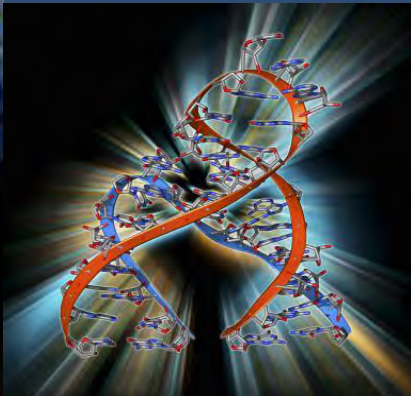


**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

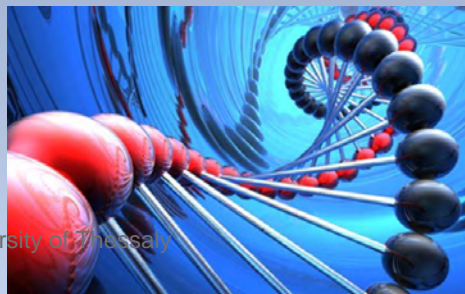


ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΤΡΑΝΣΚΡΙΠΤΟΜΙΚΗ ΚΑΙ ΠΡΩΤΕΟΜΙΚΗ
ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ΣΗΜΑΝΤΙΚΟΤΕΡΟΥ ΠΑΡΑΣΙΤΟΥ
ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ, ΤΟΥ ΕΝΤΟΜΟΥ *Bactrocera oleae*,
ΜΕ ΕΜΦΑΣΗ ΣΤΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ
ΦΥΛΟΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥ ΚΑΙ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ
ΣΤΑ ΕΝΤΟΜΟΚΤΟΝΑ**

ΣΑΓΡΗ ΕΥΘΥΜΙΑ

ΛΑΡΙΣΑ, 2015



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΤΡΑΝΣΚΡΙΠΤΟΜΙΚΗ ΚΑΙ ΠΡΩΤΕΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ΣΗΜΑΝΤΙΚΟΤΕΡΟΥ ΠΑΡΑΣΙΤΟΥ ΤΗΣ
ΕΛΙΑΣ, ΤΟΥ ΕΝΤΟΜΟΥ *Bactrocera oleae*, ΜΕ ΕΜΦΑΣΗ ΣΤΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΦΥΛΟΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥ
ΚΑΙ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΤΑ ΕΝΤΟΜΟΚΤΟΝΑ

ΣΑΓΡΗ ΕΥΘΥΜΙΑ

Γεωπόνος

MSc Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

ΛΑΡΙΣΑ 2015

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΣΑΓΡΗ ΕΥΘΥΜΙΑ

Γεωπόνος/ MSc Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΤΡΑΝΣΚΡΙΠΤΟΜΙΚΗ ΚΑΙ ΠΡΩΤΕΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ΣΗΜΑΝΤΙΚΟΤΕΡΟΥ ΠΑΡΑΣΙΤΟΥ ΤΗΣ
ΕΛΙΑΣ, ΤΟΥ ΕΝΤΟΜΟΥ *Bactrocera oleae*, ΜΕ ΕΜΦΑΣΗ ΣΤΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΦΥΛΟΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥ
ΚΑΙ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΤΑ ΕΝΤΟΜΟΚΤΟΝΑ

Αριθμός προκαταρτικών σελίδων: xvi

Συνολικός αριθμός σελίδων:274

Συνολικός αριθμός πινάκων:17

Συνολικός αριθμός εικόνων:67

Συνολικός αριθμός παρατημάτων:3

Συνολικός αριθμός βιβλιογραφικών παραπομπών:519

Συνολικός αριθμός χρησιμοποιούμενων δικτυακών τόπων:28

ΛΑΡΙΣΑ 2015

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- ◇ Ματθιόπουλος Κωνσταντίνος (Επιβλέπων Καθηγητής)
Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- ◇ Κοντού Μαρία
Επίκουρος καθηγήτρια Πρωτεϊνικής Χημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- ◇ Αϊδίνης Βασίλειος
Ερευνητής Α', Ινστιτούτο Ανοσολογίας, Ερευνητικό Κέντρο Βιοϊατρικών Επιστημών «ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ ΦΛΕΜΙΝΓΚ»

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- ◇ Αϊδίνης Βασίλειος
Ερευνητής Α', Ινστιτούτο Ανοσολογίας, Ερευνητικό Κέντρο Βιοϊατρικών Επιστημών «ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ ΦΛΕΜΙΝΓΚ»
- ◇ Βόντας Ιωάννης
Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοτεχνολογίας και Εφαρμοσμένης Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης
- ◇ Καρπούζας Δημήτριος
Αναπληρωτής Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- ◇ Κοντού Μαρία
Επίκουρος καθηγήτρια Πρωτεϊνικής Χημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- ◇ Μαμούρης Ζήσης
Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- ◇ Ματθιόπουλος Κωνσταντίνος (Επιβλέπων Καθηγητής)
Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- ◇ Σκαμνάκη Βασιλική
Λέκτορας Βιοχημείας- Μεταβολισμού, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Η παρούσα έρευνα έχει συγχρηματοδοτηθεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο - ΕΚΤ) και από εθνικούς πόρους μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» του Εθνικού Στρατηγικού Πλαισίου Αναφοράς (ΕΣΠΑ) – Ερευνητικό Χρηματοδοτούμενο Έργο: Ηράκλειτος II . Επένδυση στην κοινωνία της γνώσης μέσω του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου.



ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Όλα στη ζωή έχουν αρχή και τέλος! Έτσι και εδώ φτάσαμε στο τέλος ενός υπέροχου ταξιδιού, που με δίδαξε και μου έδωσε πολλά. Ήταν μεγάλη μου τιμή που συμμετείχα σε όλο αυτό το εγχείρημα, αν είχα την ευκαιρία να γυρίσω τον χρόνο πίσω, οι επιλογές θα ήταν οι ίδιες. Φυσικά, δεν θα μπορούσε να γίνει το παραμικρό χωρίς τον υπεύθυνο καθηγητή κ. Ματθιόπουλο Κωνσταντίνο που μου έκανε την τιμή να δουλέψω στο εργαστήριο του. Ένα ευχαριστώ δεν είναι αρκετό, για όλα όσα με δίδαξε, για την στήριξη από την αρχή έως και το τέλος, για την εμπιστοσύνη, την άριστη επιστημονική του γνώση, τις συμβουλές, την καθοδήγηση και την βοήθεια σε όλα. Κυρίως, θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για τη συμπαράσταση στο δυσβάσταχτο πόνο της απώλειας του πατέρα μου που συνέβη κατά την εξέλιξη της διατριβής μου.

Ευχαριστώ πολύ τους καθηγητές μέλη της τριμελούς επιτροπής κα. Κοντού Μαρία και κ. Αϊδίνη Βασίλειο για την άψογη συνεργασία και πολύτιμη καθοδήγηση στη διδακτορική διατριβή. Ιδιαίτερο ευχαριστώ στη κα. Κοντού που με φιλοξένησε στο Εργαστήριο Βιοχημείας τον πρώτο χρόνο του διδακτορικού μου για την εκπόνηση της πρωτοομικής ανάλυσης. Οι συμβουλές και η καθοδήγηση της συνέβαλλαν στο τελικό αποτέλεσμα.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής, κ. Βόντα Ιωάννη, κ. Καρπούζα Δημήτριο, κ. Μαμούρη Ζήση και την κα. Σκαμνάκη Βασιλική για την τιμή που μου έκαναν να είναι εξεταστές αλλά και για το χρόνο τους για την κρίση της διατριβής μου. Επίσης, ευχαριστώ τους καθηγητές του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, για την άψογη συνεργασία καθ' όλη τη διάρκεια του διδακτορικού μου.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής, που μοιραστήκαμε πολλές εμπειρίες, πολλές δυσκολίες αλλά και επιτυχίες. Ευχαριστώ στους Διδάκτορες Τσουμάνη Κων/να και Ζυγουρίδη Νικόλαο για τη βοήθεια στα πρώτα βήματα της διδακτορικής διατριβής μου. Ιδιαίτερο ευχαριστώ στην Διδάκτορα Κακάνη Ευδοξία που βοήθησε πολύ ακόμη και αν βρίσκεται στο μακρινό Πανεπιστήμιο του Harvard. Η προθυμία της να μοιράζει απλόχερα τις γνώσεις της δείχνουν το μεγαλείο του Επιστήμονα!

Θα ήταν παράληψη να μην αναφερθώ στα "κορίτσια" μου, τις συνοδοιπόρους Υπ. Διδάκτορες Μαρία-Ελένη Γρηγορίου και Παναγιώτα Κοσκινιώτη για όλες τις ημέρες και πολλές φορές νύχτες που θυσίασαμε στο βωμό της επιστήμης με τα ατελείωτα πειράματα και για την υπέροχη συνύπαρξη και συνεργασία όλα αυτά τα χρόνια. Από το ταξίδι αυτό απέκτησα δύο φίλες που μου στάθηκαν τόσο στα ευχάριστα, όσο και στα δυσάρεστα.

Επίσης, ευχαριστώ τον κ. Ραγκούση Ιωάννη και τα μέλη του εργαστηρίου του στο Ερευνητικό Κέντρο Βιοϊατρικών Επιστημών «ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ ΦΛΕΜΙΝΓΚ» για την πολύτιμη συνεργασία στο κομμάτι του RNA-seq κυρίως όμως ευχαριστώ τον Rezscó Martin για τη βιοπληροφορική ανάλυση και την άψογη συνεργασία του.

Τέλος, ευχαριστώ το εργαστήριο του κ. Wimmer Ernst, στο Georg-August-University Goettingen Johann-Friedrich-Blumenbach-Institute of Zoology and Anthropology για την υλοποίηση της πεπτιδομικής ανάλυσης. Ιδιαίτερες ευχαριστίες στην Διδάκτορα Curril Ingrid.

Ολοκληρώνοντας, θα ήθελα να πω ένα τεράστιο ευχαριστώ στην οικογένεια μου για την υπομονή και τη στήριξη καθ' όλη τη διάρκεια της διδακτορικής διατριβής μου. Ιδιαίτερα όμως εκφράζω τις ευχαριστίες μου στη μητέρα μου που αποτέλεσε κινητήρια δύναμη και στήριγμα σε ότι έχω κάνει στην μέχρι τώρα πορεία μου. Τέλος, ευχαριστώ πολύ το σύζυγο μου, Θανάση για την τεράστια υπομονή, κατανόηση και την συμπαράσταση του στο διδακτορικό και κυρίως στο συγγραφικό κομμάτι της διατριβής. Ήταν πολλές οι μέρες που με μοιράστηκε με την έρευνα και την επιστήμη!

ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2015, ΛΑΡΙΣΑ

Έφη Σαγρή

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το έντομο *Bactrocera oleae* (*Tephritidae*), κοινώς ο δάκος της ελιάς, είναι ο σημαντικότερος εχθρός της ελιάς και η ζημιά που προκαλεί φτάνει το 30% ετησίως. Οι καταστροφικές του συνέπειες τον καθιστούν στόχο συστηματικού ελέγχου, κυρίως με χρήση χημικών εντομοκτόνων. Για την καταπολέμηση του εντόμου στη χώρα μας χρησιμοποιούνται κυρίως οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα, ενώ σε μικρότερη κλίμακα εφαρμόζονται οι συνθετικές πυρεθρίνες και πρόσφατα ο νατουραλίτης spinosad. Η μη ορθολογική χρήση αυτών εμπεριέχει κινδύνους, όπως οικολογικές διαταραχές, δημιουργία και εξάπλωση ανθεκτικότητας, επιβλαβείς τοξικολογικές επιδράσεις και συνέπειες στην υγεία του ανθρώπου. Για τον έλεγχο φυσικών πληθυσμών του εντόμου έχουν προταθεί νέες φιλικότερες προς το περιβάλλον μέθοδοι, όπως η τεχνική του στείρου εντόμου (Sterile Insect Technique, SIT) που προϋποθέτει τη μαζική εκτροφή και εξαπόλυση στείρων εντόμων στη φύση. Η μέθοδος αυτή έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για τον έλεγχο άλλων εντόμων (πχ. Μεσογειακή μύγα) σε διάφορες περιοχές του κόσμου, ωστόσο η SIT δεν έχει εφαρμοσθεί με επιτυχία ακόμη στον δάκο. Όπως έχει δείχθει σε πολλές περιπτώσεις, η επιτυχής εφαρμογή της SIT προϋποθέτει καλή γνώση της βιολογίας και της οικολογίας του εντόμου, καθώς και αποτελεσματικά μοριακά και γενετικά εργαλεία. Δεδομένου ότι οι πληροφορίες για το γονιδίωμα του δάκου είναι ελάχιστες, η παρούσα έρευνα έχει σκοπό την ανάπτυξη εργαλείων μέσω της ανάλυσης της γονιδιακής έκφρασης μέσω της πρωτεομικής και τρανσκριπτομικής που θα βοηθήσουν τις προσπάθειες αποτελεσματικότερης εφαρμογής SIT και τον εντοπισμό και την απομόνωση γονιδίων του δάκου που εμπλέκονται είτε σε μονοπάτια φυλοδιαχωρισμού είτε ανθεκτικότητας στο εντομοκτόνο spinosad.

Τρανσκριπτομική ανάλυση: Η ανάλυση του τρανσκριπτώματος του δάκου στόχευε αφενός στην αποκάλυψη γενετικών τόπων που εμπλέκονται στην ανθεκτικότητα του δάκου στο spinosad και αφετέρου στον εντοπισμό γονιδίων διαχωρισμού των δύο φύλων. Για το σκοπό αυτό, RNA απομονώθηκε είτε από κεφάλια ανθεκτικών και ευαίσθητων στο spinosad εντόμων, είτε από το αναπαραγωγικό

σύστημα αρσενικών και θηλυκών ατόμων. Το RNA αυτό μετατράπηκε σε cDNA και ακολούθησε η αλληλούχηση του. Η αλληλούχηση πραγματοποιήθηκε στο Ινστιτούτο Φλέμινγκ με την τεχνολογία SOLiD. Η βιοπληροφορική ανάλυση των δειγμάτων κατέληξε σε πλήθος γονιδίων διαφορετικής έκφρασης σε ευαίσθητα και ανθεκτικά στο spinosad έντομα καθώς επίσης και σε αρσενικά και θηλυκά άτομα *B. oleae*. Η επεξεργασία και σύγκριση περισσότερων από 13.000 γονιδίων προσδιόρισε τη στατιστικά σημαντική υπερέκφραση 9 γονιδίων και στατιστικά σημαντική υποέκφραση ~40 γονιδίων ανάμεσα σε ευαίσθητα και ανθεκτικά στο spinosad έντομα. Αντίστοιχα, 330 γονίδια είχαν υπερέκφραση στα θηλυκά έντομα ενώ 1238 υπερεκφράζονται στα αρσενικά έντομα. Στη συνέχεια επιλέχθηκαν είτε γονίδια με ιδιαίτερα διαφορετική έκφραση είτε γονίδια ιδιαίτερου ενδιαφέροντος για περαιτέρω λειτουργική ανάλυση μέσω qRT-PCR. Για τη λειτουργική ανάλυση διαφορεικά εκφραζόμενων γονιδίων σε θηλυκά και αρσενικά άτομα μελετήθηκαν τα δώδεκα γονίδια: *kl2* (*male fertility factor, kl2*), *kl3* (*male fertility factor, kl3*), *kl5* (*male fertility factor, kl5*), *ory* (*occludin-related Y protein*), *fem-1* (*sex-determining protein fem-1*), *gas8* (*growth arrest specific protein 8*), *lobo* (*lost boys*), *ix* (*intersex*), *pbl* (*pebble*) και *hcf* (*host cell factor C1*) που υπερεκφράζονται στα αρσενικά και τα δύο γονίδια *sox* και *pcp* (*pupal cuticle protein 78E*) που υπερεκφράζονται στα θηλυκά έντομα. Στα αποτελέσματα που προέκυψαν επιβεβαιώθηκε σημαντική διαφορά αυξημένης έκφρασης στα αρσενικά έντομα για τα γονίδια *kl2*, *kl3*, *kl5*, *ory*, *fem-1*, *gas8*, *lobo*, *pbl*, *hcf* και το γονίδιο *pcp* με υπερέκφραση στα θηλυκά έντομα ενώ ελάχιστες διαφορές παρατηρήθηκαν μεταξύ των αρσενικών και θηλυκών εντόμων για το γονίδιο *ix*. Μόνο για το γονίδιο *sox* δεν διαπιστώθηκε το αναμενόμενο αποτέλεσμα. Παράλληλα, για τη λειτουργική ανάλυση των γονιδίων που εμπλέκονται στην ανθεκτικότητα, συνολικά μελετήθηκαν δύο ανθεκτικοί και δύο ευαίσθητοι πληθυσμοί *B. oleae*. Οι ανθεκτικοί πληθυσμοί ήταν ο εργαστηριακός πληθυσμός (SPIN) που είχε επιλεγεί μέσω συνεχούς προσθήκης του εντομοκτόνου στη διατροφή του και ένας φυσικός πληθυσμός από την Καλιφόρνια (w-CAL) που

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

εμφάνιζε 13 φορές αυξημένη ανθεκτικότητα σε σχέση με εργαστηριακό ευαίσθητο στέλεχος. Οι ευαίσθητοι πληθυσμοί ήταν ο εργαστηριακός (LAB) που εκτρέφεται σε εργαστηριακές συνθήκες τα τελευταία ~40 χρόνια και ένας πληθυσμός που προέκυψε από ελαιόκαρπους της περιοχής Βόλου- Αγριάς (w-GR) όπου δεν γίνεται χρήση εντομοκτόνων. Συνολικά μελετήθηκαν τα δεκαέξι γονίδια που πολλά ανήκουν σε ομάδες μεταβολισμού ενέργειας: *Yolk protein 2 (Yp2)*, *ATP synthase FO subunit 6 (ATP synthase)*, *Low affinity cationic amino acid transporter 2 (CAT-2)*, *Serine protease 6 (SP6)*, *4-nitrophenylphosphatase (pNPPase)*, *Salivary Cys-rich secreted peptide-vWF (SalCys)*, *Cytochrome P450 6a23-like (Cyp6a23)* και *Antigen 5 precursor (Ant5)* που υπερεκφράζονται στα ανθεκτικά στο spinosad έντομα και *Heat-shock protein 70 (Hsp70)*, *Heat-shock protein 23 (Hsp23)*, *Larval serum protein 1 (LSP1)*, *Hexamerin L1 (HexL1)*, *Chitinase 5 (Cht5)*, *Oxidase/peroxidase (oxidase)*, *Macrophage mannose receptor 1 (mmr1)* και *Cell division cycle-associated protein 7 (Cdc)* που υποεκφράζονται στα ανθεκτικά έντομα. Στα αποτελέσματα που προέκυψαν επιβεβαιώθηκε σημαντική διαφορά αυξημένης έκφρασης στα ανθεκτικά έντομα για τα γονίδια *Yp2*, *ATP synthase*, *CAT-2*, *SP6*, *pNPPase*, *SalCys* και *Cyp6a23* αλλά και των γονιδίων *Hsp70*, *Hsp23*, *LSP1*, *HexL1*, *Cht5* με υπερέκφραση στα ευαίσθητα έντομα. Για τα γονίδια *Ant5*, *oxidase*, *mmr1* και *Cdc* δεν διαπιστώθηκε το αναμενόμενο αποτέλεσμα.

Πρωτεομική ανάλυση: Για την πρωτεομική ανάλυση, αρχικά πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση δύο

διαστάσεων (2D-PAGE) σε κεφάλια από αρσενικά και θηλυκά έντομα για τη μελέτη της διαφορικής έκφρασης των πρωτεϊνών μεταξύ των δύο φύλων του δάκου. Στη συνέχεια, οι διαφορετικές πρωτεΐνες εντοπίστηκαν, αποκόπηκαν, ακολούθησε πέψη με τρυψίνη και ανάλυση με φασματομετρία μάζας στο ινστιτούτο Αλέξανδρος Φλέμινγκ. Τέλος, τα αποτελέσματα επεξεργάστηκαν μέσω βιοπληροφορικής ανάλυσης, όπου προέκυψαν πρωτεΐνες που εκφράζονται με διαφορετικό τρόπο ανάμεσα σε θηλυκά και αρσενικά έντομα. Οι πρωτεΐνες αυτές ανήκουν σε διαφορετικές λειτουργικές ομάδες όπως κυτοσκελετού, μεταβολισμού, συναπτοσωμικές, μεταγωγής σήματος και οξειδωτικού στρες. Επίσης, έγινε εφαρμογή μιας νέας προσέγγισης μέσω μελέτης των πεπτιδίων. Με σκοπό τη διερεύνηση μηχανισμών που εμπλέκονται σε συστήματα φυλοδιαχωρισμού, αρχικά συλλέχθηκαν όργανα αναπαραγωγής αρσενικών και θηλυκών εντόμων από το εργαστηριακό στέλεχος του δάκου. Στη συνέχεια, έγινε ομογενοποίηση των ιστών με κατάλληλο διάλυμα λύσης και απομόνωση των πεπτιδίων. Ακολούθησε η φασματομετρία μάζας με χρήση MALDI TOF-TOF, λήψη των αποτελεσμάτων των πεπτιδίων με τη χρήση του MASCOT και επεξεργασία των αποτελεσμάτων μέσω βιοπληροφορικής ανάλυσης. Με επιτυχία έγινε εντοπισμός πεπτιδίων που εμπλέκονται σε συστήματα διαχωρισμού των δύο φύλων καθώς παρατηρήθηκε υπερέκφραση τους σε αρσενικά και θηλυκά έντομα αντίστοιχα.

ABSTRACT

The olive fruit fly, *Bactrocera oleae* (Tephritidae), is the most important enemy of cultivated olives, causing around 30% of damages per annum. Control of the fly is mainly based on chemical insecticides. In our country, organophosphate and pyrethroid insecticides are primarily used, however, the naturalyte spinosad has been introduced in recent years. Intensive as well as improper use of insecticides has hazardous effects, such as ecological disturbances, establishment and spread of resistance, dangerous toxicological effects and consequences on human health. More environmentally friendly approaches have also been proposed, such as the sterile insect technique (Sterile Insect Technique, SIT), which involves the mass rearing and releasing of sterilized insects in nature. This method has been successfully used to control other insects (eg. Mediterranean fly) in many regions worldwide, however the SIT has not been successfully applied in the olive fly yet. As has been shown in many cases, the successful application of SIT presupposes good knowledge of the insect's biology and ecology, as well as the availability of effective molecular and genetic tools. Given the minimal information about olive fly's genome, this research aimed at the development of proteomic and transcriptomic tools in order to identify and isolate genes that are involved in pathways of sex differentiation or and spinosad resistance.

Transcriptomic analysis: In order to identify genetic loci that are involved either in spinosad resistance or that are implicated in sex differentiation, RNA was isolated either from heads of sensitive and resistant to spinosad insects, or from the reproductive systems of male and female flies. RNA was converted into cDNA and subsequently massively sequenced in the SOLiD platform of the Fleming Institute in Athens. The bioinformatic analysis resulted in a number of genes with differential expression in spinosad sensitive and resistant flies, as well as in male and female reproductive systems of *B. oleae*. Processing and comparison of more than 13,000 genes identified the statistically significant upregulation of nine genes and statistically significant downregulation of ~40 genes between sensitive and resistant to spinosad insects. Similarly, 330 genes were upregulated in the female reproduction system while 1238 were downregulated in

male testes flies. Several genes were further selected for validation through qRT-PCR. Twelve reproductive loci were considered: *kl2* (male fertility factor, *kl2*), *kl3* (male fertility factor, *kl3*), *kl5* (male fertility factor, *kl5*), *ory* (occludin-related Y protein), *fem-1* (sex-determining protein *fem-1*), *gas8* (growth arrest specific protein 8), *lobo* (lost boys), *ix* (intersex), *pbl* (pebble) and *hcf* (host cell factor C1) that were overexpressed in males and the two genes *sox* and *pcp* (pupal cuticle protein 78E) that were overexpressed in female flies. The results confirmed significant overexpression in male testes for genes *kl2*, *kl3*, *kl5*, *ory*, *fem-1*, *gas8*, *lobo*, *pbl*, *hcf* and significant overexpression of *pcp* in female tissues while minimal differences were observed in *ix* expression between males and females. qRT-PCR did not validate the expression profile of the *sox* gene obtained from RNA-seq. Furthermore, validation of the genes implicated in spinosad resistance was performed on two resistant and two sensitive populations of *B. oleae*. The resistant populations were: a laboratory strain (SPIN) selected by continually increasing amounts of the insecticide in its diet; and a wild population from California (w-CAL) which has a 13 times greater resistance compared to the laboratory sensitive strain. The sensitive populations were: the laboratory strain (LAB) which has been reared in laboratory conditions over the past ~40 years; and a population derived from olives of the region of Volos-Agria (w-GR) where insecticides are not used. In total, sixteen loci were studied, many of which belong to energy metabolism groups: *Yolk protein 2* (*Yp2*), *ATP synthase FO subunit 6* (*ATP synthase*), *Low affinity cationic amino acid transporter 2* (*CAT-2*), *Serine protease 6* (*SP6*), *4-nitrophenylphosphatase* (*pNPPase*), *Salivary Cys-rich secreted peptide-vWF* (*SalCys*), *Cytochrome P450 6a23-like* (*Cyp6a23*) and *Antigen 5 precursor* (*Ant5*) were upregulated in resistant to spinosad insects; and *Heat-shock protein 70* (*Hsp70*), *Heat-shock protein 23* (*Hsp23*), *Larval serum protein 1* (*LSP1*), *HexamerinL1* (*HexL1*), *Chitinase 5* (*Cht5*), *Oxidase/peroxidase* (*oxidase*), *Macrophage mannose receptor 1* (*mmr1*) and *Cell division cycle-associated protein 7* (*Cdc*) were down regulated in resistant flies. The results confirmed a significant overexpression of genes *Yp2*, *ATP synthase*, *CAT-2*, *SP6*, *pNPPase*, *SalCys* and *Cyp6a23* in resistant insects

ABSTRACT

and significant overexpression of genes *Hsp70*, *Hsp23*, *LSP1*, *HexL1*, *Cht5* in sensitive flies. For genes *Ant5*, *oxidase*, *mmr1* and *Cdc* the RNA seq result was not confirmed.

