουν τα κυρίαρχα φαινολικά συστατικά (Soler-Rivas et al., 2000) ενώ η βερβασβοζίδη (verbascoside) (Ryan et al., 1999) είναι το κύριο υδροξυκιναμικό (hydroxycinnamic) παράγωγο του καρπού της ελιάς (Servili et al., 1999). Γενικά, η ολευρωπαΐνη είναι η πιο σημαντική φαινολική ένωση στις διάφορες ποικιλίες των ελιών και μπορεί να φθάσει σε συγκεντρώσεις μέχρι  $140 \text{ mg g}^{-1}$  σε ξηρή ύλη σε άγουρους καρπούς ελιάς (Amiot et al., 1986) και  $60\text{-}90 \text{ mg g}^{-1}$  σε ξηρή ύλη στα φύλλα (Le Tutour et al., 1992).

Για την ανάλυση της ποιοτικής και της ποσοτικής εμφάνισης φαινολικών ενώσεων στην ελιά έχουν αναπτυχθεί διάφορες μέθοδοι. Οι απλές τεχνικές περιλαμβάνουν χρωματογραφία λεπτού στρώματος (TLC) (Capasso et al., 1992), υψηλής απόδοσης με αντίστροφη φάση υγρή Χρωματογραφία (HPLC) (Ficarra et al., 1991; De Laurentis et al., 1997), αεριοχρωματογραφία-φασματομετρία μάζας (GC-MS) (Campeol et al., 2001) και τριχοειδής ηλεκτροφόρηση (CE, capillary electrophoresis) (Bonoli et al., 2004).

#### 1.4.1 Ολευρωπαΐνη: Χημική δομή του πικρού θεμελιώδους συστατικού της ελιάς

Η ολευρωπαΐνη ανήκει στα secoiridoids, τα οποία βρίσκονται σε αφθονία σε φυτά που ανήκουν στις οικογένειες Oleaceae, Gentianaceae, Cornaleae, καθώς και σε πολλά άλλα φυτά. Τα ιριδοειδή και τα σεκοριδοειδή είναι ενώσεις που είναι συνήθως γλυκοζυμικά δεσμευμένες και παράγονται από τον δευτερογενή μεταβολισμό των τερπενίων ως πρόδρομα διαφόρων ινδολικών αλκαλοειδών. Τα σεκοριδοειδή στις Oleaceae προέρχονται συνήθως από τον ελαιοζιδικό τύπο γλυκοζιτών (ελαιοσίδια), που χαρακτηρίζονται από έναν συνδυασμό ελενολικού οξέος και ενός γλυκοσιδικού υπολείμματος. Η ολευρωπαΐνη είναι ένας εστέρας της 2-(3,4-διϋδροξυφαινυλ)-αιθανόλης-υδροξυτυροσόλης και έχει τον ολεοσιδικό σκελετό που είναι κοινός για τα σεκοριδοειδή γλυκοσίδια των Oleaceae (Soler-Rivas C et al., 2000), κυρίως στη μορφή της αγλυκόνης, η οποία καθιστά το υπόλοιπο του σακχάρου αδιάλυτο σε έλαιο (Εικ. 9).



Εικ. 9 Χημική Δομή της Ολευρωπαΐνης

#### 1.4.2 Ολευρωπαΐνη: μεταβολισμός της ένωσης

Κατά την ανάπτυξη του καρπού της ελιάς διακρίνονται συνήθως τρεις φάσεις: μια φάση αύξησης, κατά τη διάρκεια της οποίας λαμβάνει χώρα συσσώρευση της ολευρωπαΐνης, μια «πράσινη» φάση ωρίμανσης που συμπίπτει με τη μείωση των επιπέδων της χλωροφύλλης και της ολευρωπαΐνης και μία «μαύρη» φάση ωρίμανσης που χαρακτηρίζεται από την εμφάνιση ανθοκυανινών κατά τη διάρκεια της οποίας εξακολουθούν να μειώνονται τα επίπεδα ολευρωπαΐνης (Amiot et al., 1989). Επομένως, η ολευρωπαΐνη είναι άφθονη κατά τα πρώτα στάδια, δηλαδή στους άγουρους καρπούς, όπου και μπορεί να φτάσει το 14% της ξηράς ύλης και εξακολουθεί να είναι πολύ σημαντική η συγκέντρωσή της κατά τη συγκομιδή των πράσινων συλλεγόμενων ποικιλιών ελιάς αν παρότι είναι χαμηλότερη (Amiot et al., 1986). Ακόμη στις λεγόμενες μαύρες ποικιλίες ελιάς, το επίπεδό της ολευρωπαΐνης μειώνεται γρήγορα κατά την ωρίμανση (Ottolina et al., 1995). Σε ορισμένες ποικιλίες (*Oleuropea* var *leccino*), μπορεί ακόμη και να πέσει στο μηδέν όταν οι καρποί είναι εντελώς μαύροι (Bianco et al., 1993), ενώ το ελενολικό οξύ και τα γλυκοζυλιωμένα παράγωγα της ολευρωπαΐνης, εμφανίζονται από την αρχή της «πράσινης» ωρίμανσης αλλά εντοπίζονται και καθόλη τη μείωση των επιπέδων ολευρωπαΐνης. Στη συνέχεια, η ολευρωπαΐνη συσσωρεύεται, φθάνοντας το μέγιστο κατά τη «μαύρη» ωρίμανση, μέχρις ότου η διμεθυλ-ολευρωπαΐνη γίνει το κυριότερο συστατικό των μαύρων ελιών (Bianco et al., 1993). Είναι πιθανό, αυτές οι δύο ενώσεις να σχηματίζονται από τη δράση των εστερών της ολευρωπαΐνης επειδή η εστερική δραστηριότητα αυξάνεται σημαντικά κατά τη διάρκεια της πρώτης φάσης της ωρίμανσης και φθάνει στο μέγιστο κατά την «μαύρη» ωρίμανση (Fleuriet et al., 1989). Ο καρπός της *O. europaea* φαίνεται να συσσωρεύει μόνο γλυκοζυλιωμένα παράγωγα της ολευρωπαΐνης. Αντίθετα, η διυδροξυτυροσώλη και τα μη γλυκοσυλιωμένα σεκοϊριδοειδή προέρχονται από την ολευρωπαΐνη που έχει βρεθεί στα φύλλα (Amiot et al., 1989; Amiot et al., 1990). Η μείωση της ολευρωπαΐνης επίσης συμπίπτει με την μείωση άλλων ποσοτικά λιγότερο σημαντικών ελαιοσιδίων και την αύξηση σε άλλες φαινολικές ενώσεις όπως ορισμένα φλαβονοειδή (Amiot et al., 1989). Η ολευρωπαΐνη εμπλέκεται επίσης στο καφέ χρώμα που παρατηρείται στις πράσινες επιτραπέζιες ελιές, είτε μετά από κρούση και τραυματισμό κατά τη συγκομιδή, είτε κατά τις μεταγενέστερες διεργασίες επεξεργασίας.

Έχουν, επίσης βρεθεί σημαντικές διαφορές στην περιεκτικότητα σε τυροσώλη, υδροξυτυροσώλη και γλυκοσίδη τυροσώλη στους καρπούς κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης και της ωρίμανσης (Angerosa et al., 1996). Η αύξηση των επιπέδων τους συσχετίζεται σταθερά με την υδρόλυση των συστατικών με υψηλότερα μοριακά βάρη, π.χ. της ολευρωπαΐνης (Climato et al., 1990). Τα περιεχόμενα υδροξυτυροσώλης και ελενολικού οξέος μπορούν να θεωρηθούν δείκτες για την ωρίμανση των ελιών (Cinquanta et al., 1998), λόγω της αλληλεπίδρασής του με μια οξειδάση διφαινόλης (PPO · EC 1.10.3.2). Αρχικά, αυτή η οξειδάση διφαινόλης συνδέεται με τους χλωροπλάστες, αλλά γίνεται όλο και περισσότερο διαλυτή κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης.

Ως εκ τούτου, το κατά πόσο σκούρο χρώμα θα έχει ο καρπός ποικίλει σημαντικά ανάλογα με το φυσιολογικό στάδιο του φρούτου. Αυτό είναι ένα φαινόμενο που βρέθηκε να συσχετίζεται με την περιεκτικότητα σε ολεωρωπαΐνη και όχι σε ΡΡΟ, υποδεικνύοντας ότι τα ενδογενή υποστρώματα αποτελούν τον κύριο περιοριστικό παράγοντα (Goupy et al., 1991).

### 1.5 Απόκριση των εντόμων στην πικρή γεύση

Η ενεργοποίηση των υποδοχέων από κάποιο πικρό ερέθισμα, για παράδειγμα μέσω της διατροφής, ωθεί στην εκδήλωση απωθητικών συμπεριφορών στους περισσότερους οργανισμούς, όπως και στα έντομα. Με αυτό τον τρόπο, η αίσθηση του πικρού, εξυπηρετεί στην αποφυγή κατανάλωσης πιθανού τοξικού συστατικού που θα αποτελούσε κίνδυνο. Τα τοξικά αυτά μόρια παράγονται από οργανισμούς διαφόρων τάξεων συμπεριλαμβανομένων και των εντόμων, ζώων, φυτών και μικροοργανισμών και χρησιμοποιούνται ως άμυνα ενάντια σε πιθανούς θηρευτές (Berenbaum, 1995; Skelhorn and Rowe, 2009). Αν θα μπορούσαμε να πούμε πως υπάρχει ένας κανόνας για την πικρή γεύση του οποίου η βάση θα στηριζόταν στο ότι προξενεί απωθητικές συμπεριφορές, τότε ο μεταξοσκώληκας *Bombyx mori* αποτελεί εξαίρεση, καθώς διατρέφεται και αναπτύσσεται αποκλειστικά στα φύλλα της μουριάς και στο ρεπερτόριο των γευστικών του υποδοχέων παρουσιάζει μία επέκταση υποδοχέων που ενεργοποιούνται από πικρά συστατικά (Wanner & Robertson, 2008). Είναι πιθανόν ότι αυτοί οι υποδοχείς παρέχουν στον μεταξοσκώληκα τη δυνατότητα να αναγνωρίζει δευτερογενείς ενώσεις που σχετίζονται με το φυτό ξενιστή του. Αυτές οι παρατηρήσεις δείχνουν ωστόσο ότι όλοι οι οργανισμοί έχουν εξελίξει ένα φάσμα γεύσης που τους επιτρέπει να εντοπίζουν και να αποφεύγουν μόρια που αποτελούν πιθανό κίνδυνο. Αυτή η κατηγορία γεύσης ορίζεται από ένα σύνολο γονιδίων γευστικών υποδοχέων που ορίζουν έναν «πικρό» πληθυσμό υποδοχέων (Ali et al., 2015).

### 1.6 Ο δάκος της ελιάς, *Bactrocera oleae*

Ο δάκος της ελιάς ή αλλιώς *Bactrocera oleae* αποτελεί το κύριο αγροτικό παράσιτο των ελαιοδέντρων (*Olea europaea*), καλλιεργήσιμων και αγρίου τύπου. Η προνύμφη του εντόμου, αποτελεί μονοφάγο οργανισμό, που διατρέφεται αποκλειστικά με το εσωτερικό των καρπών της ελιάς για να αναπτυχθεί. Συνεπώς η ελιά είναι το φυτό-ξενιστής του δάκου. Παγκοσμίως, η παρουσία των πληθυσμών του είδους εμφανίζει την ίδια κατανομή με αυτή των ελαιοκαλλιεργειών, δηλαδή έξαρση παρατηρείται κυρίως στις Μεσογειακές χώρες. Ακόμη, ο δάκος της ελιάς φαίνεται να ενδημεί και σε περιοχές εκτός της Μεσογείου όπως στη Νότια και κεντρική Αφρική, στις Κανάριες Νήσους, στη Μέση Ανατολή, την Καλιφόρνια και την κεντρική Αμερική. Ακόμη, έχουν γίνει αναφορές για την παρουσία του δάκου της ελιάς στην Κίνα, γεγονός που υποδηλώνει την ύπαρξή του και στην Ασία, ενώ δεν φαίνεται να ενδημεί στη Νότια Αμερική και στην Αυστραλία (Daane and Johnson 2010).



Εικ.10 Γεωγραφική κατανομή των καλλιεργειών ελαιοδέντρων. (International Olive Council)



Εικ. 11 Ωπή εξόδου της προνύμφης του δάκου από τον ελαιόκαρπο.

## Ταξινόμηση

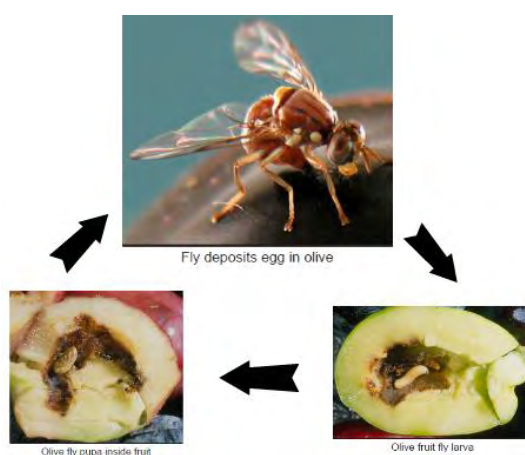
Η οικογένεια Tephritidae περιλαμβάνει ταξινομικά 4500 γνωστά είδη, συμπεριλαμβανομένων μερικών από τα πιο γνωστά αγροτικά παράσιτα. Ο δάκος της ελιάς, *B. oleae*, αποτελεί μέλος της υποοικογένειας Dacinae, της οικογένειας Tephritidae, η οποία είναι η μία από τις δύο αναφερόμενες οικογένειες και ως μύγες φρούτων (η δεύτερη είναι η οικογένεια Drosophilidae). Στην συγκεκριμένη υποοικογένεια ανήκουν μερικά από τα πιο καταστροφικά παράσιτα φρούτων και λαχανικών, συμπεριλαμβανομένων των ειδών *Bactrocera oleae* και *Bactrocera dorsalis* (Bateman et al.1976).

### 1.6.1 Κύκλος ζωής του δάκου

Ο κύκλος ζωής του δάκου απαρτίζεται από 4 βασικά αναπτυξιακά στάδια, τα οποία διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τη χρονική τους διάρκεια, τη μορφολογία του εντόμου, καθώς και τις δραστηριότητες και συμπεριφορές του. Το 1<sup>ο</sup> στάδιο είναι αυτό του αυγού, το 2<sup>ο</sup> η μετατροπή του σε προνύμφη (larva) και στη συνέχεια σε νύμφη (pupa) και το τελευταίο και 4<sup>ο</sup> στάδιο η μεταμόρφωση της νύμφης σε ενήλικο έντομο.

Αρχικά, το ενήλικο θηλυκό έντομο αναγνωρίζει τον καρπό που πρόκειται να ωοαποθέσει με κριτήρια το μέγεθος, το χρώμα και το σχήμα της ελιάς. Ακόμη ένα στοιχείο που παίζει ρόλο στην ωοαπόθεση είναι η ωριμότητα του ελαιοκάρπου, για παράδειγμα οι περισσότερες ώριμες ελιές εκκρίνουν πτητικές ενώσεις οι οποίες φαίνεται να προσελκύουν τα θηλυκά άτομα. Τα πτητικά αυτά συστατικά που

προκαλούν τα θηλυκά να ωοαποθέσουν περιλαμβάνουν παράγωγα της ολευρωπαΐνης. Αφού το θηλυκό ενήλικο έντομο αναγνωρίσει τον κατάλληλο καρπό, με τη βοήθεια του οδοντωτού ωσθέτη διαρρηγνύει τον φλοιό του και γεννάει ένα αυγό στην κάθε του ωοαπόθεση (Fletcher, 1987). Ύστερα από διάστημα δύο έως τριών ημερών το αυγό εκκολάπτεται και ακολουθεί το προνυμφικό στάδιο το οποίο διαρκεί 20 μέρες. Σε αυτό το στάδιο η μοναδική πηγή τροφής για τη προνύμφη είναι το εσωτερικό του καρπού της ελιάς όπου και διατρέφεται, δημιουργώντας διόδους στο εσωτερικό του καρπού. Έτσι αναπτύσσεται και με το πέρας των 20 ημερών βομβυκιώνεται. Απόρροια των παραπάνω γεγονότων είναι η αλλαγή των οργανοληπτικών συστατικών και η υποτίμηση του καρπού της ελιάς, με αποτέλεσμα την πτώση των καρπών στο έδαφος. Επομένως, η βομβυκίωση είναι ένα στάδιο το οποίο μπορεί να συμβεί είτε στον ίδιο τον καρπό ή και στο έδαφος (Εικ. 12).



Εικ. 12 Κύκλος ζωής του δάκου.

### 1.6.2 Συμβιωτικές σχέσεις του δάκου της ελιάς

Η συμβίωση του δάκου της ελιάς με ορισμένα βακτήρια μπορεί να του προσδώσει χημική άμυνα για την ανάπτυξη κυρίως των προνυμφών στο εσωτερικό του καρπού της ελιάς που αποτελείται από πληθώρα χημικών ενώσεων (Estes et al., 2009). Έτσι γνωρίζουμε πως έχει αναπτυχθεί μία σχέση συμβίωσης μεταξύ των προνυμφών του εντόμου και του Enterobacteriaceae *Candidatus Erwinia dacicola* (Capuzzo et al. 2005; Estes et al. 2012; Ben-Yosef et al. 2014), προκειμένου να επιβιώσουν και να αναπτυχθούν σε άγουρες ελιές που έχουν μεγάλη περιεκτικότητα σε φαινολικά συστατικά, όπως η ολευρωπαΐνη (Gutierrez-Rosales, et al. 2012; Amiot et al. 1986; Alagna et al. 2012). Αντίθετα έχει παρατηρηθεί πως όταν διατρέφονται με ώριμους καρπούς, η ανάπτυξή τους είναι ανεξάρτητη σε σχέση με αυτή των βακτηρίων. Παρόλα αυτά, ακόμα όταν πρόκειται να διατραφεί η προνύμφη με ώριμο καρπό, το εντεροβακτήριο φαίνεται να παίζει ρόλο όχι στην ανάπτυξη αλλά στην ενίσχυση της διατροφής της προνύμφης. Στην αντίθετη περίπτωση προνύμφες που δεν διέθεταν το βακτήριο-συμβιώτη φαίνεται να επιμηκύνουν τον χρόνο διατροφής τους στον ώριμο καρπό και να δίνουν νύμφες κατά 12% ελαφρύτερες σε βάρος. Συνεπώς, όπως όλοι οι οργανισμοί, έτσι και ο δάκος έχει την απαραίτητη μικροχλωρίδα που του επιτρέπει να

ξεπερνά τους χημικούς ή/και τοξικούς φραγμούς της ελιάς, εξασφαλίζοντας το πρώτο και βασικότερο βήμα της ανάπτυξης του που είναι αυτό της προνύμφης (Ben-Yosef et al. 2015).

### 1.6.3 Γιατί παρουσιάζει ενδιαφέρον η διερεύνηση του γονιδιώματος του δάκου

Η διερεύνηση του γονιδιώματος του δάκου της ελιάς είναι μεγάλης σημασίας, καθώς ο έλεγχος του πληθυσμού του εντόμου παρουσιάζει οικονομικό ενδιαφέρον.

Τόσο σε μαζικές καλλιέργειες ελιάς όσο και σε δέντρα αγρίου τύπου τα θηλυκά έντομα αφήνουν τα αυγά τους και αυτό αποτελεί την αρχή της οικονομικής καταστροφής. Με την ανάπτυξη της προνύμφης στο εσωτερικό του καρπού και έπειτα την πτώση του, μειώνεται το ποσοστό αποδοτικότητας σε λάδι μελλοντικά. Το πρόβλημα που δημιουργείται όμως δεν είναι μόνο ποσοτικό, καθώς δημιουργείται και ποιοτική υποτίμηση του καρπού και του ελαιολάδου. Αυτό συμβαίνει διότι αυξάνεται η οξύτητα των προϊόντων της ελιάς, λόγω των μικροβιακών μολύνσεων που αντιμετωπίζει. Ο δάκος της ελιάς υπολογίζεται να καταστρέφει το 5% της συνολικής παραγωγής καρπών ελιάς, ένα ποσοστό το οποίο οικονομικά μεταφράζεται σε απώλεια 800.000.000 δολαρίων το χρόνο (Daane and Johnson 2010).

Για αυτό το λόγο είναι σημαντική η μελέτη γονιδίων τα οποία εμπλέκονται στην ωοαπόθεση από τα θηλυκά έντομα, έτσι ώστε να βρεθούν γονίδια-στόχοι που εμπλέκονται στην λειτουργία αυτή. Έπειτα θα μπορέσει να γίνει αξιοποίηση αυτών των δεδομένων, είτε για την δημιουργία βιολογικών παγίδων που θα είναι προσελκυστικά hot-spots με αποτέλεσμα τον έλεγχο του πληθυσμού του δάκου.