Proteomic analysis: For proteomic analysis, a two-dimensional electrophoresis (2D-PAGE) for heads of male and female insects was initially performed, in order to study the differential expression of proteins in the two sexes of the fruit fly. Subsequently, the differentially expressed proteins were identified, isolated, followed by digestion with trypsin and analyzed by mass spectrometry in the Athens Fleming Institute. Finally, the results were analyzed through bioinformatics analysis and isolated male and female differentially expressed proteins. These proteins belong to different functional groups such as cytoskeleton, metabolism, synaptosomal, signal transduction and oxidative stress. Moreover, a new peptidomic approach was applied. In order to discover the mechanisms involved in sex differentiation systems, at first tissues were collected from the reproductive systems of male and female insects which were then homogenized in the appropriate lysis buffer and the peptides were isolated. MALDI TOF-TOF analysis was subsequently followed and the outcoming results were analyzed with the MASCOT software. This analysis successfully identified peptides overexpressed in either male or female olive fly tissues.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1. Η ελιά.....	2
1.1 Σημαντικά στοιχεία για την ελαιοκαλλιέργεια.....	2
1.2 Εχθροί και ζημιογόνοι παράγοντες της ελιάς	3
2. Ο δάκος της ελιάς.....	3
2.1 Μορφολογία του εντόμου <i>Bactrocera oleae</i>	4
2.2 Βιολογικός κύκλος	4
3. Προκαλούμενη ζημιά στην ελιά από το έντομο <i>Bactrocera oleae</i>	5
4. Διαχείριση- Καταπολέμηση του δάκου.....	5
4.1 Βιολογική καταπολέμηση.....	6
4.1.1 Συστήματα παγίδευσης.....	6
4.1.2 Ωφέλιμα έντομα.....	6
4.1.3 Τεχνική του στείρου εντόμου (Sterile Insect Technique, SIT)	6
4.1.3.1 SIT στο δάκο της ελιάς	6
4.1.3.2 Προβλήματα κατά την εφαρμογή της κλασικής μεθόδου και επίλυση	7
4.1.3.3 SIT νέας γενιάς	8
4.2 Χημική καταπολέμηση	9
4.2.1 Χρήση οργανοφωσφορικών και πυρεθροειδών εντομοκτόνων.....	9
5. Η μακροκυκλική λακτόνη Spinosad	9
5.1 Δομή-Μηχανισμός δράσης.....	9
6. Ανθεκτικότητα	10
6.1 Ανάπτυξη της ανθεκτικότητας.....	10
6.2 Ανθεκτικότητα σε οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα	11
6.3 Ανάπτυξη ανθεκτικότητας στο spinosad	12
7. Φυλοκαθορισμός και φυλοδιαχωρισμός στα Tephritidae.....	13
7.1. Τα χρωμοσώματα των Tephritidae.....	14
7.2. Φυλοκαθορισμός.....	14
7.3. Φυλοδιαχωρισμός και διμορφισμός των φύλων.....	16
8. Τρανσκριπτομική Ανάλυση.....	18
8.1 Μέθοδοι τρανσκριπτομικής ανάλυσης	18
8.1.1 Μικροσυστοιχίες.....	18
8.1.1.1 Μικροσυστοιχίες ολιγονουκλεοτιδίων.....	19
8.1.1.2 Στικτές μικροσυστοιχίες.....	19
8.1.2 ESTs (Expressed Sequence Tags)	20
8.1.3 MPSS (Massively Parallel Signature Sequencing).....	20
8.1.4 SAGE (Serial Analysis of Gene Expression)	21
8.1.4.1 Αρχή της μεθόδου	22
8.2 RNA-Sequencing (RNA-Seq).....	22
8.2.1 Αρχή της μεθόδου.....	23
8.2.2 Αλληλούχηση των RNA βιβλιοθηκών.....	24
8.2.3 Καταγραφή σήματος- Χρωματικός κώδικας	24
9. Πρωτεομική ανάλυση	26
9.1 Εφαρμογές της Πρωτεομικής	27
9.2 Πεπτιδομική ανάλυση	27

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

9.3 Ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων (2D-PAGE).....	28
9.4 Φασματομετρία μάζας.....	29
9.5 Βάσεις Δεδομένων.....	30
10. Σκοπός.....	30
1. Καλλιέργεια εντόμων <i>Bactrocera oleae</i>	33
1.1 Εργαστηριακός πληθυσμός.....	33
1.2 Καλλιέργεια ανθεκτικού πληθυσμού στο εντομοκτόνο spinosad.....	33
1.3 Κύκλος ζωής σε εργαστηριακές συνθήκες	33
1.3.1 Υλικά.....	34
2.Βιοδοκιμές	34
2.1 Βιοδοκιμές μέσω τροφής -κατάποσης με GF – 120	34
2.1.1 Προετοιμασία των αραιώσεων.....	34
2.2 Βιοδοκιμές με τοπική εφαρμογή.....	35
2.2.1 Προετοιμασία των δόσεων	35
3.Πλασμιδιακή κλωνοποίηση	36
3.1 Πλασμίδιο.....	36
3.2 Συμπληρωματικά ή τυφλά άκρα	36
3.3 Φορέας T- άκρων.....	36
3.4 Αντίδραση σύνδεσης μορίων DNA.....	36
3.5 pBluescript II KS(+)......	37
3.6 Αντίδραση σύνδεσης.....	38
3.7 Κλωνοποίηση σε πλασμιδιακούς φορείς- μετασχηματισμός βακτηρίων με ανασυνδυασμένα πλασμίδια	38
3.7.1 Παρασκευή δεκτικών κυττάρων για κλωνοποίηση	39
3.7.1.1 Υλικά	39
3.7.1.2 Μέθοδος	39
3.8 Παρασκευή SOC medium	39
3.9 Παρασκευή θρεπτικού υποστρώματος LB άγαρ	39
3.10 Μέθοδοι μετασχηματισμού	40
3.10.1 Μετασχηματισμός με ηλεκτροδιάτρηση	40
3.10.1.1 Υλικά	41
3.10.1.2 Μέθοδος.....	41
3.11 Ταυτοποίηση ανασυνδυασμένων κλώνων.....	41
3.12 Τιτλοδότηση δεκτικών κυττάρων DH5α	42
4.Απομόνωση νουκλεϊκών οξέων	42
4.1 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA	42
5. Υβριδοποίηση	43
5.1 Σήμανση ανιχνευτών	43
5.2 Μεταφορά σε νάιλον μεμβράνη	43
5.2.1 Υλικά.....	43
5.2.2 Μέθοδος	44
5.3 Υβριδοποίηση του ανιχνευτή σε μεμβράνη	44
5.3.1 Υλικά.....	44
5.3.2 Μέθοδος	44
5.4 Ανίχνευση σήματος	45
5.4.1 Υλικά.....	45
5.4.2 Μέθοδος	46

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

6. RNA Sequencing	46
6.1 Απομόνωση RNA	46
6.1.1 Υλικά	46
6.1.2 Μέθοδος	47
6.2 Κατασκευή RNAβιβλιοθηκών	48
6.2.1 Μέθοδος	49
6.3.Αλληλούχηση των RNA βιβλιοθηκών	50
6.4 Σύνθεση cDNA με τη χρήση ολικού RNA	50
6.4.1 Υλικά	50
6.4.2 Μέθοδος	51
6.5 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης	51
6.5.1 Υλικά	51
6.5.2 Μέθοδος	51
6.6 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (PAGE)	52
6.6.1 Υλικά	52
6.6.2 Μέθοδος	52
6.7 Εμφάνιση πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου με χρώση με νιτρικό άργυρο	52
6.8 Εμφάνιση πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου με χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο	52
6.9 Ανάκτηση DNA από πήκτωμα αγαρόζης	53
6.10 Ανάκτηση DNA από πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου	53
7. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης PCR (Polymerase Chain Reaction)	54
7.1 Υλικά	54
7.2 Μέθοδος	55
8. PCR πραγματικού χρόνου (Real time PCR, q-PCR)	55
8.1.1 Υλικά	56
8.1.2 Μέθοδος	56
8.2 Σύνθεση ολιγονουκλεοτιδικών εκκινήτων	56
8.3 Κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων PCR πραγματικού χρόνου	56
8.4. Επιλογή του κατάλληλου γονιδίου αναφοράς (Housekeeping genes)	57
8.4.1 Μέθοδος	57
9. Πρωτεομική Ανάλυση	58
9.1 Απομόνωση πρωτεϊνών από το έντομο <i>Bactrocera oleae</i>	58
9.1.1 Υλικά	58
9.1.2 Μέθοδος	58
9.2 Φωτομετρικός ποσοτικός προσδιορισμός Bradford	58
9.2.1 Υλικά	59
9.2.2 Μέθοδος	59
9.3. Κατακρήμνιση/Καθαρισμός πρωτεϊνών	59
9.3.1 TCA/Ice-cold acetone	59
9.3.1.1 Υλικά	59
9.3.1.2 Μέθοδος	59
9.3.2 Φαινόλη/ Παγωμένη ακετόνη (Phenol/Ice-cold acetone)	60
9.3.2.1 Υλικά	60
9.3.2.2 Μέθοδος	60
9.3.3 2D cleanup-kit (Biorad)	60
9.3.3.1 Υλικά	61
9.3.3.2 Μέθοδος	61
9.4. Ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων	61

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

9.4.1 Ηλεκτροφόρηση πρώτης διάστασης-Ισοηλεκτρική εστίαση (IEF)	61
9.4.1.1 Υλικά:	62
9.4.1.2 Μέθοδος	62
9.4.2 Ηλεκτροφόρηση δεύτερης διάστασης -SDS πολυακρυλαμίδιου (SDS-PAGE)	62
9.4.2.1 Υλικά	62
9.4.2.2 Μέθοδος	63
9.4.3 Χρώση πηκτωμάτων των πρωτεϊνών με νιτρικό άργυρο (Silver Stain).....	64
9.4.3.1 Υλικά	64
9.4.3.2 Μέθοδος	64
9.4.4 Χρώση με Coomassie	65
9.4.4.1 Υλικά	65
9.4.4.2 Μέθοδος	65
9.5 Πέψη σε πήκτωμα (In-gel digestion)	65
9.5.1 Υλικά	65
9.5.2 Μέθοδος	65
9.6 Πεπτιδωμική ανάλυση	66
9.6.1 Απομόνωση μικρών πεπτιδίων	66
9.6.1.1 Υλικά	66
9.6.1.2 Μέθοδος	67
9.7 Βιοχημική ανάλυση α-εστερασών και β-εστερασών σε ευαίσθητα και ανθεκτικά έντομα <i>B. oleae</i>	67
9.7.1 Υλικά.....	68
9.7.2 Μέθοδος	68
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	69
A. Ανάλυση γονιδιακής έκφρασης μέσω τρανσκριπτομικής στο δάκο της ελιάς	70
A.1. Η προ-τρανσκριπτομικής ανάλυσης μελέτη στο δάκο, γενικά	70
A.1.2. Southern υβριδοποίηση σε γονίδια φυλοδιαχωρισμού του δάκου με βάση το γονιδίωμα της <i>Drosophila</i>	70
A.1.3. Βιβλιογραφική αναζήτηση γονιδίων εμπλεκόμενων σε συστήματα φυλοδιαχωρισμού	72
A.2 Next Generation Sequencing-RNA seq ανάλυση στο έντομο <i>Bactrocera oleae</i>	75
A.2.1 Διαφορική έκφραση γονιδίων μεταξύ αρσενικών και θηλυκών εντόμων <i>Bactrocera oleae</i>	75
A.2.2 Επικύρωση (Validation) με qRT-PCR σε αρσενικά και θηλυκά έντομα	78
A.2.2.1 Γονίδια με υπερέκφραση στα όργανα αναπαραγωγής των αρσενικών ατόμων <i>B. oleae</i>	79
A.2.2.2 Γονίδια με υπερέκφραση στα θηλυκά όργανα αναπαραγωγής του <i>B. oleae</i>	80
A.2.3 Μελέτη γονιδίων που εμπλέκονται στο φυλοδιαχωρισμό σε αναπτυξιακά στάδια του εντόμου <i>Bactrocera oleae</i>	80
A.2.4 Διαφορική έκφραση μεταξύ ευαίσθητων και ανθεκτικών στο spinosad εντόμων <i>Bactrocera oleae</i>	86
A.2.5 Επικύρωση (Validation) με qRT-PCR σε ευαίσθητα-ανθεκτικά έντομα <i>Bactrocera oleae</i>	88
A.2.5.1 Γονίδια με υπερέκφραση σε κεφάλια του ανθεκτικού στο spinosad πληθυσμού	91
A.2.6 Λειτουργική ανάλυση πληθυσμών <i>B. oleae</i> σε χρονικά σημεία (time points) για τη μελέτη της ανθεκτικότητας στο spinosad.....	92
A.3 Επιλογή του κατάλληλου γονιδίου αναφοράς (Housekeeping genes)	101
A.3.1 Κατάταξη των γονιδίων αναφοράς (best ranking) στους ιστούς του εντόμου <i>B. oleae</i>	110
B. Πρωτεομική ανάλυση στο δάκο της ελιάς, το έντομο <i>Bactrocera oleae</i>	111
B.1 Ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων (2D PAGE) σε κεφάλια από αρσενικά και θηλυκά άτομα δάκου	111
B.2 Πεπτιδομική ανάλυση στο αναπαραγωγικό σύστημα αρσενικών και θηλυκών ατόμων <i>B. oleae</i>	112
ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	115

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. Ανάλυση των γονιδίων του δάκου που εμπλέκονται σε συστήματα φυλοδιαχωρισμού και ανθεκτικότητας	116
1.1 Γονίδια που εμπλέκονται σε συστήματα φυλοδιαχωρισμού στο δάκο της ελιάς	116
1.1.1 Γονίδια που συνδέονται με το Υ χρωμόσωμα στη <i>Drosophila</i> (<i>kl3</i> , <i>kl5</i> και <i>ory</i>)	116
1.1.2 Γονίδια που εμπλέκονται στη σπερματογένεση και την κινητικότητα του σπέρματος	117
1.1.3 Γονίδια καθορισμού του φύλου	117
1.1.4 Άλλα γονίδια	118
1.2 Γονίδια που εμπλέκονται στους μηχανισμούς ανθεκτικότητας του δάκου στο <i>spinosad</i>	118
1.2.1 Γονίδια αυξημένων απαιτήσεων ενέργειας και μεταβολισμού	118
1.2.2 Πρωτεΐνες εμβρυικής και νυμφικής ανάπτυξης	119
1.2.3 Γονίδια που σχετίζονται με το ανοσοποιητικό σύστημα, την αποτοξίνωση και το στρες	121
1.3 Σύνοψη εμπλεκόμενων γονιδίων του δάκου που απομονώθηκαν κατά την παρούσα έρευνα	124
2. Πρωτεομική ανάλυση	125
2.1 Ανάλυση των αποτελεσμάτων της πρωτεομικής στο δάκο της ελιάς	125
3. Πεπτιδομική ανάλυση	127
3.1 Πρωτεΐνες και γονίδια που εκφράζονται μόνο στα <u>θηλυκά</u> άτομα δάκου	127
3.1.1 Πρωτεΐνη CLH, γονίδιο <i>Chc</i> (<i>Clathrin heavy chain</i>)	127
3.1.2 Πρωτεΐνη PHP, γονίδιο <i>ph-p</i> (<i>polyhomeotic proximal</i>)	128
3.1.3 Πρωτεΐνη GLD2B, γονίδιο <i>wisp</i> (<i>wispy</i>) – Πρωτεΐνη BICC, γονίδιο <i>BicC</i> (<i>Bicaudal C</i>)	128
3.1.4 Πρωτεΐνη LOZEN, γονίδιο <i>Iz</i> (<i>lozenge</i>)	129
3.1.5 Πρωτεΐνη EGFR, γονίδιο <i>Egfr</i> (Epidermal growth factor receptor)	129
3.1.6 Οι πρωτεΐνες που σχετίζονται με τη δράση της εκδυσόνης: ECR, E75BA και E78C	130
3.2 Πρωτεΐνες και γονίδια που εκφράζονται μόνο στα <u>αρσενικά</u> άτομα δάκου	131
3.2.1 Πρωτεΐνη TRPCG, γονίδιο <i>Trpm</i> (Transient receptor potential cation channel, subfamily M ortholog)	131
3.2.2 Πρωτεΐνη LOLA5, γονίδιο <i>lola</i> (<i>longitudinal lacking</i>)	132
3.2.3 Πρωτεΐνη KCC2A, γονίδιο <i>CaMKII</i> (<i>Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II</i>)	132
3.2.4 Πρωτεΐνη GALT7, γονίδιο <i>GalNAc-T2</i> (<i>UDP-N-acetyl-α-D-galactosamine: polypeptideN-acetylgalactosaminyltransferase 2</i>)	132
4. Συμπεράσματα	133
4.1 SIT: Sterile Insect Technique	133
4.2 Προβλήματα και επίλυση για την επιτυχή εφαρμογή της SIT- Προοπτική για το δάκο της ελιάς	134
4.3 Ανθεκτικότητα στο <i>spinosad</i> - Προοπτική για το δάκο της ελιάς	135
5. Επίλογος	136
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	137
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ	162
ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ	232



ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η ελιά

Η ελιά (*Olea europaea* L.) αποτελεί ένα από τα μακροβιότερα δέντρα με σημαντική αξία καθώς αποτελεί πηγή ζωής για τον άνθρωπο μέχρι και σήμερα. Ο καρπός της ελιάς είναι πολύ βασικός για τη Μεσογειακή διατροφή, τόσο ως εδώδιμος όσο και επειδή από αυτόν παράγεται το ελαιόλαδο. Αποτελώντας σημαντικό μέρος της διατροφής αλλά και της οικονομικής ζωής της Μεσογείου και της Ελλάδας ειδικότερα, αναπόφευκτο ήταν η μακρόχρονη πορεία της ελιάς να έχει διεισδύσει στην καλλιτεχνική και πολιτισμική ζωή των κατοίκων της περιοχής. Με έμπνευση την αγροτική ζωή στην περιοχή της νότιας Γαλλίας, ο Ολλανδός ζωγράφος Βίνσεντ βαν Γκογκ δημιούργησε πίνακες με θέμα την ελιά (Εικόνα 1). Ο ποιητής Κωστής Παλαμάς ύμνησε την ελιά στο ομώνυμο ποίημά του, ενώ και σε δημοτικά τραγούδια συχνά γίνεται αναφορά στο ελαιόδεντρο και τους καρπούς του.



Εικόνα 1: Πίνακας του Vincent van Gogh με θέμα γυναίκες που μαζεύουν ελιές.

1.1 Σημαντικά στοιχεία για την ελαιοκαλλιέργεια

Σε παγκόσμια κλίμακα υπάρχουν περίπου 810 εκατομμύρια ελαιόδεντρα σε σύνολο 97.000.000 στρεμμάτων (Εικόνα 2).



Εικόνα 2: Κατανομή των ελαιόδεντρων σε παγκόσμιο επίπεδο.

Το 95% των ελαιοδέντρων βρίσκεται στην Μεσόγειο και στη χώρα μας το ποσοστό τους είναι περίπου 14,5-15.0% (Εικόνα 3). Επίσης, η ελιά καλλιεργείται στη Νότια και Δυτική Αφρική, τη Μέση Ανατολή και τη Βόρεια Αμερική με επίκεντρο την Καλιφόρνια (FAOSTAT). Η μεγαλύτερη παραγωγή ελαιολάδου προέρχεται από τη νότια Ευρώπη, την Αφρική και την Μέση Ανατολή. Η Ελλάδα είναι η τρίτη μεγαλύτερη ελαιοπαραγωγός χώρα στον κόσμο, μετά την Ισπανία και την Ιταλία. Πιο συγκεκριμένα, το 2013 η παραγωγή ελιάς στην Ισπανία ήταν 7.875.800 τόνοι, στην Ιταλία έφτασε τους 2.940.545 τόνους και στην Ελλάδα τους 2.000.000 τόνους. Ακολουθούν οι χώρες Τουρκία, Μαρόκο και Συρία, με παραγωγή την ίδια χρονιά τους 1.676.000, 1.181.675 και 842.097 τόνους αντίστοιχα. Η συνολική παγκόσμια παραγωγή ελιάς ήταν 20.396.699 τόνοι (FAOSTAT).



Εικόνα 3: Κατανομή των ελαιόδεντρων στη λεκάνη της Μεσογείου όπου το ποσοστό της καλλιέργειας αγγίζει το 95% της παγκόσμιας παραγωγής.

Η ελιά κατατάσσεται σε δύο κατηγορίες: επιτραπέζια ή βρώσιμη ελιά και ελαιοποιήσιμη ή ελιά παραγωγής ελαιολάδου. Σύμφωνα με τα δεδομένα του Υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης, στην Ελλάδα η

επιτραπέζια ελιά κατέχει ποσοστό κάλυψης της γεωργικής γης 3,6% ενώ για τις ελιές παραγωγής ελαιολάδου το ποσοστό φτάνει το 17,5%. Στην Ελλάδα, καλλιεργούνται περίπου 30.000.000 ελαιόδεντρα επιτραπέζιας ελιάς σε έκταση 1.500.000 στρεμμάτων με μέση ετήσια παραγωγή 120.000 τόνους ενώ εξάγονται ετησίως περίπου 55.000 τόνους σε 80 χώρες. Η αξία της εξαγόμενης επιτραπέζιας ελιάς αντιστοιχεί στο 6,5% των εξαγωγών ελληνικών γεωργικών προϊόντων και στο 1,5% του συνόλου των ελληνικών εξαγωγών. Η αξία των ελληνικών εξαγωγών ελιάς το 2012 στις ΗΠΑ διαμορφώθηκε σε 58,08 εκατομμύρια ευρώ (Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων-www.minagric.gr).

1.2 Εχθροί και ζημιογόνοι παράγοντες της ελιάς

Ωστόσο, η ελιά είναι ένα ευπαθές δένδρο σε μύκητες αλλά και σε έντομα. Η σοβαρότερη μυκητολογική ασθένεια του εδάφους της ελιάς είναι η βερτισιλλίωση της ελιάς, που προκαλείται από τον μύκητα *Verticillium dahliae*. Η βούλα και η ευτυπίωση (ή αλλιώς νέκρωση των βραχιόνων) είναι εξίσου σημαντικές ασθένειες που προσβάλλουν την ελιά προκαλούμενες από τον μύκητα *Camarosporium dalmatica* και τον ασκομύκητα *Eutypa lata* αντίστοιχα. Μια από τις σπουδαιότερες ασθένειες της ελιάς που προσβάλλει κυρίως τα φύλλα του δέντρου αλλά μπορεί να επεκταθεί και στα κλαδιά, στους ποδίσκους των ανθέων και στους μίσχους των φύλλων είναι το κυκλοκόνιο που προκαλείται από τον μύκητα *Cycloconium oleaginum* συν. *Spilosea oleagina*. Μια χρόνια ασθένεια της ελιάς είναι η φόμα (ή ασθένεια των ξυλωδών αγγείων) και προκαλείται από τον μύκητα *Phoma incompta*. Επίσης, το ωίδιο είναι μια ασθένεια που προσβάλλει τα φύλλα και κυρίως εκείνα της βάσης του βλαστού και προκαλείται από την αγενή μορφή του μύκητα *Oidiopsis taurica*. Τέλος, το γλοιοσπόριο (ή αλλιώς παστέλα, ή και λέπρα της ελιάς) είναι μια ασθένεια που προσβάλλει τις επιτραπέζιες αλλά και τις ελαιοποιήσιμες ποικιλίες της ελιάς, κυρίως όμως προσβάλλει ώριμους καρπούς και προκαλείται από τον αδηλομύκητα *Gleosporium olivarum* (Παναγόπουλος Χ.Γ. 1997, Ελένα Κ. 2000, Μαλαθράκης Ν.Ε. 2005). Παρόλα αυτά, οι προσβολές

της ελιάς από έντομα είναι εκείνες που προκαλούν τη μεγαλύτερη ζημιά στο δέντρο και συγκεκριμένα ο δάκος της ελιάς (*Bactrocera oleae*) είναι ο σημαντικότερος εχθρός της ελιάς.

2. Ο δάκος της ελιάς

Ο δάκος της ελιάς, *Bactrocera oleae*, αποτελεί το σημαντικότερο εχθρό της ελιάς, *Olea europaea*. Η οικονομική ζημιά στις επιτραπέζιες ελιές επέρχεται από την οπή ωοτοκίας των ενηλίκων μυγών στην επιφάνεια του καρπού. Η πτώση των καρπών που προκαλείται από τις προνύμφες που τρέφονται με το εσωτερικό του (και κατά συνέπεια ακολουθεί μείωση της παραγωγής λαδιού), οδηγεί σε μείωση της ποιότητας και της αξίας του ελαιολάδου λόγω της αυξημένης οξύτητας (που προκύπτει από την ανάπτυξη μικροοργανισμών) (Neuenschwander and Michelakis, 1978), αλλά και η άμεση καταστροφή του πολτού από τις προνύμφες μπορεί να καταστήσει τους καρπούς άχρηστους για κονσερβοποίηση. Σε παγκόσμια κλίμακα, εκεί όπου υπάρχει ο δάκος της ελιάς οι απώλειες μπορούν να φτάσουν έως και 80% της αξίας του ελαιολάδου και μέχρι 100% σε μερικές επιτραπέζιες ποικιλίες ελιάς (Neuenschwander and Michelakis 1981; Neuenschwander et al., 1981; Tzanakakis, 2006). Υπολογίζεται πως η ζημιά της συνολικής παραγωγής της ελιάς φτάνει σε ποσοστό 5-30% (Mazomenos, 1989), με αποτέλεσμα οι οικονομικές ζημιές να είναι περίπου 800 εκατομμύρια δολάρια ετησίως (Montiel-Bueno and Jones, 2002).

Ο δάκος της ελιάς είναι μονοφάγο είδος, καθώς τρέφεται με τους καρπούς της ελιάς. Ως εκ τούτου, η επιβίωση της μύγας είναι στενά συνδεδεμένη με την κατάσταση των καρπών της ελιάς και τη διαθεσιμότητά τους. Τα αυγά εναποτίθενται κάτω από την επιδερμίδα των ώριμων καρπών της ελιάς (Tzanakakis, 2003) ώστε η προνύμφη να έχει άμεση πρόσβαση στην τροφή. Η προνύμφη τρέφεται και μεγαλώνει σαν σκουλήκι στο μεσοκάρπιο του ελαιόκαρπου. Ενώ οι προνύμφες του δάκου εξαρτώνται από την ύπαρξη των ειδών *Olea*, τα ενήλικα τρέφονται με μια ποικιλία οργανικών πηγών, συμπεριλαμβανομένων των μελιτωμάτων των εντόμων, το νέκταρ και τη γύρη των φυτών και τις

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

εκκρίσεις των καρπών. Επίσης, δύναται να τρέφονται με πηγές θρεπτικών συστατικών όπως κοπριά των πτηνών, βακτήρια, ζύμες ώστε να καλυφθούν οι διατροφικές απαιτήσεις τους (Tsiropoulos, 1977; Tsiropoulos, 1983; Tsiropoulos, 1984).

2.1 Μορφολογία του εντόμου *Bactrocera oleae*

Ο δάκος της ελιάς, *Bactrocera oleae*, ανήκει στην τάξη των δίπτερων (Diptera), την οικογένεια Tephritidae και το γένος *Bactrocera* (White and Elson-Harris, 1992). Η οικογένεια των Tephritidae εμφανίστηκε πριν από περίπου 50 εκατομμύρια χρόνια και περιλαμβάνει περίπου 5.000 είδη μεταξύ των οποίων και τις λεγόμενες "μύγες των φρούτων" (fruit flies) (Rice, 2000). Το ενήλικο έντομο έχει μήκος περίπου 4-5mm και έκταση φτερών περίπου 10mm. Τα φτερά είναι διάφανα και διαθέτουν μία χαρακτηριστική καφέ κηλίδα στο άκρο τους. Το κεφάλι έχει χρώμα ξανθοκίτρινο και δύο μαύρες κηλίδες κάτω από τις κεραίες. Οι κεραίες είναι μικρού μεγέθους και οι οφθαλμοί του εντόμου είναι σύνθετοι, ερυθρωποί με πράσινες μεταλλικές ανταύγειες. Ο θώρακας έχει χρώμα σκούρο καφέ με δύο έως τέσσερις γκρι ή μαύρες διαμήκεις ρίγες, ενώ η κοιλιά είναι καφέ με πιο σκούρες περιοχές πλευρικά (Εικόνα 4). Τα θηλυκά μπορούν να διακριθούν από τα αρσενικά καθώς διαθέτουν τον ωοθήτη στην άκρη της κοιλιάς τους και το περίβλημα του ωοθήτη είναι μαύρο, ενώ ο ίδιος ερυθρωπός (Weems et al, 1999, Vossen et al, 2004). Το αυγό του εντόμου είναι λευκό με ελλειψοειδές σχήμα και διάμετρο 0,7mm. Η προνύμφη είναι σκουλήκι, με χρώμα ανοιχτό κίτρινο και διάμετρο 7-8mm. Το βομβύκιο έχει ωοειδές σχήμα, διάμετρο 4-5mm και χρώμα αρχικά λευκό που με την πάροδο των ημερών γίνεται ανοιχτό καφέ (Rice, 2000; Katsoyannos, 1992; Tzanakakis, 2005).

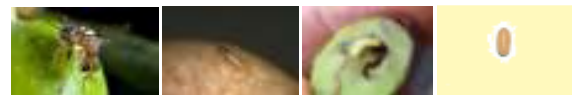
2.2 Βιολογικός κύκλος

Ο δάκος της ελιάς συνήθως έχει τρεις έως πέντε γενιές ανά έτος και η κάθε μια γενιά περιλαμβάνει τα στάδια του αυγού (egg), της προνύμφης (larva), του βομβυκίου (pupa) και του ενήλικου εντόμου (adult)

και μπορεί να ολοκληρωθεί μέσα σε 30 ημέρες (Εικόνα 5).



Εικόνα 4: Μορφολογικά χαρακτηριστικά του εντόμου *Bactrocera oleae*. Στην εικόνα, μεταξύ άλλων, διακρίνονται η κάτοψη ενός θηλυκού εντόμου (b), η πλαϊνή όψη του αρσενικού εντόμου (f), το κεφάλι σε προφίλ (c) και το φτερό (e).



α β γ δ

Εικόνα 5: Το τέλειο θηλυκό έντομο (α) εναποθέτει τα αυγά του (β) στον καρπό της ελιάς, εκεί το αυγό εξελίσσεται σε προνύμφη, η οποία τρέφεται από το εσωτερικό του καρπού (γ) και τελικά νυμφώνεται και μετατρέπεται σε βομβύκιο (δ).

Ο κύκλος ζωής εξαρτάται από τα στάδια ανάπτυξης του δέντρου της ελιάς, το χρονικό διάστημα που υπάρχει ελαιόκαρπος πάνω στα ελαιόδεντρα και από τις καιρικές συνθήκες που επικρατούν στον εκάστοτε τόπο (Weems, 1999). Για την ανάπτυξη του δάκου η μέση ημερήσια θερμοκρασία δεν πρέπει να υπερβαίνει τους 24°C, η ελάχιστη να μην ξεπερνά τους 9°C και η σχετική υγρασία να κυμαίνεται από 60% έως 80% (Manikas, 1974). Εκτός των θερμοκρασιών, η υψηλή ατμοσφαιρική υγρασία ευνοεί τη δράση και την ανάπτυξη του εντόμου. Όταν οι θερμοκρασίες υπερβούν τους 35°C και είναι παρατεταμένες, οι πληθυσμοί του εντόμου μειώνονται λόγω θνησιμότητάς του καθώς επίσης μειώνεται η δραστηριότητα και η γονιμότητά του. Ο δάκος διαχειμάζει κατά το στάδιο του βομβυκίου στο έδαφος και σε περιοχές με ήπιο χειμώνα συναντάται στο στάδιο του τελείου εντόμου κρυμμένο και αδρανοποιημένο σε ρωγμές του φλοιού των δέντρων.

Η πρώτη γενιά ενηλίκων εμφανίζεται την άνοιξη, ενώ η δεύτερη στα μισά του καλοκαιριού ή προς το τέλος του. Επιπλέον γενιές εμφανίζονται τους φθινοπωρινούς μήνες και τον Δεκέμβριο ανάλογα με τη διαθεσιμότητα των ελαιόκαρπων (Vossen et al, 2004). Τον Ιούνιο, λόγω των κατάλληλων θερμοκρασιών, το βομβύκιο μεταμορφώνεται σε τέλειο έντομο. Πριν την ωρίμανση των καρπών, τα θηλυκά έντομα εισέρχονται σε ένα στάδιο αναπαραγωγικής διάπαυσης κατά τη διάρκεια του οποίου παράγονται ελάχιστα ή και καθόλου αυγά. Στο χρονικό αυτό διάστημα τα θηλυκά έντομα ωριμάζουν και έχουν τη δυνατότητα να εξαπλωθούν σε διάφορες περιοχές. Έπειτα, τα αρσενικά συζευγνύονται με τα θηλυκά και μετά από την ξυλοποίηση του πυρήνα της ελιάς, την ωρίμανση των ελαιόκαρπων και την πάροδο των υψηλών θερμοκρασιών, τα θηλυκά ελκύνονται από τον καρπό και αρχίζουν να παράγουν σε αφθονία αυγά και να εναποθέτουν ένα ή και περισσότερα αυγά στον ελαιόκαρπο (το καθένα θηλυκό έντομο γεννάει κατά μέσο όρο περίπου 250 αυγά) (Pommois et al, 2006). Το θηλυκό πριν την ωοτοκία ανιχνεύει την επιφάνεια του καρπού, επιλέγει το κατάλληλο σημείο, τοποθετεί την κοιλιά του με κλίση περίπου 60°, διατρύπεί τον καρπό με τον ωοθέτη του και δημιουργεί χαρακτηριστικό τριγωνικό νύγμα όπου εναποθέτει το αυγό. Στη συνέχεια, τα αυγά εκκολάπτονται σε προνύμφη η οποία εφόσον τραφεί ικανοποιητικά κατευθύνεται προς την επιδερμίδα του καρπού και δημιουργεί ένα κοιλώμα όπου και νυμφώνεται. Από το βομβύκιο θα προκύψει το τέλειο έντομο και ολοκληρώνεται ο κύκλος ζωής του εντόμου (1 γενιά) (Εικόνα 5). Τα αυγά εκκολάπτονται μέσα σε 2-3 ημέρες, η προνύμφη αναπτύσσεται σε χρονικό διάστημα περίπου 20 ημερών, ενώ το βομβύκιο σε 8-10 ημέρες. Το ενήλικο έντομο, ανάλογα με τη θερμοκρασία και τη διαθεσιμότητα τροφής, μπορεί να ζήσει περίπου 2-6 μήνες. Οι καλοκαιρινές γενιές νυμφώνονται στο εσωτερικό του ελαιόκαρπου ενώ κατά το φθινόπωρο η προνύμφη τελικού σταδίου διανοίγει οπή στο καρπό της ελιάς, πέφτει στο έδαφος και νυμφώνεται σε βάθος μερικών εκατοστών (Weems, 1999).

3. Προκαλούμενη ζημιά στην ελιά από το έντομο *Bactrocera oleae*

Ο δάκος της ελιάς, είναι το σημαντικότερο παράσιτο της ελιάς, καθώς προκαλεί σοβαρές οικονομικές απώλειες λόγω των μειωμένων παραγωγών (πρώρη πτώση των καρπών ή άμεση καταστροφή του καρπού) αλλά και της χαμηλής ποιότητας των καρπών και του λαδιού (Pereira et al, 2004). Η ζημιά προκαλείται κυρίως από την απόθεση των αυγών και την διόρυξη στους καρπούς των αναδύομενων προνυμφών. Το μεγαλύτερο μέρος της καταστροφής είναι αποτέλεσμα της ανάπτυξης της προνύμφης στο εσωτερικό της ελιάς με το οποίο και διατρέφεται, καταστρέφοντας το σαρκώδες μέρος του ελαιοκάρπου με αποτέλεσμα τη μείωση του βάρους του και τη πρώρη πτώση του (Neuenschwander and Michelakis, 1978). Με τον τρόπο αυτό ο καρπός γίνεται ακατάλληλος για κονσερβοποίηση και γενικά για διάθεσή του στο εμπόριο, ενώ το λάδι που παράγεται από τους προσβεβλημένους καρπούς παρουσιάζει υψηλή οξύτητα λόγω της αποσύνθεσης του καρπού από τους μύκητες που αναπτύσσονται (Pereira et al, 2004). Παράλληλα, όμως, η οπή ωοτοκίας του δάκου (νύγμα ωοτοκίας) πιθανόν να προκαλέσει περαιτέρω προσβολή από τους μύκητες *Camarosporium dalmaticum* που προκαλεί την “ξεροβούλα” στις άγουρες και τη “σαποβούλα” στις ώριμες ελιές και μακροφώμα (*Macrophoma dalmatica*) που δημιουργεί μαύρες νεκρωτικές κηλίδες στον καρπό (Iannotta et al., 2007; Παναγόπουλος, 1997).

4. Διαχείριση- Καταπολέμηση του δάκου

Η καταπολέμηση του δάκου πραγματοποιείται κατά κύριο λόγο με χημικές μεθόδους (δολωματικοί ψεκασμοί με εντομοκτόνα), αν και τα τελευταία χρόνια γίνονται ιδιαίτερες προσπάθειες βιολογικής καταπολέμησης (παγίδες με ελκυστικά τροφής, ωφέλιμα παρασιτοειδή έντομα, Sterile Insect Technique). Ιδιαίτερης σημασίας για την καταπολέμηση του δάκου είναι τα βιο-εντομοκτόνα, όπως ο νατουραλτής spinosad που εφαρμόζεται με ψεκασμό, ωστόσο το συγκεκριμένο σκεύασμα είναι αποδεκτό και στη βιολογική γεωργία.

4.1 Βιολογική καταπολέμηση

4.1.1 Συστήματα παγίδευσης

Η παγίδευση είναι μια μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε πολύ στο παρελθόν αλλά χρησιμοποιείται ακόμη και σήμερα, τόσο ως άμεσο όσο και ως έμμεσο μέτρο καταπολέμησης. Για ορισμένα έντομα η παγίδευση αρκεί για να τα καταπολεμήσει, ενώ για τα πιο πολλά αποτελεί βοηθητικό ή συμπληρωματικό μέτρο. Συνήθως, διάφορα ερεθίσματα (χημικά, οπτικά ή άλλα) ελκύουν το έντομο στην παγίδα, απ' όπου δεν μπορεί να διαφύγει και στη συνέχεια θανατώνεται. Στις τροφικές παγίδες περιλαμβάνονται οι δακοπαγίδες ή γυάλινες παγίδες τύπου McPhail (Εικ 6). Στο κάτω μέρος τους τοποθετείται ελκυστικό υγρό, με αποτέλεσμα τα έντομα που εισέρχονται στην παγίδα να έχουν μικρή πιθανότητα να διαφύγουν και τελικά να πνίγονται σε αυτό. Το κύριο μειονέκτημα των περισσότερων τροφικών παγίδων είναι ότι χρειάζονται ανανέωση του ελκυστικού υγρού κάθε λίγες ημέρες και έχουν μικρή εκλεκτικότητα (Τζανακάκης, 1995).



Εικόνα 6: Παγίδα Mc Phail

4.1.2 Ωφέλιμα έντομα

Ένα κομμάτι της βιολογικής καταπολέμησης της καλλιέργειας, περιλαμβάνει τη μείωση των πληθυσμών του εντόμου μέσω των φυσικών εχθρών που είτε μπορούν να προϋπάρχουν στη φύση, ή σε σπάνιες περιπτώσεις μπορεί να εισαχθούν μέσω της ανθρώπινης παρέμβασης. Ως κυριότεροι φυσικοί εχθροί του δάκου αναφέρονται τα παρασιτοειδή Υμενόπτερα *Eupelmus urozonus Dalm.* (Bigler et al.,

1986; Kapatos and Fletcher, 1986), *E. martellii Masi*, *Pnigalio mediterraneus Ferr.&Del.*, *Eurytoma martellii Dom.*, *Cyrtoptyxlatipes Rond* (Silvestri, 1914) και *Opius concolor Szepi.* Εκτός από τα παρασιτοειδή υπάρχουν και άλλα είδη όπως το αρπακτικό των αυγών *Prolasioptera berlesiana Paoli* (*Cecidomyiidae*) και διάφορα *Dermaptera*, *Scolopendridae*, *Lithobiidae* που έχουν την ικανότητα να μειώσουν τον πληθυσμό του εντόμου στο στάδιο της νόμφης (Neuenschwander et al., 1986).

4.1.3 Τεχνική του στείρου εντόμου (Sterile Insect Technique, SIT)

Η τεχνική απελευθέρωσης στείρων εντόμων (Sterile Insect Technique, SIT) είναι μια από τις πιο επιτυχημένες μεθόδους βιολογικής καταπολέμησης και η οποία βασίζεται στη μαζική εκτροφή εντόμων, τη στείρωση τους με εφαρμογή ακτινοβολίας γ και την επαναλαμβανόμενη απελευθέρωση στείρων αρσενικών εντόμων με ελεγχόμενο τρόπο. Στη φύση, τα θηλυκά έντομα που ζευγαρώνουν με τα στείρα αρσενικά δεν γεννούν απογόνους (στείρα ωοτοκία) και το αποτέλεσμα της μεθόδου είναι η σταδιακή μείωση του πληθυσμού των εντόμων. Σε περίπτωση που προκύψουν απόγονοι, πεθαίνουν πρόωρα πριν ολοκληρωθεί η ανάπτυξη τους λόγω αλλαγών των χρωμοσωμάτων των γαμετών έπειτα από την ακτινοβολία (Economopoulos, 1972; Robinson, 2002). Η πρώτη επιτυχής εφαρμογή της μεθόδου πραγματοποιήθηκε το 1955 για την καταπολέμηση του εντόμου *Cochliomyia hominivorax* (σαρκοφάγος μύγα) που προσβάλλει τα βοοειδή, στη νήσο Curacao των Ολλανδικών Αντιλλών και στη δυτική Φλόριντα των Η.Π.Α. (Baumhover et al., 1955). Τα αποτελέσματα ήταν επιτυχή, ο πληθυσμός της μύγας μειώθηκε δραστικά και οι προσβολές ελαττώθηκαν στο ελάχιστο δυνατό. Τις τελευταίες δεκαετίες η μέθοδος της SIT εφαρμόστηκε με επιτυχία στην καταπολέμηση εντόμων οικονομικής σημασίας, όπως η μεσογειακή μύγα *Ceratitidis capitata* (Hendrichs et al., 1983) αλλά και στη μύγα του πεπονιού *Bactrocera cucurbitae* (Steiner et al., 1965; Ito & Koyama, 1982).

4.1.3.1 SIT στο δάκο της ελιάς

Στον δάκο, έγινε προσπάθεια καταπολέμησης του πληθυσμού με την τεχνική SIT στις αρχές της

δεκαετίας του '70 αλλά κατέστη ανεπιτυχής διότι τα στείρα αρσενικά έντομα είχαν μειωμένη ανταγωνιστικότητα σε σχέση με τα άγρια αρσενικά αλλά και γιατί είχαν διαφορετική ώρα σύζευξης σε σύγκριση με τα άγρια θηλυκά (Economopoulos, 1972). Συγκεκριμένα, τα εργαστηριακά έντομα ήταν σεξουαλικά ώριμα και ζευγάρωναν σε ηλικία δύο έως τριών ημερών σε αντίθεση με τα έντομα του φυσικού πληθυσμού που η πρώτη τους σύζευξη πραγματοποιείται όταν είναι ηλικίας τεσσάρων έως έξι ημερών (Economopoulos et al., 1971). Σημαντικότερο, όμως, για τους σκοπούς της SIT ήταν το γεγονός πως τα εργαστηριακά έντομα προτιμούσαν να συζευχθούν τις τέσσερις ώρες πριν το τέλος της φωτόφασης, ενώ τα έντομα του φυσικού πληθυσμού επέλεξαν να συζευχθούν τις δύο τελευταίες ώρες της φωτόφασης (Zervas & Economopoulos, 1982). Τέλος, παρατηρήθηκε πως τα εργαστηριακά έντομα ζευγάρωναν λιγότερες φορές σε σύγκριση με τα έντομα του φυσικού πληθυσμού (Economopoulos, 1972). Συνεπώς, η προσπάθεια εφαρμογής της μεθόδου στον δάκο εγκαταλείφθηκε λόγω της απουσίας βασικών μοριακών και γενετικών εργαλείων που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την αντιμετώπιση των προαναφερόμενων προβλημάτων. Πάντως, ήδη έχουν πραγματοποιηθεί κάποιες μελέτες με σκοπό τη λύση αυτών των προβλημάτων. Παράδειγμα αποτελεί η χρήση βιοχημικών μεθόδων για την παρακολούθηση μεταβολών στις ισοενζυμικές συχνότητες συγκεκριμένων ενζυμικών τύπων (Loukas et al., 1985). Όπως επίσης, μια ακόμη μελέτη εστίασε στην παρατήρηση γενετικών αλλαγών στην προσαρμοστικότητα σε συνθήκες μαζικής εκτροφής ενός SIT στελέχους δάκου, με τη χρήση μικροδορυφόρων (Zygouridis et al., 2013).

4.1.3.2 Προβλήματα κατά την εφαρμογή της κλασικής μεθόδου και επίλυση

Σύμφωνα με την κλασική εκδοχή της SIT προβλέπεται εξαπόλυση τόσο αρσενικών όσο και θηλυκών εντόμων. Ωστόσο, από την εμπειρία της εφαρμογής της μεθόδου έγινε αντιληπτό ότι οι εξαπολύσεις μόνο αρσενικών εντόμων είναι προτιμότερες. Αυτό κυρίως οφείλεται στο γεγονός

ότι, τα στείρα θηλυκά έντομα που εξαπολύονται στη φύση προκαλούν ζημιά στους καρπούς λόγω των νυγμάτων που προκαλούν. Επομένως, όσο πιο μεγάλος είναι ο αριθμός των εξαπολυόμενων εντόμων, τα νύγματα θα είναι περισσότερα. Παράλληλα, τα νύγματα αυτά αποτελούν πηγές δευτερογενών μολύνσεων. Επιπλέον, τα εξαπολυόμενα θηλυκά έντομα δρουν ανταγωνιστικά ως προς τα άγρια έντομα, με τελικό αποτέλεσμα να περιορίζεται ο αριθμός των συζεύξεων των αγρίων θηλυκών με τα εργαστηριακά αρσενικά (Whitten, 1969; Fletcher, 1989). Σε αρκετά είδη, τα προβλήματα που προέκυψαν για την επιτυχή εφαρμογή της SIT αντιμετωπίστηκαν κυρίως λόγω της σεξουαλικού διμορφισμού, που καθιστά εύκολο το διαχωρισμό των δύο φύλων σε πρώιμο στάδιο με απλές μεθόδους. Ωστόσο, σε έντομα όπου ο φυλοδιαχωρισμός ήταν αδύνατον να συμβεί σε αρχικά αναπτυξιακά στάδια, εφαρμόστηκαν τεχνικές με τη χρήση εργαλείων της κλασικής γενετικής και την ανάπτυξη στελεχών γενετικού φυλοδιαχωρισμού (Genetic Sexing Strains, GSS). Αρχικά, στο έντομο *Lucilia cuprina* χρησιμοποιήθηκε μια μετάλλαξη που διαφοροποιεί τα αρσενικά από τα θηλυκά άτομα. Στη συνέχεια, ακολούθησε προσπάθεια στο έντομο *C. capitata* με τη χρήση δύο συστημάτων που βασίστηκαν στο διαφορετικό χρωματισμό των βομβυκίων (*white pupae*, *wp*) και στη θερμοευαισθησία (*temperature sensitivity lethal*, *tsl*). Σύμφωνα με το πρώτο σύστημα, ο φυλοδιαχωρισμός είναι εφικτός στο στάδιο των νυμφών και στηρίζεται στο χρώμα των βομβυκίων, με τα βομβύκια που έχουν καφέ χρώμα να είναι τα αρσενικά άτομα ενώ εκείνα που έχουν λευκό χρώμα, είναι τα θηλυκά έντομα (Rössler, 1979; Robinson and vanHeemert, 1982; Robinson, 2002b). Το δεύτερο σύστημα συμβαίνει στο στάδιο του αυγού όπου τα θηλυκά άτομα θανατώνονται με τη χρήση υψηλής θερμοκρασίας (Franz et al., 1996; Fisher, 1998; Fisher and Cáceres, 2000; Cáceres, 2002). Οι προσπάθειες σε πειραματικό στάδιο στέφθηκαν με επιτυχία καθώς όταν έγινε εξαπόλυση μόνο στείρων αρσενικών ατόμων παρατηρήθηκε αύξηση της συνολικής στειρότητας του πληθυσμού κατά 3-5 φορές εν συγκρίσει με την ταυτόχρονη εξαπόλυση ίδιου αριθμού στείρων αρσενικών και θηλυκών εντόμων (Rendón et al., 2000).

4.1.3.3 SIT νέας γενιάς

Ένα ακόμη σημαντικό μειονέκτημα της κλασικής SIT είναι ότι η στέρωση πραγματοποιείται με τη χρήση ακτινοβολίας, όπου συχνά τα έντομα γίνονται αδύναμα και ακατάλληλα να ανταγωνιστούν τα άγρια αρσενικά. Συνεπώς, κρίνεται απαραίτητο για την αποτελεσματική εφαρμογή της SIT να υπάρξουν παράγοντες όπως η εντατική εκτροφή μεγάλου αριθμού εντόμου για τη μαζική εξαπόλυση, αποτελεσματικές μέθοδοι φυλοδιαχωρισμού, τεχνικές στέρωσης που να παράγουν μεγάλο αριθμό εντόμων με ελάχιστες επιπτώσεις στην προσαρμοστικότητα, αποτελεσματικές μέθοδοι απελευθέρωσης αλλά και συστήματα σήμανσης για την παρακολούθηση των ατόμων που εξαπολύονται (για ανασκόπηση βλέπε Franz, 2005). Τα τελευταία χρόνια ξεκίνησε η εφαρμογή της διαγονιδιακής τεχνολογίας που έχει συμβάλει ουσιαστικά στην SIT στο γενετικό φυλοδιαχωρισμό, τη στέρωση και τον εντοπισμό των εξαπολυόμενων εντόμων. Αποτελεί μια παραλλαγή της SIT που περιλαμβάνει τη δημιουργία ενός στελέχους του εντόμου στόχου που φέρει ένα θνησιγόνο, επικρατές γονίδιο το οποίο βρίσκεται σε συνθήκες καταστολής στο εργαστήριο (παρουσία τετρακυκλίνης), τέτοιες που δεν πρόκειται να βρεθούν στη φύση. Πρόκειται για τη μέθοδο RIDL (Release of Insects carrying a Dominant Lethal), κατά την οποία απελευθερώνονται στη φύση αρσενικά χωρίς όμως να είναι στείρα με τη χρήση ακτινοβολίας (Thomas et al., 2000; Alphey 2002; Alphey and Andearsen, 2002). Αντίθετα, τα έντομα που απελευθερώνονται στη φύση φέρουν το επικρατές γονίδιο σε ομοζυγωτία και εφόσον συζευχθούν με τους άγριους πληθυσμούς των εντόμων (απουσία τετρακυκλίνης), οι απόγονοί τους θα είναι ετερόζυγοι ως προς το γονίδιο με τελικό αποτέλεσμα να πεθαίνουν. Στην επόμενη γενιά, μάλιστα, τα μισά θηλυκά άτομα θα φέρουν το γονίδιο και συνεπώς θα πεθάνουν δίνοντας την δυνατότητα να αυξηθεί η αποτελεσματικότητα της μεθόδου σε επόμενες γενιές.

Η πρώτη επιτυχής αναπαραγωγική στέρωση πραγματοποιήθηκε μέσω ενός διαγονιδιακού συστήματος εμβρυικής θνησιμότητας χωρίς τη χρήση ραδιενέργειας στη *D. melanogaster* (Horn and Wimmer, 2003) και έπειτα στη *C. capitata* (Schetelig

et al., 2009) και την *A. suspensa* (Schetelig and Handler, 2012). Πρόκειται για ένα σύστημα που προκαλεί εμβρυική θνησιμότητα στους απογόνους και στηρίζεται στη μετάδοση ενός διαγονιδιακού συνδυασμού.

Ωστόσο, για τον περιορισμό της επίδρασης των διαγονιδίων στο στάδιο του εμβρύου, η έκφραση του ενεργοποιητή που ελέγχεται από την τετρακυκλίνη (tTA) ελέγχεται από υποκινητές/ενισχυτές (P/Es) γονιδίων που εκφράζονται κατά το στάδιο της κυτταροποίησης, ενός πρώιμου σταδίου της εμβρυογένεσης. Έπειτα, ο ετερόλογα εκφραζόμενος ενεργοποιητής ενεργοποιεί την έκφραση του θνησιγόνου προαποπτωτικού γονιδίου *hid^{Ala5}* (Bergmann et al. 1998), και οδηγεί σε πλήρη εμβρυϊκή θνησιμότητα. Τα συγκεκριμένα στελέχη δύναται να διατηρηθούν στο εργαστήριο σε συνθήκες καταστολής του tTA, παρουσία της τετρακυκλίνης. Παράλληλα, απουσία της τετρακυκλίνης, μπορούν να μεταφέρουν στους απογόνους τα κυρίαρχα θνησιγόνα με αποτέλεσμα την πλήρη εμβρυϊκή θνησιμότητα. Η ιδιότητα της υπό συνθήκης ρύθμισης της εμβρυϊκής θνησιμότητας είναι ιδιαίτερα σημαντική στα έντομα, καθώς ακόμη και στο στάδιο της προνύμφης είναι επιβλαβή και η θνησιμότητα σε επόμενο στάδιο μπορεί να προκαλέσει ζημιά στα φυτά ξενιστές. Τέλος, το κομμάτι του εντοπισμού των πληθυσμών είναι ένα αποτελεσματικό σύστημα σήμανσης που θα παρακολουθεί τον αριθμό και την επιτυχία στη σύζευξη των εξαπολυόμενων εντόμων στη φύση. Ήδη, έχουν δημιουργηθεί συστήματα με τη χρήση ενός σπερματοειδικού υποκινητή, της *β 2-tubulin* που οδηγεί στην έκφραση μιας φθορίζουσας πρωτεΐνης κόκκινου χρώματος (DsRed) ή πράσινου χρώματος (GFP) (Scolari et al., 2008). Η απομόνωση του φθορίζοντος σπέρματος μπορεί γίνει από τους όρχεις ή τις σπερματοθήκες (τα όργανα αποθήκευσης του σπέρματος των θηλυκών) των εντόμων που συλλέγονται από τη φύση μετά την εξαπόλυση τους και παράλληλα να πραγματοποιηθεί αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας του προγράμματος της SIT.

Ήδη στο δάκο της ελιάς έχει ξεκινήσει η εφαρμογή της συγκεκριμένης μεθόδου με τη δημιουργία ενός διαγονιδιακού στελέχους στο οποίο έχει εισαχθεί ένα γονίδιο που προκαλεί το θάνατο των θηλυκών

απογόνων όταν βρίσκονται ακόμα στο στάδιο της προνύμφης (Ant et al., 2012).

4.2 Χημική καταπολέμηση

4.2.1 Χρήση οργανοφωσφορικών και πυρεθροειδών εντομοκτόνων

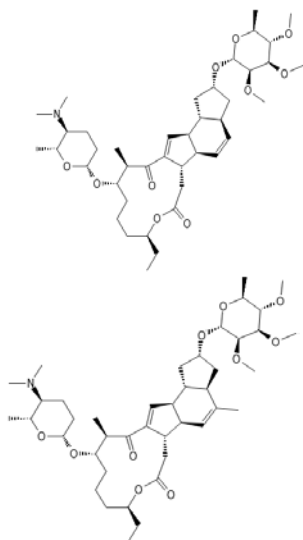
Οι χημικές ουσίες αποτελούν το βασικό εργαλείο ελέγχου των πληθυσμών του δάκου. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται είναι οι δολωματικοί ψεκασμοί από αέρος ή από εδάφους και οι ψεκασμοί καλύψεως. Οι δολωματικοί ψεκασμοί από εδάφους προκαλούν λιγότερες παρενέργειες στο οικοσύστημα σε σύγκριση με τους ψεκασμούς που εφαρμόζονται από αέρος. Το κόστος εφαρμογής είναι σημαντικά μεγαλύτερο λόγω του κόστους εργασίας και του συγχρονισμού επεμβάσεων σε μεγάλη έκταση. Στην Ελλάδα, οι οικονομικές απώλειες που προέρχονται από το δάκο υπολογίζονται ετησίως στο 30% της συνολικής παραγωγής και το κόστος του χημικού ελέγχου του εντόμου υπολογίστηκε σε 32 εκατομμύρια ευρώ κάθε έτος. Ωστόσο όμως, το συνολικό όφελος από την δακοκτονία ανέρχεται στα 550 εκατομμύρια ευρώ (www.minagric.gr). Τις τελευταίες τέσσερις δεκαετίες η διαχείριση της μύγας της ελιάς βασίζεται στη χρήση των οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων, είτε με δολωματικούς ψεκασμούς ή με ψεκασμούς καλύψεως (π.χ. dimethoate και fenthion) (Hsu et al., 2006; Margaritoroulos et al., 2008; Skouras et al., 2007). Τα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα αναφέρονται και ως οργανοφωσφορούχες ενώσεις ή οργανοφωσφορικοί εστέρες και η ομάδα των εντομοκτόνων αυτών περιέχει περισσότερα από κάθε άλλη ομάδα που κυκλοφορεί στη διεθνή αγορά (Τζανακάκης, 1995). Κατά τη διάρκεια των τελευταίων ετών, έχει παρατηρηθεί αύξηση στη χρήση των πυρεθροειδών (Margaritoroulos et al., 2008) και πολύ πρόσφατα τη μακροκυκλική λακτόνη Spinosad, που έχει ενσωματωθεί σε ένα δολωματικό σπρέι (GF-120) για αυξημένη αποτελεσματικότητα με λιγότερα δραστικά συστατικά (Thomas and Mangan, 2005).