## **2 ΣΚΟΠΟΣ:**

Ο σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας ήταν η διερεύνηση της απόκρισης του δάκου της ελιάς σε γευστικά ερεθίσματα του καρπού. Πιο συγκεκριμένα, αρχικά εντοπίστηκαν, μέσω βιοπληροφορικής ανάλυσης, γευστικοί υποδοχείς που είτε ανταποκρίνονται στην πικρή γεύση, είτε εμφανίζουν ειδο-ειδικότητα στο είδος του *Bactrocera oleae* και ακολούθως μελετήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης των επιλεγμένων γονιδίων σε συζευγμένα θηλυκά έντομα του εργαστηριακού πληθυσμού του δάκου της ελιάς, μέσω Real Time PCR, ως απόκριση στο κύριο φαινολικό συστατικό της ελιάς, την ολεωρωπαΐνη.



*Υλικά και Μέθοδοι*

## 3 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 3.1 ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ- φυλογένεση και σχεδιασμός ομόλογων εκκινήτων

Η χρήση των εργαλείων της βιοπληροφορικής αποτέλεσε σημαντικό κομμάτι της παρούσας διπλωματικής εργασίας, καθώς μας βοήθησε τόσο στο να επιλέξουμε τα κατάλληλα γονίδια των γευστικών υποδοχέων όσο και στο να σχεδιάσουμε τους κατάλληλους εκκινήτες που θα εμφάνιζαν ομολογία με τις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες του δάκου της ελιάς, *B. oleae*.

#### 3.1.1 Βάση δεδομένων NCBI-nucleotide & NCBI-protein

- **NCBI nucleotide database:**

Η NCBI nucleotide βάση δεδομένων αποτελεί τη συλλογή των αλληλουχιών από διάφορες βάσεις δεδομένων όπως είναι οι GenBank, RefSeq, TPA και PDB. Μας παρέχει όλες τις απαραίτητες πληροφορίες για την αλληλουχία του γονιδίου που μας ενδιαφέρει. Οι πληροφορίες αυτές περιλαμβάνουν στοιχεία όπως το όνομα του οργανισμού στο οποίο το γονιδίωμα ανήκει το γονίδιο ενδιαφέροντος, το όνομα του γονιδίου, το μέγεθος του σε βάσεις καθώς και το locus στο οποίο τοποθετήθηκε το γονίδιο ύστερα από την αλληλούχιση. Σημαντική είναι και η παραπομπή στην αντίστοιχη αμινοξική αλληλουχία, που υπάρχει στην βάση δεδομένων NCBI protein. Τέλος, υπάρχει η αλληλουχία των νουκλεοτιδίων του γονιδίου με αρίθμηση των βάσεων σε EMBL μορφή.

- **NCBI protein database:**

Η συγκεκριμένη βάση δεδομένων περιέχει τόσο αυτόματες μεταφράσεις των γονιδίων από τις βάσεις δεδομένων GenBank, RefSeq και TPA καθώς και αρχεία των βάσεων δεδομένων SwissProt, PIR, PRF και PDB. Μέσω της συγκεκριμένης βάσης δεδομένων παρέχεται πληθώρα στοιχείων για την πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει.

Τα δεδομένα αλληλούχισης από τις βάσεις δεδομένων αποτελούν τα εκμαγεία για τα υπόλοιπα προγράμματα-αλγόριθμους.

#### 3.1.2 Αλγοριθμός blast

Το blast αποτελεί έναν ευρετικό αλγόριθμο που ανιχνεύει ομόλογες αλληλουχίες με την αλληλουχία επερώτησης σε βάσεις δεδομένων. Οι ομόλογες ακολουθίες είναι πιθανό να έχουν και παρόμοια λειτουργία. Στην ουσία αποτελεί είδος στοίχισης (align) και συγκεκριμένα είναι τοπική στοίχιση.

Η αλληλουχία επερώτησης είναι mRNA ακολουθία ενώ η αλληλουχία με την οποία στοιχίζεται είναι DNA ακολουθία. Αφορά ακολουθίες που έχουν αποκλείει αρκετά και έχουν απομείνει συντηρημένες μόνο ορισμένες περιοχές τους.

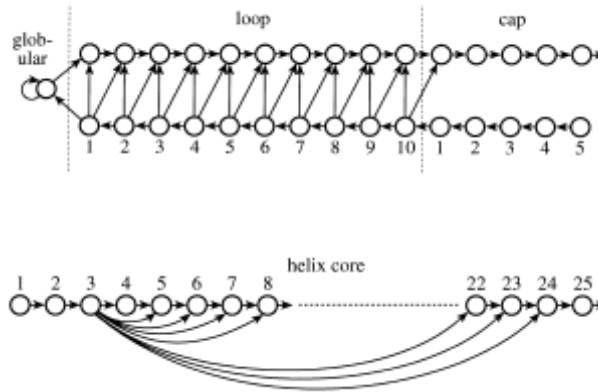
Στη συγκεκριμένη περίπτωση πραγματοποιήθηκε ο τύπος blastx. Στον συγκεκριμένο τύπο blast, η ακολουθία επερώτησης είναι νουκλεοτιδική, στην οποία πραγματοποιείται αυτόματη μετάφραση μέσω του αλγορίθμου και η ομολογή της από τη βάση δεδομένων είναι αμινοξική. Ο λόγος για τον οποίο εφαρμόστηκε ο τύπος blastx είναι επειδή, οι πρωτεΐνες είναι περισσότερο συντηρημένες μεταξύ συγγενικών οργανισμών, ενώ στην περίπτωση που θα χρησιμοποιούσαμε τον αλγόριθμο blastn θα διευρυνόταν η αναζήτηση στις βάσεις δεδομένων και λόγω καθολικότητας του γενετικού κώδικα θα λαμβάναμε αποτελέσματα ακόμη και για πολύ απομακρυσμένους εξελικτικά από το δάκο οργανισμούς.

### 3.1.3 Πολλαπλή στοίχιση και εύρεση επικρατειών των υποδοχέων

Η πολλαπλή στοίχιση μεταξύ των 53 αμινοξικών ακολουθιών που είχαν ανακτηθεί από τη βάση δεδομένων πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα MAFFT, του οποίου ο αλγόριθμος είναι Needleman-Wunsch (NW). Το πρόγραμμα πραγματοποιεί ολική στοίχιση κάθε πιθανού ζεύγους όπως και το ClustalW. Αρχικά οι δύο πιο κοντινές αμινοξικές ακολουθίες στοιχίζονται και δημιουργούν την ακολουθία συναίνεσης. Έπειτα με βάση το δέντρο-οδηγό, η ακολουθία συναίνεσης στοιχίζεται με την αμέσως επόμενη πιο κοντινή ακολουθία ή την επόμενη πιο κοντινή ακολουθία συναίνεσης μέσω δυναμικού προγραμματισμού. Τέλος, η διαδικασία αυτή συνεχίζεται έως ότου να έχουν στοιχηθεί όλες οι ακολουθίες που θέλουμε να αναλύσουμε μεταξύ τους.

Μέσω της πολλαπλής στοίχισης μπορούμε να προβλέψουμε τις συντηρημένες περιοχές μεταξύ των ακολουθιών έτσι ώστε να αποφύγουμε να σχεδιάσουμε εκφυλισμένους εκκινητές στις συγκεκριμένες περιοχές των γονιδίων. Ακόμη μέσω του προγράμματος MAFFT παρατηρούνται και οι χημικές ιδιότητες των αμινοξέων των αλληλουχιών και ορισμένες περιοχές χαρακτηρίστηκαν υδρόφιλες ενώ άλλες υδρόφοβες. Αυτό μας επιτρέπει σε ένα βαθμό να προβλέψουμε τις διαμεμβρανικές περιοχές καθώς αποτελούνται από υδρόφοβα αμινοξέα, όντας συντηρημένες και με βάση την υδροφοβικότητα στο εσωτερικών των μεμβρανών, ιδιότητα που τους αποδίδεται λόγω των φωσφολιπιδίων.

Έπειτα ακολούθησε η χρήση του προγράμματος TMHMM, το οποίο μέσω αλγορίθμου προβλέπει την περιοχή στην αμινοξική αλληλουχία που αντιστοιχεί στη διαμεμβρανική επικράτεια. Πρόκειται για ένα μοντέλο Hidden Markov. Στην ουσία, πραγματοποιούνται πολλαπλές στοίχισεις γνωστών επικρατειών και βασίζεται σε συντηρημένες περιοχές πρωτεϊνών (Εικ. 13) (Andres Krogh et. al. 2001).



Εικ. 13 HM μοντέλο για εύρεση διαμεμβρανικών περιοχών.

### 3.1.4 Κατασκευή φυλογενετικού δέντρου

Η φυλογένεση εκτιμά την εξελικτική πορεία των γονιδιωμάτων, γονιδίων ή πρωτεϊνών των οργανισμών και βοηθά στην μελέτη της συγγένειας των ειδών σε αυτά τα 3 επίπεδα. Η συσσώρευση μεταλλάξεων είναι ο λόγος για τον οποίον παρουσιάζονται διαφορές μεταξύ των οργανισμών. Τα ομόλογα γονίδια είναι τα γονίδια που υπάρχουν στους οργανισμούς που έχουν κοινό εξελικτικό πρόγονο. Γενικά υπάρχουν οι εξής τύποι γονιδίων :

- 1) Ορθόλογα γονίδια: είναι ένα γονίδιο στο οποίο όμως έχουν συμβεί μεταλλάξεις και βρίσκεται σε 2 ή περισσότερους οργανισμούς. Αυτά τα γονίδια είναι πιθανό να έχουν κοινή λειτουργία στο επίπεδο της πρωτεΐνης.
- 2) Παράλογα γονίδια: είναι γονίδια που έχουν προέλθει από γονιδιακό διπλασιασμό.
- 3) Ξενόλογα γονίδια: είναι αυτά που προέρχονται από οριζόντια μεταφορά.

Συνεπώς, μέσω ενός φυλογενετικού δέντρου παρουσιάζονται όλες οι αλλαγές που έχουν συμβεί μέσα από τις εξελικτικές δυνάμεις. Από ένα τέτοιο δέντρο μπορούμε να εκμαιεύσουμε πληροφορίες όπως είναι η εξελικτική απόσταση από τον κοινό πρόγονο, η ύπαρξη πολύ συντηρημένων αλληλουχιών ανάμεσα σε οργανισμούς καθώς και η απόκλιση και εμφάνιση ειδο-ειδικών αλληλουχιών.

Για την κατασκευή του φυλογενετικού δέντρου έγινε χρήση του προγράμματος MEGA software στην έκδοση MEGA 6.0 και οι 53 αμινοξικές ακολουθίες εισήλθαν σε FASTA μορφή. Η μέθοδος φυλογένεσης επιλέχθηκε να είναι η Neighbor joining, η οποία δεν θεωρεί ότι όλες οι ακολουθίες εξελίσσονται με τον ίδιο ρυθμό, ενώ η αξιολόγηση του φυλογενετικού δέντρου πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο bootstrap. Τα βήματα για την δημιουργία του δέντρου ήταν τα εξής:

- 1) Ανάκτηση των αμινοξικών αλληλουχιών του δάκου της ελιάς μέσω βάσης δεδομένων, όπως αναλύθηκε παραπάνω
- 2) Ανάκτηση των αμινοξικών αλληλουχιών των υπόλοιπων οργανισμών που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή του δέντρου

- 3) Κατασκευή αρχείου .txt με τις αλληλουχίες και των 4 οργανισμών σε FASTA μορφή
- 4) Πολλαπλή στοίχιση στο MEGA 6.0 μέσω MUSCLE (**M**Ultiple **S**equence **C**omparison by **L**og- **E**xpectation).
- 5) Υπολογισμός του φυλογενετικού δέντρου με τις εξής παραμέτρους:
  - Επιλογή εξελικτικού μοντέλου στην προκειμένη περίπτωση είναι Neighbor joining.
  - Επιλογή μεθόδου δημιουργίας του δέντρου που είναι με pairwise deletion.
  - Αξιολόγηση του δέντρου που ορίστηκε 500 bootstrap.

Με βάση το δέντρο που κατασκευάστηκε, μελετήθηκαν οι εξελικτικές σχέσεις μεταξύ των γευστικών υποδοχέων των 4 οργανισμών με βάση τα εξής κριτήρια: 1) εμφάνιση ειδο-ειδικότητας γονιδίων υποδοχέων που εμφανίζονται μόνο στο δάκο της ελιάς *Bactrocera oleae* και 2) την πιθανότητα ανταπόκρισης των υποδοχέων σε συστατικά που προσδίδουν πικρή γεύση (bitter taste).

### 3.1.5 OMIGA 2.0

Πρόκειται για ένα εργαλείο το οποίο παρέχει στους χρήστες του την ικανότητα να επεξεργάζονται και να αναλύουν μέσω του υπολογιστή τους αλληλουχίες. Είναι ένα εργαλείο το οποίο προορίζεται για ανάλυση τόσο νουκλεοτιδικών όσο και αμινοξικών αλληλουχιών. Η έκδοση Omiga 2.0 επιτρέπει την εισαγωγή ακολουθιών σε ξεχωριστά project. Ο χρήστης έτσι μπορεί να αναζητήσει πιθανές θέσεις περιορισμού, μοτίβα τα οποία να εμφανίζονται στην αλληλουχία καθώς και άλλα χαρακτηριστικά της ακολουθίας. Ακόμη εμφανίζει όλα τα αναγνωστικά πλαίσια μίας ακολουθίας και πραγματοποιεί αυτόματη αντιστοίχιση της τριπλέτας των νουκλεοτιδίων (κωδικόνιο) με το αντίστοιχο αμινοξύ που κωδικοποιεί.

### 3.1.6 Integrated DNA Technologies PrimerQuest tool - Oligoanalyzer tool / Primer-Blast

- PrimerQuest tool- Integrated DNA Technologies:

Αποτελεί εργαλείο της βιοπληροφορικής του οποίου η φιλοσοφία παρομοιάζεται με αυτή του Primer-BLAST και είναι κατάλληλο για τον σχεδιασμό εκφυλισμένων ειδικών ζευγών εκκινητών.

Μέσω του PrimerQuest tool μπορούν να σχεδιαστούν ζεύγη εκκινητών τα οποία θα μπορούν έπειτα να χρησιμοποιηθούν είτε για τη μέθοδο της απλής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR), είτε για ποσοτική PCR με probes ή ακόμα για ποσοτική PCR μέσω φθορίζουσών χρωστικών.

Πως λειτουργεί:

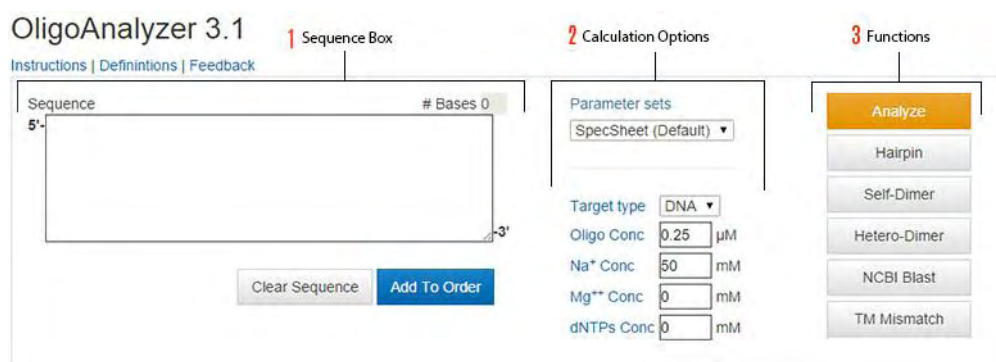
Χρησιμοποιούμε σαν ακολουθία-εκμαγείο ολόκληρη την αλληλουχία του γονιδίου που μας ενδιαφέρει ή τμήμα αυτής το οποίο να αντιστοιχεί σε συγκεκριμένη περιοχή της πρωτεΐνης που κωδικοποιεί για πιο στοχευόμενα αποτελέσματα. Στην συνέχεια

ακολουθεί η επιλογή ορισμένων παραμέτρων ανάλογα τον τύπο PCR που θα πραγματοποιηθεί. Στην συγκεκριμένη περίπτωση επιλέχθηκε ο σχεδιασμός των primer με παράμετρο **qPCR Intercalating Dyes (Primers only)** καθώς θα γίνει χρήση της χρωστικής SYBR Green στην ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου. Έπειτα, στον σχεδιασμό των primer τα βήματα που ακολουθούν είναι τα εξής:

- 1) Ορισμός της τιμής της θερμοκρασίας τήξης των εκκινητών (primer  $T_m$ ), στην συγκεκριμένη περίπτωση 50-65° C
  - 2) Ορισμός της τιμής της περιεκτικότητας των εκκινητών σε GC, στην συγκεκριμένη περίπτωση 35-65% και τέλος
  - 3) Ορισμός της τιμής του μεγέθους του PCR προϊόντος, το οποίο στην συγκεκριμένη περίπτωση ορίστηκε μεταξύ 90-130, καθώς οι εκκινητές θα χρησιμοποιηθούν σε qRT-PCR.
- OligoAnalyzer 3.1- Integrated DNA Technologies:

Αποτελεί ένα διαδικτυακό εργαλείο μέσω του οποίου παρέχεται στον χρήστη η ικανότητα να μελετήσει τη δομή του ζεύγους εκκινητών που έχει σχεδιάσει. Τα βήματα είναι τα εξής:

- 1) Εισαγωγή της αλληλουχίας του εκκινητή
- 2) Τροποποίηση των επιλογών υπολογισμού και
- 3) Επιλογή των δομών που μπορεί να εμφανίζει ένα ζεύγος εκκινητών ή μεμονωμένα ο κάθε εκκινητής (Εικ. 14).



Εικ. 14 Βήματα ελέγχου δομών των εκκινητών

Οι πιθανές δομές είναι:

- 1) Ο σχηματισμός δομής φουρκέτας λόγω των GC νησίδων, που επηρεάζουν το αποτέλεσμα εάν βρίσκονται στο 3' άκρο της αλληλουχίας των εκκινητών.
  - 2) Ο σχηματισμός ομοδιμερών
  - 3) Ο σχηματισμός ετεροδιμερών μεταξύ των δύο εκκινητών
  - 4) Καθώς και ο έλεγχος για ομολογία των εκκινητών με άλλα γονίδια του οργανισμού ή άλλα γονιδιώματα, μέσω του NCBI-Blast.
- NCBI Primer-Blast:

Αποτελεί μία μέθοδο τοπικής στοίχισης που επιτρέπει το σχεδιασμό ζευγών εκκινητών ειδικών για την ενίσχυση PCR-εκμαγείων.

Οι παράμετροι που λαμβάνει υπόψη του ο αλγόριθμος καθορίζονται από το χρήστη και είναι ίδιες με αυτές του PrimerQuest tool- Integrated DNA Technologies. Ακόμη όμως παρέχει τη δυνατότητα για αυτόματη εύρεση ομολογίας των εκκινητών με γονίδια άλλων οργανισμών.

## 3.2 Πειραματική διαδικασία

Οι απαραίτητοι χειρισμοί πραγματοποιήθηκαν σε εργαστηριακό πληθυσμό *Bactrocera oleae* (στέλεχος Δημόκριτος) και περιελάμβαναν 1) έκθεση στην ολευρωπαϊνή και 2) έκθεση σε διαλύτη (control). Σε κάθε περίπτωση χρησιμοποιήθηκαν ενήλικα θηλυκά έντομα 12<sup>ης</sup> ημέρας ύστερα από σύζευξη με αρσενικά έντομα. Για κάθε χειρισμό, πραγματοποιήθηκαν δύο βιολογικές επαναλήψεις σε δεξαμενές εντόμων (pool).

### 3.2.1 Απομόνωση ιστών των ενήλικων θηλυκών εντόμων

Η απομόνωση των ιστών αποτέλεσε το πρώτο βήμα της πειραματικής διαδικασίας. Η διαδικασία έγινε με τα εξής βήματα που ακολουθήθηκαν για όλα τα έντομα:

- 1) Συλλογή του αριθμού των θηλυκών γονιμοποιημένων εντόμων και διαχωρισμός τους σε έντομα-oleuropein και έντομα-control (Πίνακας 1, Πίνακας 2).
- 2) Τοποθέτηση των εντομών για 2-5 λεπτά στους 4°C , ή εναλλακτικά για 1 λεπτό στους -20°C , με αυτόν τον τρόπο προκαλούμε παροδική αναισθησία στα έντομα χωρίς όμως να τα θανατώσουμε.
- 3) Προετοιμασία αποστειρωμένων erpendorf tubes και προσθήκη 50μl TRI-REAGENT μέσα στα οποία θα αποθηκευτούν οι απομονωμένοι ιστοί. Ακόμη το TRI αποτελεί το αντιδραστήριο το οποίο βοηθάει στην ομογενοποίηση ή στην λύση κυττάρων και ιστών.
- 4) Αφού τα έντομα έχουν ακινητοποιηθεί τοποθετούμε στον ιστό που επιθυμούμε 1μl ολευρωπαϊνης στα έντομα-oleuropein. Η ολευρωπαϊνή είναι συγκέντρωσης 7,7 ng/μl και η αραίωση της πραγματοποιήθηκε με διαλύτη την ακετόνη.  
Αντίστοιχά στα έντομα-control έγινε εφαρμογή 1μl ακετόνης στον ιστό ενδιαφέροντος με τον ίδιο τρόπο.
- 5) Έπειτα ακολουθεί επώαση με το έλαιο για 20 λεπτά σε τρυβλίο Petri, ξεχωριστά για τα έντομα-oleuropein και για τα έντομα-control
- 6) Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε η αφαίρεση μέσω κοπής των ιστών με τη βοήθεια ηλεκτρονικού μικροσκοπίου.
- 7) Τοποθέτηση των ιστών ανάλογα με το είδος τους σε διαφορετικό tube με TRI-REAGENT.
- 8) Τέλος, πραγματοποιήθηκε spin down διότι όλη η ποσότητα του ιστού πρέπει να βρίσκεται εμβαπτισμένη στο αντιδραστήριο.
- 9) Αποθήκευση των ιστών στους -80°C.