5. Η μακροκυκλική λακτόνη Spinosad

5.1 Δομή-Μηχανισμός δράσης

Το Spinosad αποτελεί ένα αποτελεσματικό εντομοκτόνο που χρησιμοποιείται ευρέως για την εξάλειψη του δάκου της ελιάς αλλά και πολλών εντόμων (Lepidoptera, Diptera, Hymenoptera, Thysanoptera, και σε μερικά Coleoptera). Επίσης, έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για την προστασία 100 μεγάλων καλλιεργειών παγκοσμίως. Το Spinosad, είναι ένα βιο-εντομοκτόνο που ανήκει στην οικογένεια των νατουραλτών. Οι νατουραλτές, είναι σκευάσματα φυτικής και φυσικής προέλευσης που χρησιμοποιούνται και στη βιολογική γεωργία για την αντιμετώπιση των προσβολών από τα διάφορα έντομα. Είναι μια πολλά υποσχόμενη εναλλακτική λύση σε σχέση με τα υπόλοιπα διαθέσιμα εμπορικά εντομοκτόνα για την καταπολέμηση των εντόμων (Thompson et al. 2000). Το Spinosad προέρχεται από ένα βακτηριακό οργανισμό που έχει απομονωθεί από το έδαφος, το ακτινοβακτήριο *Saccharopolyspora spinosa*, Αποτελείται από το μείγμα δύο σπινωσινών (spinosoids), των spinosyn A και spinosyn D σε αναλογία 17:3 (Mertz et al., 1990) (Εικόνα 7). Έχει ισχυρή εντομοκτόνο δράση, με χαμηλά επίπεδα τοξικότητας στα θηλαστικά και σχετικά μικρή τοξικότητα σε έντομα μη-στόχους (Sparks et al., 1998; Bret et al., 1997).

Το spinosad είναι ένα δηλητήριο στομάχου που είναι ιδιαίτερα τοξικό για τα έντομα των τάξεων των λεπιδόπτερων και των δίπτερων (Εικόνα 8). Πρόκειται για μια νευροτοξίνη, η οποία διαθέτει έναν νέο μηχανισμό δράσης με κύριο στόχο τον νικοτινικό υποδοχέα της ακετυλοχολίνης (nAChR) και δευτερεύοντα στόχο στους υποδοχείς του γ-αμινοβουτυρικού οξέος (GABA). Έπειτα από την έκθεση των εντόμων στο συγκεκριμένο εντομοκτόνο, το έντομο σταματά να διατρέφεται και 24 ώρες αργότερα παραλύει και πεθαίνει (Qiao et al., 2007).

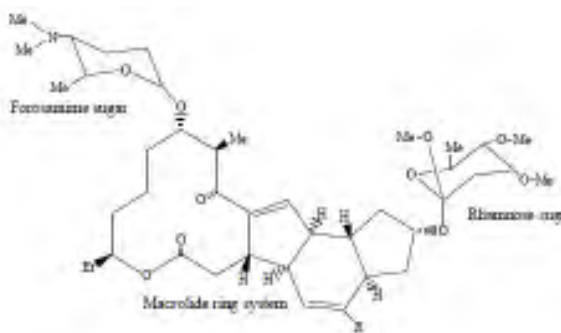


Εικόνα 7: Η δομή των spinosyn A ($C_{41}H_{65}NO_{10}$) αριστερά και spinosynD ($C_{42}H_{67}NO_{10}$) δεξιά

6. Ανθεκτικότητα

6.1 Ανάπτυξη της ανθεκτικότητας

Η συνεχής και παρατεταμένη χρήση των χημικών εντομοκτόνων κατά κανόνα οδηγεί στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας. Έχουν περιγραφεί τέσσερις μηχανισμοί ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα, όπου τα έντομα έχουν εξελιχθεί έτσι ώστε να μειωθεί η ευαισθησία τους σ' αυτά. Πολύ συχνά, μάλιστα, τα ανθεκτικά έντομα έχουν περισσότερους από έναν από τους μηχανισμούς ανθεκτικότητας. Οι βασικοί μηχανισμοί είναι:



Εικόνα 8: Η δομή του spinosad

- i. Η ανθεκτικότητα συμπεριφοράς: συνεπάγεται την αλλαγή στην συμπεριφορά του εντόμου όπως να αποφεύγεται η επαφή με το προϊόν ελέγχου των εντόμων στις περιοχές όπου γίνεται η εφαρμογή του (Roberts and Andre, 1994). Για παράδειγμα, η ανθεκτικότητα στο DDT στα υπο-είδη του *Anopheles gambiae* αποτελεί δείγμα της ανθεκτικότητας συμπεριφοράς. Ο έλεγχος της ελονοσίας βασίστηκε στον ψεκάσμο των εσωτερικών χώρων με το DDT. Ως αποτέλεσμα, ο εσωτερικός υποπληθυσμός που ήταν ευαίσθητος στο DDT αντικαταστάθηκε από τον εξωτερικό υποπληθυσμό, που έγινε κυρίαρχος.
- ii. Η ανθεκτικότητα διείσδυσης: όπου στα ανθεκτικά έντομα η επιδερμίδα έχει μεταβληθεί δομικά ή αλλάζει τη σύνθεση της, μειώνοντας έτσι την απορρόφηση του εντομοκτόνου. Οι τοξίνες, μπορούν να διεισδύσουν στα έντομα μέσω της επιδερμίδας, του αναπνευστικού συστήματος ή του εντέρου. Η ανθεκτικότητα στις τοξίνες, συμπεριλαμβανομένων και των εντομοκτόνων, επηρεάζεται όταν κάποια από τις τρεις οδούς εισόδου εμποδίζεται. Κλασικό παράδειγμα αποτελεί το γονίδιο *pen* στη *Musca domestica* το οποίο μειώνει το βαθμό διείσδυσης των εντομοκτόνων μέσω της επιδερμίδας (Plapp and Hoyer, 1968).
- iii. Η ανθεκτικότητα μεταβολισμού (βιοχημική): είναι αποτέλεσμα του ενισχυμένου μεταβολισμού του εντομοκτόνου, που οφείλεται στην αύξηση της ποσότητας ή της αποτελεσματικότητας ενός ενζύμου που μπορεί και διασπά το εν λόγω εντομοκτόνο. Συχνά, τα έντομα με ανθεκτικότητα μεταβολισμού θα έχουν διασταυρούμενη ανθεκτικότητα σε άλλα προϊόντα ελέγχου των εντόμων που μεταβολίζονται από το ίδιο ένζυμο. Επίσης, βασίζεται στην αποτοξίνωση των εντομοκτόνων όπου περιλαμβάνει τη δέσμευση ή τη δραστική αποδόμηση των μορίων στόχων (Oakshott et al., 2003).

- Σύμφωνα με τις βιοχημικές αναλύσεις, αποδείχθηκε ότι υπάρχουν τρεις βασικές οικογένειες γονιδίων: οι εστεράσες, οι glutathione-S-Transferases και οι cytochrome P450 μονοοξυγενάσες, όπου είτε μόνες ή σε συνδυασμό, εμπλέκονται στην αποτοξίνωση των εντομοκτόνων (Hemingway, 2000).
- iv. Η ανθεκτικότητα με τροποποίηση του στόχου δράσης του εντομοκτόνου: όπου η δομή του στόχου του εντομοκτόνου είναι τροποποιημένη και οφείλεται σε αλλαγές των αμινοξέων με τρόπο που επηρεάζει την ευαισθησία στο εντομοκτόνο. Αυτός ο τύπος μηχανισμού προσδίδει συνήθως διασταυρούμενη ανθεκτικότητα σε όλα τα εντομοκτόνα της ίδιας χημικής κατηγορίας, καθώς και σε άλλα εντομοκτόνα που ενεργούν στην ίδια θέση. Παραδείγματα περιλαμβάνουν την knock-out ανθεκτικότητα, η οποία προσδίδει ανθεκτικότητα στο DDT αλλά και τα πυρεθροειδή, και την ανθεκτικότητα στη dieldrin, η οποία προσδίδει διασταυρούμενη ανθεκτικότητα στα lindane, fipronil και όλα τα cyclodienes (Bloomquist, 1996).

Η ανθεκτικότητα μεταβολισμού και τροποποίησης της θέσης στόχου αποτελούν τους βασικούς μηχανισμούς ανθεκτικότητας για τα έντομα (Hemingway, 2000). Ενώ, η ανθεκτικότητα συμπεριφοράς και διείσδυσης φαίνεται να αποτελούν πρόσθετους μηχανισμούς.

6.2 Ανθεκτικότητα σε οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα

Όπως προαναφέρθηκε, τα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα έχουν χρησιμοποιηθεί πολύ εκτεταμένα για την καταπολέμηση των προσβολών του δάκου της ελιάς τα τελευταία 40 χρόνια. Κατά συνέπεια, η ανάπτυξη ανθεκτικότητας ήταν αναπόφευκτη. Ο μοριακός μηχανισμός της ανθεκτικότητας στα οργανοφωσφορικά έχει μελετηθεί σε βάθος σε πολλά διαφορετικά έντομα αλλά και πιο πρόσφατα στο δάκο.

Η ανθεκτικότητα στα οργανοφωσφορικά προκαλείται από την τροποποίηση του στόχου δράσης τους, την

ακετυλοχολινεστεράση. Πρόκειται για μεταλλάξεις που βρίσκονται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου και αλλάζουν την διαμόρφωσή του κατά τέτοιο τρόπο ώστε να μην επιτρέπεται η πρόσδεση του εντομοκτόνου σε αυτό, ενώ αντίθετα η ακετυλοχολίνη συνεχίζει να προσδέεται κανονικά. Ο κύριος τρόπος της τοξικής δράσης των οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων στα έντομα καθώς και στα άλλα ζώα είναι η παρεμπόδιση του ενζύμου της ακετυλοχολινεστεράσης. Τα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα (όπως και τα καρβαμικά) αποτελούν υποστρώματα για το ένζυμο AChE και αντιδρούν μαζί του με τρόπο ανάλογο της ακετυλοχολίνης. Αρχικά, δημιουργούν σύμπλοκο με το ένζυμο και έπειτα το φωσφορυλιώνουν και ακολουθεί με βραδύ ρυθμό η αποφωσφορυλίωση που μπορεί να διαρκέσει έως και μήνες. Η φωσφορυλίωση γίνεται με ηλεκτρονιόφιλη προσβολή του ατόμου P σε ένα OH της σερίνης του ενζύμου. Η δέσμευση αυτή της AChE έχει ως συνέπεια την περίσσεια ακετυλοχολίνης και την πληθώρα νευρομεταδόσεων στους νευρώνες του κεντρικού νευρικού συστήματος που οδηγεί σε υπερδιέγερση, μεγάλη κινητικότητα, σπασμούς, παράλυση και τελικά σε θάνατο του εντόμου (Ware, 1989). Ορισμένα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα αν και δεν είναι ισχυροί παρεμποδιστές του ενζύμου στην καθαρή μορφή τους και στα σκευάσματα που κυκλοφορούν στην αγορά, στο σώμα των εντόμων ενεργοποιούνται και μέσω της οξειδωσης μετατρέπονται σε ισχυρούς παρεμποδιστές του ενζύμου (Τζανακάκης, 1995).

Σε πολλά έντομα έχουν αναφερθεί μεταλλάξεις στο γονίδιο της ακετυλοχολινεστεράσης, που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα όπως στη *Drosophila melanogaster* (Furnier et al., 1992; Mutero et al., 1994) σε αρκετά είδη κουνουπιών (Vaughan et al., 1997; Weill et al., 2004) στη *Musca domestica* (Williamson et al., 1992; Feyereisen, 1995, Kozaki et al., 2001; Walsh et al., 2001) και το *Aphis gossypii* (Andrews et al., 2004; Toda et al., 2004). Σε όλες αυτές τις περιπτώσεις οι μεταλλάξεις εντοπίζονται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου και η μόνη καταγεγραμμένη περίπτωση μετάλλαξης εκτός ενεργού κέντρου αναφέρεται για το σκαθάρι της πατάτας του Κολοράντο, *Leptinotarsa decemlineata*,

στο οποίο η ανθεκτικότητα θεωρείται ότι συνδέεται με μια γενική αλλαγή της δευτεροταγούς δομής της πρωτεΐνης (Zhu et al., 1996). Στον δάκο της ελιάς έχουν καταγραφεί ανθεκτικοί πληθυσμοί στα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα και πιο συγκεκριμένα, στη χώρα μας έχουν βρεθεί πληθυσμοί που παρουσιάζουν έως και 64 φορές υψηλότερη ανθεκτικότητα σε σχέση με εργαστηριακούς πληθυσμούς. Το επίπεδο της ανθεκτικότητας σχετίζεται με την χρήση των εντομοκτόνων δηλαδή, οι περιοχές που ψεκάζονται περισσότερο εμφανίζουν και μεγαλύτερη ανθεκτικότητα (Skouras et al., 2007). Η ανθεκτικότητα στα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα που παρουσιάζουν οι πληθυσμοί αυτοί σχετίζεται με το γονίδιο της ακετυλοχολινεστεράσης (*ace*). Στις αρχές της δεκαετίας του '70, υπήρχε η άποψη ότι η ανθεκτικότητα οφειλόταν στην ποσοτική αλλαγή της ακετυλοχολινεστεράσης και πως τα έντομα που επιβίωναν για κάποιο λόγο παρήγαγαν περισσότερο ένζυμο. Τελικά όμως, αποδείχθηκε ότι οι ποιοτικές αλλαγές της AChE είναι υπεύθυνες για την ανθεκτικότητα και οι μεταλλάξεις στο γονίδιο τροποποιούν τις κινητικές παραμέτρους του ενζύμου (Vontas et al., 2002). Συγκεκριμένα, στο δάκο της ελιάς, η ανθεκτικότητα στα οργανοφωσφορικά αποδίδεται στην ύπαρξη δύο μεταλλάξεων στο ενεργό κέντρο του ενζύμου (Vontas et al., 2002) καθώς και σε μια μικρή έλλειψη στο καρβοξυτελικό άκρο του ενζύμου (Kakani et al., 2008). Οι δύο μεταλλάξεις στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου εντοπίζονται στη θέση 214 και 488 και αφορούν την αντικατάσταση των αμινοξέων ισολευκίνης και γλυκίνης από τα αμινοξέα βαλίνη και σερίνη, αντίστοιχα (I214V, G488S). Η εισαγωγή των αμινοξέων αυτών στη πεπτιδική αλυσίδα του ενζύμου έχει ως αποτέλεσμα να αλλάζει η στερεοδιαμόρφωση και ο προσανατολισμός του ενεργού κέντρου. Το γεγονός αυτό καθιστά αδύνατη την είσοδο και την πρόσδεση του εντομοκτόνου στο ενεργό κέντρο του ενζύμου, με αποτέλεσμα το ένζυμο να μην παρεμποδίζεται και να εξακολουθεί να επιτελεί τη λειτουργία του. Έτσι, η ακετυλοχολινεστεράση συνεχίζει να υδρολύει την ακετυλοχολίνη, η διαβίβαση της νευρικής ώσης πραγματοποιείται φυσιολογικά και το έντομο επιβιώνει παρά την παρουσία του εντομοκτόνου (Vontas et al., 2002). Η τρίτη μετάλλαξη αφορά μία

έλλειψη 9 νουκλεοτιδίων, η οποία οδηγεί στην έλλειψη τριών αμινοξέων γλουταμίνης. Η έλλειψη εντοπίζεται στο καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης, του οποίου η λειτουργία εμπλέκεται στη σωστή τοποθέτηση της AChE στη μετασυναπτική μεμβράνη. Η σωστή τοποθέτηση της ακετυλοχολινεστεράσης προϋποθέτει την απομάκρυνση του καρβοξυτελικού άκρου του ενζύμου και την αντικατάσταση του από μία άγκυρα γλυκοσιδουλ-φωσφατιδουλ-ινοσιτόλης (GPI anchor). Για την αντικατάσταση αυτή απαιτούνται ορισμένες προϋποθέσεις που αναφέρονται στο αμινοξύ που βρίσκεται στη θέση αποκοπής (ω -site), στο μήκος μιας σειράς υδροφιλικών αμινοξικών καταλοίπων (spacer length) που ακολουθεί το ω -site και στο τελικό καρβοξυλικό τμήμα (Furukawa et al., 1997). Η έλλειψη των τριών γλουταμινικών οξέων στο καρβοξυτελικό άκρο του ενζύμου έχει προταθεί ότι βελτιώνει το μήκος της σειράς των υδροφιλικών αμινοξέων με αποτέλεσμα την αποτελεσματικότερη προσθήκη της GPI άγκυρας ή τη μεγαλύτερη σταθερότητα του ώριμου μορίου της ακετυλοχολινεστεράσης. Με τον τρόπο αυτό, τα άτομα που φέρουν την συγκεκριμένη έλλειψη παρουσιάζουν μεγαλύτερα ποσά ενζύμου της ακετυλοχολινεστεράσης σωστά τοποθετημένα στη μετασυναπτική μεμβράνη συνεπώς, καταφέρνουν να επιβιώνουν στην έκθεση σε υψηλές δόσεις εντομοκτόνου (Kakani et al., 2008).

6.3 Ανάπτυξη ανθεκτικότητας στο spinosad

Παρά το πολύ μικρότερο ιστορικό ύπαρξης και χρήσης του spinosad, η ανθεκτικότητα έχει ήδη αναπτυχθεί και μελετηθεί σε πολλά έντομα (Wolstenholme and Kaplan, 2012). Οι πρώτες μελέτες για την ανθεκτικότητα στο spinosad στον αγρό ήταν για το σκουλήκι των τεύτλων, *Spodoptera exigua* (Moulton et al., 1999; 2000). Η ανάπτυξη ανθεκτικότητας στο spinosad έχει μελετηθεί σε πολλά έντομα όπως η μύγα του πεπονιού, *Bactrocera cucurbitae* (Hsu et al., 2012), το σκαθάρι της πατάτας, *Leptinotarsa decemlineata* (Mota-Sanchez et al., 2006), η κοινή οικιακή μύγα, *Musca domestica* (Shono and Scott 2003) και το σκουλήκι του καπνού, *Heliothis virescens* (Young et al., 2003). Ωστόσο, ο

μοριακός μηχανισμός της ανθεκτικότητας στο spinosad δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως ενώ υπάρχουν δεδομένα που αποδεικνύουν πως η ανθεκτικότητα στο spinosad είναι αποτέλεσμα είτε αυξημένου μεταβολισμού των ενζύμων αποτοξίνωσης είτε μεταλλάξεων σε σημεία στόχους. Η πιο αξιοσημείωτη περίπτωση σημειακής μετάλλαξης λόγω ανθεκτικότητας στο spinosad είναι ο νικοτινικός υποδοχέας της ακετυλοχολίνης (nAChR). Σύμφωνα με την βιβλιογραφία, σε πολλά έντομα έχει βρεθεί ότι η ανάπτυξη της ανθεκτικότητας οφείλεται κυρίως σε μεταλλάξεις γενετικών τόπων που σχετίζονται με τον νικοτινικό υποδοχέα της ακετυλοχολίνης (nAChR). Στα έντομα, ο nAChR αποτελείται από πέντε υπομονάδες που έχουν όμοια δομή, με κάθε υπομονάδα να έχει ένα μεγάλο εξωκυτταρικό, αμινοτελικό άκρο που περιέχει τη θέση σύνδεσης του νευροδιαβιβαστή, τέσσερις διαμεμβρανικές περιοχές (TM1-4) και ένα ενδοκυτταρικό καρβοξυτελικό άκρο. Ένα ακόμη χαρακτηριστικό του nAChR των εντόμων είναι ότι αποτελείται από συνδυασμούς α και β υπομονάδων (Scott et al., 2008). Στη *Drosophila melanogaster*, μεταλλάξεις στην $\alpha 6$ υπομονάδα του nAChR ($\alpha 6$) ευθύνονται για την ανθεκτικότητα στο spinosad, καθιστώντας σαφώς την $\alpha 6$ υπομονάδα υπεύθυνη για την ανάπτυξη ανθεκτικότητας (Perry et al., 2007; Watson et al., 2010). Ομοίως, για το έντομο *Plutella xylostela* βρέθηκε πως συνδέεται με μεταλλάξεις στο γονίδιο της $\alpha 6$ υπομονάδας. Οι προκαλούμενες μεταλλάξεις του γενετικού τόπου προτείνουν πιθανές θέσεις σύνδεσης του εντομοκτόνου στην συγκεκριμένη υπομονάδα όπως είναι τα αμινοξικά κατάλοιπα της ενδοκυτταρικής θηλιάς που βρίσκεται ανάμεσα στις διαμεμβρανικές περιοχές TM3 και TM4, το εξωκυτταρικό καρβοξυτελικό άκρο της υπομονάδας και η TM3 περιοχή (Perry, 2007; Baxter, 2010). Τα έντομα *Plutella xylostela* και *Drosophila melanogaster* αποτέλεσαν πρότυπο για διερεύνηση του συγκεκριμένου γενετικού τόπου και σε άλλους οργανισμούς. Βάσει μελετών, βρέθηκε πως η $\alpha 6$ υπομονάδα του nAChR συνδέεται με την ανθεκτικότητα στο spinosad και σε άλλα έντομα. Για παράδειγμα, μετάγραφα της $\alpha 6$ υπομονάδας του nAChR στον σκώρο, *Plutella xylostella* (Baxter et al., 2010; Rinkevich et al., 2010) τα οποία είτε είχαν

ματιστεί λάθος είτε είχαν υποστεί πρόωρο τερματισμό, μετάγραφα του $\beta da 6$ του *Bactrocera dorsalis* (Hsu et al., 2012) με πρόωρο τερματισμό, ή μια σημειακή μετάλλαξη (G275E) στη διαμεμβρανική περιοχή της $\alpha 6$ υπομονάδας του nAChR στον θρύπα, *Frankliniella occidentalis* (Puinean et al., 2013), επιβεβαιώνουν υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας στο spinosad. Αντίθετα, η ανθεκτικότητα στο spinosad στη *Musca domestica* δεν βρέθηκε να συνδέεται με την $\alpha 6$ υπομονάδα του αλλά με έναν υπολειπόμενο παράγοντα στο χρωμόσωμα I (Shono and Scott 2003) και όχι στις τρεις υπομονάδες του νικοτινικού υποδοχέα της ακετυλοχολίνης ($\alpha 5$, $\alpha 6$, $\beta 3$) που εδράζονται στο ίδιο χρωμόσωμα (Scott et al., 2008). Σε πολλές περιπτώσεις, η αύξηση του μεταβολισμού λόγω των ενζύμων αποτοξίνωσης συνδέεται με την ανάπτυξη ανθεκτικότητας στο spinosad. Παραδείγματα χάριν, η μικροσωμική-O-διμεθυλάση (microsomal-O-demethylase) καθώς επίσης και οι μονοοξυγενάσες εμπλέκονται στην ανθεκτικότητα του *Spodoptera exigua* στην Κίνα (Wang et al., 2006), ενώ η αύξηση της κυττοχρωμικής P450 μονοοξυγενάσης σχετίζεται με το σκουλήκι του βαμβακιού, *Helicoverpa armigera* (Wang et al., 2009). Τέλος, η αυξημένη δράση των detoxifying mixed-function oxidases συνδέονται με την ανθεκτικότητα πληθυσμών του *Tuta absoluta* από τη Χιλή (Reyes et al., 2012). Μέχρι την παρούσα διατριβή έχει διαπιστωθεί μικρή αύξηση της ανθεκτικότητας στο δάκο της ελιάς σε περιοχές που χρησιμοποιούσαν το εντομοκτόνο spinosad (Kakani et al., 2010), ωστόσο ο μηχανισμός είναι άγνωστος.

7. Φυλοκαθορισμός και φυλοδιαχωρισμός στα Tephritidae

Πέρα από το θεωρητικό ενδιαφέρον που παρουσιάζει η ανάλυση του φυλοδιαχωρισμού και φυλοκαθορισμού στα ζώα, η ανάγκη ανάπτυξης στελεχών γενετικού φυλοδιαχωρισμού (Genetic Sexing Strains) για αποτελεσματικότερη SIT, που προαναφέρθηκε, έδωσε μια πρακτική διάσταση στη μελέτη του φυλοδιαχωρισμού στα έντομα γεωργικής

σημασίας. Η μελέτη αυτή δεν μπορούσε παρά να περάσει μέσα από την έρευνα και γνώση της γενετικής και κυτταρογενετικής για τα Tephritidae.

7.1. Τα χρωμοσώματα των Tephritidae

Σύμφωνα με τις μέχρι τώρα αναλύσεις, οι καρυότυποι της πλειοψηφίας των ειδών Tephritidae αποτελούνται από έξι ζευγάρια χρωμοσωμάτων συμπεριλαμβανομένου και ενός ζεύγους μεγάλων ετεροχρωματικών φυλετικών χρωμοσωμάτων, με το αρσενικό να είναι το ετερογαμετικό φύλο (Singh and Gupta, 1984; Bedo, 1986; Mavragani-Tsipidou et al., 1992; Hunwattanakul and Baimai, 1994; Baimai et al., 1995; 2000; Zhao et al., 1998; Frias, 2002; Cevallos and Nation, 2004; Selivon et al., 2005; Kounatidis et al., 2008; Garcia-Martinez et al., 2009; Drosopoulou et al., 2010, 2011). Αν και παρατηρείται μεγάλη μεταβλητότητα στο μήκος των φυλετικών χρωμοσωμάτων, οι αρσενικοί και θηλυκοί καρυότυποι των περισσότερων ειδών διακρίνονται εύκολα από το ετερομορφικό ζεύγος χρωμοσωμάτων XY. Μόνο σε μερικά είδη τα χρωμοσώματα X και Y είναι παρόμοια σε μήκος δυσκολεύοντας την διάκριση των αρσενικών και θηλυκών καρυότυπων (Procunier and Smith, 1993; Kounatidis et al., 2008; Drosopoulou et al., 2010; 2011).

Σύμφωνα με βασικά κυτταρογενετικά χαρακτηριστικά ο καρυότυπος ($2n = 12$) του δάκου αποτελείται από πέντε ζεύγη αυτοσωμικών και ένα XY ζεύγος ετερομορφικών φυλετικών χρωμοσωμάτων. Ωστόσο, τα πολυταινικά (polytene complements) αυτού του είδους αποτελούνται από μόνο πέντε banded χρωμοσώματα και συνοδεύονται από μια ετεροχρωματική μάζα που βρίσκεται διασπαρμένη σε ομάδες με μικρότερους κόκκους (reviewed in Mavragani-Tsipidou, 2002). Σε όλα τα είδη των tephritids που μελετήθηκαν ως τώρα βρέθηκε μια παρόμοια κοκκώδης μάζα και έχει γίνει η υπόθεση ότι σχηματίστηκε από τα φυλετικά χρωμοσώματα (Bedo, 1986; Procunier and Smith, 1993; Zhao et al., 1998; Shahjahan and Yesmin, 2002; Kounatidis et al., 2008; Drosopoulou et al., 2010; 2011; Zacharopoulou et al., 2011). Διαφορές στην ένταση του σήματος

υβριδισμού του rDNA βρέθηκαν μεταξύ του X και Y χρωμοσώματος του δάκου, που δείχνουν ότι το Y χρωμόσωμα φέρει μεγαλύτερο αριθμό ριβοσωμικών γονιδίων σε σχέση με το X χρωμόσωμα (Drosopoulou et al., 2012).