### 3.2.2 Απομόνωση RNA των ιστών

Η διαδικασία απομόνωσης του RNA έγινε με τα εξής βήματα:

#### **ΟΜΟΓΕΝΟΠΟΙΗΣΗ**

- 1) Ομογενοποίηση των ιστών σε TRI-REAGENT (1ml/50-100mg ιστού)
- 2) Συμπλήρωση δειγμάτων με TRI-REAGENT έως ότου ο όγκος να είναι 300μl

#### **ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΦΑΣΕΩΝ**

- 3) Φυγοκέντριση στα **12.000g** για **5 λεπτά** στους **4° C**
- 4) Μεταφορά της **υδατικής φάσης** σε καινούργιο αποστειρωμένο eppendorf tube
- 5) Προσθήκη 30μl BCP σε κάθε ένα δείγμα και γρήγορη ανάδευση χωρίς vortex
- 6) Φυγοκέντριση στα **12.000g** για **15 λεπτά** στους **4° C**
- 7) Μεταφορά της υδατικής φάσης σε καθαρό eppendorf tube
- 8) Προσθήκη 150μl ισοπροπανόλης σε κάθε ένα από τα δείγματα
- 9) Επώαση σε **θερμοκρασία δωματίου** για **10 λεπτά**
- 10) Φυγοκέντριση στα **12.000g** για **8 λεπτά** στους **4° C**

#### **RNA WASH**

- 11) Αφαίρεση του υπερκειμένου και πλύση του RNA ιζήματος με 300μl 75% αιθανόλη για το κάθε ένα δείγμα και vortex
- 12) Φυγοκέντριση στα **7.500g** για **5 λεπτά** στους **4° C**
- 13) Ξανά αφαίρεση του υπερκειμένου και επανάληψη με προσθήκη 300μl 75% αιθανόλη
- 14) Φυγοκέντριση στα **7.500g** για **5 λεπτά** στους **4° C**
- 15) Αφαίρεση της αιθανόλης και στέγνωμα του RNA ιζήματος για 3-5 λεπτά στον απαγωγό
- 16) Τέλος, αφού βεβαιωθούμε πως το RNA ίζημα δεν έχει αφυδατωθεί προσθέτουμε 8μl ddH<sub>2</sub>O.

### 3.2.3 Επεξεργασία/ καθαρισμός του RNA με DNase

Η μέθοδος πραγματοποιήθηκε με το TURBO DNA-free™ Kit. Αποτελεί μέθοδο απομάκρυνσης μολυσματικού DNA από δείγματα RNA και στη συνέχεια αφαίρεσης της DNase και των δισθενών κατιόντων από τα δείγματα.

Η συγκεκριμένη αντίδραση πραγματοποιείται με τα εξής βήματα:

- 1) Προσθήκη των αντιδραστηρίων πέψης DNase.  
Αυτό περιλαμβάνει προσθήκη 0,1 του όγκου του Buffer αρχικής συγκέντρωσης 10x, καθώς και προσθήκη 1μl TURBO DNase μέσα στα mRNA δείγματα για αντίδραση τελικού όγκου 50μl. Στο τέλος του πρώτου βήματος πραγματοποιείται και μία ήπια ανάδευση.
- 2) Επώαση των δειγμάτων στους **37° C** για **20-30 λεπτά**.



- 3) Προσθήκη 5μl DNase Inactivation Reagent σε μία αντίδραση με τελικό τα 50μl.
- 4) Φυγοκέντριση στα **11.000g** για **2 λεπτά**.
- 5) Μεταφορά του υπερκειμένου σε καθαρό αποστειρωμένο eppendorf tube.

Ο προτεινόμενος τελικός όγκος της αντίδρασης είναι 10-100μl. Στην συγκεκριμένη περίπτωση η αντίδραση που πραγματοποιήθηκε με το TURBO DNase kit είχε τελικό όγκο 10μl. Έτσι οι ποσότητες των αντιδραστηρίων ορίστηκαν ως εξής:

<b>ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ</b>	<b>ΠΟΣΟΤΗΤΕΣ</b>
<b>RNA</b>	8μl
<b>TURBO DNase</b>	0,2μl
<b>Buffer</b>	1μl
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	0,8μl
<b>V<sub>τελικός</sub></b>	10μl

Καθώς και η ποσότητα του αντιδραστηρίου DNase Inactivation ορίστηκε στο 1μl.

Μέσω αυτού του πρωτοκόλλου το RNA είναι έτοιμο να χρησιμοποιηθεί στην αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής (RT-PCR).

### 3.2.4 Αντίστροφη μεταγραφή-RT PCR

Η αντίστροφη μεταγραφή έχει σαν σκοπό τη μετατροπή ενός ώριμου mRNA εκμαγείου σε cDNA. Έτσι η μέθοδος στηρίζεται στη χρήση ενός ενζύμου που καλείται αντίστροφη μεταγραφή και πραγματοποιεί την παραπάνω αντίδραση. Ακόμη η μέθοδος είναι πιθανό να χρησιμοποιεί ένα από τα βασικότερα χαρακτηριστικά των mRNA έτσι ώστε να πετύχει και αυτό είναι η ύπαρξη της πολύ-Α ουράς στο 3' άκρο τους. Εναλλακτικά η αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής πραγματοποιείται με random εκκινητές.

Το πρωτόκολλο της Invitrogen M-MLV Reverse Transcriptase ορίζει πως μία αντίδραση τελικού όγκου 20μl πραγματοποιείται εάν τα δείγματα έχουν περιεκτικότητα 1-500ng σε mRNA. Η αντίδραση πραγματοποιείται με τα εξής βήματα:

- 1) Προσθήκη σε αποστειρωμένο eppendorf tube:

<b>ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ</b>	<b>ΠΟΣΟΤΗΤΕΣ</b>
Oligo (dT)12-18 (500μg/ml), ή 50-250ng Random primers, ή 2 pmole gene-specific primer	1μl
Συνολικό RNA/Mrna	1ng σε 5μg συνολικό RNA 1ng σε 500ng mRNA
40mM dNTP mix (10Mm για καθένα dATP, dGTP, dCTP & dTTP σε ουδέτερο	1μl

pH	Αποστειρωμένο/Απιονισμένο νερό	Έως τα 12μl
----	--------------------------------	-------------

- 2) Θέρμανση του mix στους **65°C** για **5 λεπτά** και γρήγορη τοποθέτηση στον πάγο με το πέρας του χρόνου επώασης και προσθήκη:

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	ΠΟΣΟΤΗΤΕΣ
5x First Strand Buffer	4μl
0,1M DDT	2μl
RNase OUT Inhibitor (400Units/μl)	1μl

- 3) Επώαση στους **37°C** για **2 λεπτά**  
 4) Προσθήκη 1μl (200Units) ενζύμου M-MLV RT και ανάδευση με την πιπέτα  
 5) Έπειτα ακολουθούν 3 βήματα που λαμβάνουν χώρα εντός του θερμοκυκλοποιητή:
- 25°C – 2 λεπτά
  - 37°C – 10 λεπτά
  - 70°C – 15 λεπτά (αδρανοποίηση του ενζύμου μέσω θέρμανσης)

### 3.2.5 Ποσοτική PCR πραγματικού με ενίσχυση από τους ομόλογους εκκινητές (qPCR)

Η PCR πραγματικού χρόνου αποτελεί μία ποσοτική μέθοδο, καθώς μας δίνει την δυνατότητα για προσδιορισμό των ποσοτήτων των νουκλεϊκών οξέων (DNA & RNA) ενός δείγματος, όμως επιτρέπει και τη σύγκριση ποσοτήτων της ακολουθίας που ενισχύεται σε περισσότερα δείγματα.

Η αρχή της μεθόδου είναι ο ενζυμικός πολλαπλασιασμός αλληλουχιών-στόχων DNA μέσω επαναλαμβανόμενων κύκλων με ταυτόχρονη περιοδική εναλλαγή θερμοκρασία. Στον πρώτο κύκλο έχουμε μόρια DNA που χρησιμοποιούνται ως εκμαγεία για τη δημιουργία των νεοσυντιθέμενων κλώνων. Έπειτα οι νεοσυντιθέμενοι κλώνοι αποτελούν με τη σειρά τους τα εκμαγεία πολλαπλασιάζοντας έτσι την ακολουθία εκθετικά, μέχρι η αντίδραση να φτάσει σε κορεσμό και πραγματοποιηθεί φάση Plateau. Ο κάθε κύκλος PCR αποτελείται από τρία βήματα τα οποία είναι τα εξής:

- 1) Το **στάδιο αποδιάταξης** του δίκλωνου DNA ή cDNA. Σε αυτό το βήμα απαιτείται υψηλή θερμοκρασία **94-95°C**.
- 2) Το **στάδιο υβριδοποίησης (annealing)** των εκκινητών στις ήδη αποδιαταγμένες αλυσίδες. Για την επίτευξη της υβριδοποίησης των εκκινητών είναι υπεύθυνη η θερμοκρασία annealing (**T<sub>a</sub>**), η οποία εξαρτάται από την θερμοκρασία τήξης των εκκινητών (**T<sub>m</sub>**). Έτσι για να υπολογιστεί η θερμοκρασία υβριδοποίησης πρώτα υπολογίζεται η θερμοκρασία τήξης μέσω του τύπου:

$$T_m = 4 \times (\text{αριθμός βάσεων G+C}) + (\text{αριθμός βάσεων A+T}) \text{ και τυπικά}$$

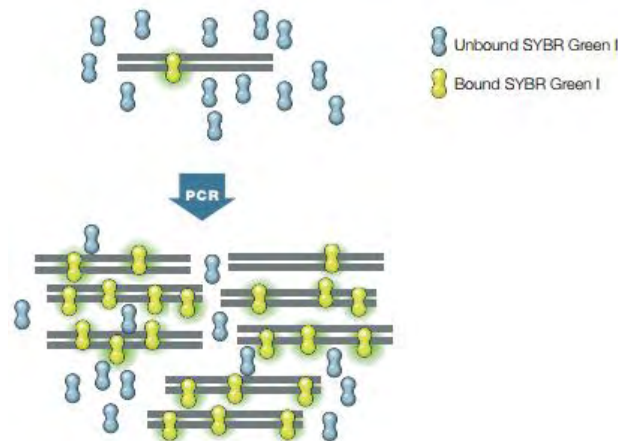
$$T_a = T_m - 5^\circ\text{C}$$

Εναλλακτικά, η βέλτιστη θερμοκρασία annealing υπολογίζεται από τον τύπο:

$$T_{a\text{Opt}} = 0.3 \times (T_m \text{ εκκινητή}) + 0.7 \times (T_m \text{ του PCR προϊόντος}), \text{ όπου}$$

- $T_m$  εκκινητή = η θερμοκρασία τήξης του πιο ασταθούς εκκινητή του ζεύγους και
  - $T_m$  του PCR προϊόντος = η θερμοκρασία τήξης του PCR προϊόντος.
- 3) Τέλος, το **στάδιο επιμήκυνσης**, στο οποίο το ένζυμο Taq πολυμεράση αναγνωρίζει το ζεύγος εκκινητών και προκαλεί επιμήκυνση της ακολουθίας-στόχου σε θερμοκρασία **72-74°C**.

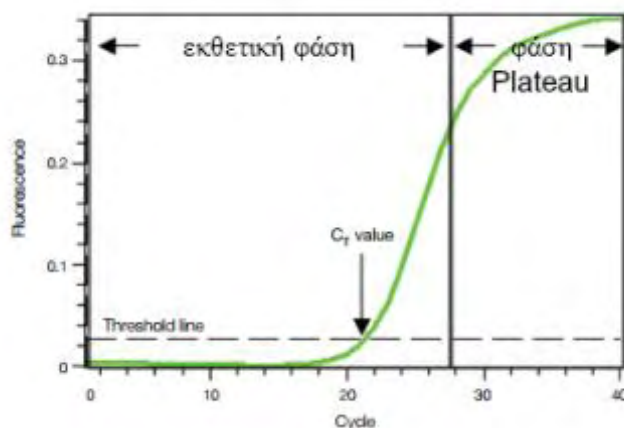
Ακόμη στην PCR πραγματικού χρόνου υπάρχει το πλεονέκτημα παρακολούθησης της αντίδρασης σε πραγματικό χρόνο. Αυτή η δυνατότητα παρέχεται συνήθως μέσω κάποιου ειδικού probe ή μέσω κάποιας φθορίζουσας χρωστικής όπως είναι η χρωστική SYBR Green. Η φθορίζουσα χρωστική έχει την ικανότητα να ενσωματώνεται στις δίκλωνες νεοσυντιθέμενες αλυσίδες DNA και να παράγει φθορισμό κατά τη διάρκεια της αντίδρασης (Εικ. 15). Ο φθορισμός που παράγεται έχει συγκεκριμένη ένταση, η οποία αντιστοιχεί και στην ανάλογη συγκέντρωση του PCR προϊόντος. Τα αποτελέσματα του φθορισμού, εντούτοις μπορεί να είναι παραπλανητικά καθώς η συγκεκριμένη χρωστική ενσωματώνεται και στα διμερή που σχηματίζουν οι εκκινητές. Όμως αυτό μπορεί να διαπιστωθεί μέσω της ανάλυσης του γραφήματος Melt curve.



Εικ. 15 Ικανότητα του SYBR Green να ενσωματώνεται σε δίκλινα νουκλεϊκά οξέα.

Αρχικά, ο φθορισμός παραμένει στα επίπεδα του background και με αύξηση του φθορισμού στους κύκλους 1-18 της Εικ. 16 δεν ανιχνεύονται, ακόμη και αν αρχίσει να συσσωρεύεται εκθετικά το προϊόν, λόγω του κατωφλιού (threshold). Τελικά, ένα αρκετά ενισχυμένο προϊόν συσσωρεύεται για να αποδώσει ένα ανιχνεύσιμο σήμα φθορισμού. Ο αριθμός του κύκλου που συμβαίνει αυτό ονομάζεται κύκλος κατωφλιού ή αλλιώς  $C_T$  ή  $C_q$  (Threshold cycle) (Εικ. 16). Το PCR προϊόν θα πρέπει να έχει μέγεθος 90-130bp έτσι ώστε να εξασφαλιστεί η αποτελεσματικότητα της αντίδρασης.

Melt curve analysis: μέσω της γραφικής παράστασης και της ανάλυσης της μπορεί να διαπιστωθεί η θερμοκρασία τήξης  $T_m$  των PCR προϊόντων. Με αυτόν τον τρόπο μπορεί να διαπιστωθεί η ύπαρξη παραπροϊόντων (μη ειδικά προϊόντα) ή η εμφάνιση διμερών που ίσως σχηματίζουν οι εκκινητές. Ακόμη διευκρινίζεται και αν είναι καθαρός ο αρνητικός μάρτυρας που υπάρχει σε κάθε αντίδραση.



**Εικ. 16** Γραφική παράσταση της πορείας της αντίδρασης. Απεικονίζεται το σημείο στο οποίο μετριέται η τιμή  $C_T$ .

Το σημαντικότερο ίσως βήμα στην ανάλυση των αποτελεσμάτων είναι η κανονικοποίηση των διάφορων δειγμάτων. Η κανονικοποίηση είναι απαραίτητη για να πραγματοποιηθεί η σύγκριση των επιπέδων mRNA και συνεπώς και η σύγκριση των επιπέδων έκφρασης. Αυτή η κανονικοποίηση εξομαλύνει τυχόν σφάλματα των προηγούμενων πειραματικών διαδικασιών, επειδή πρόκειται για χειρισμούς που δεν μπορούν να αποδώσουν πανομοιότυπα δείγματα. Έτσι πραγματοποιείται και η ενίσχυση ενός γονιδίου αναφοράς (housekeeping gene, hkg), γονίδια δηλαδή που έχουν σταθερή έκφραση στους διάφορους ιστούς. Η ποσοτικοποίηση των δειγμάτων πραγματοποιείται μέσω της σύγκρισης των τιμών  $C_T$  ( $\Delta\Delta C_T$ ).

Αντιδραστήρια:

- DNA ή cDNA
- Ζεύγος εκκινητών – Forward & Reverse primer
- SYBR Green Supermix, το οποίο περιέχει:
  - iTaq DNA polymerase
  - dNTPs
  - $MgCl_2$
  - SYBR<sup>®</sup> Green I dye

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία οι real time PCR αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε Bio-Rad.

Πειραματική διαδικασία:

Η αντίδραση λαμβάνει χώρα μέσα σε PCR strips στον θερμοκυκλοποιητή. Το κάθε strip έχει 8 tubes, μέσα στα οποία μπορούν να τρέξουν 8 αντιδράσεις. Η κάθε μια αντίδραση έχει τελικό όγκο 15μl. Οι ποσότητες των αντιδραστηρίων είναι:

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	ΠΟΣΟΤΗΤΕΣ
Supermix (2x)	7,5μl
10μM Forward primer (SYBR target_1)	0,45μl
10μM Reverse primer (SYBR target_2)	0,45μl
Template (DNA/cDNA)	2μl
Water	4,6μl
V <sub>τελικός</sub>	15μl

Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε εντός του θερμοκυκλοποιητή ήταν το εξής:

×49

- 1) Στάδιο αναδιάταξης στους **95°C** για **2 λεπτά** (αρχική αποδιάταξη) και **15 δευτερόλεπτα**.
- 2) Στάδιο υβριδοποίησης στην **Ta (56°C)** για **20 δευτερόλεπτα**.
- 3) Στάδιο επιμήκυνσης στους **72°C** για **15 δευτερόλεπτα**.
- 4) Melt Curve από τους **56°C** στους **95°C**, με αύξηση της θερμοκρασίας κατά **0.5°C** για **5 δευτερόλεπτα**.

### 3.3 Στατιστική ανάλυση – GraphPad software

- T-test:

Το t-test εφαρμόζεται συνήθως όταν το στατιστικό αποτέλεσμα μίας δοκιμασίας θα ακολουθήσει κανονική κατανομή. Για παράδειγμα το t-test μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να διαπιστωθεί εάν δύο σύνολα δεδομένων είναι σημαντικά διαφορετικά μεταξύ τους.

Η στατιστική δοκιμή t επί της ουσίας συγκρίνει τους μέσους όρους για μία κοινή μεταβλητή δύο ομάδων. Για παράδειγμα, συγκρίνεται εάν τα επίπεδα έκφρασης ενός γονιδίου διαφέρουν μεταξύ μίας ομάδας ελέγχου και μίας ομάδας που έχει εκτεθεί σε ένα παράγοντα που μπορεί να επηρεάσει αυτό το μέγεθος.

Η στατιστική μέθοδος unpaired t-test ελέγχει τη μηδενική υπόθεση δηλαδή ότι ο μέσος όρος του πληθυσμού σχετίζεται με δύο ανεξάρτητα τυχαία δείγματα από μια περίπου κανονική κατανομή (Altman, 1991, Armitage and Berry, 1994). Υποθέτοντας ίσες διακυμάνσεις, το στατιστικό αποτέλεσμα της δοκιμής υπολογίζεται ως:

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{s^2 \left( \frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)}} \quad \left| \quad s^2 = \frac{\sum_{i=1}^{n_1} (x_i - \bar{x}_1)^2 + \sum_{j=1}^{n_2} (x_j - \bar{x}_2)^2}{n_1 + n_2 - 2}$$

Όπου,  $\bar{x}_1$  bar &  $\bar{x}_2$  bar = μέσοι όροι δειγμάτων

$S^2$  = διακύμανση των δειγμάτων

$n_1$  &  $n_2$  = τα μεγέθη των δειγμάτων 1 & 2, το πλήθος των τιμών που τα απαρτίζουν (π.χ.  $n_1=2$ ,  $n_2=2$ ) και

$t$  = ένα t Student ποσοστημόριο με  $n_1 + n_2 - 2$  βαθμούς ελευθερίας.