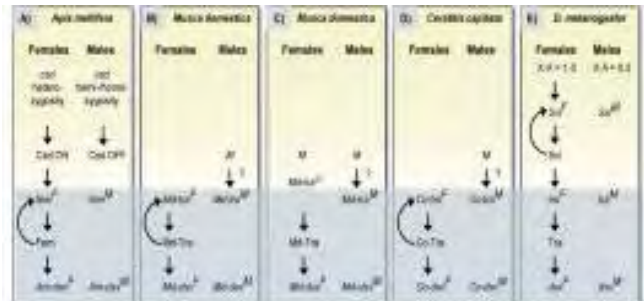
7.2. Φυλοκαθορισμός

Οι μηχανισμοί καθορισμού του φύλου μπορεί να διαφέρουν σημαντικά μεταξύ φυλογενετικά συγγενών ειδών (Graves, 2008; Graves, 2006; Bull, 1983), ακόμη και σε ένα μόνο είδος (Franco et al., 1982; Thompson and Bowen, 1972; Traut, 1994). Μάλιστα, ο ίδιος μηχανισμός μπορεί να ρυθμίζεται από διαφορετικά γονίδια (Matsuda, 2005; Hasselmann et al., 2008). Αυτό σημαίνει ότι οι μηχανισμοί αυτοί εξελίσσονται πολύ γρήγορα, παρά την αρχαιότητα των δύο φύλων. Όσο αφορά τα έντομα, η κλασική γενετική και οι κυτταρολογικές μελέτες έχουν εντοπίσει μια ποικιλία γενετικών και περιβαλλοντικών σημάτων που προσδιορίζουν τα δύο φύλα. Για παράδειγμα, στη μύγα των φρούτων *D. melanogaster*, η διπλάσια δόση του X χρωμοσώματος (Erickson and Quintero, 2007) καθορίζει το θηλυκό φύλο, ενώ η μονή δόση την αρρενωπότητα. Άλλα δίπτερα έντομα (π.χ. *Musca domestica* και *Ceratitis capitata*) χρησιμοποιούν το χρωμόσωμα Y που καθορίζει το αρσενικό: τα θηλυκά είναι XX ενώ τα αρσενικά XY (Pane et al., 2002; Dubendorfer et al., 2002). Οι πεταλούδες παρουσιάζουν το αντίθετο σενάριο, διαθέτουν το W χρωμόσωμα που καθορίζει τα θηλυκά: όπου τα θηλυκά είναι ZW και τα αρσενικά είναι ZZ (Bull, 1983). Στα συστήματα με τα XY χρωμοσώματα ο αριθμός των Y χρωμοσωμάτων μπορεί να ποικίλλει σημαντικά (Marin and Baker, 1998), για παράδειγμα σε ορισμένα είδη της μύγας των φρούτων *Anastrepha*, τα θηλυκά είναι XX/XX και τα αρσενικά XX/Y (Sanchez, 2008). Τα συστήματα καθορισμού του φύλου χρησιμοποιούν διαφορετικά γονίδια και ρυθμιστικούς μηχανισμούς ώστε να καθιερωθούν οι δράσεις σε αρσενικά ή θηλυκά (Εικόνα 9). Οι δράσεις αυτές ρυθμίζουν τα γονίδια *tra*, τα οποία είναι τα συστατικά κλειδιά, ανοδικά της πατρογονικής οδού φυλοκαθορισμού (Hasselmann et al., 2008; Pane et al., 2002; Gempe et al., 2009; Hediger et al., 2010;

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Salvemini et al., 2009; Concha and Scott, 2009; Lagos et al., 2007; Verhulst et al., 2010). Στη *D. melanogaster*, η διπλάσια δόση του χρωμοσώματος X (Erickson and Quintero, 2007) καθορίζει τη δραστηριότητα του θηλυκού (Εικόνα 9, E). Το χρωμόσωμα X κωδικοποιεί αρκετούς μεταγραφικούς παράγοντες (π.χ. *runt*, *sisA*, *sisB*) όπου, μέσα από τη διπλάσια δοσολογία στα θηλυκά, ενεργοποιεί το γονίδιο *sxl*. Οι πρωτεΐνες Sxl στα θηλυκά είναι παράγοντες ματίσματος που συνδέουν τα *tra* mRNAs στα θηλυκά ώστε να παράγουν μια λειτουργική πρωτεΐνη Tra. Το ένα μόνο X χρωμόσωμα έχει ως αποτέλεσμα την απουσία της πρωτεΐνης Sxl και κατά συνέπεια, τα αρσενικά *tra* mRNAs παράγονται με ένα πρόωρο κωδικόνιο λήξης. Στη μέλισσα *Apis mellifera*, η ετεροζυγωτία του συμπληρωματικού γονιδίου φυλοκαθορισμού (*csd*) καθορίζει τη δράση των θηλυκών (Beye, 2004; Beye et al., 2003) (Εικόνα 9, A). Οι αλληλομορφικές πρωτεΐνες Csd προέρχονται από ετερόζυγα *csd* που ενεργοποιούν το γονίδιο *feminizer* (*fem*) κατευθύνοντας το μάτισμα για να σχηματίσουν τα θηλυκά *fem* mRNA που κωδικοποιούν την πρωτεΐνη Fem. Οι πρωτεΐνες που προέρχονται από ημίζυγα (απλοειδή μη γονιμοποιημένα ωάρια) ή ομόζυγα *csd* γονίδια είναι μη ενεργές. Ως αποτέλεσμα, τα *fem* mRNAs ματίζονται στη σύνθεση των αρσενικών που περιέχουν ένα πρόωρο κωδικόνιο λήξης της μετάφρασης. Το *fem* προφανώς είναι το ορθόλογο του γονιδίου *tra* (Hasselmann et al., 2008). Η οικιακή μύγα, *M. domestica*, παρουσιάζει μια σειρά από διαφορετικά συστήματα καθορισμού του φύλου (Franco et al., 1982; Dubendorfer et al., 2002; Inoue et al., 1983; Mc Donald et al., 1978) που συνυπάρχουν σε αυτό το είδος. Υπάρχει ένα κλασικό σύστημα (Εικόνα 9, B) στο οποίο ένας κυρίαρχος καθοριστής του αρσενικού φύλου στο χρωμόσωμα Y παρέχει μια ανδρογονική δραστηριότητα (τα αρσενικά είναι X/M-Y και τα θηλυκά X/X, όπου η μοριακή φύση του M δεν έχει ακόμη προσδιοριστεί). Άλλα συστήματα μπορούν να έχουν τον κυρίαρχο καθοριστή του αρσενικού M σε οποιαδήποτε από τα πέντε αυτοσωμικά χρωμοσώματα και ακόμη και στο X χρωμόσωμα. Επιπλέον, ένας κυρίαρχος καθοριστής του θηλυκού (F^D) υπάρχει σε αυτά τα είδη που καθορίζει τη θηλυκή δραστηριότητα. Τα θηλυκά είναι

F^D M/FM και τα αρσενικά είναι FM/FM (Εικόνα 9, C). Το F^D , ο κυρίαρχος καθοριστής του θηλυκού, είναι μια αλληλική παραλλαγή του γονιδίου *Md-tra* (Hediger et al., 2010), που παράγει τα θηλυκά *tra* mRNAs και ενεργοποιεί την πρωτεΐνη Tra ακόμη και κατά την παρουσία του αρσενικού καθοριστή M. Κατά την απουσία του F^D αλληλομόρφου, ο καθοριστής του αρσενικού M εξασφαλίζει αρρενοειδικό μάτισμα των άλλων αλληλομορφών *Md-tra* και κατά συνέπεια, την απουσία της ενεργής πρωτεΐνης *Md-Tra* στα αρσενικά. Η Μεσογειακή μύγα, *C. capitata*, διαθέτει επίσης έναν κυρίαρχο καθοριστή του αρσενικού M στο χρωμόσωμα Y, που είναι υπεύθυνος για την ανδρογονική δράση (Pane et al., 2002; Salvemini et al., 2009; Willhoeft and Franz, 1996) (Εικόνα 9, D). Η μοριακή φύση του M δεν έχει προσδιοριστεί ακόμη. Με την παρουσία του M παράγονται τα αρσενικά *Cc-tra* mRNAs, αλλά όχι οι Tra πρωτεΐνες. Σε περίπτωση απουσίας του M, οι μητρικής προέλευσης πρωτεΐνες Tra ματίζονται απευθείας σε παραγωγικά θηλυκά *Cc-tra* mRNAs.



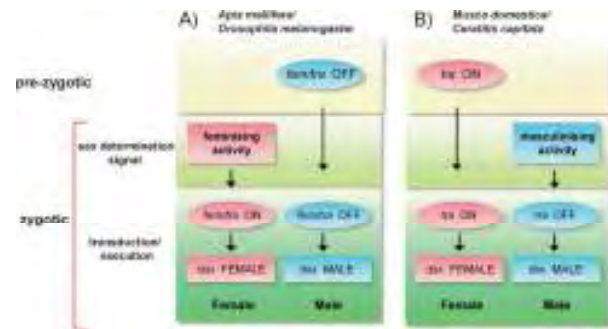
Εικόνα 9: Ο καθορισμός του φύλου σε είδη εντόμων μοντέλα, με φυλογενετικές σχέσεις τους που αντιπροσωπεύουν 300 εκατομμύρια χρόνια της εξέλιξης. Η μύγα των φρούτων *D. melanogaster*, η οικιακή μύγα *M. domestica*, η μεσογειακή μύγα *Ceratitis capitata* και η μέλισσα *Apis mellifera* έχουν ένα κοινό μονοπάτι (φαίνεται με το γκρι πλαίσιο) που αποτελείται από το γονίδιο *transformer* (*tra*) και τον μεταγενέστερο στόχο το *doublesex* (*dsx*). A: Το φύλο στη μέλισσα (*A. mellifera*) καθορίζεται από την ετεροζυγωτία ή ομο-/ημιζυγωτία του γονιδίου *csd*. (B και C) Τα μοντέλα των δύο εναλλακτικών συστημάτων καθορισμού του φύλου που συνυπάρχουν στους πληθυσμούς της *M. domestica*. B: Το φύλο προσδιορίζεται από την απουσία/παρουσία του άγνωστου παράγοντα καθορισμού των αρσενικών M. C: Το φύλο στη *M. domestica* μπορεί επίσης να καθοριστεί από έναν παράγοντα καθορισμού του θηλυκού. D: Το φύλο στην *C. capitata* προσδιορίζεται από την παρουσία/απουσία, έως τώρα, του άγνωστου αρσενικού-καθοριστή M. E: Το φύλο στη *D. melanogaster* καθορίζεται από τη δόση του X χρωμοσώματος.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι οι μηχανισμοί καθορισμού του φύλου στα έντομα χρησιμοποιούνται με δύο τρόπους (Εικόνα 10). Οι μηχανισμοί καθορισμού του φύλου στο ζυγώτη παράγουν είτε θηλεο-ειδικές δραστηριότητες (*D. melanogaster* / *A. mellifera*) που ενεργοποιούν τα *tra* γονίδια στο ON, ή παράγουν ανδρογονική δραστηριότητα (*C. capitata* και *M. domestica*) που ενεργοποιούν τα *tra* γονίδια στο OFF. Απουσία αυτών των σημάτων εκτελείται η προ-ζυγωτική κατάσταση του *tra* ('προεπιλογή' OFF ή ON), οδηγώντας στην ανάπτυξη αρσενικών (*D. melanogaster* / *A. mellifera*), ή θηλυκών (*C. capitata* και *M. domestica*). Η γονιδιακή ρύθμιση του *tra* στο *N. vitripennis* ακολουθεί τον τελευταίο κανόνα (Verhulst et al., 2010).

Το γονίδιο *sxl*, εκτός από τη *Drosophila*, έχει απομονωθεί και από άλλα Δίπτερα, όπως ο δάκος της ελιάς, η Μεσογειακή μύγα, η μύγα *Megaselia* και η οικιακή μύγα. Σε κανένα από αυτά η πρωτεΐνη SXL δεν διαφέρει μεταξύ των αρσενικών και θηλυκών. Επομένως, το *sxl* δεν συμμετέχει στον καθορισμό του φύλου στα συγκεκριμένα έντομα. Στα Tephritids, *Bactrocera*, *Ceratitis* και *Anastrepha*, το γονίδιο *tra* λειτουργεί ως ο διακόπτης μνήμης για το φυλοκαθορισμό, μέσω μιας αυτορυθμιζόμενης λειτουργίας, και η λειτουργική πρωτεΐνη Tra παράγεται μόνο στα θηλυκά. Όπως και στη *Drosophila*, στη *Ceratitis* και το *Bactrocera* το εναλλακτικό μάτισμα ρυθμίζει επίσης την έκφραση του *tra* έτσι ώστε μόνο τα θηλυκά να περιέχουν ολόκληρη (full-length) την πρωτεΐνη. Επίσης, οι ειδικές θέσεις σύνδεσης του *Transformer 2* έχουν βρεθεί στην περιοχή ρύθμισης του ματίσματος (splicing regulatory) του *tra* αλλά όχι στα pre-mRNAs του *dsx* σε αυτά τα Tephritids (Ruiz et al., 2007). Το γονίδιο *dsx* φαίνεται να διατηρεί τη δομή και τη λειτουργία στα *Bactrocera*, *Ceratitis*, *Megaselia* και στο μεταξοσκόληκα *Bombyx mori* (Λεπιδόπτερα). Τα εμφανή ομόλογα του *dsx* μπορεί επίσης να βρεθούν στο νηματώδη *Caenorhabditis (mab-3)*, και σε θηλαστικά (*DMT1*) και στο καθένα έχουν φυλο-ειδικές λειτουργίες στο σωματικό σεξουαλικό διαχωρισμό ή/και στο διαχωρισμό της βλαστικής σειράς. Ο έλεγχος του φυλοκαθορισμού είναι εξαιρετικά μεταβλητός στα έντομα, αλλά ο έλεγχος

του φυλοδιαχωρισμού που οδηγεί στον σωματικό σεξουαλικό διαχωρισμό και στο διαχωρισμό της βλαστικής σειράς σε αρσενικά και θηλυκά φαίνεται να διατηρείται, με την πιθανότητα ότι τα γονίδια εντός των μονοπατιών φυλοδιαχωρισμού για όλα τα μετάζωα να έχουν κοινή καταγωγή (Encyclopedia of Insects, Reshand Cardé, 2003).



Εικόνα 10: Η ρυθμιστική αρχή που διέπει τους μηχανισμούς καθορισμού του φύλου των εντόμων. Τα συγκεκριμένα είδη ζώων, τα συστήματα καθορισμού του φύλου είτε παράγουν θηλεο-παραγωγό δραστηριότητα ή αρρενο-παραγωγό δραστηριότητα στο ζυγώτη για τον καθορισμό των δύο φύλων στις κατάλληλες αναλογίες. Ελλείψει αυτής της δραστηριότητας, η προκαθορισμένη δραστηριότητα του *tra* στον προ-ζυγώτη παράγει το εναλλακτικό φύλο. A: Θηλεο-παραγωγός δραστηριότητα σε *D. melanogaster* και *A. mellifera* αλλάζει το γονίδιο *tra* από τη προ-ζυγωτική κατάσταση OFF (μη ενεργό) στην κατάσταση ON (ενεργό). B: αρρενο-παραγωγός δραστηριότητα σε *C. capitata* και *M. domestica* αλλάζει το γονίδιο *tra* από την προ-ζυγωτική κατάσταση ON στην κατάσταση OFF.

7.3. Φυλοδιαχωρισμός και διμορφισμός των φύλων

Ο φυλοδιαχωρισμός είναι το γενετικό μονοπάτι που οδηγεί στην ανάπτυξη του αρσενικού ή θηλυκού φύλου, συμπεριλαμβανόμενης της ρύθμισης του σωματικού φυλοδιαχωρισμού, του διαχωρισμού των γαμετών αλλά και (πιθανόν) της αντιστάθμισης δόσης. Ο σωματικός φυλοδιαχωρισμός είναι ο προσδιορισμός κατά το στάδιο της ανάπτυξης των τμημάτων του σώματος, συμπεριλαμβανόμενων των αρσενικών και θηλυκών οργάνων και άλλων φυλο-ειδικών μορφολογικών χαρακτηριστικών ή/και διαφορές στην συμπεριφορά. Ο φυλοκαθορισμός είναι το αρχικό γεγονός που καθορίζει εάν οι γονάδες θα αναπτυχθούν ως όρχεις είτε ως ωοθήκες ενώ, ο φυλοδιαχωρισμός είναι τα μεταγενέστερα γεγονότα

που τελικά παράγουν είτε τον αρσενικό ή τον θηλυκό φαινότυπο (Encyclopedia of Insects, Reshand Cardé, 2003).

Τα αρσενικά και τα θηλυκά εκτός της διαφοράς τους στα δύο χρωμοσώματα, διαφέρουν σε γονίδια που σχετίζονται με τα πρωτογενή σεξουαλικά χαρακτηριστικά όπως ωοθήκες, όρχεις, και όργανα αναπαραγωγής. Ο διμορφισμός των φύλων εξαρτάται από τον φυλο-ειδικό τρόπο σύνδεσης ενός μεγάλου αριθμού γονιδίων (sex-biased and sex-enriched genes) που ελέγχουν ποικίλα γνωρίσματα και εξηγούν το εύρος και την πολυπλοκότητα των sexual αλληλεπιδράσεων μεταξύ των δύο φύλων (Ranz et al., 2003; Ellegren and Parsch, 2007). Στο γονιδίωμα της *Drosophila* ένα σημαντικό ποσοστό γονιδίων εμφανίζει sex-biased έκφραση (Graveley et al., 2011; Ranz et al., 2003). Τα male-biased γονίδια υποεκπροσωπούνται στο X χρωμόσωμα ενώ αντίθετα, τα female-biased γονίδια υπάρχουν σε αφθονία. Τα συγκεκριμένα γονίδια εκφράζονται με ένα ειδικό τρόπο σε κάθε ιστό (π.χ., σωματικοί ιστοί, ωοθήκες και όρχεις) και εμφανίζουν φύλο-ειδικά, αυξημένα επίπεδα μετακίνησης μεταξύ των φυλετικών χρωμοσωμάτων και των αυτοσωμάτων (Meisel et al., 2010; Meisel et al., 2012; Ellegren and Parsch, 2007; Yang et al., 2006; Parisi et al., 2010; Zhang et al., 2007; Parisi et al., 2004; Parisi et al., 2003). Για την εξήγηση της ανεπάρκειας των male-biased γονιδίων στο χρωμόσωμα X και της υπεύθυνης κινήτριας δύναμης για την εξέλιξη των φυλετικών χρωμοσωμάτων, έχουν προταθεί διάφορες θεωρίες όπως ο ανταγωνισμός των φύλων, η αντιστάθμιση δόσης, η μειωτική αδρανοποίηση του φυλετικού χρωμοσώματος και η μειωτική κίνηση (Betran et al., 2002; Ellegren and Parsch, 2007; Parisi et al., 2003; Rice, 1984; Vibranovski et al., 2009). Τα δύο φύλα διαφέρουν ως προς τους ρυθμούς της εξέλιξης, της στειρότητας και της μη βιωσιμότητας κατά τη διάρκεια της γένεσης του είδους (Haldane, 1922). Όσον αφορά τους ρυθμούς της εξέλιξης, τα γονίδια με τη sex-biased έκφραση και ιδιαίτερα τα male-biased φυλετικά γονίδια εμφανίζουν ασυνήθιστα υψηλά ποσοστά (Ellegren and Parsch, 2007; Zhang et al., 2004; Proschel et al., 2006).

Πολλές διαφορές υπάρχουν στη μορφολογία και τη συμπεριφορά μεταξύ αρσενικών και θηλυκών *Drosophila*, των οποίων οι διαφορετικοί φαινότυποι παράγονται από την ιεραρχία των γονιδίων φυλοκαθορισμού. Ομοίως, υπάρχει ένας αριθμός από γονίδια φυλο-ειδικού διαχωρισμού, όπως τα γονίδια *chorion* και *vitelline membrane* στα θηλυκά και το *sex peptide* και άλλες πρωτεΐνες βοηθητικών αδένων στα αρσενικά. Ένα παράδειγμα άμεσης σύνδεσης του μονοπατιού φυλοκαθορισμού και των μεταγενέστερων γονιδίων φυλοδιαχωρισμού αποτελεί η ρύθμιση των θηλεο-ειδικών γονιδίων *yolk protein*. Τα συγκεκριμένα γονίδια συντίθεται στο σώμα των ενήλικων θηλυκών αλλά και στα κύτταρα του ωοθυλακίου, στη συνέχεια μεταφέρονται στο ωοκύτταρο όπου αποθηκεύονται για να χρησιμοποιηθούν κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης. Η έκφραση τους δεν ελέγχεται εξ ολοκλήρου από την ιεραρχία του φυλοκαθορισμού καθώς υπάρχουν πολλά διαφορετικά ρυθμιστικά μονοπάτια που αλληλεπιδρούν ώστε να κατευθύνουν τη σωστή σεξουαλική, χρονική και χωρική ρύθμιση τους κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης (Bownes, 1994).

Όσον αφορά το φυλετικό διμορφισμό στη *Drosophila*, τα αρσενικά διακρίνονται εύκολα από τα θηλυκά με βάση τις διαφορές στο χρώμα, την πιο σκούρα πλάτη, το μήκος (είναι ελαφρώς μικρότερα), τη διακριτή μαύρη κηλίδα στην κοιλιά (που είναι λιγότερα αισθητή στις νεοεκκολλαπτόμενες μύγες), τα claspers (ένα σύμπλεγμα από αγκαθωτές τρίχες που περιβάλλουν τα όργανα αναπαραγωγής και χρησιμοποιούνται για τη σύνδεση τους με τα θηλυκά κατά τη σύζευξη), αλλά και από τα sex combs. Το δευτερεύον φυλετικό χαρακτηριστικό, το sex comb, που βρέθηκε στη *Drosophila* παρατηρείται μόνο σε είδη του υπογένους *Sophophora*. Πρόκειται για μια διάταξη από συμπυκνωμένες τρίχες, που βρίσκεται στην περιφερική περιοχή του ταρσικού τμήματος του μπροστινού ποδιού των αρσενικών της *Drosophila* (Atallah et al., 2009) και χρησιμοποιείται από τα αρσενικά κατά τη διάρκεια του ζευγαρώματος. Παράλληλα, το sex comb εμφανίζει τεράστια ποικιλομορφία στο μέγεθος αλλά και τη θέση του σε διαφορετικά είδη (Atallah et al., 2009; Tanaka et al., 2009). Τέλος, στα αρσενικά της *Drosophila* αποτελεί

ένα ιδιαίτερα καλό σύστημα για τη μελέτη της ποικιλομορφίας της ανάπτυξης (Tanaka et al, 2009; Atallah, 2008) και των γενετικών μηχανισμών που ελέγχουν μορφογένεση και την ταχεία εξέλιξη τους, συγκριτικά με άλλα μοτίβα τριχών στις εν λόγω μύγες (Barmina and Kopp, 2007; Ahuja and Singh, 2008; True, 2008; Randsholt and Santamaria, 2008).

8. Τρανσκριπτομική Ανάλυση

Η τρανσκριπτομική ανάλυση αποτελεί τη μελέτη του μεταγραφώματος, δηλαδή όλων των μορίων RNA που παράγονται από το γονιδίωμα σε κάθε στιγμή, σε επίπεδο κυττάρου, ιστού ή οργανισμού. Η κυτταρική λειτουργία μεσολαβείται από την έκφραση των γονιδίων, η οποία περιλαμβάνει τη σύνθεση του αγγελιαφόρου RNA (mRNA). Σχεδόν όλες οι λειτουργίες του κυττάρου, όπως η κυτταρική διαίρεση και διαφοροποίηση, ο κυτταρικός θάνατος και η απόκριση σε ορμόνες και αυξητικούς παράγοντες, σχετίζονται με αλλαγές στην έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων. Οι πληροφορίες που παρέχει το μεταγράφομα δεν αποτελούν μόνο μία αναπαραγωγή αυτών που προέρχονται από το γονιδίωμα, αφού ούτε όλα τα γονίδια εκφράζονται ανά πάσα στιγμή αλλά και η αλληλουχία ενός μορίου RNA μπορεί να τροποποιηθεί από διεργασίες όπως το εναλλακτικό μάτισμα ή άλλες επεξεργασίες. Συνεπώς μέσω της τρανσκριπτομικής ανάλυσης παρέχονται πληροφορίες για τη μεταγραφή του RNA αλλά και για τις μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις που υφίσταται, οι οποίες είναι χρήσιμες για την μελέτη της βιολογικής λειτουργίας σε επίπεδο κυττάρου, ιστού αλλά και οργανισμού (Tsapakis et al, 2004).

Τα επίπεδα του mRNA σε ένα δείγμα μπορούν να καθοριστούν με τη χρήση μεθόδων όπως η προστασία από νουκλεάση (nuclease protection), το στύπωμα κατά Northern και η ποσοτική PCR. Οι συγκεκριμένες τεχνικές όμως επιτρέπουν τη μελέτη ενός ή λίγων μόνο γονιδίων ανά πείραμα (Watson, 2007). Για τη μελέτη ολόκληρου του τρανσκριπτόματος αναπτύχθηκαν νέες τεχνικές που επιτρέπουν την ταυτόχρονη ανάλυση χιλιάδων γονιδίων και τεχνικές που δεν προαπαιτούν γνώση της αλληλουχίας του οργανισμού. Σε αυτές τις τεχνικές

συγκαταλέγονται οι μικροσυστοιχίες, οι ετικέτες εκφραζόμενων αλληλουχιών (Expressed Sequence Tags, ESTs), η MPSS (Massively Parallel Signature Sequencing), η σειριακή ανάλυση γονδιακής έκφρασης (Serial Analysis of Gene Expression, SAGE) και η αλληλούχηση του RNA (RNA-seq).

8.1 Μέθοδοι τρανσκριπτομικής ανάλυσης

8.1.1 Μικροσυστοιχίες

Οι μικροσυστοιχίες (microarrays), γονιδίων ή αλλιώς αναφερόμενες ως γονιδιακό ή γονιδιωματικό τσιπ, DNA chip ή διάταξη γονιδίων, είναι μία διάταξη μικροσκοπικών σημείων που αντιπροσωπεύουν μοναδικά γονίδια και ακινητοποιούνται με ομοιοπολικούς δεσμούς σε μία στερεή επιφάνεια (συνήθως γυάλινη). Χρησιμοποιούνται για τη μέτρηση DNA ή χρησιμοποιούν το DNA για το σύστημα ανίχνευσής τους. Οι ποσοτικές ή ποιοτικές μετρήσεις με μικροσυστοιχίες γονιδίων στηρίζονται στην εκλεκτική φύση της αρχής της συμπληρωματικότητας μεταξύ των νουκλεϊκών οξέων DNA-DNA ή DNA-RNA ή (πρόσφατα) και μεταξύ των αμινοξέων των πρωτεϊνών, υπό αυστηρά ελεγχόμενες συνθήκες θερμοκρασίας και με τη χρήση φθορίζουσων ουσιών (Gibson, 2003). Η τεχνική αυτή δύναται να εφαρμοστεί για τον προσδιορισμό των επιπέδων των μεταγράφων σε ένα δείγμα και κατά συνέπεια για την ανάλυση της έκφρασης ολόκληρου του γονιδιώματος (Watson, 2007). Πρόκειται για μια τεχνική γρήγορη, χωρίς μεγάλο κόστος, που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση συγκεκριμένων αλληλουχιών, με μειονέκτημα την ανικανότητα ανίχνευσης νέων γονιδίων. Επίσης, η μέθοδος εμπεριέχει και το περιθώριο του λάθους καθώς κατά τη διαδικασία της υβριδοποίησης ενδέχεται να προκύψουν κάποια ψευδώς θετικά ή ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα (Grskovic, Ramalho-Santos, 2008).

Εργαλεία λογισμικού όπως το Array Track, έχουν αναπτυχθεί για να βοηθήσουν στην ερμηνεία και την ανάλυση των δεδομένων των DNA μικροσυστοιχιών, που αναπτύχθηκε στο National Center for Toxicological Research (NCTR) (Tong et al., 2004). Πρόκειται για δημόσιο λογισμικό διαχείρισης των

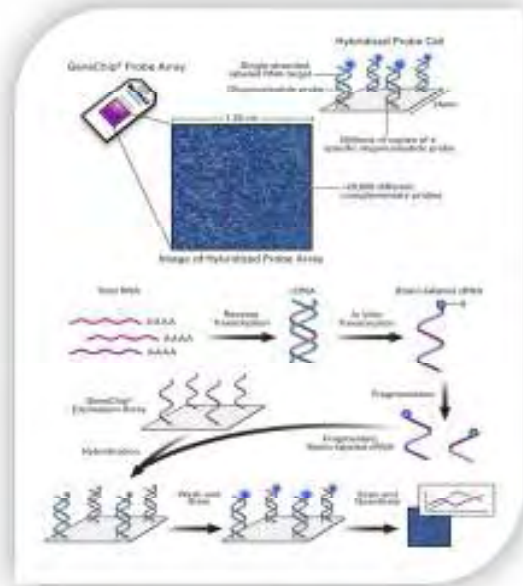
ΕΙΣΑΓΩΓΗ

δεδομένων των μικροσυστοιχιών και ανάλυσης. Παρέχει εργαλεία απεικόνισης, λειτουργικές πληροφορίες για τα γονίδια, τις πρωτεΐνες αλλά και τα μονοπάτια που προέρχονται από διάφορες δημόσιες βάσεις βιολογικών δεδομένων ώστε να γίνει διευκόλυνση της ερμηνείας των δεδομένων.

Οι δύο βασικές προσεγγίσεις κατασκευής και χρήσης των μικροσυστοιχιών είναι οι μικροσυστοιχίες ολιγονουκλεοτιδίων και οι στικτές μικροσυστοιχίες που αναλύονται παρακάτω.

8.1.1.1 Μικροσυστοιχίες ολιγονουκλεοτιδίων

Πολλές εταιρίες έχουν αναλάβει την κατασκευή των μικροσυστοιχιών ολιγονουκλεοτιδίων, με πρώτη την Affymetrix. Τη βάση της κατασκευής των μικροσυστοιχιών συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων αποτέλεσε η διαδικασία της φωτολιθογραφίας που αναπτύχθηκε στα τέλη του 1980 και με την οποία κατασκευάζονται τσιπ μικροεπεξεργαστών. Οι μικροσυστοιχίες ολιγονουκλεοτιδίων δύναται να χρησιμοποιηθούν ακόμη και όταν το γονιδίωμα είναι άγνωστο. Συμπεριλαμβάνουν την σύνθεση και την ταυτόχρονη καθήλωση διάφορων ολιγονουκλεοτιδίων, το ένα δίπλα στο άλλο, πάνω σε γυάλινο πλακίδιο. Αρχικά, τα υπό εξέταση mRNA τεμαχίζονται και μετατρέπονται σε cDNA και τα τμήματα που προκύπτουν σημαίνονται με μία φθορίζουσα χρωστική. Έπειτα, η μικροσυστοιχία εμβαπτίζεται στο μείγμα των σημασμένων τμημάτων και καθένα από αυτά υβριδοποιείται με το συμπληρωματικό του στο αντίστοιχο σημείο της μικροσυστοιχίας. Έτσι, σε κάθε σημείο υπάρχουν καθηλωμένα εκατομμύρια αντίγραφα ενός συγκεκριμένου ολιγονουκλεοτιδίου. Στη συνέχεια, το τσιπ ξεπλένεται ώστε να απομακρυνθούν τα μη υβριδοποιημένα τμήματα και η μικροσυστοιχία τοποθετείται σε ειδική συσκευή ανίχνευσης η οποία σαρώνει το τσιπ και μετρά την ένταση του φθορισμού. Η διαφορετική ένταση σε κάθε ομάδα των διαφορετικών ολιγονουκλεοτιδίων που αντιστοιχούν σε ένα συγκεκριμένο γονίδιο, αντιστοιχεί στην ποσότητα του αντίστοιχου mRNA στο εξεταζόμενο δείγμα (Watson, 2007) (Εικόνα 11).



Εικόνα 11: Βασική διαδικασία χρήσης μίας μικροσυστοιχίας

8.1.1.2 Στικτές μικροσυστοιχίες

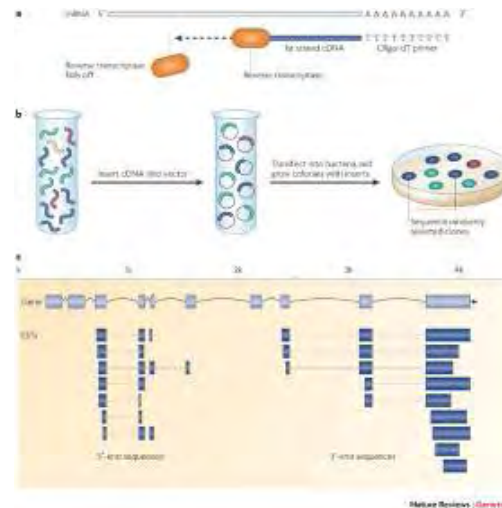
Οι στικτές μικροσυστοιχίες βασίζονται στην πρόσδεση ολιγονουκλεοτιδίων, μορίων cDNA ή προϊόντων PCR σε γυάλινο πλακίδιο. Όμως, η συγκεκριμένη τεχνική απαιτεί την πρότερη γνώση του γονιδιώματος καθώς τα ακινητοποιημένα τμήματα αποτελούν μέρη γνωστών γονιδίων. Αναπτύχθηκε για την ταυτοποίηση διαφορών στα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης ανάμεσα σε διάφορα δείγματα, ενώ σήμερα βρίσκει εφαρμογή στη μελέτη της γονιδιακής έκφρασης αλλά και στη μελέτη του γονιδιωματικού DNA (Auburn, 2005). Στις στικτές μικροσυστοιχίες ως υπό εξέταση δείγματα χρησιμοποιούνται δύο διαφορετικοί πληθυσμοί mRNA. Ο ένας αποτελεί το δείγμα αναφοράς και μία ποσότητά του χρησιμοποιείται σε κάθε πείραμα ώστε να συγκριθεί με το υπό εξέταση δείγμα, την έκφραση του οποίου θέλουμε να μελετήσουμε. Αρχικά, τα mRNA μετατρέπονται σε cDNA και σημαίνονται με μία διαφορετική φθορίζουσα χρωστική. Έπειτα, τα σημασμένα δείγματα αναμειγνύονται και υβριδοποιούνται στη μικροσυστοιχία. Σε κάθε σημείο της μικροσυστοιχίας προσδιορίζεται η αναλογία των

σημάτων υβριδοποίησης των δύο φθορίζουσών ουσιών μέσω συσκευής ανίχνευσης του φθορισμού. Συνεπώς, η διαφορετική ένταση φθορισμού της κάθε χρωστικής σε κάθε σημείο της μικροσυστοιχίας αντιστοιχεί στη διαφορετική έκφραση του γονιδίου στο δείγμα αναφοράς και στο εξεταζόμενο δείγμα (Watson, 2007).

8.1.2 ESTs (Expressed Sequence Tags)

Οι ετικέτες εκφραζόμενων αλληλουχιών (ESTs, Expressed Sequence Tags) είναι αλληλουχίες τμημάτων cDNA (200-800bp), κάθε μία από τις οποίες προέρχεται από μία ανάγνωση αλληλουχίας τυχαία επιλεγμένων cDNA κλώνων. Μέχρι σήμερα έχουν αποκτηθεί περισσότερες από 45 εκατομμύρια ESTs, που προέρχονται από περισσότερα από 1400 διαφορετικά είδη ευκαρυωτών και η χρήση τους ξεκίνησε το 1980. Πρόκειται για εργαλεία που χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση γονιδίων και την επαλήθευση των προβλέψεων για τον ρόλο κάθε γονιδίου. Οι γνωστές ESTs δημοσιεύονται σε δημόσιες βάσεις δεδομένων (dbEST) έτσι ώστε να είναι διαθέσιμες για την επιστημονική κοινότητα. Τα πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι η ικανότητα ανίχνευσης νέων γονιδίων και εξονίων και η μεγάλη ευαισθησία της, ενώ μειονέκτημα της μεθόδου αποτελεί ο περιορισμός της χρήσης της για την ανίχνευση γονιδίων που εκφράζονται σε χαμηλά επίπεδα (Parkinson and Blaxter 2009, Grskovic and Ramalho-Santos, 2008). Αρχικά, για τη δημιουργία των ESTs γίνεται απομόνωση mRNA από ολόκληρο τον οργανισμό ή από συγκεκριμένους ιστούς. Το mRNA απομονώνεται με βάση την πολύ (A) ουρά και μετατρέπεται σε cDNA με αντίστροφη μεταγραφή. Έπειτα, οι cDNA βιβλιοθήκες δημιουργούνται μέσω της χρήσης κατάλληλων φορέων κλωνοποίησης και μεμονωμένοι (συνήθως τυχαίοι) κλώνοι απομονώνονται από τις βιβλιοθήκες και υφίστανται μία αντίδραση αλληλούχησης είτε από το ένα άκρο είτε και από τα δύο, με τη χρήση καθολικών εκκινητών (universal primers). Στη συνέχεια, μέσω της βιοπληροφορικής ανάλυσης, γίνεται επεξεργασία των αλληλουχιών όπου και απορρίπτονται οι μη αξιόπιστες αλλά και εκείνες που ανήκουν στον φορέα.

Συνήθως το μέγεθος των αναγνώσεων ποικίλει ανάλογα με την τεχνολογία αλληλούχησης που χρησιμοποιείται (Parkinson, Blaxter 2009) (Εικόνα 12).



Εικόνα 12: Διαδικασία δημιουργίας ESTs

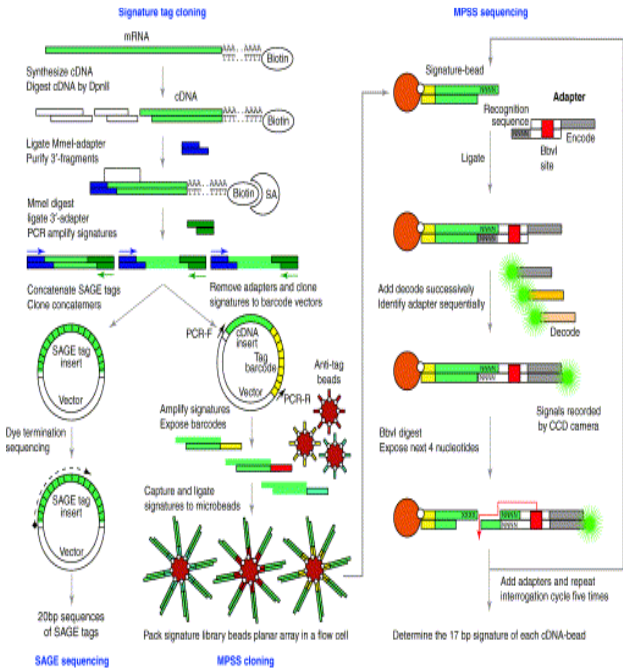
8.1.3 MPSS (Massively Parallel Signature Sequencing)

Πρόκειται για μια μέθοδο ανάλυσης των επιπέδων έκφρασης όλων των γονιδίων ενός δείγματος μέσω της καταμέτρησης των επιμέρους μορίων mRNA που παράγονται από κάθε γονίδιο. Γίνεται ταυτόχρονη ανάλυση όλων των γονιδίων και μέσω της βιοπληροφορικής ανάλυσης εξάγεται ο αριθμός των μορίων mRNA που αντιστοιχούν σε ένα γονίδιο σε σχέση με τον συνολικό αριθμό μορίων του δείγματος. Η συγκεκριμένη τεχνική δύναται να ανιχνεύσει νέα γονίδια και εξόνια, να παρέχει μεγάλες και μοναδικές ετικέτες και να ταυτοποιήσει γονίδια που εκφράζονται σε χαμηλά επίπεδα. Ενώ, δεν απαιτεί τη γνώση της αλληλουχίας του οργανισμού και έχει ευαισθησία της τάξεως λίγων μορίων mRNA ανά κύτταρο, δεδομένου ότι μία τυπική ανάλυση περιλαμβάνει ένα εκατομμύριο μετάγραφα. Επιπλέον, τα δεδομένα εξάγονται σε ψηφιακή μορφή απλοποιώντας τη διαχείριση και ανάλυση τους. Ωστόσο, το υψηλό κόστος και ο μεγάλος χρόνος που απαιτεί η συγκεκριμένη μέθοδος αποτελούν ανασταλτικό

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

παράγοντα για την επιλογή της (Brenner et al., 2000, Reinartz, 2002, Grskovic, Ramalho-Santos, 2008). Αρχικά, τα μόρια mRNA που διαθέτουν πολύ (A) ουρά μετατρέπονται σε δίκλινα μόρια cDNA και τα οποία υφίστανται πέψη με τον ένζυμο περιορισμού DpnII και κλωνοποιούνται σε κατάλληλο πλασμιδιακό φορέα ο οποίος περιέχει μία ετικέτα 32bp. Ο κάθε κλώνος διαθέτει διαφορετική ετικέτα. Έπειτα, ακολουθεί ενίσχυση με PCR όπου και προκύπτουν γραμμικά μόρια τα οποία επεξεργάζονται με κατάλληλη εξωνουκλεάση, η οποία μετατρέπει τις δίκλιμες ετικέτες σε μονόκλιμες. Στη συνέχεια, οι ετικέτες στο άκρο κάθε μορίου cDNA υβριδίζονται με συμπληρωματικές αλληλουχίες, ομοιοπολικά συνδεδεμένες με μικροσφαιρίδια διαμέτρου 5μm, ενώ όταν τα μόρια υβριδίζονται οι εγκοπές κλείνουν ενζυματικά. Το τελικό προϊόν που προκύπτει είναι ένα μικροσφαιρίδιο με 100.000 πανομοιότυπα μόρια cDNA συνδεδεμένα ομοιοπολικά στην επιφάνεια του (Εικόνα 13). Ακολουθεί η αλληλούχιση των βιβλιοθηκών όπου η διαδικασία ξεκινά με τη σύνδεση ενός μορίου προσαρμογέα στην αλληλουχία αναγνώρισης του ενζύμου DpnII (GATC) στο άκρο των μορίων cDNA. Το μόριο προσαρμογέα περιέχει μία θέση αναγνώρισης του ενζύμου τύπου II, BbvI, το οποίο κόβει το DNA 9-13 νουκλεοτίδια καθοδικά της αλληλουχίας αναγνώρισης. Από τη δράση αυτού του ενζύμου παράγονται μόρια με μονόκλιμα άκρα μήκους τεσσάρων βάσεων δίπλα στην αλληλουχία αναγνώρισης του ενζύμου DpnII. Έπειτα, στα μονόκλιμα άκρα υβριδίζεται ένα ακόμη σετ μορίων προσαρμογέων που καλούνται κωδικοποιημένοι (encoded). Οι προσαρμογείς αυτοί έχουν ένα προεξέχον άκρο τεσσάρων βάσεων με όλους τους δυνατούς συνδυασμούς νουκλεοτιδίων και ο καθένας από αυτούς θα συνδεθεί σε ένα συμπληρωματικό μόριο cDNA. Η ακριβής αλληλουχία των τεσσάρων νουκλεοτιδίων αποκωδικοποιείται μέσω 16 διαδοχικών αντιδράσεων υβριδισμού με ένα σετ φθοριζόντων ανιχνευτών. Έτσι, από τη διαδικασία αυτή ταυτοποιούνται τα τέσσερα πρώτα νουκλεοτίδια του κάθε μορίου cDNA. Για να ληφθούν δεδομένα για όλη την υπό εξέταση αλληλουχία (περίπου 17bp), ο πρώτος κωδικοποιημένος προσαρμογέας απομακρύνεται μέσω πέψης με το ένζυμο περιορισμού BbvI και η διαδικασία επαναλαμβάνεται

πολλές φορές. Από μία πειραματική διαδικασία που περιλαμβάνει ένα εκατομμύριο μικροσφαιρίδια, προκύπτουν 250.000-400.000 υψηλής ποιότητας αλληλουχίες 17 ζευγών βάσεων (Reinartz, 2002) (Εικόνα 13).



Εικόνα 13: Δημιουργία cDNA βιβλιοθηκών (α) και αντιδράσεις αλληλούχισης (β) κατά τη μέθοδο MPSS

8.1.4 SAGE (Serial Analysis of Gene Expression)

Η σειριακή ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης (SAGE, Serial Analysis of Gene Expression) αποτελεί μέθοδο κυρίως για την μελέτη των προτύπων γονιδιακής έκφρασης, υπό διαφορετικές πειραματικές συνθήκες σε μία ποικιλία κυτταρικών τύπων. Πρόκειται για ένα χρήσιμο εργαλείο για την ανάλυση και σύγκριση μεταγραφωμάτων, χωρίς να απαιτεί πρότερη γνώση της αλληλουχίας των γονιδίων που εξετάζονται. Από την πρώτη περιγραφή της μεθόδου έως σήμερα, η SAGE έχει βρει εφαρμογή σε ένα μεγάλο εύρος πειραματικών ερευνών που ποικίλει από τη μελέτη του καρκίνου έως τη μελέτη της ανάπτυξης των μικροοργανισμών. Η τεχνική βασίζεται στον προσδιορισμό της αφθονίας ενός mRNA που συνάγεται μετρώντας πόσες φορές

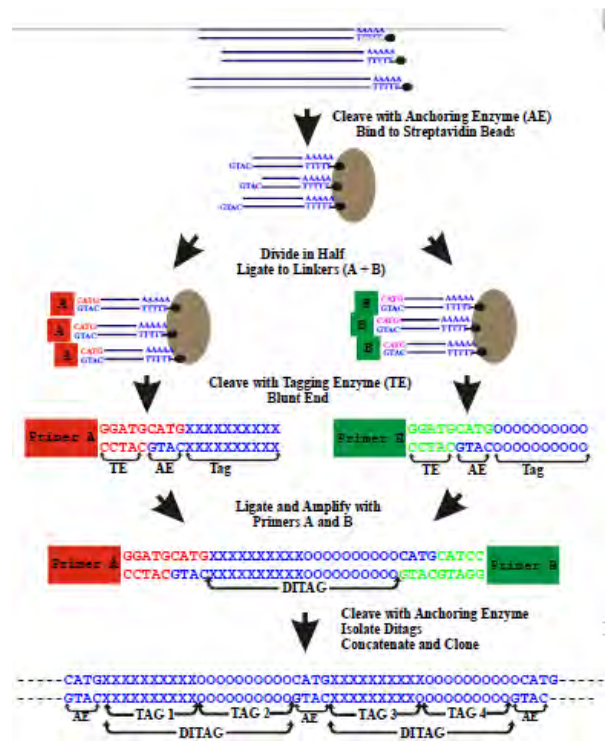
ΕΙΣΑΓΩΓΗ

εκπροσωπείται σε ένα δείγμα και μία αντίδραση αλληλούχησης και επιτρέπει τον εντοπισμό έως και 50 μορίων mRNA (Watson, 2007, Vilain et al., 2003). Η SAGE στοχεύει στον εντοπισμό νέων γονιδίων και εξονίων και δεν περιλαμβάνει τη διαδικασία του υβριδισμού που μπορεί να οδηγήσει σε ψευδώς θετικά ή αρνητικά αποτελέσματα. Ωστόσο, η χρήση της χαρακτηρίζεται από ορισμένους περιορισμούς όπως το υψηλό κόστος, τις μεγάλες χρονικές απαιτήσεις, την παραγωγή αποτελεσμάτων με μειωμένη αξιοπιστία και τη μεγάλη ποσότητα αρχικού πολυαδενυλιωμένου RNA (2,5-5μg) που απαιτείται (Grskovic, Ramalho-Santos, 2008). Τα περισσότερα από τα μειονεκτήματα της SAGE έχουν αντιμετωπισθεί μέσω ποικίλων τροποποιήσεων στο βασικό πρωτόκολλο. Οι σημαντικότερες από αυτές στοχεύουν στη μείωση της αρχικής ποσότητας RNA. Σημαντικές τροποποιήσεις αποτελούν η PCR-SAGE, η SAGE Lite, η SAR-SAGE (Small Amplified RNA-SAGE), η SADE (a SAGE Adaptation for Downsized Extracts), η micro SAGE, η super SAGE και η long SAGE (Παράρτημα III).

8.1.4.1 Αρχή της μεθόδου

Περιγράφοντας το βασικό πρωτόκολλο της μεθόδου αρχικά, γίνεται απομόνωση των πολυαδενυλιωμένων mRNA μέσω της πρόσδεσης της πολύ (A) ουράς τους σε σφαιρίδια που φέρουν λίγο(dT). Τα μόρια με τη βοήθεια της αντίστροφης μεταγραφάσης μετατρέπονται σε cDNA και πέπτονται με ένα ένζυμο περιορισμού του οποίου η θέση κοπής συναντάται συχνά (συνήθως το NlaIII), ώστε το 3' άκρο τους να παραμείνει συνδεδεμένο στα σφαιρίδια. Στη συνέχεια, στα ελεύθερα άκρα κάθε τμήματος προσδένεται ένα δίκλωνο συνθετικό μόριο DNA μικρού μήκους (linker), με τη βοήθεια λιγάσης. Τα συνθετικά αυτά τμήματα φέρουν μια θέση αναγνώρισης μίας ενδονουκλεάσης περιορισμού τύπου II (π.χ. BsmFI). Με την επίδραση του συγκεκριμένου ενζύμου προκύπτει η απελευθέρωση από τα σφαιρίδια τμημάτων ετικετών (μήκους 10-14bp) καθώς το ένζυμο έχει την ικανότητα να κόβει το DNA μερικές θέσεις καθοδικά της θέσης πρόσδεσης. Οι ετικέτες αυτές ενώνονται ανά δύο και σχηματίζουν διπλές

ετικέτες (ditags) που έχουν θέση αναγνώρισης του BsmFI σε κάθε άκρο. Ακολουθεί ενίσχυση των ετικετών με PCR και σύνδεση μεταξύ τους ώστε να σχηματιστούν τα αλυσομερή (concatamers) κάθε ένα από τα οποία περιλαμβάνει 20-25 διπλές ετικέτες. Στη συνέχεια, τα αλυσομερή κλωνοποιούνται σε έναν πλασμιδιακό φορέα και ακολουθεί αλληλούχηση. Δεδομένου ότι οι ετικέτες διαχωρίζονται από γνωστές θέσεις περιορισμού, είναι εύκολο να γίνει καθορισμός των αλληλουχιών αλλά και αντιστοίχηση τους σε ένα συγκεκριμένο γονίδιο έπειτα από βιοπληροφορική ανάλυση. Τέλος, πραγματοποιείται καταμέτρηση των ετικετών και υπολογίζεται η συχνότητα εμφάνισης τους. Επομένως, πραγματοποιείται ο προσδιορισμός της σχετικής αφθονίας των αντίστοιχων mRNA στο αρχικό δείγμα (Watson, 2007) (Εικόνα 14).



Εικόνα 14: Μεθοδολογία της μεθόδου SAGE

8.2 RNA-Sequencing (RNA-Seq)

Η τεχνική RNA-Sequencing (RNA-Seq) ανήκει στις τεχνικές αλληλούχησης νέας γενιάς (Next Generation Sequencing). Πρόκειται για μία νέα τεχνική τρανσκριπτομικής ανάλυσης, που χρησιμοποιεί

τεχνολογίες αλληλούχησης υψηλής απόδοσης (deep-sequencing). Μέχρι τώρα έχουν χρησιμοποιηθεί για το σκοπό αυτό τα συστήματα IlluminaI, IonTorrent, PacBio (Pacific Biosciences), Helicos, Complete Genomics, Applied Biosystems SOLiD (Life Science) και Roche 454 (Metzker, 2010). Η RNA-Seq αποτελεί την πρώτη μέθοδο που βασίζεται στην αλληλούχηση και η οποία επιτρέπει την ανάλυση ολόκληρου του μεταγραφώματος με υψηλή απόδοση. Η ευαισθησία της μεθόδου είναι ιδιαίτερα υψηλή σε επίπεδο της μίας βάσης και επίσης παρέχονται ψηφιακά δεδομένα για τα επίπεδα της γονιδιακής έκφρασης που αντιστοιχούν σε ολόκληρο το γονιδίωμα. Το κόστος της τεχνικής είναι συχνά χαμηλότερο από το κόστος των συμβατικών μεθόδων και μειώνεται συνεχώς. Τα πλεονεκτήματα της RNA-seq είναι πολλά σε σύγκριση με τις υπάρχουσες τεχνικές τρανσκριπτομικής ανάλυσης. Σε αντίθεση με τις προσεγγίσεις που βασίζονται στην υβριδοποίηση (π.χ. στικτές μικροσυστοιχίες) η τεχνική δεν περιορίζεται στον εντοπισμό μεταγράφων που αντιστοιχούν σε γνωστές αλληλουχίες. Συνεπώς, συγκαταλέγεται σε σημαντικό εργαλείο για την ανάλυση οργανισμών που δεν αποτελούν οργανισμούς μοντέλα και των οποίων το γονιδίωμα δεν έχει αλληλουχηθεί. Επιπλέον, η μεγάλη ευαισθησία της μεθόδου επιτρέπει την ταυτοποίηση πολυμορφικών περιοχών (SNPs). Η τεχνική, με τις αναγνώσεις αλληλουχιών μικρού μήκους (30bp) που παρέχει, δίνει πληροφορίες για την σύνδεση δύο εξονίων, ενώ με τις μεγαλύτερες αναγνώσεις αποκαλύπτεται ο τρόπος σύνδεσης ανάμεσα σε πολλά εξόνια επιτρέποντας έτσι τη μελέτη περίπλοκων μεταγραφωμάτων. Σημαντικό πλεονέκτημα της μεθόδου για τους οργανισμούς που είναι γνωστό το γονιδίωμα τους αποτελεί το μικρό έως και ανύπαρκτο “background signal” που εμφανίζεται, καθώς οι αλληλουχίες DNA χαρτογραφούνται σε συγκεκριμένες περιοχές του γονιδιώματος. Τέλος, κατά την ποσοτικοποίηση δεν υπάρχει ανώτατο όριο στον αριθμό των ακολουθιών που καταγράφονται. Παρόλα αυτά τα πλεονεκτήματα, η μέθοδος μπορεί να βελτιωθεί περισσότερο ώστε να αυξηθούν τόσο η απόδοση της αλλά και η αξιοπιστία της. Η κατασκευή των cDNA βιβλιοθηκών είναι ένα από τα στάδια που ενδέχεται να δυσκολέψει στην ανάλυση των αποτελεσμάτων και να οδηγήσει σε

εσφαλμένα αποτελέσματα. Αρχικά, κατά την σύνθεση των cDNA βιβλιοθηκών τα μόρια RNA είτε τα μόρια cDNA πρέπει να τεμαχιστούν. Ωστόσο, η πέψη των μορίων RNA οδηγεί σε μειωμένη απόδοση αλληλουχιών που αντιστοιχούν στα άκρα των μεταγράφων, ενώ η πέψη των cDNA μορίων αποδίδει περισσότερες αλληλουχίες που αντιστοιχούν στο 3' άκρο σε σχέση με εκείνες που αντιστοιχούν στο υπόλοιπο μετάγραφο. Επίσης, η κρίση δυσχεραίνεται εάν κάποια αντίγραφα αναγνώσεων ακολουθίας μικρού μήκους αντιστοιχούν σε αντίγραφα mRNA ή αποτελούν προϊόντα της ενίσχυσης των cDNA μορίων. Τέλος, υπάρχουν δυσκολίες και στο στάδιο της βιοπληροφορικής ανάλυσης των αποτελεσμάτων κυρίως κατά το στάδιο της ανάλυσης μεγάλων ή πολύπλοκων μεταγραφωμάτων. Συνεπώς, χρειάζεται να αναπτυχθεί μια μέθοδος που να αποθηκεύει, να ανακαλεί και να επεξεργάζεται μεγάλες ποσότητες δεδομένων, αποφεύγοντας σφάλματα κατά την ανάλυση αλλά και να απομακρύνει τις αναγνώσεις αλληλουχίας χαμηλής ποιότητας (Wang et al, 2009; Costa et al, 2010).