- GraphPad software:

Μέσω του GraphPad software μπορεί να πραγματοποιηθεί μία δοκιμασία unpaired t-test και να υπολογιστεί το p-value. Η τιμή p χρησιμοποιείται ευρέως στις στατιστικές δοκιμασίες και πιο συγκεκριμένα σε δοκιμασία όπως αυτή της μηδενικής υπόθεσης. Στην ουσία ορίζεται μία τιμή-κατώφλι για την τιμή p, η οποία τις περισσότερες φορές είναι το 5% ή 1% και αυτό καλείται επίπεδο σημαντικότητας ( $\alpha$ ). Εάν η τιμή p είναι μικρότερη από το καθορισμένο επίπεδο σημαντικότητας, αυτό σημαίνει ότι τα δεδομένα είναι αρκετά διαφορετικά σε σχέση με την μηδενική υπόθεση και άρα πως η μηδενική υπόθεση μπορεί να απορριφθεί. Ωστόσο, αυτό δεν αποδεικνύει ότι η δοκιμασμένη υπόθεση είναι πάντα αληθής. Όταν η τιμή p υπολογίζεται σωστά, αυτή η δοκιμασία εγγυάται ότι το ποσοστό του type I error (δηλαδή ψευδώς θετικό) είναι το πολύ 5%. Συνεπώς, η μηδενική υπόθεση απορρίπτεται όταν  $p < 0.05$  και επικρατεί όταν  $p > 0.05$ .

Έτσι τα δεδομένα που εισάγονται στον αλγόριθμο είναι για 2 δείγματα (group) που εξετάζονται υπό το πρίσμα κοινής μεταβλητής και περιλαμβάνουν τους μέσους όρους των τιμών του κάθε group, το SEM (Standard error of the Mean) που είναι η τυπική απόκλιση και το πλήθος των τιμών που απαρτίζουν το κάθε group.

*Αποτελέσματα*

## 4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 4.1 Επιλογή των γονιδίων των γευστικών υποδοχέων του *Bactrocera oleae*

Για να επιλεγούν τα κατάλληλα γονίδια που κωδικοποιούν γευστικούς υποδοχείς του δάκου της ελιάς πραγματοποιήθηκε η κατασκευή και η ανάλυση φυλογενετικού δέντρου με τη βοήθεια εργαλείων της βιοπληροφορικής. Ως κριτήρια για την επιλογή των γονιδίων ορίστηκαν δύο παράγοντες οι οποίοι αφορούσαν:

- 1) Την εμφάνιση ειδο-ειδικότητας σε γονίδια γευστικών υποδοχέων για το δάκο της ελιάς και
- 2) Την πρόβλεψη της απόκρισης των γευστικών υποδοχέων που κωδικοποιούνται από τα συγκεκριμένα γονίδια στην πικρή γεύση.

Έτσι, για το σκοπό αυτόν πραγματοποιήθηκαν οι εξής ενέργειες:

- Αρχικά, με τη βοήθεια της βάσης δεδομένων NCBI nucleotide ανακτήθηκαν οι 53 υποψήφιες αλληλουχίες των γονιδίων που κωδικοποιούν γευστικούς υποδοχείς του δάκου της ελιάς και κατασκευάστηκε αρχείο σε μορφή .txt και σε μορφή FASTA (Supplementary, 1.1).
- Έπειτα, βρέθηκαν οι 53 αμινοξικές αλληλουχίες των πρωτεϊνών-γευστικών υποδοχέων του δάκου της ελιάς μαζί με αυτές που έχουν προκύψει από εναλλακτικά μετάγραφα των γονιδίων των γευστικών υποδοχέων σε EMBL μορφή. Τέλος, κατασκευάστηκε αντίστοιχο αρχείο με αυτό των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών σε FASTA μορφή (Supplementary, 1.2).
- Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε αναζήτηση ομολογίας μέσω blastx, χρησιμοποιώντας ως αλληλουχίες επερώτησης τις 53 νουκλεοτιδικές ακολουθίες. Η διαδικασία αυτή ήταν χρήσιμη τόσο για την επιβεβαίωση των ονομάτων των γονιδίων των γευστικών υποδοχέων του δάκου της ελιάς, με βάση την ονοματολογία που ακολουθείται στη *Drosophila* όσο και για να δούμε αν εμφανίζουν ομολογία με άλλα συγγενικά είδη όπως είναι η μεσογειακή μύγα *Ceratitis capitata* ή η oriental μύγα *Bactrocera dorsalis*. Τέλος, δεκτά αποτελέσματα έγιναν όσα είχαν τιμή E-value  $< 1e^{-3}$ , έτσι ώστε να υπάρχει υψηλή εμπιστοσύνη στις ομόλογες ακολουθίες.
- Στη συνέχεια ανακτήθηκαν οι αμινοξικές ακολουθίες των υπόλοιπων τριών συγγενικών ειδών που θα συμμετείχαν στη δημιουργία του φυλογενετικού δέντρου. Οι οργανισμοί ήταν οι εξής:
  - *Ceratitis capitata* | οικογένεια: Tephritidae, τάξη: Diptera (81 αμινοξικές ακολουθίες γευστικών υποδοχέων)
  - *Drosophila melanogaster* | οικογένεια: Drosophilidae, τάξη: Diptera (68 αμινοξικές ακολουθίες γευστικών υποδοχέων)



- *Musca domestica* | οικογένεια: Muscidae, τάξη: Diptera (103 αμινοξικών υποδοχέων)
- Για την κατασκευή του φυλογενετικού δέντρου έγινε χρήση του προγράμματος MEGA 6.0. Έτσι μέσω του αρχείου σε FASTA μορφή που αναγνωρίζει ο αλγόριθμος του προγράμματος, εισάχθηκαν οι αμινοξικές ακολουθίες και των 4 οργανισμών και πραγματοποιήθηκε πολλαπλή στοίχιση μέσω MUSCLE. Στις παραμέτρους, σαν εξελικτικό μοντέλο ορίστηκε ο τύπος Neighbor-joining με μέθοδο δημιουργίας του δέντρου pairwise deletion, έτσι ώστε να απαλείφουν οι αλληλουχίες υψηλής ομολογίας για τις οποίες δεν μπορούν να υπολογιστούν εξελικτικές αποστάσεις. Τέλος, η μέθοδος bootstrap χρησιμοποιήθηκε σαν μέθοδος αξιολόγησης του δέντρου και ορίστηκε στο 500. Συνεπώς το δέντρο θα είναι άριζο.

## 4.2 ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΟ ΔΕΝΤΡΟ

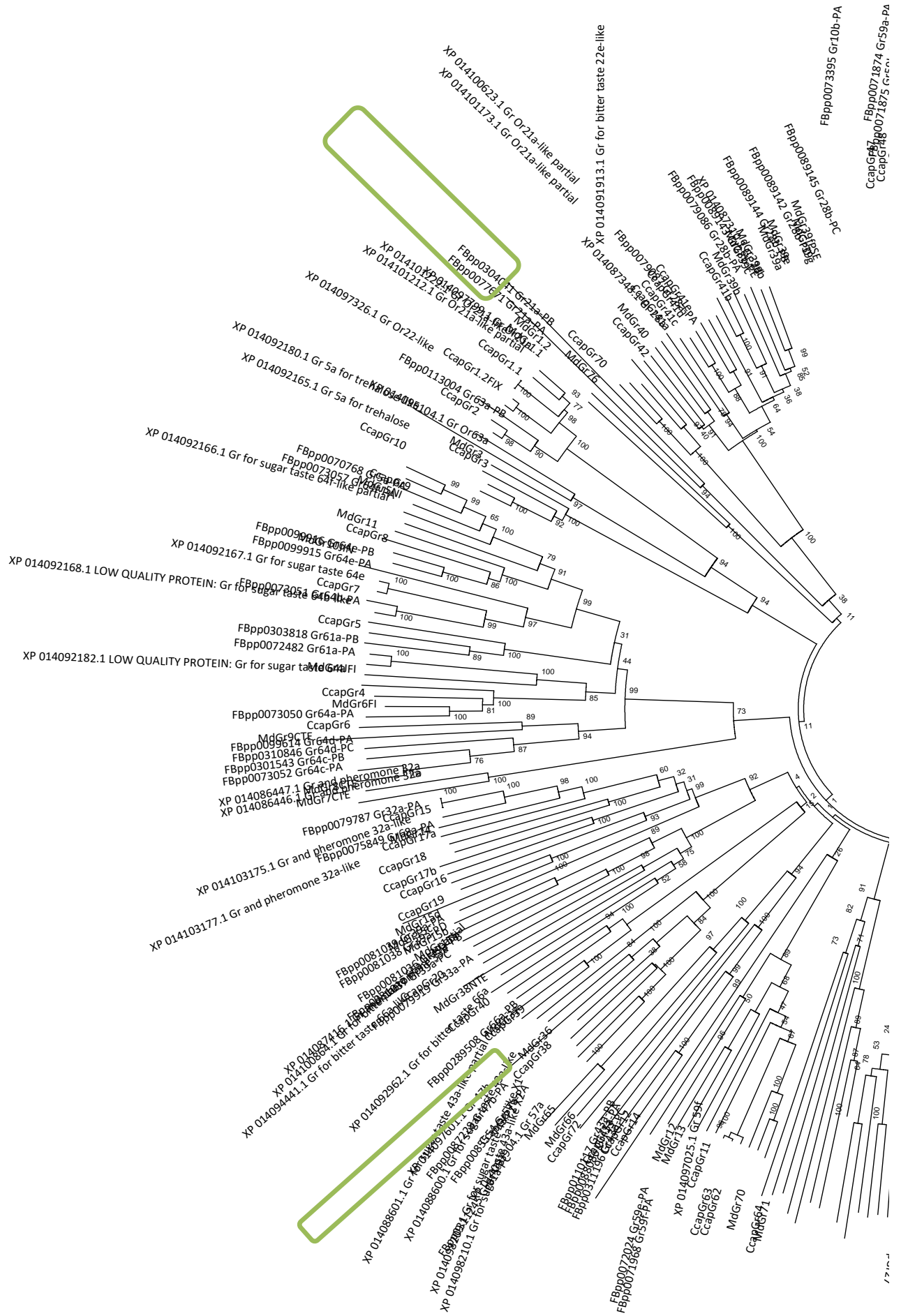
### **ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ:**

*Bactrocera oleae*

*Ceratitis capitata*

*Drosophila melanogaster*

*Musca domestica*





Με βάση το φυλογενετικό δέντρο που κατασκευάστηκε επιλέχθηκαν 5 γονίδια με κριτήριο το να εμφανίζουν ειδο-ειδικότητα για τον δάκο της ελιάς ή να εμφανίζουν απόκριση στην πικρή γεύση με βάση τα δεδομένα που είχαμε από τους άλλους οργανισμούς, οι κωδικοί και τα ονόματα των οποίων εμφανίζονται στον παρακάτω πίνακα.

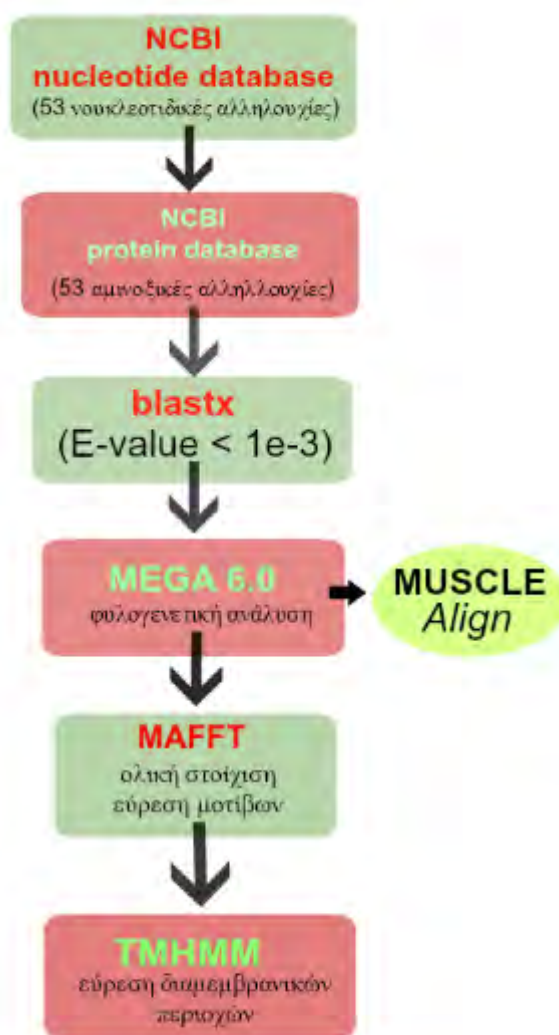
<b>ΚΩΔΙΚΟΣ XM / XP</b>	<b>ΟΝΟΜΑ ΓΟΝΙΔΙΟΥ</b>	<b>ΠΙΘΑΝΟΣ ΡΟΛΟΣ</b>
<b>XM_014245698.1</b> <b>XP_014101173.1</b>	<b>Gr21a</b>	gustatory and odorant receptor
<b>XM_014245148.1</b> <b>XP_014100623.1</b>	Gr21a2	gustatory and odorant receptor
<b>XM_014240323.1</b> <b>XP_014095798.1</b>	Gr93a	receptor for bitter taste
<b>XM_014238966.1</b> <b>XP_014094441.1</b>	Gr66a	receptor for bitter taste
<b>XM_014235045.1</b> <b>XP_014090520.1</b>	Gr39b	putative gustatory receptor

Πίνακας 4.1 Κωδικοί XM και XP των γονιδίων που επιλέχθηκαν.

Στη συνέχεια ακολούθησε η ανάλυση και σύγκριση των ακολουθιών που επιλέχθηκαν τόσο μεταξύ τους όσο και με τις υπόλοιπες αμινοξικές αλληλουχίες του δάκου που δεν επιλέχθηκαν.

Αρχικά, ελέγχθηκαν τα scaffold έτσι ώστε να διαπιστωθεί εάν υπάρχει κάποιος διπλασιασμός ή εάν γονίδια από αυτά που επιλέχθηκαν αλληλεπικαλύπτονται ή να βρίσκονται κοντά και πιθανόν να αποτελούν τον ίδιο γενετικό τόπο και απλά τους δόθηκε διαφορετική ονομασία και κωδικός από τη βάση δεδομένων (Εικ. 17)

Έπειτα, πραγματοποιήθηκε πολλαπλή στοίχιση με το πρόγραμμα MAFFT. Από τις 53 αμινοξικές αλληλουχίες μεγέθους  $\approx 1-860$ αα που ελέχθηκαν στην περιοχή 105-860αα, δεν εντοπίστηκε κάποιο επαναλαμβανόμενο μοτίβο, πέρα από ορισμένες ακολουθίες που εμφάνιζαν υψηλή ομολογία στα 760-790αα. Παράλληλα η ολική στοίχιση μας προέδρασε για τις πιθανές θέσεις των διαμεμβρανικών περιοχών των υποδοχέων μέσω της ύπαρξης πολλών υδροφοβών αμινοξέων. Αυτή η παρατήρηση ήταν σημαντική καθώς τέτοιες επικράτειες στις πρωτεΐνες



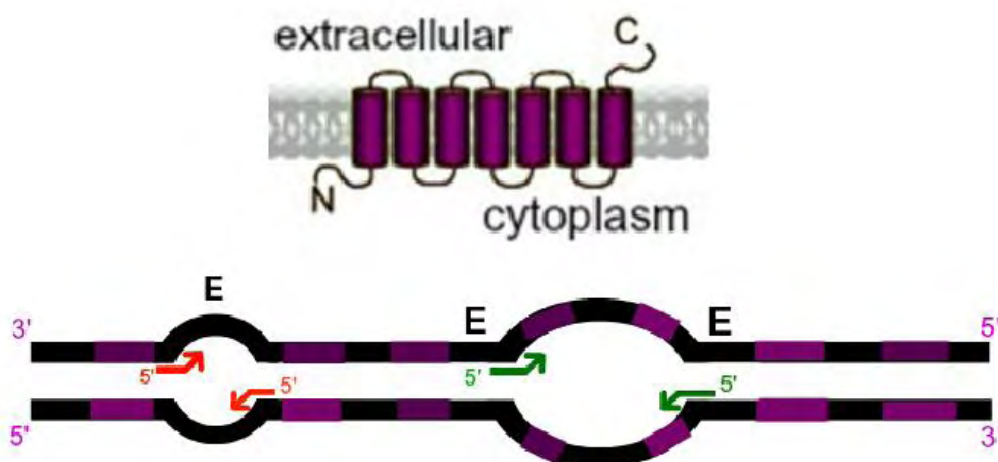
τείνουν να εμφανίζουν σημαντικό ποσοστό συντήρησης και κατά αυτόν τον τρόπο αποφεύγαμε τον σχεδιασμό των εκκινητών σε αυτά τα σημεία στις αντίστοιχες νουκλεοτιδικές ακολουθίες.

Εικόνα 17 Σχεδιάγραμμα των βημάτων της βιοπληροφορικής ανάλυσης.

Ακόμη έγινε χρήση και του προγράμματος TMHMM ώστε να εντοπιστούν οι διαμεμβρανικές επικράτειες και να καθοριστούν τα αμινοξέα που τις αποτελούν. Έτσι και οι 53 αμινοξικές αλληλουχίες εξετάστηκαν με σκοπό να διαπιστωθούν οι περιοχές στις οποίες εμφανίζονται οι συντηρημένες διαμεμβρανικές έλικες. Ακόμη, έγινε πρόβλεψη τόσο των εξωκυτταρικών όσο και ενδοκυτταρικών περιοχών, που αποτέλεσε χρήσιμη πληροφορία για τον σχεδιασμό των ζευγών εκκινητών.

Συνεπώς, προέκυψαν δύο εναλλακτικές προσεγγίσεις (Εικ. 18) για την εύρεση της κατάλληλης περιοχής που θα αποτελούσε την αλληλουχία-στόχο για τον σχεδιασμό των εκκινητών, δεδομένου ότι το προϊόν ενίσχυσης κατά την επακόλουθη PCR πραγματικού χρόνου θα πρέπει να είναι μεγέθους 90-130bp. Στην πρώτη προσέγγιση, οι εκκινητές υβριδοποιούνται και ενισχύουν μία εξωκυτταρική υπομονάδα. Στη δεύτερη προσέγγιση, οι εκκινητές υβριδοποιούνται σε δύο διαφορετικές

εξωκυτταρικές υπομονάδες εκατέρωθεν δύο διαμεμβρανικών υπομονάδων, ενισχύοντας τμήμα που περιλαμβάνει τελικά την εξωκυτταρική, τις διαμεμβρανικές υπομονάδες αλλά και την επικράτεια εντός του κυτταροπλάσματος. Τέτοια τμήματα μέσω της ανάλυσης των ακολουθιών με το πρόγραμμα Omega απορρίφθηκαν διότι θα παρήγαγαν έπειτα από ενίσχυση προϊόν μεγαλύτερο των 130bp.



Εικ. 18 Πιθανές περιοχές πρόσδεσης των εκκινητών. Με μωβ χρώμα αναπαρίστανται κατά αντιστοιχία οι διαμεμβρανικές υπομονάδες. Με κόκκινα βέλη παρουσιάζεται ένα πιθανό ζεύγος εκκινητών, και με πράσινο αντίστοιχα ένα άλλο.

### 4.3 Σχεδιασμός εκκινητών για τα πέντε γονίδια που επιλέχθηκαν

Ο σχεδιασμός των ζευγών εκκινητών έγινε με χρήση του PrimerQuest tool (Integrated DNA Technologies, IDT) και οι δομές των primer ελέγχθηκαν μέσω του OligoAnalyzer tool 3.1 (IDT) έτσι ώστε να γίνει επιλογή του καλύτερου δυνατού συνδυασμού ζευγών εκκινητών.

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι αλληλουχίες των εκκινητών που σχεδιάστηκαν για τα γονίδια που επιλέχθηκαν:

Πίνακας 4.2 Ακολουθίες των εκκινητών για τα επιλεγμένα γονίδια.

ΟΝΟΜΑ PRIMER PAIRS	ΑΚΟΛΟΥΘΙΑ FORWARD	ΑΚΟΛΟΥΘΙΑ REVERSE
<b>Gr21a primer set</b> (XM_014245698.1)	5'-GGCTGTGTG CGTCTTCT-3'	5'-CGGCGATCA GAATCGTTGA-3'
<b>Gr21a2 primer set</b>	5'-CATCAGTTTAT TGTTACGCA-3'	5'-CGTCCACATAT TCTTAAAGATAGC-3'

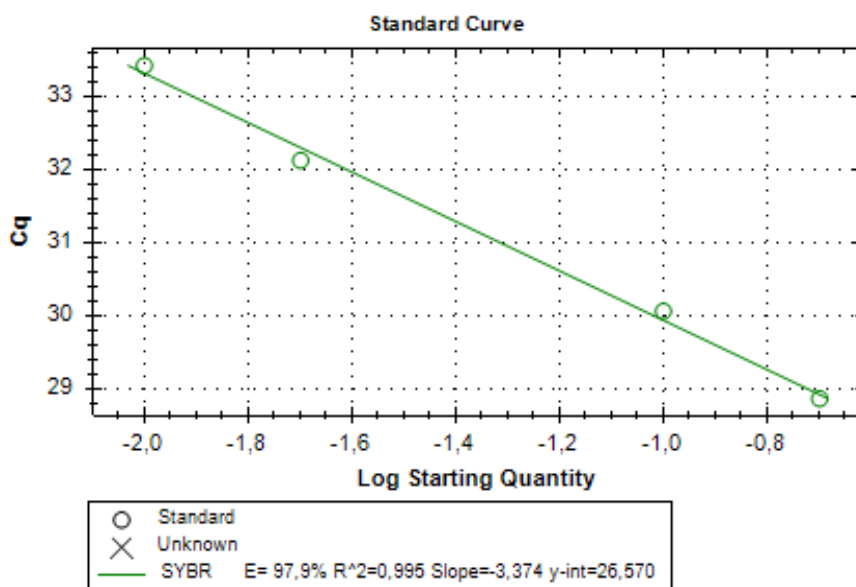
(XM_014245148.1)		
<b>Gr 93a primer set</b> (XM_014240323)	5'-TAGAATTCGT AAACACCCGATA-3'	5'-GCAGTCCTG TATCTTCCACAA-3'
<b>Gr66a primer set</b> (XM_014238966.1)	5'-ACCTTTGGC GACGAACAG-3'	5'-CATGGTGGCG GGAGTAATATAG-3'
<b>Gr 39b primer set</b> (XM_014235045)	5'-GCTTTGTGC TTTATTAACGGT-3'	5'-TCCTGGGACGA ACATTTGTAATA-3'

#### 4.4 Υπολογισμός της απόδοσης (Efficiency, E) των εκκινητών

Έπειτα ακολούθησε, ο υπολογισμός των δύο αυτών τιμών υπολογίστηκε μέσω της δημιουργίας της καμπύλης αναφοράς (standard curve) έπειτα από qPCR με το κάθε ζεύγος εκκινητών ξεχωριστά με γονιδιωματικό DNA που απομονώθηκε από ολόκληρο έντομο. Η τιμή του Efficiency ήταν απαραίτητη καθώς θα χρησιμοποιούνταν για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων μέσω των γονιδίων αναφοράς.

Η τιμή της απόδοσης θα πρέπει να είναι E=90-110% και η τιμή της κλίσης (slope, s)  $s \approx -3,3$ . Στη συνέχεια παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για κάθε ζεύγος εκκινητών.

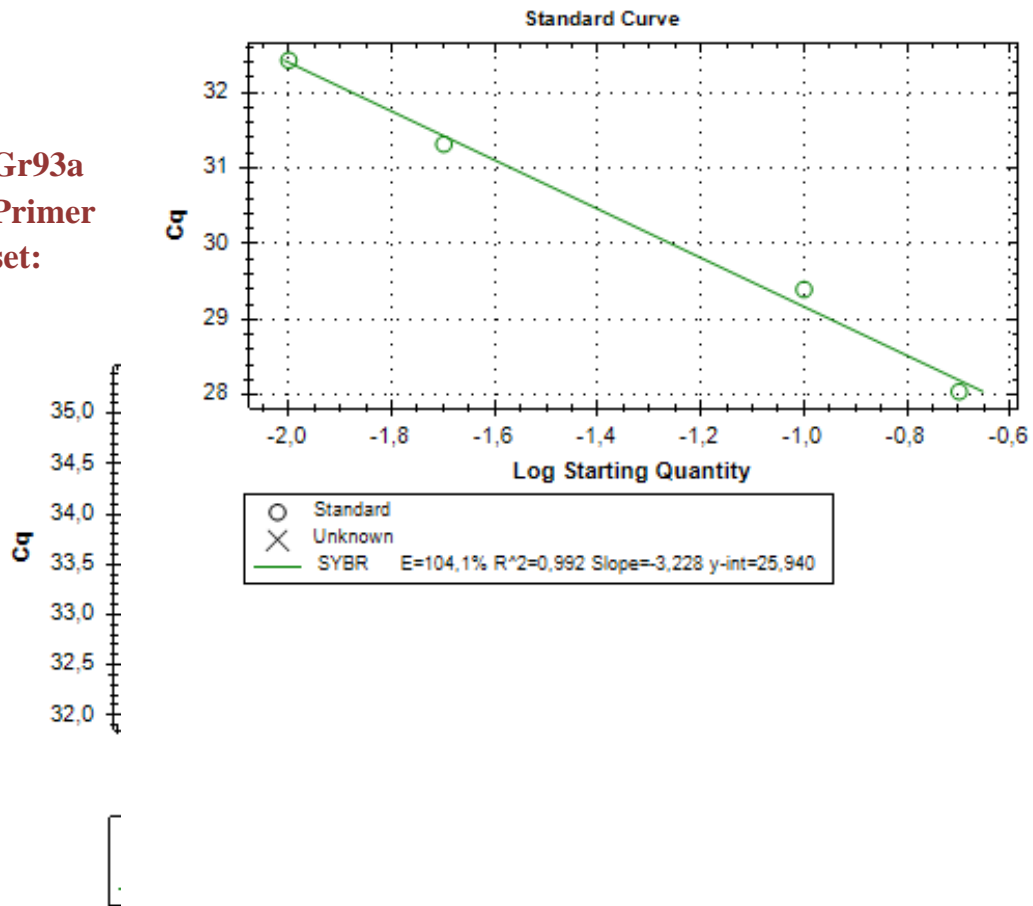
#### Gr21a Primer set:



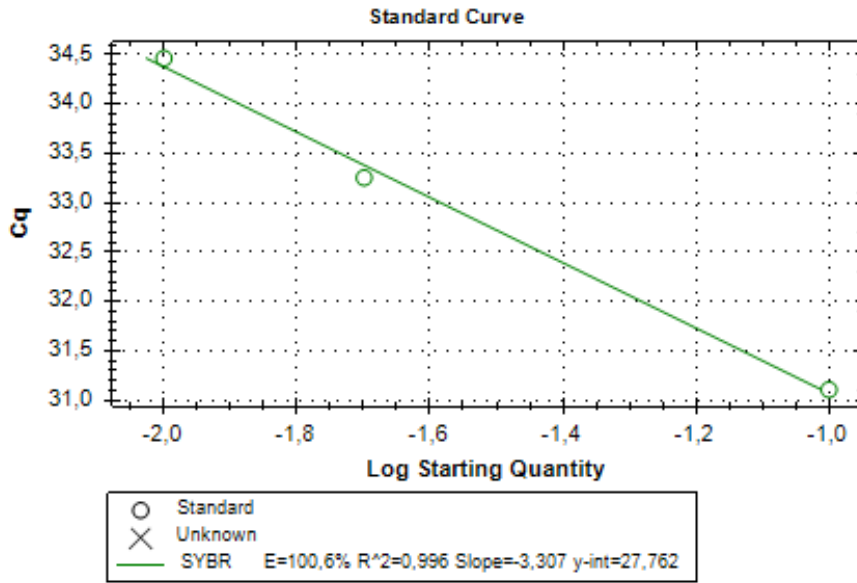


**Gr21a2 Primer set:**

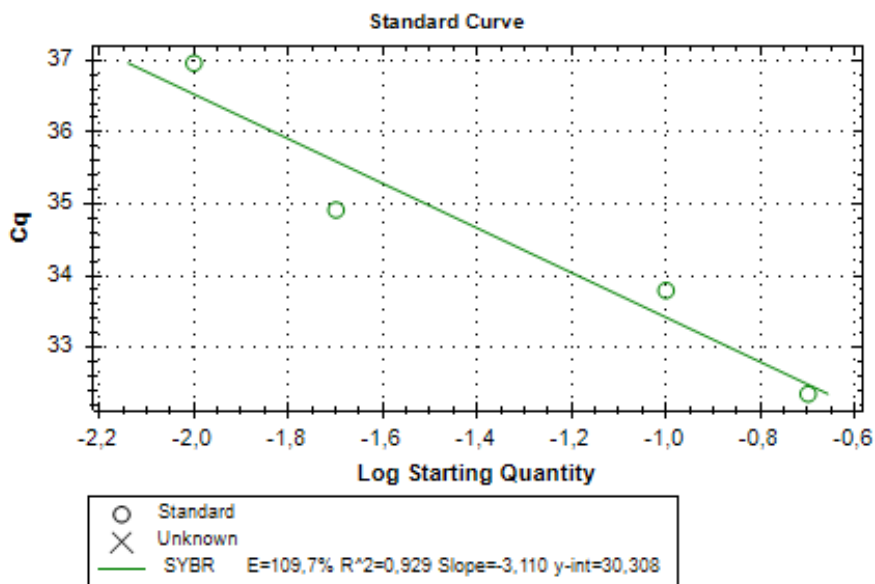
**Gr93a  
Primer  
set:**



**Gr66a Primer set:**



### Gr39b Primer set:



Συνεπώς, όλα τα ζεύγη εκκινητών κρίθηκαν κατάλληλα για να χρησιμοποιηθούν σε real time PCR με εκμαγείο cDNA.

### 4.5 Απομόνωση ιστών ενήλικων εντόμων

Τα βιολογικά pool των εντόμων που δημιουργήθηκαν ανάλογα με τον ιστό φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

ΕΙΔΟΣ ΙΣΤΟΥ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΕΝΤΟΜΩΝ (pool)	Biological Pool	ΟΝΟΜΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ
Γναθικές	3	control	1

<b>προσακτρίδες</b>	3		2
<b>Γναθικές προσακτρίδες</b>	3	oleuropein	5
	3		6

Πίνακας 1. Σχεδιασμός του πρώτου σταδίου της πειραματικής διαδικασίας που αφορά την απομόνωση των γναθικών προσακτιδίων καθώς και των κεφαλιών από τα οποία απομονώθηκαν οι γναθικές προσακτρίδες.

<b>ΕΙΔΟΣ ΙΣΤΟΥ</b>	<b>ΑΡΙΘΜΟΣ ENTOMΩΝ (pool)</b>	<b>Biological Pool</b>	<b>ΟΝΟΜΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ</b>
<b>Θώρακες</b>	2	control	9
	2		10
<b>Θώρακες</b>	2	oleuropein	11
	2		12

Πίνακας 2. Σχεδιασμός του πρώτου σταδίου της πειραματικής διαδικασίας που αφορά την απομόνωση των θωράκων καθώς και των κεφαλιών των ίδιων εντόμων που απομονώθηκαν οι θώρακες.

Έπειτα πραγματοποιήθηκε απομόνωση του RNA όλων των δειγμάτων, καθώς και επεξεργασία αυτών με TURBO DNA-free™ Kit, για τον καθαρισμό των δειγμάτων από υπολείμματα DNA και αντίστροφη μεταγραφή με Invitrogen M-MLV Reverse Transcriptase για την δημιουργία cDNA όλων των δειγμάτων. Το cDNA των δειγμάτων των γναθικών προσακτιδίων και θωράκων αποτελεί και το εκμαγείο για την μελέτη των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων των γευστικών υποδοχέων μέσω qPCR.

#### 4.6 Αποτελέσματα real time PCR

Η ανάλυση των επιπέδων έκφρασης έγινε με χρήση του λογισμικού Bio-Rad CFX Manager 3.1, ενώ η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε μέσω του GraphPad software και του t test calculator με κατώφλι-τιμή  $p=0.05$ .

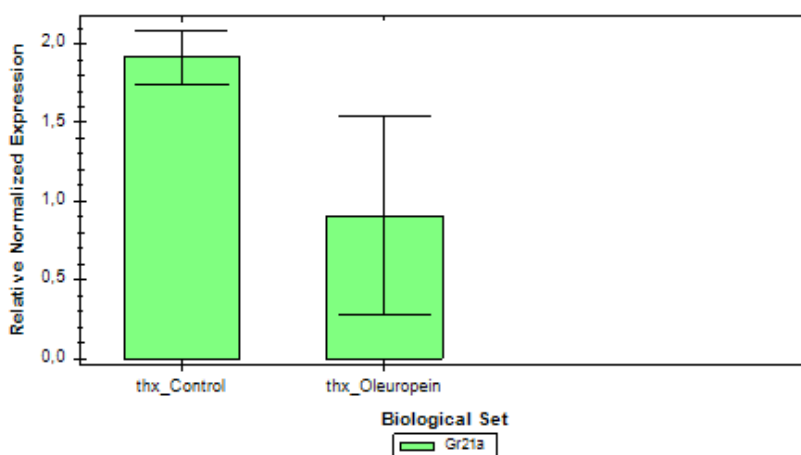
Τα αποτελέσματα των επιπέδων έκφρασης θα παρουσιαστούν και θα αναλυθούν με βάση τον ιστό (γναθικές προσακτρίδες και θώρακες). Ακόμη το γονίδιο που χρησιμοποιήθηκε για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων ήταν το γονίδιο της α τουμπουλίνης. Η δομή των μικροσωληνίσκων του κυτταροσκελετού αποτελείται ως επί το πλείστον από τουμπουλίνη, μία ετεροδιμερή πρωτεΐνη που αποτελείται από δύο ισχυρά προσδεσμένες υπομονάδες, την  $\alpha$ - και  $\beta$ - τουμπουλίνη. Η επιλογή του συγκεκριμένου γονιδίου βασίστηκε σε προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου, στην οποία ελέγχθηκαν ως προς τη σταθερότητα τους. (Sagri et al. 2016).

Ακόμη, τα επίπεδα έκφρασης παρουσιάζονται κανονικοποιημένα και ως προς το μηδέν.

## ΘΩΡΑΚΕΣ:

### 1. Gr21a - XM\_014245698.1:

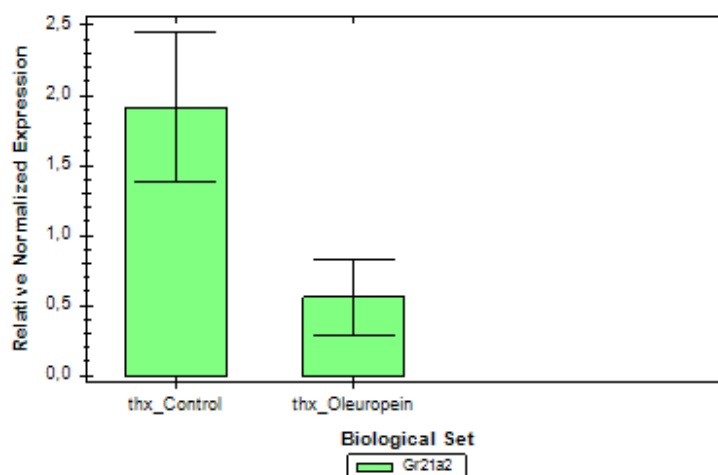
Το πρώτο γονίδιο που εξετάστηκε ήταν το Gr21a. Παρατηρείται ότι η έκφραση του γονιδίου τόσο στα έντομα control όσο και στα έντομα που εκτέθηκαν στην ολευρωπαΐνη παραμένει στα ίδια επίπεδα. Ακόμη, πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση του αποτελέσματος και η τιμή  $p$  καθορίστηκε ίση με  $0.2628 > 0.05$  συνεπώς ισχύει η μηδενική υπόθεση και το αποτέλεσμα δεν θεωρείται στατιστικά σημαντικό. Άρα οι δύο τιμές που αναλογούν στην κανονικοποιημένη έκφραση θεωρούνται ίσες.



Target	Biological Set	Expression	Expresion SEM
Gr21a	thx_Control	1,91290	0,16705
Gr21a	thx_Oleuropein	0,90618	0,63073

### 2. Gr21a2 - XM\_014245148.1:

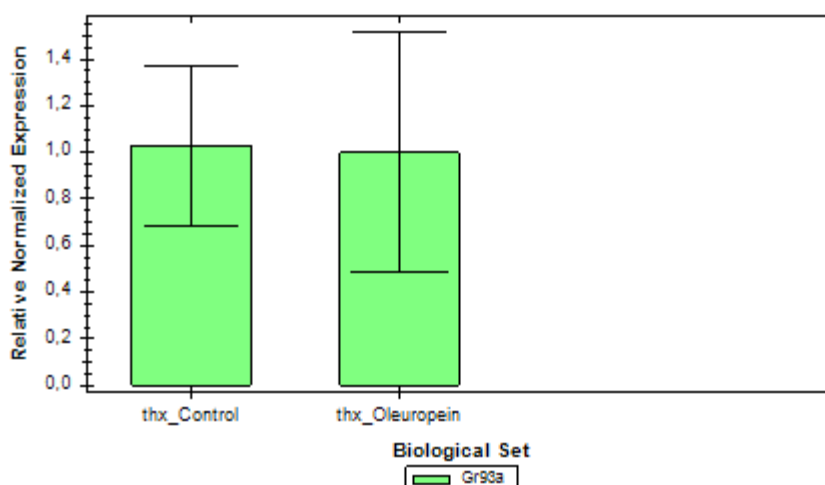
Έπειτα μελετήθηκε η έκφραση του γονιδίου Gr21a2. Παρατηρείται ότι έκφραση του στα έντομα που εκτέθηκαν στην ολευρωπαΐνη είναι μειωμένη, συγκριτικά με τα έντομα control, που εκτέθηκαν στην ακετόνη. Παρόλα αυτά, αν και παρατηρείται μια τάση για μείωση της έκφρασης του γονιδίου στους θώρακες των εντόμων-oleuropein, η στατιστική ανάλυση έδωσε τιμή  $p = 0,1525 > 0,05$ , άρα ισχύει η μηδενική υπόθεση.



Target	Biological Set	Expression	Expresion SEM
Gr21a2	thx_Control	1,91290	0,53374
Gr21a2	thx_Oleuropein	0,55745	0,27451

### 3. Gr93a- XM\_014240323.1:

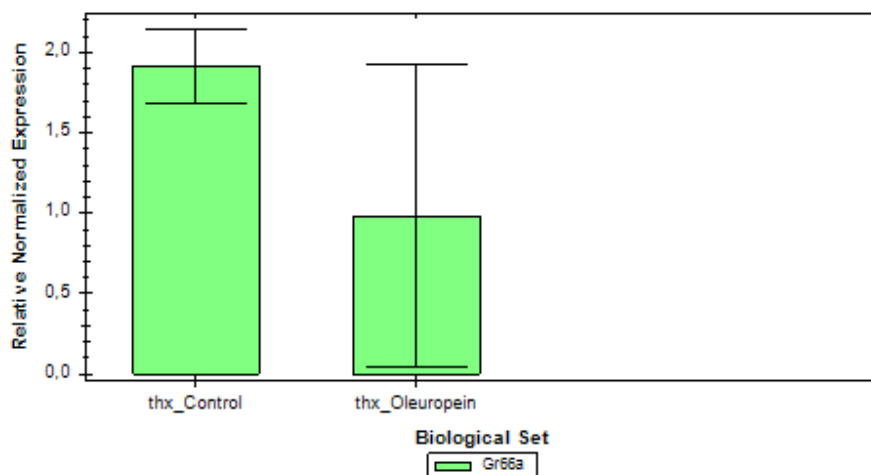
Το τρίτο γονίδιο, του οποίου μελετήθηκε η έκφραση ήταν το Gr93a με πιθανό ρόλο την απόκριση στην πικρή γεύση. Από την ανάλυση προέκυψε ότι η έκφραση και τις δυο ομάδες εντόμων, control και oleuropein αντίστοιχα, βρίσκεται στα ίδια επίπεδα, με τιμή  $p=0,9687$ . Συνεπώς, ισχύει η μηδενική υπόθεση και η διαφορά των τιμών θεωρείται μη στατιστικά σημαντική.



Target	Biological Set	Expression	Expresion SEM
Gr93a	thx_Control	1,02745	0,34702
Gr93a	thx_Oleuropein	1,0000	0,51409

#### 4. Gr66a- XM\_014238966.1:

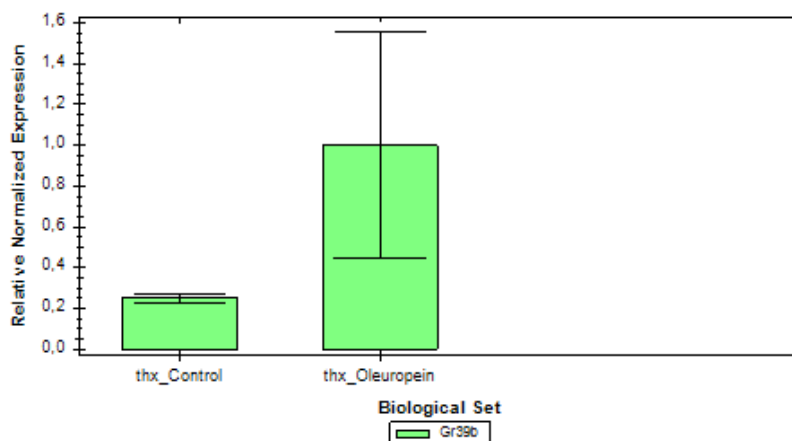
Η μελέτη έκφρασης του υποδοχέα Gr66a, δεν κατέδειξε σημαντικά στατιστική διαφορά μεταξύ των των δυο χειρισμών που ελέγχθηκαν ( $p=0,4411 > 0,05$  οπότε ισχύει η μηδενική υπόθεση). Τέλος το μεγάλο σφάλμα στη στήλη της έκφρασης του γονιδίου που αναφέρεται στα έντομα control οφείλεται σε μεγάλη διαφορά μεταξύ των βιολογικών δειγμάτων και όχι σε τεχνικό σφάλμα.