8.2.1 Αρχή της μεθόδου

Αρχικά, η μέθοδος περιλαμβάνει τη μετατροπή μορίων RNA (mRNA ή ολικό RNA- rRNA depleted¹) σε τμήματα cDNA που είναι συνδεδεμένα στο ένα ή και στα δύο άκρα με ειδικά δίκλινα μόρια προσαρμογείς (adaptors). Έπειτα, ακολουθεί το στάδιο της ενίσχυσης των μορίων cDNA. Στα παραγόμενα μόρια γίνεται αλληλούχηση έτσι ώστε να προκύψουν μικρές αναγνώσεις ακολουθίας μήκους 30-400bp ανάλογα με την τεχνολογία αλληλούχησης DNA που χρησιμοποιείται. Η ανάγνωση της ακολουθίας μπορεί να ξεκινάει από το ένα μόνο άκρο (single-end sequencing) ή και από τα δύο (pair-end

¹ Ολικό RNA με επιλεκτική αφαίρεση του ριβοσωμικού RNA, rRNA, κατά την αντίστροφη μεταγραφή στο στάδιο της ενίσχυσης, μέσω της τεχνολογίας RiboMinus. Η τεχνολογία RiboMinus έχει σχεδιαστεί για να εμπλουτίζει όλο το φάσμα των μεταγραφών RNA από επιλεκτικούς καταστροφείς των μορίων ριβοσωμικού RNA (rRNA), ανεξάρτητα από την φάση της πολυαδενυλίωσης ή την παρουσία δομής 5'-cap. Η μέθοδος RiboMinus έχει αποδειχθεί ότι απομακρύνει το μεγαλύτερο μέρος από τα άφθονα μόρια ριβοσωμικού RNA (μέχρι 99,9%) ώστε να επιτραπεί μεγαλύτερη εξακρίβωση στα λιγότερο άφθονα αντίγραφα.

sequencing). Τέλος, πραγματοποιείται βιοπληροφορική ανάλυση των αποτελεσμάτων η οποία δύναται να γίνει με *de novo* συναρμολόγηση των αναγνώσεων ή με βάση έναν συγγενικό οργανισμό του οποίου οι αλληλουχίες του DNA είναι γνωστές. Η προσέγγιση της παρούσας μελέτης έγινε με την τεχνολογία της Applied Biosystems SOLiD.

8.2.2 Αλληλούχηση των RNA βιβλιοθηκών

Αρχικά, πραγματοποιείται το στάδιο της PCR ενίσχυσης σε γαλάκτωμα (emulsion PCR) των cDNA μορίων, όπου δημιουργούνται ενισχυμένοι «κλώνοι» πάνω σε μαγνητικά σφαιρίδια. Στο τέλος του βήματος κάθε σφαιρίδιο έχει συνδεδεμένα στην επιφάνεια του πολλά αντίγραφα ενός μορίου cDNA. Όπως περιγράφεται αναλυτικά στην ενότητα των Υλικών και Μεθόδων, η διαδικασία βασίζεται στη χρήση μαγνητικών σφαιριδίων όπου στην επιφάνειά τους είναι συνδεδεμένα δίκλιωνα τμήματα DNA. Σε εκείνα υβριδοποιείται η αλληλουχία P1 των cDNA μορίων και των σφαιριδίων από πολυστυρένιο στην επιφάνεια των οποίων είναι συνδεδεμένα δίκλιωνα τμήματα DNA στα οποία υβριδοποιείται η P2 αλληλουχία. Το γαλάκτωμα αποτελείται από μία φάση λαδιού που περιέχει γαλακτωματοποιητές και από μία υδάτινη φάση που περιέχει τα συστατικά της PCR. Εδώ, συμπεριλαμβάνονται και τα μαγνητικά σφαιρίδια σε κατάλληλη αναλογία έτσι ώστε όταν δημιουργηθούν φυσαλίδες όπου σε κάθε μία από αυτές να υπάρχει ένα μόριο cDNA και ένα μαγνητικό σφαιρίδιο ενώ οι φυσαλίδες δρουν ως μικροαντιδραστήρες. Όταν η αναλογία είναι ιδανική, μετά το πέρας των κύκλων της PCR ενίσχυσης προκύπτουν σφαιρίδια σε κάθε ένα από τα οποία είναι προσκολλημένα μόρια DNA που προέρχονται από την αντιγραφή ενός μόνο αρχικού μορίου. Στη συνέχεια προστίθεται βουτανόλη για τη διάλυση των φυσαλίδων και ακολουθούν πλύσεις για να αφαιρεθεί το γαλάκτωμα. Έπειτα προστίθεται γλυκερόλη και νέα σφαιρίδια από πολυστυρένιο που έχουν την ιδιότητα να συγκρατούν τα μαγνητικά σφαιρίδια που έχουν στην επιφάνεια τους τα ενισχυμένα μόρια DNA, όπου τα παρασύρουν στην επιφάνεια του διαλύματος και τα διαχωρίζουν από τα κενά μαγνητικά σφαιρίδια. Τέλος, στα 3' άκρα

των μορίων cDNA γίνεται τροποποίηση με την προσθήκη μίας τριφωσφορικής ουρακίλης που καθιστά δυνατή τη σύνδεση τους στο γυάλινο πλακίδιο της συσκευής αλληλούχησης. Η αντίδραση καταλύεται από το ένζυμο Terminal Transferase, ένα ένζυμο που ανεξάρτητα από την αλυσίδα μήτρα καταλύει την προσθήκη τροποποιημένων νουκλεοτιδίων στο 3' άκρο μορίων DNA (Εικόνα 15) (Applied Biosystems SOLiD™4 System Templated Bead Preparation Guide).



Εικόνα 15: EmulsionPCR

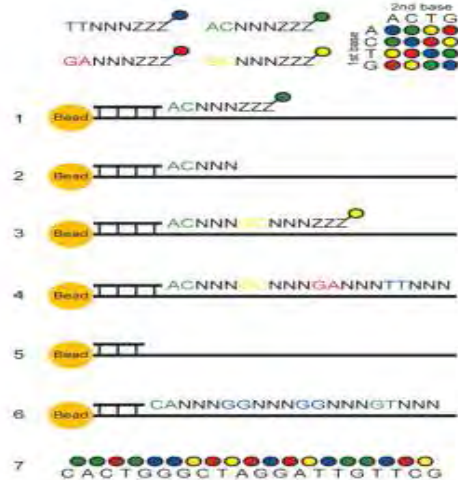
8.2.3 Καταγραφή σήματος- Χρωματικός κώδικας

Τα πλακίδια με τα ακινητοποιημένα μόρια cDNA στην επιφάνειά τους τοποθετούνται στη συσκευή αλληλούχησης ABI SOLiD, όπου πραγματοποιείται η αλληλούχηση. Η λειτουργία της συσκευής βασίζεται στη συνεχή καταγραφή φθορίζοντων σημάτων και στην επεξεργασία τους ενώ η διαδικασία διαρκεί περίπου επτά ημέρες. Η ανάγνωση της αλληλουχίας βασίζεται στη χρήση μορίων ανιχνευτών (probes) σημασμένων με τέσσερις διαφορετικές χρωστικές. Οι ανιχνευτές αποτελούνται από οχτώ νουκλεοτίδια, εκ των οποίων τα δύο πρώτα είναι γνωστά, τα επόμενα τρία είναι εκφυλισμένα και τα τρία τελευταία είναι κοινά σε όλους (Εικόνα 16).

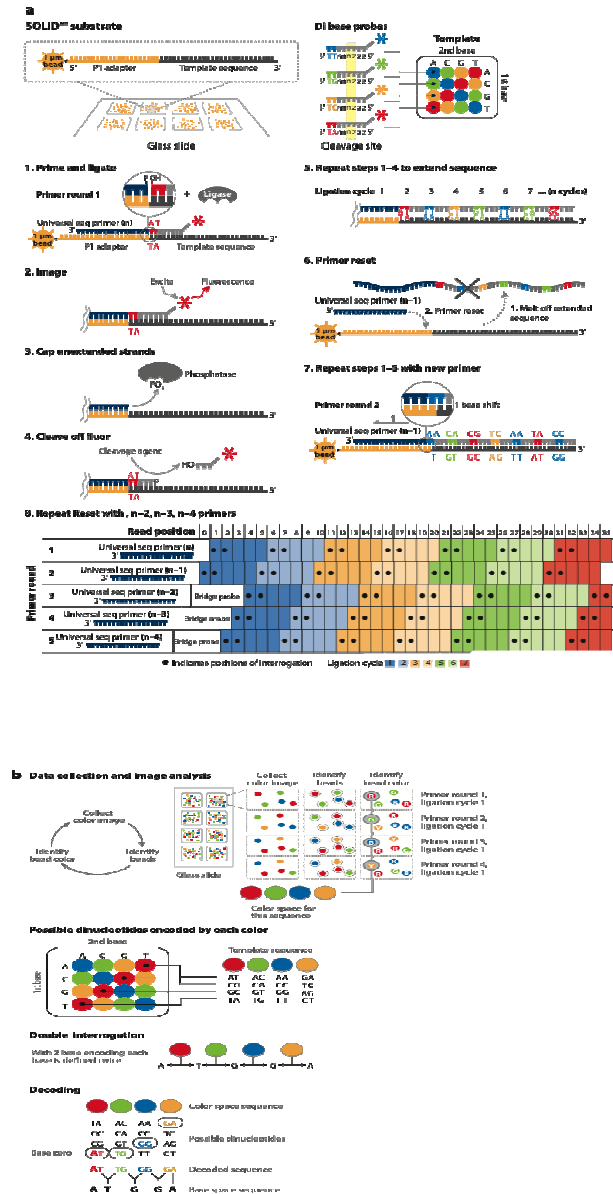
Αρχικά, η διαδικασία της αλληλούχησης περιλαμβάνει την υβριδοποίηση ενός εκκινητή στην P1 αλληλουχία του μορίου που πρόκειται να αλληλουχηθεί και έπειτα την υβριδοποίηση ενός ανιχνευτή του οποίου τα γνωστά νουκλεοτίδια είναι συμπληρωματικά με τα δύο πρώτα νουκλεοτίδια του υπό εξέταση τμήματος DNA. Αφού υβριδοποιηθεί ο

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ανιχνευτής, η συσκευή αλληλούχησης λαμβάνει το φθορίζον σήμα από τη χρωστική. Έπειτα από την καταγραφή του σήματος γίνεται αποφωσφορυλίωση του 5' άκρου του εκκινήτη των τμημάτων στα οποία δεν πραγματοποιήθηκε υβριδοποίηση ενός ανιχνευτή και συνεπώς δεν παρείχαν σήμα στον πρώτο κύκλο ώστε να μην μπορούν να υβριδοποιηθούν άλλοι ανιχνευτές. Παράλληλα, γίνεται αποκοπή των τριών τελευταίων νουκλεοτιδίων κάθε υβριδοποιημένου probe μαζί με τη συζευγμένη χρωστική. Η παραπάνω διαδικασία επαναλαμβάνεται επτά φορές για να δημιουργηθεί μια ανάγνωση 35 βάσεων και έπειτα η νεοσυντιθέμενη αλυσίδα αποκόπτεται για να υβριδοποιηθεί ένας νέος εκκινήτης, στο νουκλεοτίδιο που βρίσκεται μία θέση ανοδικά του νουκλεοτιδίου στο οποίο υβριδοποιήθηκε το προηγούμενο. Η διαδικασία που περιγράφηκε για τον πρώτο εκκινήτη επαναλαμβάνεται και για τον δεύτερο, με τη διαφορά ότι το πρώτο νουκλεοτίδιο τώρα είναι μέρος του P1 και συνεπώς γνωστό. Το γεγονός αυτό είναι πολύ σημαντικό γιατί, για την αποκωδικοποίηση των χρωμάτων είναι απαραίτητο ένα γνωστό νουκλεοτίδιο της υπό εξέταση αλληλουχίας (Εικόνα 16).



Εικόνα 16: Μόρια ανιχνευτές (probes) και αλληλούχηση.



Εικόνα 17: Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας της αλληλούχησης (a) και της συλλογής και ανάλυσης των δεδομένων (b).

Συγκεκριμένα, κάθε χρωστική μπορεί να αντιπροσωπεύει τέσσερα διαφορετικά δινουκλεοτίδια της υπό εξέταση αλληλουχίας και για να διαπιστωθεί σε ποια αντιστοιχεί κάθε φορά πρέπει να είναι γνωστή η μία βάση από τις δύο πρώτες στις οποίες έχει υβριδοποιηθεί ο ανιχνευτής. Για παράδειγμα, εάν καταγραφεί κόκκινο χρώμα και είναι γνωστό ότι η πρώτη βάση στην οποία υβριδοποιήθηκε ο

ανιχνευτήζείναι μία αδενίνη, τότε συμπεραίνεται ότι η δεύτερη βάση είναι μία θυμίνη.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, όπως περιγράφεται σχηματικά στον πίνακα (Εικόνα 17, a 1-8) το φθορίζον σήμα που δίνει ο πρώτος ανιχνευτής που υβριδοποιήθηκε δίπλα στον δεύτερο εκκινητή οδηγεί στην ταυτοποίηση του πρώτου νουκλεοτιδίου της εξεταζόμενης αλληλουχίας. Έπειτα, το φθορίζον σήμα από τον πρώτο ανιχνευτή που υβριδοποιήθηκε δίπλα στον πρώτο εκκινητή ταυτοποιεί το δεύτερο νουκλεοτίδιο της εξεταζόμενης αλληλουχίας. Ακολουθώντας της πορεία που υποδεικνύει ο πίνακας και λαμβάνοντας υπόψη όλους τους κύκλους υβριδοποίησης ταυτοποιούνται όλα τα νουκλεοτίδια των εξεταζόμενων αλληλουχιών.

Η παραπάνω διαδικασία αφορά τη γενική αρχή της διαδικασίας της αλληλούχησης προς μία κατεύθυνση. Σύμφωνα με την ίδια αρχή μπορεί να πραγματοποιηθεί αλληλούχηση και προς τις δύο κατευθύνσεις, ώστε να εξασφαλιστεί μεγαλύτερη εγκυρότητα των αποτελεσμάτων. Επιπλέον, πραγματοποιείται αλληλούχηση της αλληλουχίας «barcode» για την ταυτοποίηση των κλώνων που βρίσκονται σε κάθε μαγνητικό σφαιρίδιο. Τέλος, τα αποτελέσματα που παρέχει η συσκευή της αλληλούχησης υφίστανται βιοπληροφορική ανάλυση, σύμφωνα με το πρόγραμμα Blast, για να προκύψει η ολοκληρωμένη αλληλούχια των RNA μορίων του δείγματος (Mardis, 2008, SOLiD™ 4 System SETS Software, User Guide).

9. Πρωτεομική ανάλυση

Οι πρωτεΐνες είναι ζωτικά συστατικά των οργανισμών καθώς συμμετέχουν σε φυσιολογικά μεταβολικά μονοπάτια των κυττάρων. Η κάθε πρωτεΐνη έχει τη δική της αλληλουχία αμινοξέων, συγκεκριμένο μοριακό μέγεθος και ηλεκτρικό φορτίο. Οποιαδήποτε αλλαγή σε αυτά τα χαρακτηριστικά επηρεάζει άμεσα τη βιολογική λειτουργία της πρωτεΐνης. Η γνώση μόνο της αμινοξικής αλληλουχίας δεν παρέχει και τη γνώση της τρισδιάστατης δομής, της λειτουργίας και

της αλληλεπίδρασης μεταξύ πρωτεϊνών. Η πρωτεομική ανάλυση είναι η μελέτη των πρωτεϊνών και ιδιαίτερα των δομών και λειτουργιών τους, σε μεγάλη κλίμακα. Το 1997 χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά ο όρος πρωτεομική θέλοντας να γίνει συσχέτιση με τη γονιδιωματική, τη μελέτη δηλαδή του γονιδιώματος. Το πρωτέομα είναι το σύνολο των πρωτεϊνών που παράγονται από έναν οργανισμό που ποικίλλουν ανάλογα με τον χρόνο, τις απαιτήσεις ή τις καταπονήσεις που υφίσταται ένα κύτταρο ή ένας οργανισμός (Wilkins et al., 1996). Το πρωτέομα είναι περισσότερο περίπλοκο από ότι το γονιδίωμα καθώς διαφέρει από κύτταρο σε κύτταρο και από καιρό σε καιρό. Στο παρελθόν η ανάλυση των πρωτεϊνών γινόταν με την ανάλυση του mRNA που τελικά βρέθηκε πως δεν συσχετίζεται με την περιεκτικότητα των πρωτεϊνών. Το mRNA δεν μεταφράζεται πάντα σε πρωτεΐνη και η ποσότητα της πρωτεΐνης που παράγεται από μια δεδομένη ποσότητα mRNA εξαρτάται από το γονίδιο από το οποίο μεταγράφεται. Με την πρωτεομική επιβεβαιώνεται η παρουσία της πρωτεΐνης και επιτυγχάνεται η ποσοτικοποίηση της. Η μεγαλύτερη πρόκληση της πρωτεομικής είναι η δημιουργία μεθοδολογιών με τις οποίες θα είναι εφικτή η ανίχνευση μεγάλου αριθμού διακριτών πρωτεϊνικών μορίων τα περισσότερα εκ των οποίων βρίσκονται σε χαμηλά επίπεδα, ενώ πολλά υπάρχουν σε τροποποιημένες μορφές.

Οι βασικές τεχνικές της πρωτεομικής είναι το πήκτωμα ακρυλαμιδίου (SDS-PAGE και 2D-PAGE) και η φασματομετρία μάζας (MS) για την ανάλυση τους. Το πλεονέκτημα της δισδιάστατης ηλεκτροφόρησης είναι η μεγαλύτερη αναλυτική ικανότητα που οδηγεί στον ευκολότερο εντοπισμό των πρωτεϊνών. Αρχικά, οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται μέσω της ηλεκτροφόρησης, έπειτα διασπώνται με τη χρήση ενζύμων και αναλύονται με MS όπου και τελικά γίνεται η ταυτοποίησή τους μέσω της βιοπληροφορικής (Intelicato-Young and Fox, 2013).

Οι εφαρμογές της πρωτεομικής σχετίζονται με την εύρεση ή εξόρυξη πληροφορίας, την πρωτεϊνική έκφραση, τη χαρτογράφηση δικτύου πρωτεϊνών και τη χαρτογράφηση των πρωτεϊνικών τροποποιήσεων. Συγκεκριμένα, η εξόρυξη πληροφορίας αφορά την

ταυτοποίηση όλων ή των περισσότερων πρωτεϊνών σε ένα δείγμα. Η πρωτεϊνική έκφραση είναι η ταυτοποίηση των πρωτεϊνών σε ένα συγκεκριμένο δείγμα σε σχέση με μια κατάσταση του οργανισμού ή του κυττάρου ή σε σχέση με την έκθεσή του σε χημικό ή φυσικό ερέθισμα. Συνήθως συναντάται με τη μορφή της διαφορικής ανάλυσης όπου γίνεται σύγκριση δύο καταστάσεων (π.χ. φυσιολογικά και παθολογικά κύτταρα). Η χαρτογράφηση δικτύου πρωτεϊνών αφορά τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνών, όπως η μετάδοση σημάτων και τα σύνθετα μονοπάτια στους οργανισμούς. Τέλος, στην χαρτογράφηση των πρωτεϊνικών τροποποιήσεων μελετάται το πώς και πού τροποποιούνται οι πρωτεΐνες, κυρίως από φορτισμένα ή μη μόρια που δημιουργούνται από περιβαλλοντικούς παράγοντες και ενδογενή χημικά.

9.1 Εφαρμογές της Πρωτεομικής

Παράλληλα με τη γονιδιωματική, η πρωτεομική παρέχει μια σφαιρική άποψη του προφίλ των πρωτεϊνών σε έναν οργανισμό. Επιπλέον, οι πρόσφατα αναπτυσσόμενες τεχνολογίες στην πρωτεομική επιτρέπουν την αποκωδικοποίηση πολύπλοκων βιολογικών συστημάτων, συμπεριλαμβανομένων των κυτταρικών αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-πρωτεΐνης των δικτύων και διάφορες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις. Οι τεχνολογίες της πρωτεομικής έχουν εφαρμοστεί για να μελετηθούν τα πρότυπα έκφρασης των πρωτεϊνών μεταξύ των διαφόρων σταδίων ανάπτυξης των εντόμων (Zhao et al., 2006; Li et al., 2007; Zhang et al., 2007; Chan and Foster, 2008; Li et al., 2009; Wu et al., 2009) και σε διάφορους ιστούς των εντόμων, όπως αναπαραγωγικοί ιστοί (Kelleher et al., 2009; Takemori and Yamamoto, 2009), το νευρικό σύστημα, οι σιελογόνοι και οι μεταξογόνοι αδένες (Zhang et al, 2006, Almeras et al, 2009), η επιδερμίδα (Holm και Sander, 1997), και η αιμολέμφο (Li et al, 2006, Furusawa et al., 2008a). Η πρωτεομική έχει χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση νέων πρωτεϊνών των δηλητηρίων (de Graaf et al, 2010) και πρωτεϊνών του σιελογόνου αδένου (Oleaga et al., 2007, Carolan et al., 2009), καθώς και πρωτεϊνών του βασιλικού

πολού των μελισσών (Furusawa et al, 2008b; Li et al, 2008b; Yu et al, 2010). Επιπλέον, η πρωτεομική έχει εφαρμοστεί σε μελέτες μεταξύ εντόμων-φυτών και στις αλληλεπιδράσεις ξενιστών-παρασίτων (Chen et al, 2005; Biron et al., 2005, 2006; Francis et al, 2006; An Nguyen et al., 2007). Η *de novo* ανακάλυψη γονιδίων που βασίζονται στην πρωτεομική, έχει εφαρμοστεί με μεγάλο ενδιαφέρον για την ταυτοποίηση νέων γονιδίων τα οποία δεν προβλέπονται από τη γονιδιακή υπομνηματοποίηση (genome annotation) (Findlay et al., 2009). Η ανάπτυξη των ισχυρών τεχνικών της φωσφο-πρωτεομικής (phosphoproteomics) επιτρέπει τον εντοπισμό σε μεγάλη κλίμακα των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων, όπως η φωσφορυλίωση (Fu et al, 2009; Rewitz et al., 2009). Η ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα (π.χ., οι τοξίνες Cry που παράγονται από το βακτήριο του εδάφους *Bacillus thuringiensis*) έχει γίνει ένα σοβαρό πρόβλημα που απειλεί τον Bt-βασισμένο έλεγχο και τη διαχείριση επιβλαβών οργανισμών. Συνεπώς, αποτελεί σημαντικό βήμα η κατανόηση του τρόπου δράσης των Cry τοξινών και ειδικά η αλληλεπίδραση μεταξύ των Cry τοξινών και των συστημάτων άμυνας του ξενιστή. Αρκετές μελέτες έχουν εφαρμόσει τις τεχνολογίες της πρωτεομικής για την ανακάλυψη των Cry binding πρωτεϊνών (McNall and Adang, 2003; Krishnamoorthy et al, 2007; Bayyareddy et al., 2009; Chen et al, 2009) και τις αλλαγές των πρωτεϊνών του εντέρου των προνυμφών μεταξύ των ευαίσθητων και ανθεκτικών στελεχών των Indian meal σκώρων (Candas et al., 2003).

9.2 Πεπτιδομική ανάλυση

Η πεπτιδομική ανάλυση (peptidomics) περιλαμβάνει την αρχική απομόνωση πεπτιδίων από τον εξεταζόμενο οργανισμό και στη συνέχεια την ανάλυση με φασματομετρία μάζας χωρίς την χρήση ενζύμων. Σύμφωνα με την πεπτιδομική διερευνώνται τα πεπτιδικά χαρακτηριστικά μέσα από δυο κατευθύνσεις, α) την αναγνώριση και την ταυτοποίηση των πεπτιδίων και β) την κατανόηση των πεπτιδικών λειτουργιών. Η πεπτιδομική αναφέρεται σε οποιαδήποτε μέθοδο που παρέχει μια ευρεία άποψη στο σύνολο μιας ομάδας (pool)

πεπτιδίων σε ένα βιολογικό δείγμα, το πεπτιδίωμα (Svensson et al., 2003; Hummon et al., 2006). Οι σύγχρονες προσεγγίσεις της πεπτιδομικής βασίζονται σε μεγάλο βαθμό στην τεχνολογία LC-MS/MS για να παρέχουν ανίχνευση μεγάλης ευαισθησίας και ταυτοποίηση των πεπτιδίων από τα βιολογικά δείγματα. Οι δύο κυρίαρχοι τύποι φασματομέτρων μάζας που χρησιμοποιούνται σε μελέτες πεπτιδομικής είναι το quadrupole time-of-flight (Q-TOF) και το IonTrap (IT) (Domon and Aebersold, 2006). Τα μέσα αυτά επιτρέπουν την ποσοτικοποίηση χρησιμοποιώντας διάφορες προσεγγίσεις και παρέχουν διαδοχικά φάσματα μάζας που είναι απαραίτητα για τον προσδιορισμό της αλληλουχίας του πεπτιδίου. Τα βασικά βήματα σε κάθε πείραμα πεπτιδομικής είναι απομόνωση των πεπτιδίων, ο τεμαχισμός και η επεξεργασία τους, η φασματομετρία μάζας και η ανάλυση των δεδομένων.

Πολλά είναι τα παραδείγματα πεπτιδομικής ανάλυσης στα έντομα τα τελευταία χρόνια. Ο συνδυασμός της πεπτιδομικής ανάλυσης και της γονιδιωματικής ανάλυσης, οδήγησε στην ανακάλυψη αντιμικροβιακών πεπτιδίων από τους αδένες δηλητηρίου της σφήκας *Vespa tropica* (Yang et al., 2013). Η πεπτιδομική ανάλυση στο σκόρο *Galleria mellonella* αποκάλυψε πληθώρα αντιμικροβιακών πεπτιδίων τα οποία βοηθούν στην προφύλαξη από εισβολές μικροβίων (Brown et al., 2009). Η διαφορική πεπτιδομική ανάλυση ανάδειξε την adipokinetic ορμόνη, ως βασικό παράγοντα στη ρύθμιση της πέψης στην σαρκοφάγο μύγα, *Sarcophaga crassipalpis* (Bil et al., 2014). Μέσω της πεπτιδομικής ανάλυσης, ταυτοποιήθηκαν περισσότερα από 38 πεπτιδία της επιζήμιας κατά το στάδιο της προνύμφης μύγας της ρίζας των λάχανων *Delia radicum* (Diptera: Anthomyiidae) (Zoepfel et al., 2012). Τέλος, πραγματοποιήθηκε πεπτιδομική ανάλυση στο έντερο της *Drosophila* και η επεξεργασία των πεπτιδικών ορμονών (entero endocrine peptides) οδήγησε σε πληροφορίες σχετικά με τη λειτουργία των πεπτιδικών ορμονών του εντέρου που ρυθμίζουν τη διατροφή και το μεταβολισμό (Reiher et al., 2011).