Target	Biological Set	Expression	Expresion SEM
Gr66a	thx_Control	1,9129	0,22831
Gr66a	thx_Oleuropein	0,9851	0,94626

#### 5. Gr39b- XM\_014235045:

Τελευταίο γονίδιο που μελετήθηκε στους θώρακες ήταν αυτό που κωδικοποιεί τον υποδοχέα Gr39b. Ενώ παρατηρείται η τάση για αύξηση των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου στα έντομα oleuropein, η τιμή  $p=0,3090$ . Συνεπώς ισχύει η μηδενική υπόθεση και η διαφορά των τιμών δεν θεωρείται στατιστικά σημαντική.

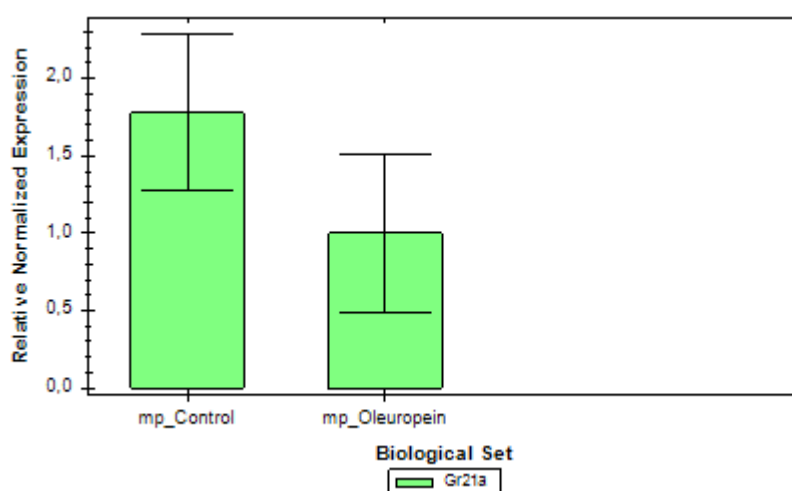


Target	Biological Set	Expression	Expresion SEM
Gr39b	thx_Control	0,25111	0,02209
Gr39b	thx_Oleuropein	1,00000	0,55351

## ΓΝΑΘΙΚΕΣ ΠΡΟΣΑΡΚΤΙΔΕΣ:

### 1. Gr21a - XM\_014245698.1:

Το πρώτο γονίδιο που αναλύθηκε για τον ιστό των γναθικών προσαρκτίδων είναι αυτό που κωδικοποιεί τον υποδοχέα Gr21a. Παρατηρήθηκε ότι στα έντομα control εμφανίζεται μία ανεπαίσθητη αύξηση στα επίπεδα της έκφρασης. Αυτή η διαφορά δεν δηλώνει υπερέκφραση, καθώς δεν είναι στατιστικά σημαντική αφού η τιμή p ορίστηκε ίση με  $0,3912 > 0,05$ .

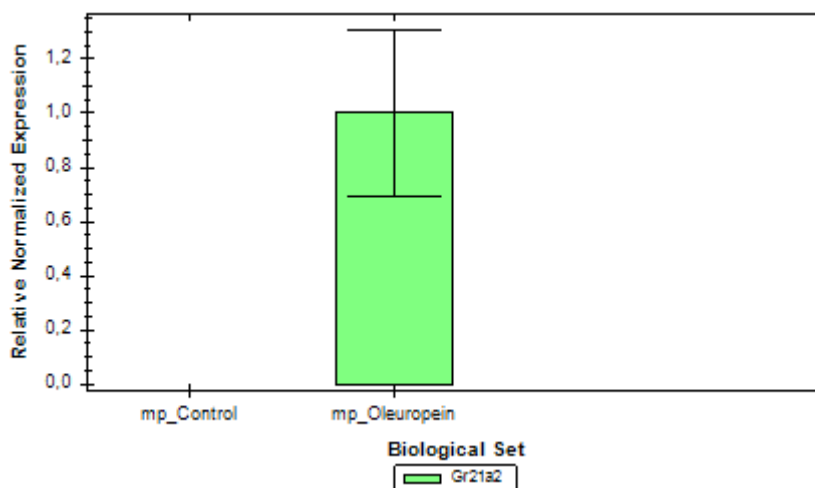


Target	Biological Set	Expression	Expresion SEM
Gr21a	thx_Control	1,00000	0,51215
Gr21a	thx_Oleuropein	1,77941	0,50342

Όσον αφορά τα αποτελέσματα των παραπάνω τεσσάρων γονιδίων, παρατηρούμε μηδενική έκφραση στα έντομα control και έκφραση η οποία αντιστοιχεί στην τιμή 1,00000 στα έντομα oleuropein, με σχετική τιμή για όλα τα αποτελέσματα το μηδέν, χωρίς δηλαδή να έχει χρησιμοποιηθεί κάποιο δείγμα για control. Το γεγονός μας

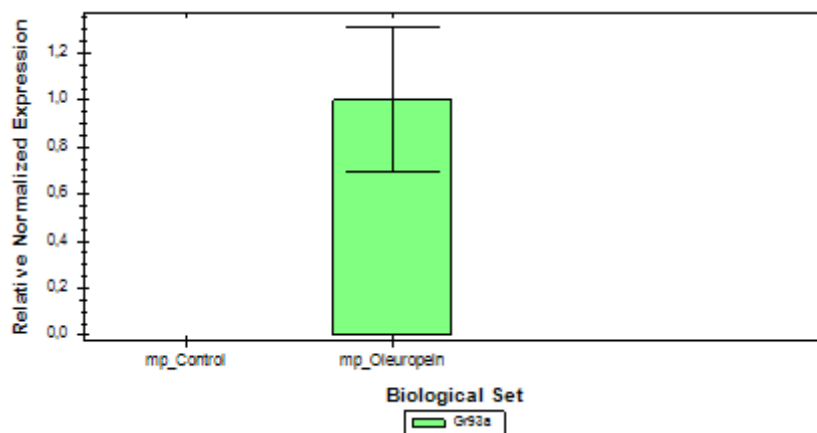
οδηγεί στο συμπέρασμα ότι τα συγκεκριμένα γονίδια εμφανίζουν την τάση να εκφράζονται μόνο στα έντομα του εργαστηριακού πληθυσμού που εκτέθηκαν στην ολευρωπαϊνή.

## 2. Gr21a2 - XM\_014245148.1:



Target	Biological Set	Expression	Expresion SEM
Gr21a2	thx_Control	N/A	N/A
Gr21a2	thx_Oleuropein	1,00000	0,30442

## 3. Gr93a- XM\_014240323.1:

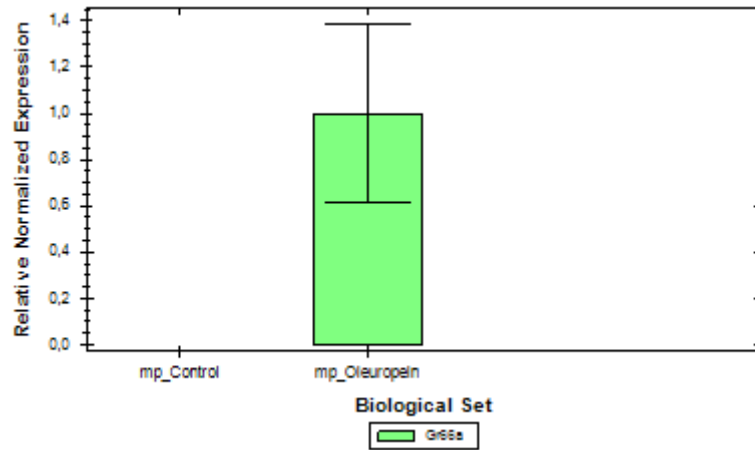


Target	Biological Set	Expression	Expresion SEM
--------	----------------	------------	---------------



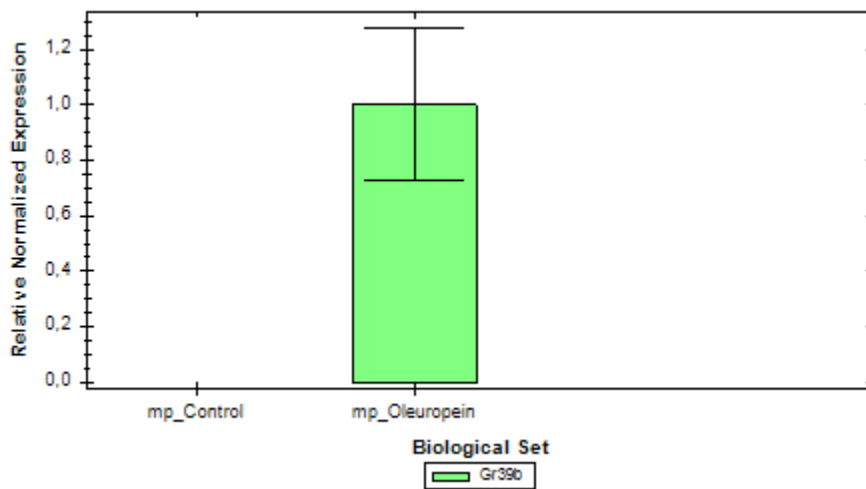
<b>Gr93a</b>	thx_Control	N/A	N/A
<b>Gr93a</b>	thx_Oleuropein	1,00000	0,30754

**4. Gr66a- XM\_014238966.1:**



Target	Biological Set	Expression	Expresion SEM
<b>Gr66a</b>	thx_Control	N/A	N/A
<b>Gr66a</b>	thx_Oleuropein	1,00000	0,38577

**5. Gr39b- XM\_014235045:**



Target	Biological Set	Expression	Expresion SEM
--------	----------------	------------	---------------

<b>Gr39b</b>	thx_Control	N/A	N/A
<b>Gr39b</b>	thx_Oleuropein	1,00000	0,27521

*Συζήτηση*

## 5 Συζήτηση

Οι καρποί των δέντρων υφίστανται πολλαπλούς μετασχηματισμούς κατά τα στάδια ωρίμανσής τους. Οι άγουροι καρποί έχουν υψηλή περιεκτικότητα σε δευτερογενείς μεταβολίτες που έχουν αντιμικροβιακή, αποτρεπτική ή/και τοξική δράση. Γι' αυτό το λόγο, άγουροι καρποί εμφανίζουν συνήθως ανθεκτικότητα σε φυτοφάγα και διάφορα παθογόνα. Κατά τη διαδικασία της ωρίμανσης όμως, οι δευτερογενείς αυτοί μεταβολίτες υπόκεινται αλλαγές στη συγκέντρωσή τους και με την ταυτόχρονη συσσώρευση σακχάρων, που λαμβάνει χώρα εντός των καρπών, προκαλείται μείωση της οξύτητας και αύξηση της θρεπτικότητας των φρούτων. Έτσι οι ώριμοι καρποί είναι πιο δεκτικοί στην ανάπτυξη διάφορων φυτοφάγων και οι περισσότερες μύγες φρούτων τείνουν να αφήνουν τα αυγά τους σε ώριμους καρπούς.

Ο δάκος της ελιάς αντιπροσωπεύει μία από τις εξαιρέσεις στα παραπάνω. Σε αντίθεση με άλλα είδη της υποοικογένειας Dacinae, ο δάκος της ελιάς συσχετίζεται με ένα συμβιωτικό βακτήριο, *E. dacicola*, το οποίο διαβιεί στο έντερο της προνύμφης και είναι απαραίτητο για την ανάπτυξή της. Το βακτήριο *E. dacicola* προσδίδει στην προνύμφη το πλεονέκτημα να διατρέφεται με το εσωτερικό του καρπού της ελιάς, που είναι πλούσιο σε ολευρωπαΐνη. Ένα από τα συστήματα που εμπλέκονται στη φυσιολογική διεργασία της διατροφής είναι το γευστικό σύστημα.

Μία ακόμη διεργασία στην οποία φαίνεται να είναι απαραίτητη η λειτουργία του γευστικού συστήματος στο δάκο της ελιάς είναι η ωσαπόθεση, μέσω της οποίας το θηλυκό ενήλικο έντομο δημιουργεί οπές στους καρπούς με αποτέλεσμα την αλλοίωσή τους. Η ύπαρξη γευστικών υποδοχέων των θηλυκών εντόμων των τάξεων των Διπτέρων και των Λεπιδοπτέρων στον ωσθέτη έχει επιβεβαιωθεί με τη χρήση ηλεκτροφυσιολογίας (Rice 1976; Hood Henderson, 1982; Waladdle, 1983; Girolami et al., 1986; Cmjar et al., 1989; Maher et al., 2006). Άρα με βάση τα παραπάνω δεδομένα, η μελέτη του γευστικού συστήματος και κατ' επέκταση των γευστικών υποδοχέων του δάκου της ελιάς θα μπορούσε να αποτελέσει τη βάση για την ανάπτυξη μεθόδων που θα αποσκοπούν στον έλεγχο του πληθυσμού του φυτοφάγου.

Για αυτό το λόγο στην παρούσα πτυχιακή εργασία σκοπός ήταν η μελέτη των επιπέδων έκφρασης επιλεγμένων γονιδίων που κωδικοποιούν γευστικούς υποδοχείς στο εργαστηριακό στέλεχος του δάκου της ελιάς, πριν και μετά την έκθεση των εντόμων στην ολευρωπαΐνη.

Έτσι, επιλέχθηκαν γονίδια γευστικών υποδοχέων που να πληρούν τις εξής προϋποθέσεις: να εμφανίζουν ειδο-ειδικότητα για το είδος *Bactrocera oleae* ή/και απόκριση στην πικρή γεύση. Οσον αφορά τα γονίδια τα οποία μελετήθηκαν, η επιλογή τους έγινε αρχικά με βάση τις εξελικτικές σχέσεις που εμφανίζονται στο φυλογενετικό δέντρο που κατασκευάστηκε και έπειτα με τη βοήθεια της βιβλιογραφίας. Αρχικά, τα δύο γονίδια Gr21a (που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες με κωδικούς XM\_014245698.1 και XM\_014245148.1 αντίστοιχα στη βάση δεδομένων NCBI) επιλέχθηκαν διότι οι δύο βραχίονές τους στο δέντρο ήταν συνδεδεμένοι

μεταξύ τους, ενώ δεν παρουσίαζαν σύνδεση με άλλους κλάδους που να αναφέρονταν σε πρωτεΐνες είτε του δάκου είτε των άλλων οργανισμών. Αυτό σημαίνει πως τα δύο αυτά γονίδια πιθανόν να είναι ειδο-ειδικά. Επιπλέον, το ότι εμφανίζονται μαζί ίσως υποδηλώνει διπλασιασμό και παρόμοια λειτουργία που να έχει να κάνει με το φυτό ξενιστή που είναι η ελιά και στο οποίο παρασιτεί αποκλειστικά ο δάκος, *Bactrocera oleae*.

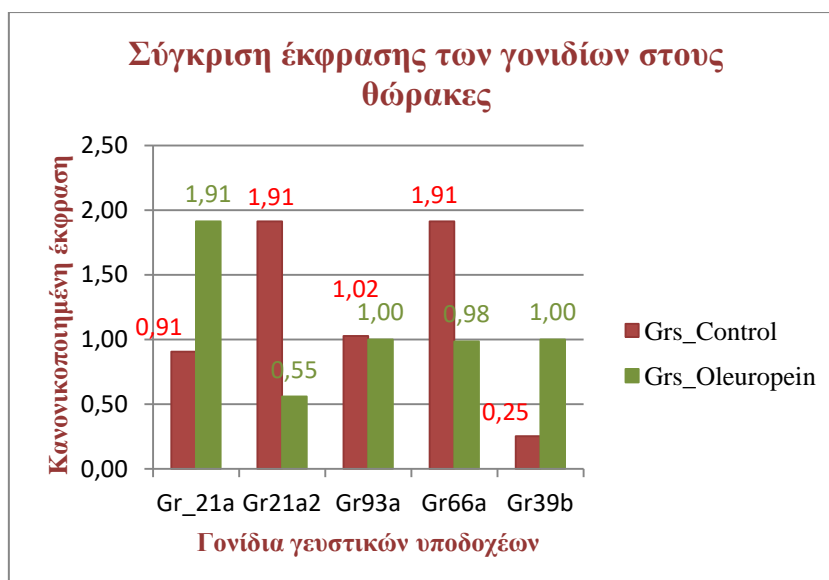
Η επιλογή των υπόλοιπων γονιδίων βασίστηκε στην παράλληλη αξιοποίηση των αποτελεσμάτων του φυλογενετικού δέντρου και βιβλιογραφικών δεδομένων. Η συνδυαστική αυτή προσέγγιση ακολουθήθηκε ώστε τελικά να επιλεγούν υποδοχείς που να εμφανίζουν απόκριση στην πικρή γεύση, εφόσον δεν εμφανιζόταν κάποιος κλάδος μοναδικών γονιδίων για τον δάκο της ελιάς.

Το γονίδιο Gr93a με κωδικό XM\_014240323.1 βρέθηκε να είναι ορθόλογο με το γονίδιο που κωδικοποιεί τον γευστικό υποδοχέα Ccap.Gr68 στη μύγα *Ceratititis capitata* ο οποίος είναι ομόλογος με τον υποδοχέα MdomGr74 στην οικιακή μύγα *Musca domestica* και τον DmelGr93a στην *Drosophila melanogaster* με ρόλο την απόκριση στην πικρή γεύση. Πολύ σημαντικός υποδοχέας για την ανίχνευση πικρών συστατικών όμως, όπως αναφέρθηκε και στην Εισαγωγή, είναι ο Gr66a στην *Drosophila melanogaster*, καθώς έχει το ρόλο συνυποδοχέα στο μονοπάτι μεταγωγής σήματος και τη δική του ιστορία σε βάθος χρόνων στην εξέλιξη. Το γονίδιο Gr66a εμφανίζει υψηλή συντήρηση στο είδος της *D. melanogaster* και είναι απαραίτητο για την ανίχνευση πολλών πικρών συστατικών (Lee Y et al., 2009). Ακόμη εμφανίζει ένα υψηλά συντηρημένο ορθόλογο γονίδιο και στις μύγες *M. domestica* και *C. capitata* (MdomGr36 και CcapGr38 αντίστοιχα). Παρόλα αυτά οι δύο αυτές μύγες έχουν από ένα παλαιότερο διπλασιασμό του συγκεκριμένου γονιδίου στο γονιδίωμά τους, τα γονίδια MdomGr37 και CcapGr39 τα οποία έχουν εξελιχθεί για ανίχνευση πικρών συστατικών. Έτσι επιλέχθηκε το γονίδιο Gr66a του *B. oleae*, το οποίο φαίνεται στο δέντρο να είναι ορθόλογο του γονιδίου CcapGr39.

Τέλος, επιλέχθηκε το γονίδιο Gr39b του δάκου της ελιάς με κωδικό XM\_014235045.1 το οποίο φαίνεται ομόλογο του γονιδίου Mdom19. Ακόμη, εμφανίζει ομολογία με το γονίδιο Dmel39b, ενώ δεν υπάρχει ομόλογο γονίδιο στην *Ceratititis capitata*, γεγονός που υποδηλώνει πως ίσως να σχετίζεται σε κάποια λειτουργία του δάκου που έχει να κάνει με τον ξενιστή του, που είναι η ελιά.

Με σκοπό να μελετηθούν τα προφίλ έκφρασης των γονιδίων που επιλέχθηκαν, ήταν απαραίτητο θηλυκές ενήλικες συζευγμένες μύγες να εκτεθούν στην κατάλληλη συγκέντρωση ολεωρωπαΐνης. Στη βιβλιογραφία παρόλα αυτά δεν υπήρχε σχετική αναφορά με την τιμή LD50 (median lethal dose) της φαινολικής ένωσης για το δάκο της ελιάς. Το γεγονός αυτό μας ανάγκασε να επιλέξουμε τη συγκέντρωση ολεωρωπαΐνης που θα αποτελούσε τη δόση που θα χορηγούνταν στα ενήλικα θηλυκά έντομα, βασιζόμενοι στην υπόθεση ότι η τιμή LD50 ισούται με 100μM, δηλαδή με 54,05 mg/ml.

Η ανάλυση της έκφρασης των γονιδίων που επιλέχθηκαν, πραγματοποιήθηκε σε έντομα των οποίων οι ιστοί εκτέθηκαν στην ολευρωπαϊνή και οι τιμές που μετρήθηκαν παρουσιάστηκαν συγκριτικά με τις αντίστοιχες τιμές σε έντομα ελέγχου, εκτεθειμένα δηλαδή μόνο στον διαλύτη, ο οποίος ήταν η ακετόνη (control). Συγκεκριμένα, στις παραπάνω ομάδες εντόμων που χρησιμοποιήθηκαν στους χειρισμούς αυτούς, πραγματοποιήθηκε έκθεση των θώρακων και γναθικών προσακτιδών στην ολευρωπαϊνή και απομόνωση των ιστών. Συνολικά, από τα αποτελέσματα των προφίλ έκφρασης των γονιδίων παρατηρείται ότι στους απομονωμένους έπειτα από έκθεση στην ολευρωπαϊνή θώρακες τα γονίδια Gr21a2 και Gr66a εμφανίζουν μειωμένη έκφραση στα έντομα που εκτέθηκαν στην ολευρωπαϊνή σε σχέση με τα έντομα control. Ακόμη τα γονίδια Gr21a και Gr39b εμφάνισαν αυξημένη έκφραση στα έντομα που εκτέθηκαν στην ολευρωπαϊνή σε σχέση με τα έντομα control, ενώ το γονίδιο Gr93a εμφανίζει ίδια επίπεδα έκφρασης στα έντομα control και τα έντομα ολευροειν. Συνεπώς, μπορούμε να υποθέσουμε ότι ίσως οι υποδοχείς Gr21a και Gr39b στους θώρακες ευαισθητοποιούνται περισσότερο με την ύπαρξη της ολευρωπαϊνης.



Τέλος, τα αποτελέσματα των επιπέδων έκφρασης στις γναθικές προσακτιρίδες εμφανίζουν να έχουν την ίδια τάση στα τέσσερα από τα πέντε γονίδια, καθώς παρατηρούμε την έκφραση τους μόνο στα έντομα των οποίων οι ιστοί εκτέθηκαν στην ολευρωπαϊνή. Από αυτό μπορούμε να κάνουμε την υπόθεση πως για την αντίληψη της γεύσης του δάκου της ελιάς στο συγκεκριμένο φαινολικό συστατικό ίσως να απαιτείται έκφραση πολλών υποδοχέων ταυτόχρονα.



Με βάση τα αποτελέσματα που λάβαμε από την ανάλυση της έκφρασης των γονιδίων, έπειτα από τις Real Time PCR, τα οποία φαίνονται και στις παρακάτω γραφικές παραστάσεις συγκεντρωτικά, καταλήξαμε στο συμπέρασμα πως τα 7,7ng/μl ίσως να ήταν μία μικρή δόση, εάν αναλογιστούμε και το γεγονός ότι ένας ενήλικος δάκος συναντάει στις διάφορες ποικιλίες καρπών της ελιάς, 140mg/g στους άγουρους καρπούς και μικρή μείωση της συγκέντρωσης αυτής στους πιο ώριμους καρπούς τους οποίους και επιλέγει.

Από την παρούσα μελέτη των γονιδίων Gr21a, Gr21a2, Gr93a, Gr66a και Gr39b και στους δύο ιστούς με κοινό παράγοντα την έκθεση στην ολευρωπαΐνη, δεν παρατηρήθηκαν έντονες διακυμάνσεις στην έκφρασή τους, όπως θα αναμενόταν, για αυτόν τον λόγο καλό θα ήταν να πραγματοποιηθεί περαιτέρω έλεγχος της έκφρασης με μεγαλύτερη συγκέντρωση της ολευρωπαΐνης, που θα αποτελέσει την δόση που θα τοποθετηθεί στους ιστούς. Το γεγονός ότι ο πληθυσμός που χρησιμοποιήθηκε είναι ένα αμιγές εργαστηριακό στέλεχος που διατηρείται σε συνθήκες τεχνητής εκτροφής και ωοαπόθεσης για παραπάνω από 15 χρόνια, θα μπορούσε να αιτιολογήσει την έκφραση των υποδοχέων στα έντομα που εκτέθηκαν στην ολευρωπαΐνη, ένα ερέθισμα όχι και τόσο γνώριμο. Επιπλέον δεν μπορούμε να παραβλέψουμε ότι η γεύση αποτελεί περίπλοκη αίσθηση, η οποία σε γονιδιακό επίπεδο θα μπορούσαμε να πούμε ότι μοιάζει με ένα μωσαϊκό, καθώς ένα μόνο συστατικό της τροφής μπορεί να πυροδοτήσει την έναρξη μονοπατιών από διαφορετικούς υποδοχείς-τελεστές. Είναι πιθανόν να αποτελεί μηχανισμό «με μνήμη» καθώς όταν οι οργανισμοί εκτίθενται σε νέα ερεθίσματα αντιδρούν με μεγαλύτερη ένταση είτε προσελκυστικά, είτε απωθητικά, ενώ όταν η έκθεση είναι χρόνια τότε αρχίζει να γίνεται γνώριμο το ερέθισμα. Για να γίνει όμως για παράδειγμα ένα αποτρεπτικό ερέθισμα γνώριμο και να είναι συνδεδεμένο με την επιβίωση του οργανισμού απαιτούνται αλλαγές στο γονιδίωμα που θα έχουν σαν αποτέλεσμα φυσιολογικές αλλαγές. Αυτός ίσως να είναι και ο λόγος που ο δάκος έχει παραμείνει ο μοναδικός οργανισμός που παρασιτεί στην ελιά, έναν φυτικό οργανισμό που οι καρποί του αποτελούνται ως επί το από πικρά φαινολικά συστατικά. Αλλαγές στο γονιδίωμα του και ίσως και συμβιωτικές σχέσεις,

που του επιτρέπουν το πλεονέκτημα διατροφής και επιβίωσης σε ένα σχετικά «αφιλόξενο» περιβάλλον του έχουν αποδώσει το συγκεκριμένο πλεονέκτημα. Για αυτόν τον λόγο θα μπορούσε να ανοίξει και ένας κύκλος ερευνών πάνω στο συμβιωτικό βακτήριο *E. dacicola* αν και κάτι τέτοιο δεν είναι ακόμα εφικτό καθώς το εντεροβακτήριο δεν μπορεί να καλλιεργηθεί in vitro (Capuzzo et al., 2005; Estes et al., 2009).

Μελλοντικά, συνεπώς, είναι απαραίτητη η περαιτέρω μελέτη των γονιδίων των γευστικών υποδοχέων και σε άλλους ιστούς όπως είναι τα πόδια, με τα οποία γίνεται η πρώτη επαφή με το ερέθισμα. Όμως και η διερεύνηση του προφίλ έκφρασης των γευστικών υποδοχέων που υπάρχουν στον ωοθέτη είναι σημαντική, καθώς θα επιτρέψει να εξεταστούν ποιοι είναι οι υποδοχείς που ανιχνεύουν το προσελκυστικό ερέθισμα έτσι ώστε το θηλυκό έντομο να επιλέξει τους κατάλληλους για ωοαπόθεση καρπούς. Ακόμη, σημαντικό θα ήταν να πραγματοποιηθούν πειραματικές δοκιμές και σε προνύμφες του δάκου της ελιάς, που τρέφονται από τον ελαιόκαρπο. Αυτό θα αποκάλυπτε τους υποδοχείς που είναι ενεργοί στο συγκεκριμένο αναπτυξιακό στάδιο και αποκρίνονται στα φαινορικά συστατικά του καρπού της ελιάς. Συνεπώς, οι γευστικοί υποδοχείς στα πόδια και τον ωοθέτη, καθώς και αυτοί που εμφανίζονται στο αναπτυξιακό στάδιο της προνύμφης αποτελούν τρία επιπλέον σημεία-στόχους για περαιτέρω μελέτη που μπορεί να συνεισφέρει ώστε να παρεμποδιστεί 1) η προσέγγιση του καρπού-τροφής (υποδοχείς ποδιών), 2) η ωοαπόθεση αυγών σε καρπούς ελιάς και 3) η αδυναμία διατροφής και ανάπτυξης στο εσωτερικό του καρπού της ελιάς. Ο απώτερος σκοπός σε όλες τις παραπάνω περιπτώσεις θα είναι ο έλεγχος των πληθυσμών του συγκεκριμένου παρασίτου. Αυτό βέβαια προϋποθέτει τόσο την ανίχνευση υποδοχέων με πολύ υψηλά επίπεδα έκφρασης ως απόκριση σε κάποιο συστατικό, όπως στην ολευρωπαΐνη, όσο και την συμβολή και άλλων τεχνολογιών έτσι ώστε να «κατασκευαστούν» μόρια με παρόμοια ίσως δομή, τα οποία θα είναι περισσότερο προσελκυστικά για τον δάκο της ελιάς, δηλαδή θα εμφανίζουν εξειδίκευση. Με αυτόν τον τρόπο θα μπορέσει να ελεγχθεί ο πληθυσμός του δάκου με φιλικά περιβαλλοντικό τρόπο, καθώς τα εντομοκτόνα και παρασιτοκτόνα που χρησιμοποιούνται αποτελούν σημαντικούς οργανικούς ρύπους (οργανοχλωριωμένα & οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα).

Προς την κατεύθυνση αυτή, σημαντική θα ήταν και η μελέτη των υποδοχέων σε επίπεδο πρωτεϊνών, έτσι ώστε να γίνουν πιο ξεκάθαρες οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ προσδέτη- υποδοχέα όπως και να επιβεβαιωθούν τα σηματοδοτικά μονοπάτια. Όμως το μεγάλο μέγεθος των συγκεκριμένων υποδοχέων και η ύπαρξη υδροφοβικών επικρατειών δεν επιτρέπει ακόμα την απομόνωση και κρυστάλλωση αυτών των πρωτεϊνών. Ακόμη, η εν μέρει κρυστάλλωση και ανάλυση της τρισδιάστατης δομής μόνο τον εξωκυτταρικών επικρατειών ίσως να μην γίνει επιτυχώς λόγω απόκτησης λανθασμένης αναδίπλωσης τους.



## 6 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Alagna F *et al.* 2012 Olive phenolic compounds: metabolic and transcriptional profiling during fruit development. *BMC Plant Biol.* **12**, 162. (doi:10.1186/1471-2229-12-162)
- Amiot MJ, Fleuriet A, Macheix JJ. 1986 Importance and evolution of phenolic compounds in olive during growth and maturation. *J. Agric. Food Chem.* **34**, 823–826. (doi:10.1021/jf00071a014)
- Amiot MJ, Fleuriet A, Macheix JJ. Accumulation of oleuropein derivatives during olive maturation. *Phytochemistry.* 1989;28:67–70. doi:10.1016/0031-9422(89)85009-5.
- Amiot MJ, Fleuriet A, Macheix JJ. Importance and evolution of phenolic compounds in olive during growth and maturation, 1986. *J Agric Food Chem.* ;34:823–826. doi:10.1021/jf00071a014.
- Amiot MJ, Tacchini M, Fleuriet A, Macheix JJ. The technological debittering process of olives: characterization of fruits before and during alkaline treatment. *Sci Aliments.* 1990;10:619–632.
- Angerosa F, D'Alessandro N, Konstantinou P, Di Giacinto L. GC-MS evaluation of phenolic compounds in virgin olive oil. *J Agric Food Chem.* 1995;43:1802–1807. doi:10.1021/jf00055a010.
- Badsha F, Kain P, Prabhakar S, et al. Mutants in *Drosophila* TRPC channels reduce olfactory sensitivity to carbon dioxide. *PLoS One.* 2012;7(11):e49848.
- Benton R, Sachse S, Michnick SW, Vosshall LB. Atypical membrane topology an heteromeric function of *Drosophila* odorant receptors in vivo. *PLoS Biol.* 2006;4(2):e20.
- Ben-Yosef M, Pasternak Z, Jurkevitch E, Yuval B., 2015. Symbiotic bacteria enable olive fly larvae to overcome host defences. *R. Soc. open sci.* **2**: 150170. <http://dx.doi.org/10.1098/rsos.150170>
- Ben-Yosef M, Pasternak Z, Jurkevitch E, Yuval B., 2014. Symbiotic bacteria enable olive flies (*Bactrocera oleae*) to exploit intractable sources of nitrogen. *J. Evol. Biol.* **27**, 2695–2705. (doi:10.1111/jeb.12527)
- Betman, M.A., E.F. Boller, G.L. Bush, Chambers, A.P. Economopoulos, B.S. Fletcher, M.D. Huettel, V. Moericke and R.J. Prokopy, 1976. Fruit flies. In *Studies in Biological Control*, (V.L. Delucchi ed.), pp.11-49.
- Bianco A, Lo Scalzo R, Scarpati ML. Isolation of cornoside from *Olea europaea* and its transformation into halleridone. *Phytochemistry*, 1993.;32:455–457. doi:10.1016/S0031-9422(00)95015-5.
- BiochimicaBiophysicaActa, 1422, Flower, D. R., 1999. Modelling G protein-coupled receptors for drug design, 207-234. Copyright, with permission from Elsevier.
- Bonoli M, Bendini A, Cerretani L, Lercker G, Toschi TG, 2004. Qualitative and semiquantitative analysis of phenolic compounds in extra virgin olive oils as a function of the ripening degree of olive fruits by different analytical techniques. *J Agric Food Chem.* ;52:7026–7032. doi:10.1021/jf048868m.
- Brenes M, Garcia P, Duran MC, Garrido A., 1993. Concentration of phenolic compounds change in storage brines of ripe olives. *J Food Sci.* ;58:347–350. doi:10.1111/j.1365-2621.1993.tb04272.x.
- Campeol E, Flamini G, Chericoni S, Catalano S, Cremonini R., 2001. Volatile compounds from three cultivars of *Olea europaea* from Italy. *J Agric Food Chem.* ;49:5409–5411. doi:10.1021/jf010455n.
- Capasso R, Evidente A, Scognamiglio F., 1992. A simple thin layer chromatographic method to detect the main polyphenols occurring in olive oil vegetation waters. *Phytochem Anal.* ;3:270–275. doi:10.1002/pca.2800030607.

Capuzzo C, Firrao G, Mazzon L, Squartini A, Girolami V. 2005 'Candidatus Erwinia dacicola', a coevolved symbiotic bacterium of the olive fly *Bactrocera oleae*(Gmelin). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**, 1641–1647.

Chyb S, Dahanukar A, Wickens A, Carlson JR., 2003. *Drosophila* Gr5a encodes a taste receptor tuned to trehalose. *Proc Natl Acad Sci USA.* ;100(Suppl 2):14526–14530.

Climato A, Mattei A, Osti M., 1990. Variation of polyphenol composition with harvesting period. *Acta Hort.* ;286:453–456.

Crnjar, R., Angioy, A.M., Pietra, P., Stoffolano Jr., J.G., Liscia, A., Tomassini Barbarossa, I., 1989. Electrophysiological studies of gustatory and olfactory responses of the sensilla on the ovipositor of the apple maggot, *Rhagoletis pomonella* (Walsh). *Bollettino di Zoologia* **56**, 41e46.

Dahanukar A; YT Lei; JY Kwon; Carlson - JR Neuron, 2007. A *Drosophila* gustatory receptor required for the responses to sucrose, glucose, and maltose identified by mRNA tagging, PNAS.

David A. Yarmolinsky, Charles S. Zuker, and Nicholas J.P. Ryba, 2009 Oct 16. Common Sense about Taste: From Mammals to Insects, *Cell.* ; 139(2): 234–244.

Dunipace L, S Meister, C McNealy, 2001. Spatially restricted expression of candidate taste receptors in the *Drosophila* gustatory system, *Current Biology.*

Dus M; JSY Lai; KM Gunapala; S Min; Tayler - TD Neuron, 2015. Nutrient sensor in the brain directs the action of the brain-gut axis in *Drosophila*, *Neuron.*

Emily R. Liman, Yali V. Zhang, and Craig Montell, 2014 Mar 5. Peripheral coding of taste, *Neuron* **81**(5): 984–1000.

Estes AM, Hearn DJ, Bronstein JL, Pierson EA., 2009. The olive fly endosymbiont 'Candidatus Erwinia dacicola' switches from an intracellular existence to an extracellular existence during host insect development. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 7097–7106. (doi:10.1128/AEM.00778-09)

Esti M, Cinquanta L, Notte EI, La Notte E., 1998. Phenolic compounds in different olive varieties. *J Agric Food Chem.* ;46:32–35. doi:10.1021/jf970391+

F. Ling, *J. Neurosci*, 2014. The molecular and cellular basis of taste coding in the legs of *Drosophila*.

Ficarra P, Ficarra R, de Pasquale A, Monforte MT, Calabro ML, 1991. HPLC analysis of oleuropein and some flavonoids in leaf and bud of *Olea europaea* L. *Farmaco.* ;46:803–815. PMID:1772565.

Fletcher B. S., 1987. The biology of a Dacine Fruit Flies, *Ann. Rev. Entol*(11)/ 32:115-4

Fredriksson R, Lagerström MC, Lundin LG, Schiöth HB, *Mol Pharmacol.* 2003 Jun; **63**(6):1256-72. The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints.

French A, Ali Agha M, Mitra A, Yanagawa A, Sellier M-J and Marion-Poll F., 2015. *Drosophila* Bitter Taste(s). *Front. Integr. Neurosci.* **9**:58. doi: 10.3389/fnint.2015.00058

French A, Ali Agha M, Mitra A, Yanagawa A, Sellier M-J and Marion-Poll F, 2015. *Drosophila* Bitter Taste(s) *Front. Integr. Neurosci.* **9**:58. doi: 10.3389/fnint.2015.00058

Gerber B; Stocker, 2006. The *Drosophila* Larva as a Model for Studying Chemosensation and Chemosensory Learning: A Review, *Chemical senses.*

- Girolami, V., Crnjar, R., Angioy, A.M., Strapazon, A., Pietra, P., Stoffolano Jr., J.G., Prokopy, R.J., 1986. Behavior and sensory physiology of *Rhagoletis pomonella* in relation to oviposition stimulants and deterrents in fruit. In: Cavalloro, R. (Ed.), *Fruit Flies of Economic Importance*, 84. A.A. Baljema Pub., Rotterdam-Boston, pp. 183e190.
- Goupy P, Fleuriet A, Amiot MJ, Macheix JJ, 1991. Enzymatic browning, oleuropein content, and diphenol oxidase activity in olive cultivars (*Olea europaea* L.) *J Agric Food Chem*;39:92–95.doi:10.1021/jf00001a017.
- Gutierrez-Rosales F, Romero MP, Casanovas M, Motilva MJ, Minguez-Mosquera MI. 2012.  $\beta$ -Glucosidase involvement in the formation and transformation of oleuropein during the growth and development of olive fruits (*Olea europaea* L. cv. Arbequina) grown under different farming practices. *J. Agric. Food Chem.* **60**, 4348–4358. (doi:10.1021/jf205209y)
- Hood Henderson, D.E., 1982. Fine structure and neurophysiology of a gustatory sensillum on the ovipositors of *Metasyrphus venablesi* and *Eupeodes volucris* (Diptera: Syrphidae). *Canadian Journal of Zoology* **60**, 3187e3195.
- Howard AD, McAllister G, Feighner SD, Liu Q, Nargund RP, Van der Ploeg LH, Patchett AA, *Trends Pharmacol Sci.* 2001 Mar; **22**(3):132-40. Orphan G-protein-coupled receptors and natural ligand discovery.
- Hugh M. Robertson, Coral G. Warr, and John R. Carlson, 2003. Molecular evolution of the insect chemoreceptor gene superfamily in *Drosophila melanogaster*, *Colloquium*.
- Jae Young Kwon,1,2 Anupama Dahanukar,1,3 Linnea A. Weiss,1 and John R. Carlson1, October 26, 2011. Molecular and Cellular Organization of the Taste System in the *Drosophila* Larva, *The Journal of Neuroscience* • **31**(43):15300 –15309.
- Ji TH, Grossmann M, Ji IJ *Biol Chem.* 1998 Jul 10; **273**(28):17299-302. G protein-coupled receptors. I. Diversity of receptor-ligand interactions.
- Ji TH, Grossmann M, Ji IJ *Biol Chem.* 1998 Jul 10; **273**(28):17299-302. G protein-coupled receptors. I. Diversity of receptor-ligand interactions.
- Jones WD, Cayirlioglu P, Kadow IG, Vosshall LB, 2007. Two chemosensory receptors together mediate carbon dioxide detection in *Drosophila*. *Nature*;**445**(7123):86–90.
- Kent M. Daane and Marshall W. Johnson, 2010. Olive Fruit Fly: Managing an Ancient Pest in Modern Times, *Annual Review of Entomology*. DOI: 10.1146/annurev.ento.54.110807.090553, PMID: 19961328
- Kiritsakis A. *Olive oil- Second Edition, From the tree to the table.* Food and Nutrition. Press, Inc.; Trumbull, Connecticut, USA: 1998. p. 006611.
- Knaden, M., Strutz, A., Ahsan, J., Sachse, S., and Hansson, B. S., 2012. Spatial representation of odorant valence in an insect brain. *Cell Rep.* **1**, 392–399.
- Kwon JY, Dahanukar A, Weiss LA, Carlson JR, 2007. The molecular basis of CO<sub>2</sub> reception in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA*;**104**(9):3574–3578.
- Le Tutour B, Guedon D., 1992. Antioxidant activities of *Olea europaea* leaves and related phenolic compounds. *Phytochemistry*;31:1173–1178. doi:10.1016/0031-9422(92)80255-D.
- Lee Y, Moon SJ, Montell C, 2009. Multiple gustatory receptors required for the caffeine response in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**:4495-4500
- Leslie B Vosshall; Reinhard F Stocker, *Annu. Rev. Neurosci*, 2007. Molecular architecture of smell and taste in *Drosophila*.

- Liman ER; YV Zhang; Montell - C Neuron, 2014. Peripheral coding of taste, Neuron.
- Limiroli R, Consonni R, Ottolina G, Marsilio V, Bianchi G, Zetta L., 1995.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR characterization of new oleuropein alkycones. *J Chem Soc Perkin Trans 1*. :1519–1523.doi:10.1039/P19950001519.
- Ling F, A Dahanukar, LA Weiss, 2014. The molecular and cellular basis of taste coding in the legs of *Drosophila*, *The Journal of Neuroscience* 34(21):7148 –7164.
- Lundin C, Kall L, Kreher SA, 2007. Membrane topology of the *Drosophila* OR83b odorant receptor. *FEBS Lett.*;581(29):5601–5604.
- M R Berenbaum, 1995. The chemistry of defense: theory and practice, *The chemistry of defense: theory and practice*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. PMID: 7816816
- Maher, N., Thiéry, D., Städler, E., 2006. Oviposition by *Lobesia botrana* is stimulated by sugars detected by contact chemoreceptors. *Physiological Entomology* 31, 14e22.
- Marella S, Fischler W, Kong P, Asgarian S, Rueckert E, Scott K. Imaging taste responses in the fly brain reveals a functional map of taste category and behavior. *Neuron*. 2006;49:285–295.
- Miyamoto T, J Slone, X Song, 2012. A fructose receptor functions as a nutrient sensor in the *Drosophila* brain, *Cell*.
- Moon SJ, Kottgen M, Jiao Y, Xu H, Montell C., 2006. A taste receptor required for the caffeine response in vivo. *Curr Biol*. ;16:1812–1817.
- Nanaë Gendre, Karin Lüer, Sandrine Friche, Nicola Grillenzoni, Ariane Ramaekers, Gerhard M. Technau and Reinhard F. Stocker, 2004. Integration of complex larval chemosensory organs into the adult nervous system of *Drosophila*.
- Naoji Fujishiro Hiromasa Kijima, Hiromichi Morita, 1984. Impulse frequency and action potential amplitude in labellar chemosensory neurones of *Drosophila melanogaster*, *Journal of Insect Physiology*.
- Nicolas Meunier, Frédéric Marion-Poll, Jean-Pierre Rospars, Teiichi Tanimura, 2003. Peripheral coding of bitter taste in *Drosophila*, *Developmental Neurobiology*, Volume 56, Issue 2, Pages 139-152.
- Nicolas Meunier, Frédéric Marion-Poll, Jean-Pierre Rospars, Teiichi Tanimura, 2003. Peripheral coding of bitter taste in *Drosophila*, *Developmental Neurobiology*, Volume 56, Issue 2, Pages 139-152.
- Nicolas Meunier; Frédéric Marion-Poll; Jean-Pierre P Rospars; Teiichi Tanimura, 2003. Peripheral coding of bitter taste in *Drosophila*, *Journal of neurobiology*.
- Park JH, Kwon - JY One, 2011. Heterogeneous expression of *Drosophila* gustatory receptors in enteroendocrine cells, *PLoS One*.
- Rebecca Delventhal, John R Carlson, 2016. Bitter taste receptors confer diverse functions to neurons, *eLife*.
- Rice MJ. 1977. Blowfly ovipositor receptor neurone sensitive to monovalent cation concentration. *Nature* 268:747–749.
- Rice, M.J., 1976. Contact chemoreceptors on the ovipositor of *Lucinia cuprina* (Wied.), the Australian sheep blowfly. *Australian Journal of Zoology* 24, 353e360.

Ryan D, Robards K, Prenzler P, Jardine D, Herlt T, Antolovich M., 1999. Liquid chromatography with electrospray ionisation mass spectrometric detection of phenolic compounds from *Olea europaea*. *J Chromatogr A*. ;855:529–537. doi:10.1016/S0021-9673(99)00719-0.

Ryan M. Joseph and John R. Carlson, 2015. *Drosophila* Chemoreceptors: A Molecular Interface Between the chemical World and the Brain, CellPress.

Sato K, Pellegrino M, Nakagawa T, Nakagawa T, Vosshall LB, Touhara K, 2008 Apr 24. Insect olfactory receptors are heteromeric ligand-gated ion channels. *Nature* 452(7190):1002-6.

Servili M, Baldioli M, Selvaggini R, Macchioni A, Montedoro G., 1999. Phenolic compounds of olive fruit: one- and two-dimensional nuclear magnetic resonance characterization of Nuzhenide and its distribution in the constitutive parts of fruit. *J Agric Food Chem*. ;47:12–18. doi:10.1021/jf9806210.

Shubha V Nayak; Naresh R Singh, 1983. Sensilla on the tarsal segments and mouthparts of adult *Drosophila melanogaster* Meigen (Diptera: Drosophilidae), *International Journal of Insect Morphology and Embryology*.

Siddiqi O, Rodrigues V, 1980. Genetic analysis of a complex chemoreceptor, *Basic Life Sci*. 16():347-59.

Singh R N , 1997. Neurobiology of the gustatory systems of *Drosophila* and some terrestrial insects, *Microscopy research and technique*.

Skelhorn, J., and Rowe, C., 2009. Distastefulness as an antipredator defence strategy. *Anim. Behav.* 78, 761–766. doi: 10.1016/j.anbehav.2009.07.006

Soler-Rivas C, Espin JC, Wichers HJ. Oleuropein and related compounds. *J Sci Food Agric*. 2000;80:1013–1023. doi:10.1002/(SICI)1097-0010(20000515)80:7<1013::AID-JSFA571>3.0.CO;2-C.

Soler-Rivas C, Espin JC, Wichers HJ. Oleuropein and related compounds. *J Sci Food Agric*. 2000;80:1013–1023. doi:10.1002/(SICI)1097-0010(20000515)80:7<1013::AID-JSFA571>3.0.CO;2-C.

Thorne N, Bray S, Amrein H, *Chem Senses*, 2005 Jan 30. Function and expression of the *Drosophila* gr genes in the perception of sweet, bitter and pheromone compounds. *Suppl 1*():i270-2.

Thorne N, Chromey C, Bray S, Amrein H., 2004. Taste perception and coding in *Drosophila*. *Curr Biol*. ;14:1065–1079.

Waladde, S.M., 1983. Chemoreception of adult stem-borers: tarsal and ovipositor sensilla on *Chilo partellus* and *Eldana saccharina*. *International Journal of Tropical Insect Science* 4, 159e165.

Wang Z, Singhvi A, Kong P, Scott K., 2004. Taste representations in the *Drosophila* brain. *Cell*. ;117:981–991.

Wanner, K. W., and Robertson, H. M., 2008. The gustatory receptor family in the silkworm moth *Bombyx mori* is characterized by a large expansion of a single lineage of putative bitter receptors. *Insect Mol. Biol.* 17, 621–629. doi: 10.1111/j.1365-2583.2008.00836.x

Weiss LA, A Dahanukar, JY Kwon, Banerjee - D Neuron, 2011. The molecular and cellular basis of bitter taste in *Drosophila*, *Neuron*.

Wicher D, Schäfer R, Bauernfeind R, Stensmyr MC, Heller R, Heinemann SH, Hansson BS, 2008 Apr 24. *Drosophila* odorant receptors are both ligand-gated and cyclic-nucleotide-activated cation channels. *Nature* 452(7190):1007-11.

Wolbarsht ML, Dethier VG. 1958. Electrical activity in the chemoreceptors of the blowfly. I. Responses to chemical and mechanical stimulation. *J Gen Physiol* 42:393–412.

Yao CA, Carlson JR., 2010. Role of G-proteins in odor-sensing and CO<sub>2</sub>-sensing neurons in *Drosophila*. *J Neurosci.*;30(13):4562–4572.

Zhang HJ, AR Anderson, 2011. Topological and functional characterization of an insect gustatory receptor, *PloS one*.

Zhang, Y. V., Raghuwanshi, R. P., Shen, W. L., and Montell, C. (2013b). Food experience-induced taste desensitization modulated by the *Drosophila* TRPL channel. *Na. Neurosci.*

*Παράρτημα*

## 7 ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

### 7.1 ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΕΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΕΣ ΤΩΝ 53 ΥΠΟΨΗΦΙΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΠΟΥ ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΟΥΝ ΓΕΥΣΤΙΚΟΥΣ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΤΟΥ *B.oleae*

>XM\_014245747.1 PREDICTED: Bactrocera oleae gustatory and odorant receptor 21a-like (LOC106625926),

>XM\_014238429.1 PREDICTED: Bactrocera oleae putative gustatory receptor 57a (LOC106619776), mRNA

>>XM\_014247700.1 PREDICTED: Bactrocera oleae gustatory and pheromone receptor 32a-like (LOC106627548), mRNA

>XM\_014239629.1 PREDICTED: Bactrocera oleae gustatory and odorant receptor 63a (LOC106620951), mRNA

>XM\_014230282.1 PREDICTED: Bactrocera oleae putative gustatory receptor 58a (LOC106614499), mRNA

>XM\_014247702.1 PREDICTED: Bactrocera oleae gustatory and pheromone receptor 32a-like (LOC106627551), mRNA

>XM\_014230971.1 PREDICTED: Bactrocera oleae gustatory and pheromone receptor 32a (LOC106614996), transcript variant X1, mRNA

>XM\_014231377.1 PREDICTED: Bactrocera oleae putative gustatory receptor 22c (LOC106615239), mRNA

>XM\_014231376.1 PREDICTED: Bactrocera oleae putative gustatory receptor 22a (LOC106615238), mRNAA

>XM\_014231242.1 PREDICTED: Bactrocera oleae putative gustatory receptor 89a (LOC106615154), mRNA

>XM\_014230972.1 PREDICTED: Bactrocera oleae gustatory and pheromone receptor 32a (LOC106614996), transcript variant X2, mRNA

>XM\_014231835.1 PREDICTED: Bactrocera oleae putative gustatory receptor 28b (LOC106615562), mRNA

>XM\_014231378.1 PREDICTED: Bactrocera oleae gustatory receptor for bitter taste 22e-like (LOC106615240), mRNA

>XM\_014231873.1 PREDICTED: Bactrocera oleae putative gustatory receptor 28a (LOC106615595), mRNA

>XM\_014239081.1 PREDICTED: Bactrocera oleae putative gustatory receptor 23a, isoforms A/C (LOC106620555), mRNA



>XM\_014239080.1 PREDICTED: *Bactrocera oleae* putative gustatory receptor 23a, isoform B (LOC106620553), mRNA

>XM\_014238966.1 PREDICTED: *Bactrocera oleae* gustatory receptor for bitter taste 66a-like (LOC106620458), mRNA

>XM\_014237723.1 PREDICTED: *Bactrocera oleae* putative gustatory receptor 98b (LOC106619573), mRNA

>XM\_014237722.1 PREDICTED: *Bactrocera oleae* putative gustatory receptor 98b (LOC106619572), mRNA

>XM\_014237487.1 PREDICTED: *Bactrocera oleae* gustatory receptor for bitter taste 66a (LOC106619412), mRNA

>XM\_014236707.1 PREDICTED: *Bactrocera oleae* gustatory receptor for sugar taste 64a (LOC106618820), mRNA

>XM\_014236705.1 PREDICTED: *Bactrocera oleae* gustatory receptor 5a for trehalose-like (LOC106618817), mRNA

>XM\_014236693.1 PREDICTED: *Bactrocera oleae* gustatory receptor for sugar taste 64b-like (LOC106618806), mRNA

>XM\_014236692.1 PREDICTED: *Bactrocera oleae* gustatory receptor for sugar taste 64e (LOC106618805), mRNA

>XM\_014236691.1 PREDICTED: *Bactrocera oleae* gustatory receptor for sugar taste 64f-like (LOC106618804), partial mRNA

>XM\_014236690.1 PREDICTED: *Bactrocera oleae* gustatory receptor 5a for trehalose (LOC106618803), mRNA

>XM\_014236438.1 PREDICTED: *Bactrocera oleae* gustatory receptor for bitter taste 22e-like (LOC106618635), mRNA

>XM\_014236437.1 PREDICTED: *Bactrocera oleae* putative gustatory receptor 36b (LOC106618634), mRNA

>XM\_014236435.1 PREDICTED: *Bactrocera oleae* gustatory receptor 10a (LOC106618632), mRNA

>XM\_014235045.1 PREDICTED: *Bactrocera oleae* putative gustatory receptor 39b (LOC106617681), mRNA

>XM\_014234428.1 PREDICTED: *Bactrocera oleae* putative gustatory receptor 94a (LOC106617318), mRNA

>XM\_014233126.1 PREDICTED: *Bactrocera oleae* gustatory receptor for sugar taste 43a-like (LOC106616462), partial mRNA

>XM\_014231941.1 PREDICTED: *Bactrocera oleae* gustatory and pheromone receptor 33a (LOC106615631), mRNA

>XM\_014233125.1 PREDICTED: *Bactrocera oleae* gustatory receptor for sugar taste 43a-like (LOC106616461), mRNA

>XM\_014245737.1 PREDICTED: Bactrocera oleae gustatory and odorant receptor 21a-like (LOC106625916), partial mRNA

>XM\_014245698.1 PREDICTED: Bactrocera oleae gustatory and odorant receptor 21a-like (LOC106625878), partial mRNA

>XM\_014245389.1 PREDICTED: Bactrocera oleae gustatory receptor for bitter taste 66a-like (LOC106625559), partial mRNA

>XM\_014245148.1 PREDICTED: Bactrocera oleae gustatory and odorant receptor 21a-like (LOC106625323), partial mRNA

>XM\_014245112.1 PREDICTED: Bactrocera oleae putative gustatory receptor 98b (LOC106625288), partial mRNA

>XM\_014242989.1 PREDICTED: Bactrocera oleae gustatory receptor 8a-like (LOC106623458), mRNA

>XM\_014242987.1 PREDICTED: Bactrocera oleae gustatory receptor 8a (LOC106623457), mRNA

>XM\_014242735.1 PREDICTED: Bactrocera oleae gustatory receptor for sugar taste 43a-like (LOC106623283), transcript variant X2, mRNA

>XM\_014242734.1 PREDICTED: Bactrocera oleae gustatory receptor for sugar taste 43a-like (LOC106623283), transcript variant X1, mRNA

>XM\_014242324.1 PREDICTED: Bactrocera oleae gustatory and odorant receptor 21a (LOC106622974), mRNA

>XM\_014242126.1 PREDICTED: Bactrocera oleae putative gustatory receptor 47b (LOC106622820), mRNA

>XM\_014241851.1 PREDICTED: Bactrocera oleae gustatory and odorant receptor 22-like (LOC106622618), mRNA

>XM\_014240323.1 PREDICTED: Bactrocera oleae gustatory receptor for bitter taste 93a (LOC106621446), mRNA

>XM\_014239088.1 PREDICTED: Bactrocera oleae putative gustatory receptor 39b (LOC106620561), mRNA

>XM\_014241550.1 PREDICTED: Bactrocera oleae putative gustatory receptor 59f (LOC106622393), mRNA

>XM\_014239087.1 PREDICTED: Bactrocera oleae putative gustatory receptor 39b (LOC106620560), mRNA

>XM\_014239086.1 PREDICTED: Bactrocera oleae putative gustatory receptor 39b (LOC106620559), mRNA

>XM\_014239085.1 PREDICTED: Bactrocera oleae putative gustatory receptor 39b (LOC106620558), mRNA

>XM\_014239082.1 PREDICTED: Bactrocera oleae putative gustatory receptor 2a (LOC106620556), mRNA

## 7.2 ΑΜΙΝΟΞΙΚΕΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΕΣ ΤΩΝ 53 ΥΠΟΨΗΦΙΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΠΟΥ ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΟΥΝ ΓΕΥΣΤΙΚΟΥΣ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΤΟΥ *B.oleae*

- >XP\_014101222.1 PREDICTED: gustatory and odorant receptor 21a-like [Bactrocera oleae]
- >XP\_014093904.1 PREDICTED: putative gustatory receptor 57a [Bactrocera oleae]
- >XP\_014103175.1 PREDICTED: gustatory and pheromone receptor 32a-like [Bactrocera oleae]
- >XP\_014095104.1 PREDICTED: gustatory and odorant receptor 63a [Bactrocera oleae]
- >XP\_014085757.1 PREDICTED: putative gustatory receptor 58a [Bactrocera oleae]
- >XP\_014103177.1 PREDICTED: gustatory and pheromone receptor 32a-like [Bactrocera oleae]
- >XP\_014086446.1 PREDICTED: gustatory and pheromone receptor 32a [Bactrocera oleae]
- >XP\_014086852.1 PREDICTED: putative gustatory receptor 22c [Bactrocera oleae]
- >XP\_014086851.1 PREDICTED: putative gustatory receptor 22a [Bactrocera oleae]
- >XP\_014086717.1 PREDICTED: putative gustatory receptor 89a [Bactrocera oleae]
- >XP\_014086447.1 PREDICTED: gustatory and pheromone receptor 32a [Bactrocera oleae]
- >XP\_014087310.1 PREDICTED: putative gustatory receptor 28b [Bactrocera oleae]
- >XP\_014086853.1 PREDICTED: gustatory receptor for bitter taste 22e-like [Bactrocera oleae]
- >XP\_014087348.1 PREDICTED: putative gustatory receptor 28a [Bactrocera oleae]
- >XP\_014094556.1 PREDICTED: putative gustatory receptor 23a, isoforms A/C [Bactrocera oleae]
- >XP\_014094555.1 PREDICTED: putative gustatory receptor 23a, isoform B [Bactrocera oleae]
- >XP\_014094441.1 PREDICTED: gustatory receptor for bitter taste 66a-like [Bactrocera oleae]
- >XP\_014093198.1 PREDICTED: putative gustatory receptor 98b [Bactrocera oleae]
- >XP\_014093197.1 PREDICTED: putative gustatory receptor 98b [Bactrocera oleae]
- >XP\_014092962.1 PREDICTED: gustatory receptor for bitter taste 66a [Bactrocera oleae]
- >XP\_014092182.1 PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: gustatory receptor for sugar taste 64a [Bactrocera oleae]
- >XP\_014092180.1 PREDICTED: gustatory receptor 5a for trehalose-like [Bactrocera oleae]
- >XP\_014092168.1 PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: gustatory receptor for sugar taste 64b-like [Bactrocera oleae]
- >XP\_014092167.1 PREDICTED: gustatory receptor for sugar taste 64e [Bactrocera oleae]
- >XP\_014092166.1 PREDICTED: gustatory receptor for sugar taste 64f-like, partial [Bactrocera oleae]
- >XP\_014092165.1 PREDICTED: gustatory receptor 5a for trehalose [Bactrocera oleae]
- >XP\_014091913.1 PREDICTED: gustatory receptor for bitter taste 22e-like [Bactrocera oleae]

>XP\_014091912.1 PREDICTED: putative gustatory receptor 36b [Bactrocera oleae]  
>XP\_014091910.1 PREDICTED: gustatory receptor 10a [Bactrocera oleae]  
>XP\_014090520.1 PREDICTED: putative gustatory receptor 39b [Bactrocera oleae]  
>XP\_014089903.1 PREDICTED: putative gustatory receptor 94a [Bactrocera oleae]  
>XP\_014088601.1 PREDICTED: gustatory receptor for sugar taste 43a-like, partial [Bactrocera oleae]  
>XP\_014087416.1 PREDICTED: gustatory and pheromone receptor 33a [Bactrocera oleae]  
>XP\_014088600.1 PREDICTED: gustatory receptor for sugar taste 43a-like [Bactrocera oleae]  
>XP\_014101212.1 PREDICTED: gustatory and odorant receptor 21a-like, partial [Bactrocera oleae]  
>XP\_014101173.1 PREDICTED: gustatory and odorant receptor 21a-like, partial [Bactrocera oleae]  
>XP\_014100864.1 PREDICTED: gustatory receptor for bitter taste 66a-like, partial [Bactrocera oleae]  
>XP\_014100623.1 PREDICTED: gustatory and odorant receptor 21a-like, partial [Bactrocera oleae]  
>XP\_014100587.1 PREDICTED: putative gustatory receptor 98b, partial [Bactrocera oleae]  
>XP\_014098464.1 PREDICTED: gustatory receptor 8a-like [Bactrocera oleae]  
>XP\_014098462.1 PREDICTED: gustatory receptor 8a [Bactrocera oleae]  
>XP\_014098210.1 PREDICTED: gustatory receptor for sugar taste 43a-like isoform X2 [Bactrocera oleae]  
>XP\_014098209.1 PREDICTED: gustatory receptor for sugar taste 43a-like isoform X1 [Bactrocera oleae]  
>XP\_014097799.1 PREDICTED: gustatory and odorant receptor 21a [Bactrocera oleae]  
>XP\_014097601.1 PREDICTED: putative gustatory receptor 47b [Bactrocera oleae]  
>XP\_014097326.1 PREDICTED: gustatory and odorant receptor 22-like [Bactrocera oleae]  
>XP\_014095798.1 PREDICTED: gustatory receptor for bitter taste 93a [Bactrocera oleae]  
>XP\_014094563.1 PREDICTED: putative gustatory receptor 39b [Bactrocera oleae]  
>XP\_014097025.1 PREDICTED: putative gustatory receptor 59f [Bactrocera oleae]  
>XP\_014094562.1 PREDICTED: putative gustatory receptor 39b [Bactrocera oleae]  
>XP\_014094561.1 PREDICTED: putative gustatory receptor 39b [Bactrocera oleae]  
>XP\_014094560.1 PREDICTED: putative gustatory receptor 39b [Bactrocera oleae]>XP\_014094557.1 PREDICTED: putative gustatory receptor 2a [Bactrocera oleae]