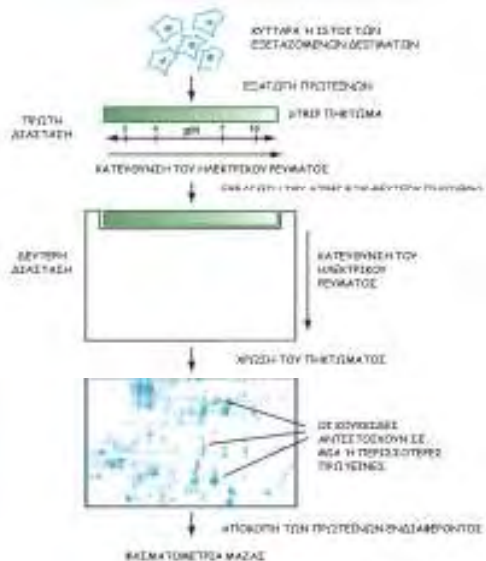
Εικόνα 18 : Σχηματική αναπαράσταση- κατάταξης των -omics

9.3 Ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων (2D-PAGE)

Η δισδιάστατη ανάλυση αποτελεί ένα από τα ισχυρότερα εργαλεία της πρωτεομικής και παρουσιάστηκε για πρώτη φορά το 1975 από τους O'Farrell και Klose. Περιλαμβάνει δύο βήματα, την ηλεκτροφόρηση της πρώτης διάστασης ή ισοηλεκτρικού σημείου (isoelectric focusing- IEF) και την SDS ηλεκτροφόρηση πηκτωμάτων ακρυλαμιδίου (SDS-PAGE). Κατά την ισοηλεκτρική εστίαση οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται σύμφωνα με το ισοηλεκτρικό τους σημείο (pI), το pH στο οποίο το ολικό ηλεκτρικό φορτίο τους ισούται με μηδέν. Η βάση της ισοηλεκτρικής εστίασης είναι οι διαφορές του pI των πρωτεϊνών, που καθορίζονται από τον αριθμό και τον τύπο των φορτισμένων ομάδων σε αυτές. Το εύρος του pI των διαφόρων πρωτεϊνών κυμαίνεται σε pH 3-12, με την πλειοψηφία αυτών να κυμαίνονται μεταξύ pH 4-7. Για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών χρησιμοποιούνται τα IPG strips, ταινίες πηκτής πολυακρυλαμιδίου με διακύμανση στο pH που επιτυγχάνεται με αμφολύτες. Η πρωτεΐνη τοποθετείται στα IPG strips και υπό την εφαρμογή του ηλεκτρικού πεδίου κινείται προς το ηλεκτρόδιο με το αντίθετο φορτίο μέχρι να φτάσει στο σημείο όπου το pH ισούται με το pI της. Εκεί, παύει να μετακινείται και δύναται να παραμείνει σταθερή για αρκετά μεγάλο διάστημα. Ο ρυθμός μετακίνησης επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες, όπως η δύναμη του πεδίου, το ολικό φορτίο της πρωτεΐνης, το μέγεθος της, το σχήμα της, η ιοντική ισχύς, το ιξώδες και η θερμοκρασία του μέσου. Κατά την SDS ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται με βάση το μοριακό τους βάρος υπό την επίδραση ηλεκτρικού φορτίου. Η ταχύτητα μετακίνησης των

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

πρωτεϊνών επηρεάζεται από παράγοντες όπως η ένταση του ηλεκτρικού πεδίου, το ολικό τους φορτίο, το μέγεθος και το σχήμα τους, η ιοντική ισχύς, το ιζώδες και η θερμοκρασία του μέσου. Το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου αποτελείται από το πήκτωμα συσσώρευσης (stacking gel) που τοποθετείται πάνω από το πήκτωμα διαχωρισμού (separating gel). Ο αποδιατακτικός παράγοντας SDS δεσμεύεται στο εσωτερικό της πολυπεπτιδικής αλυσίδας με υδροφοβικούς δεσμούς, αποδιατάσσοντάς την και δημιουργώντας ένα επίμηκες σύμπλοκο SDS-πολυπεπτιδικής αλυσίδας. Συνεπώς, η ηλεκτροφορητική ικανότητα του πηκτώματος εξαρτάται μόνο από το μοριακό βάρος του πεπτιδίου που προσδιορίζεται με τη χρήση πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους (μάρτυρες) (Εικόνα 19). Μειονέκτημα της μεθόδου αποτελεί η ύπαρξη βασικών ή με μεγάλο βαθμό γλυκοσυλίωση πρωτεΐνες που κινούνται πιο αργά στο πήκτωμα καθώς το SDS δεσμεύεται μόνο στο πρωτεϊνικό τους τμήμα με αποτέλεσμα να γίνεται λανθασμένη ταυτοποίηση. Επίσης, σημαντικό μειονέκτημα αποτελεί το γεγονός ότι ορισμένες πρωτεΐνες δεν αποδιατάσσονται πλήρως με την παρουσία του SDS που μπορεί να οδηγήσει σε ελλιπή αποτελέσματα.



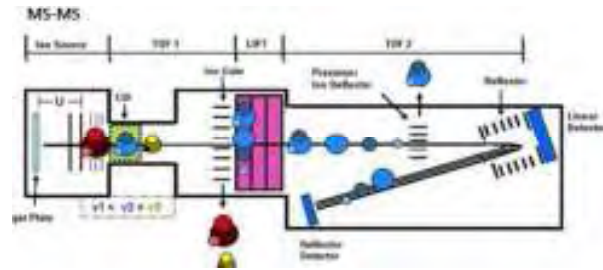
Εικόνα 19: Σχηματική αναπαράσταση ηλεκτροφόρησης δύο διαστάσεων (2D-PAGE)

9.4 Φασματομετρία μάζας

Ένα ακόμη σημαντικό εργαλείο της πρωτεομικής είναι η φασματομετρία μάζας (mass spectrometry-MS). Στηρίζεται στην αναγνώριση των μορίων σύμφωνα με ακριβείς μετρήσεις του λόγου μάζας προς φορτίο τους (m/z). Τα δείγματα ακτινοβολούνται από παλμό λέιζερ, δημιουργώντας μια μικρή δέσμη ιόντων. Τα ιόντα επιταχύνονται με καθορισμένο ποσό κινητικής ενέργειας και στη συνέχεια ταξιδεύουν στον σωλήνα πτήσης. Τα μικρότερα ιόντα έχουν μεγαλύτερη ταχύτητα και φτάνουν στον ανιχνευτή πριν από τα μεγαλύτερα ιόντα, παράγοντας το φάσμα του χρόνου πτήσης. Επίσης, έχει αναπτυχθεί η οργανολογία του MALDI LIFT TOF/TOF φασματογράφου μάζας. Περιλαμβάνει τη διάταξη “lift” μέσω της οποίας αυξάνεται η δυναμική ενέργεια των ιόντων, αυξάνοντας έτσι την αρχική τους κινητική ενέργεια, έτσι ώστε να γίνει η ανίχνευση τους μετά από τη θραυσματοποίηση του αρχικού πρόδρομου πεπτιδίου. Ακολουθεί η διάταξη “post lift metastable suppressor” που απομακρύνει τα εναπομείναντα πρόδρομα ιόντα που δεν έχουν θραυσματοποιηθεί, εμποδίζοντας τον σχηματισμό μη επιθυμητών θραυσμάτων ιόντων. Τέλος, ακολουθεί και ο δεύτερος αναλυτής μάζας χρόνου πτήσης. Η υψηλή ακρίβεια της μεθοδολογίας lift δίνει MS/MS φάσματα με υψηλή διακριτική ικανότητα, ενώ το σύνολο των πληροφοριών μπορεί να ληφθεί στο επίπεδο των m/z σε μερικά δευτερόλεπτα (Εικόνα 20).

Τα τελευταία χρόνια η τεχνολογία της φασματομετρίας μάζας είναι ραγδαία εξελισσόμενη. Πρόκειται για εργαλείο με υψηλή ευαισθησία, ενώ γίνεται ανάλυση με ακρίβεια του μοριακού βάρους των πρωτεϊνών και ειδικότερα των πεπτιδίων. Στην περίπτωση που το γονιδίωμα του εξεταζόμενου οργανισμού έχει αλληλουχηθεί είναι εφικτή η ταυτοποίηση της πρωτεΐνης. Σε αντίθετη περίπτωση, το γονιδίωμα του οργανισμού είναι άγνωστο, η απομονωμένη πρωτεΐνη δύναται να αλληλουχηθεί με διαδοχικούς κύκλους φασματομετρίας μάζας. Μετά τον αρχικό προσδιορισμό του μοριακού βάρους, γίνεται πέψη με θρυψίνη προς σχηματισμό πεπτιδίων. Έπειτα, τα πεπτίδια διαχωρίζονται κατά τον πρώτο κύκλο της φασματομετρίας μάζας και στη συνέχεια το καθένα διασπάται με ιονικό βομβαρδισμό. Τα θραύσματα που προκύπτουν διαχωρίζονται σε ένα

δεύτερο κύκλο φασματομετρίας μάζας. Στη συνέχεια, τα δεδομένα από τις μάζες των πεπτιδίων συγκρίνονται απευθείας με τις Βάσεις Δεδομένων για γίνει η ταυτοποίηση των πρωτεϊνών (Purves et al., 1998; Aebersold and Mann, 2003; Knochenmuss, 2006).



Εικόνα 20: Σχηματική απεικόνιση λειτουργίας του φασματογράφου μάζας

9.5 Βάσεις Δεδομένων

Οι Βάσεις Δεδομένων αποτελούν ένα ακόμη εργαλείο της πρωτεομικής, καθώς παρέχουν έναν πλήρη κατάλογο όλων των πρωτεϊνών που έχουν βρεθεί σε διάφορους οργανισμούς. Αρχικά, γίνεται σύγκριση της μετρούμενης μάζας κάθε πεπτιδίου που προκύπτει από την πέψη των μελετώμενων πρωτεϊνών με τη μάζα των πεπτιδίων της Βάσης. Όταν το πεπτίδιο ταυτίζεται με κάποιο πεπτίδιο της Βάσης τότε μπορεί να προσδιοριστεί η πρωτεΐνη από την οποία έχει προέλθει και συνεπώς να γίνει ταυτοποίηση της άγνωστης πρωτεΐνης. Ωστόσο, ένα πεπτίδιο συνήθως δεν συναντάται μόνο σε μια πρωτεΐνη, έτσι απαιτούνται πολλαπλά ταιριάσματα από μια πρωτεΐνη για την ταυτοποίησή της. Επίσης, δεδομένου του εύρους λάθους στη μετρούμενη μάζα του πεπτιδίου, απαιτείται και μεγαλύτερος αριθμός ταιριασμάτων. Ο όγκος όμως των δεδομένων σε μια Βάση είναι αρκετά μεγάλος με αποτέλεσμα την ανάγκη δημιουργίας ισχυρών και γρήγορων αλγορίθμων που πραγματοποιούν εικονική πέψη των πρωτεϊνών της Βάσης (με βάση την αλληλουχία τους) και υπολογίζουν τη μάζα των πεπτιδίων που προκύπτουν. Εφόσον γίνει εισαγωγή των δεδομένων, εκτελείται ένα φίλτράρισμα στην Βάση που πραγματοποιεί τους απαραίτητους υπολογισμούς στις πρωτεΐνες που απομένουν. Τα πεπτίδια της Βάσης που ταιριάζουν με τις μετρούμενες μάζες ταξινομούνται σύμφωνα με τη

μάζα τους και όσα ανήκουν στο επιλεγμένο εύρος λάθους είναι τα «hits». Στη συνέχεια, για κάθε «hit» υπολογίζεται μια τιμή (σκορ) η οποία χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση της πρωτεΐνης που ταυτοποιείται. Αρκετές υπολογιστικές μέθοδοι μπορεί τώρα να χρησιμοποιηθούν για την ταυτοποίηση πεπτιδίων και πρωτεϊνών. Οι πιο δημοφιλείς βασίζονται στη χρήση των μηχανών αναζήτησης (Eng et al., 2011) και στις βάσεις δεδομένων πρωτεϊνικής αλληλουχίας, αλλά υπάρχουν και άλλες προσεγγίσεις, όπως η *de novo* αλληλούχηση (χρησιμοποιείται ειδικά όταν το γονιδίωμα του οργανισμού που μελετήθηκε δεν είναι γνωστό) (Hughes et al., 2010; Seidler et al., 2010) και οι αναζητήσεις σε βιβλιοθήκες με φάσματα (Lam 2011; Lam and Aebersold, 2011). Ως αποτέλεσμα, υπάρχουν πολλές εφαρμογές λογισμικού που έχουν καθιερωθεί όπως Mascot (Perkins et al., 1999), X!Tandem (Craig and Beavis, 2004), Sequest (Eng et al., 1994), MyriMatch (Tabb et al., 2007), SpectraST (Lam and Aebersold, 2011), OMSSA (Geer et al., 2004), and Andromeda (Cox et al., 2011).

10. Σκοπός

Ο δάκος της ελιάς είναι ο σημαντικότερος εχθρός της ελαιοπαραγωγής και οι καταστροφικές του συνέπειες τον καθιστούν στόχο συστηματικού ελέγχου, κυρίως με χρήση χημικών εντομοκτόνων. Για την καταπολέμηση του εντόμου τα προηγούμενα έτη έχει γίνει εκτεταμένη χρήση οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων, πυρεθρινών και πρόσφατα του νατουραλίτη spinosad. Εκτός από τις βλαβερές επιπτώσεις των εντομοκτόνων στο περιβάλλον, η υπερβολική και η μη ορθολογική χρήση τους έχει δημιουργήσει και ένα έντονο πρόβλημα ανθεκτικότητας των εντόμων στα εντομοκτόνα. Στις πιο φιλικές προς το περιβάλλον μεθόδους καταπολέμησης κατατάσσεται η SIT (Sterile Insect Technique) που προϋποθέτει τη μαζική εκτροφή και εξαπόλυση στείρων εντόμων στη φύση. Στο παρελθόν, η τεχνική αυτή έχει επιχειρηθεί στο δάκο χωρίς επιτυχία. Απαραίτητη προϋπόθεση αποτελεσματικής εφαρμογής της SIT αποτελεί ο διαχωρισμός των δύο φύλων. Χρήσιμες είναι, επίσης,

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

νέες διαγονιδιακές τεχνολογίες δημιουργίας υπο-συνθήκη θανατογόνων στελεχών. Δεδομένου ότι οι πληροφορίες για το γονιδίωμα του δάκου είναι ελάχιστες και οδηγούν στην έλλειψη μοριακών και γενετικών εργαλείων, πραγματοποιήθηκε μια βασική τρανσκριπτομική και πρωτεομική ανάλυση αφενός αρσενικών και θηλυκών δάκων, αφετέρου ανθεκτικών και ευαίσθητων στο εντομοκτόνο spinosad δάκων. Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι η ανάπτυξη εργαλείων που θα βοηθήσουν τις προσπάθειες εφαρμογής της SIT αλλά και ο εντοπισμός και η απομόνωση γονιδίων του δάκου που εμπλέκονται είτε σε μονοπάτια φυλοδιαχωρισμού είτε ανθεκτικότητας στο εντομοκτόνο spinosad. Απώτερος στόχος της παρούσας μελέτης είναι η δημιουργία ενός στελέχους δάκου που θα προκαλεί το θάνατο των θηλυκών στο στάδιο του εμβρύου ώστε να βελτιστοποιηθεί η SIT στο δάκο και να ελαχιστοποιηθεί το κόστος παραγωγής των προς εξαπόλυση εντόμων. Παράλληλα, οι γενετικοί τόποι που εμπλέκονται σε συστήματα φυλοδιαχωρισμού αλλά και φυλοκαθορισμού, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για το διαχωρισμό των δύο φύλων του εντόμου σε πρώιμο αναπτυξιακά στάδιο. Η υλοποίηση της συγκεκριμένης ιδέας μπορεί να είναι εφικτή με τη χρήση ειδικών μοριακών ως ένα διαγνωστικό μέσο προσδιορισμού του φύλου στα αναπτυξιακά στάδια όπου δεν είναι εφικτό να συμβεί από τα μορφολογικά χαρακτηριστικά του εντόμου.



**ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ
ΜΕΘΟΔΟΙ**

1. Καλλιέργεια εντόμων *Bactrocera oleae*

1.1 Εργαστηριακός πληθυσμός

Στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας καλλιεργείται και εκτρέφεται για περίπου 15 χρόνια ο εργαστηριακός πληθυσμός του εντόμου *Bactrocera oleae*. Το στέλεχος προέρχεται από την αποικία του Εργαστηρίου Εντομολογίας του ΕΚΕΦΕ 'Δημόκριτος' με κωδικό ΑΤ (από τα αρχικά της Αγίας Τριάδας Ευβοίας, περιοχή όπου συλλέχθηκε ο φυσικός πληθυσμός) που εγκαθιδρύθηκε στο εντομοτροφείο πριν από περίπου 40 χρόνια. Η καλλιέργεια του εντόμου διατηρείται σε θάλαμο σταθερής θερμοκρασίας $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, σχετικής υγρασίας $65\% \pm 5^{\circ}\text{C}$ και συγκεκριμένη φωτοπερίοδο 12:12 (φως:σκοτάδι) (Tzanakakis, 1989).

1.2 Καλλιέργεια ανθεκτικού πληθυσμού στο εντομοκτόνο spinosad

Ένα ακόμη στέλεχος δάκου με ανθεκτικότητα στο εντομοκτόνο spinosad εδραιώθηκε στο εργαστήριο. Τα έντομα προέρχονταν από τον προαναφερόμενο εργαστηριακό πληθυσμό και είχαν εμπλουτισθεί με ~1000 μύγες άγριου πληθυσμού από την Αργαλαστή (Πήλιο, Ελλάδα). Αρχικά, στα έντομα χορηγήθηκαν μέσω της τροφής τους (με διάλυση του εντομοκτόνου στο νερό) βαθμιαία αυξανόμενες δόσεις του spinosad που έπειτα από 10 γενιές έφτασαν στα 0.04 g/ml. Η συγκεκριμένη δόση ανθεκτικότητας/επιλογής στο spinosad αντιστοιχεί περίπου στο 2x της συνιστώμενης δόσης σε συνθήκες αγρού ώστε να επιφέρει το 100% της θνησιμότητας. Επίσης, αντιστοιχεί στο 125x του LC50 του ευαίσθητου εργαστηριακού πληθυσμού. Η αποικία διατηρήθηκε για ~22 γενιές υπό συνεχή επιλογή με spinosad στην προαναφερμένη δόση. Με σκοπό να αυξηθεί η ανθεκτικότητα του στελέχους στο εντομοκτόνο spinosad, η αποικία εμπλουτίστηκε για δεύτερη φορά με άγριο πληθυσμό από την περιοχή Sonoma County (CA, USA), καθώς στην συγκεκριμένη περιοχή είχε στο παρελθόν δείχτει ότι έχει το υψηλότερο επίπεδο ανθεκτικότητας στο spinosad (Kakani et al., 2010). Έξι

μήνες αργότερα, η αποικία ουσιαστικά κατέρρευσε και ανακτήθηκε από ένα θηλυκό έντομο (χωρίς επιλογή στο spinosad). Στη συνέχεια, οι απόγονοι του εντόμου αυτού τέθηκαν υπό βαθμιαία αυξανόμενες ποσότητες του spinosad και έπειτα από μόνο 4 γενιές η αποικία ανέκτησε τα προηγούμενα επίπεδα ανθεκτικότητας (0.04 g/ml). Μετά από συνολικά 46 γενιές, ελήφθη μια πιο ακριβής εκτίμηση του ποσοστού ανθεκτικότητας (Resistance Ratio, RR) μέσω βιοδοκιμών επαφής του εντομοκτόνου όπως περιγράφεται από τους Kakani et al., 2010, και βρέθηκε πως το επίπεδο ανθεκτικότητας είχε φτάσει σε 35x. Τέλος, το φθινόπωρο του 2012, εντελώς απρόσμενα και χωρίς προφανείς αλλαγές στις συνθήκες του εντομοτροφείου, η ανθεκτική στο spinosad αποικία εξαλείφθηκε. Αρχικά, διαπιστώθηκε ότι τα θηλυκά έντομα δεν μπορούσαν να γεννήσουν στον προσφερόμενο κερωμένο κώνο, ενώ ο αριθμός τόσο των αρσενικών αλλά και των θηλυκών ενήλικων εντόμων άρχισε να μειώνεται. Το συγκεκριμένο χρονικό διάστημα, έγιναν προσπάθειες εμπλουτισμού με νέα έντομα άγριου πληθυσμού που παρελήφθησαν από την Καλιφόρνια αλλά μετά από τρεις περίπου συνεχόμενους μήνες οι τελευταίες ενήλικες μύγες πέθαναν χωρίς να δώσουν απογόνους.

1.3 Κύκλος ζωής σε εργαστηριακές συνθήκες

Ενήλικα άτομα του πληθυσμού (~200 άτομα) διατηρούνται σε ξύλινο κλωβό διαστάσεων τουλάχιστον 30 cm x 30 cm x 30 cm (7- 8 άτομα/lit), (Hagen et al., 1963). Ο κλωβός διαθέτει ανοίγματα στις πλάγιες πλευρές όπου τοποθετείται ειδικό δίχτυ ώστε να εξασφαλίζεται ο αερισμός των εντόμων. Στα έντομα παρέχεται τροφή ενηλίκων σε στερεά μορφή μέσα σε τρυβλίο petri (Tsitsipis and Kontos, 1983) και το νερό προσλαμβάνεται μέσω απομύζησης από συνεχώς εμποτιζόμενο wettex που τοποθετείται μέσα σε πλαστικό δοχείο (Tzanakakis, 1989). Στο κέντρο και κατά ύψους του κλωβού τοποθετείται ειδικός κώνος από οργανίνα, εμβαπτισμένος (κερωμένος) σε μίγμα παραφίνης ώστε να δημιουργείται μια λεπτή στρώση διαπερατή από τον ωσθέτη των εντόμων. Ο κώνος είναι το υλικό φωτοκίας για τα θηλυκά ενήλικα έντομα και έχει εκατέρωθεν ανοίγματα για να γίνεται η συλλογή των αυγών (Economopoulos and

Tzanakakis, 1967). Στην κορυφή του κώνου τοποθετείται νωπός σπόγγος για να εξασφαλίζει την απαραίτητη υγρασία για τα αυγά που παραμένουν στο εσωτερικό του. Τα ενήλικα έντομα είναι ώριμα σεξουαλικά και έτοιμα για αναπαραγωγή τέσσερις μέρες περίπου μετά την εκκόλασή τους. Η καλύτερη περίοδος συλλογής των αυγών είναι από την έβδομη ως και τη δέκατη πέμπτη μέρα της ενήλικης ζωής των εντόμων. Ο κώνος αποτελεί μια προσομοίωση του καρπού της ελιάς όπου το θηλυκό έντομο τον διατρύπα με τον ωοθέτη του αφήνοντας στο εσωτερικό τα αυγά του. Τα αυγά συλλέγονται κάθε ημέρα με dH₂O το οποίο ξεπλένει και παρασύρει τα αυγά από την κορυφή του κώνου σε τρυβλίο petri. Στη συνέχεια, τα αυγά μεταφέρονται με πουάρ Pasteur σε διηθητικό χαρτί που έχει διαβρεχτεί με διάλυμα προπιονικού οξέος 0,3% και επωάζονται για 48 ώρες περίπου σε υψηλή σχετική υγρασία 90% (Manoukas and Mazomenos, 1977). Η επώαση στο προπιονικό οξύ αποτελεί βασικό βήμα καθώς χρησιμοποιείται για την προστασία από μύκητες αλλά και εξασφαλίζεται η μείωση της θνησιμότητας των αυγών μέχρι την ολοκλήρωση της εμβρυογένεσης. Οι προνύμφες μεταφέρονται έπειτα σε τροφή προνυμφών σε δοχεία που αερίζονται επαρκώς (Tsitsipis, 1975; Tzanakakis, 1989) για περίπου 8 ημέρες μέχρι να νυμφωθούν. Τέλος, οι νύμφες συλλέγονται, τοποθετούνται σε τρυβλία petri και μεταφέρονται σε νέο κλωβό ώσπου να μεταμορφωθούν σε ενήλικα έντομα και να συνεχιστεί η καλλιέργεια. Ο κύκλος ζωής στο εργαστήριο διαρκεί περίπου ένα μήνα ενώ η διατήρηση των νυμφών σε χαμηλές θερμοκρασίες (16°C) μπορεί να τον επιβραδύνει.

1.3.1 Υλικά

- Κλωβός καλλιέργειας
- Οργαντίνα για τον κώνο
- Τρυβλία petri
- Πουάρ Pasteur
- Πλαστικά δοχεία νερού
- Wettex
- Μίγμα παραφίνης (1kg): παραφίνη σημείου τήξεως 52-54°C (0,85kg), παραφίνη σημείου τήξεως 46-48°C (0,085kg), φυσικό κερί μέλισσας (0,065kg)

- Τροφή ενηλίκων (~1kg): υδρολυμένη μαγιά 200 gr, ζάχαρη άχνη 800gr, κρόκος αυγού σκόνη 60gr, στρεπτομυκίνη 0,5gr
- Τροφή προνυμφών (~1kg): νερό 550ml, μαγιά μύρας 75 gr, υδρολυμένη σόγια 30gr, ζάχαρη 20 gr, κυτταρίνη 275 gr, νιπαγίνη 2gr, σορβικό κάλιο 0,5 gr, ελαιόλαδο 20 ml, Tween-80 7,5 ml, HCl 2N 30 ml

2.Βιοδοκιμές

2.1 Βιοδοκιμές μέσω τροφής -κατάποσης με GF – 120

Για κάθε συγκέντρωση εντομοκτόνου, τοποθετούνται περίπου 20 μύγες σε μικρά κλουβιά (~10 x10 cm²). Για τις βιοδοκιμές τα ενήλικα έντομα (μισά αρσενικά και μισά θηλυκά) θα πρέπει να είναι ηλικίας περίπου 7 ημερών. Πριν από την βιοδοκιμή οι μύγες ακινητοποιούνται είτε με CO₂ ή με την τοποθέτηση τους σε θάλαμο χαμηλής θερμοκρασίας (2-4°C) για μικρό χρονικό διάστημα (5-8 min). Τα έντομα τίθενται σε νηστεία από τροφή και νερό για περίπου 30 ώρες πριν από τη βιοδοκιμή και τα κλουβιά διατηρούνται σε ελεγχόμενες συνθήκες θερμοκρασίας 23-25°C και υγρασίας 65%. Πριν το πέρας της νηστείας παρασκευάζονται οιαραιώσεις του spinosad με προσθήκη μιας προσελκυστικής ουσίας (Entomela) σε τελική συγκέντρωση 6%. Σε μικρά πλαστικά μπουκάλια (~5ml) τοποθετείται ένα πόμα από βαμβάκι και προστίθενται 2ml από κάθε αραιώση του spinosad. Μόλις ολοκληρωθούν οι 30 ώρες νηστείας τοποθετούνται τα μπουκάλια με τις δόσεις του spinosad σε κάθε κλουβί για ακριβώς 24 ώρες. Το spinosad έπειτα αντικαθίσταται με νερό και επίσης προστίθεται ένα μικρό δοχείο (erpendorf ή πόμα από 15ml falcon) με κρυσταλλική ζάχαρη και παραμένει για 48 ώρες. Τέλος, μετά από 3 ημέρες ή 72 ώρες μετά την έναρξη του πειράματος, μετράται ο αριθμός των νεκρών και των ζωντανών εντόμων.

2.1.1 Προετοιμασία των αραιώσεων

Το εμπορικό σκεύασμα του spinosad, GF-120, έχει συγκέντρωση 0.024 % w/v, με τη συνιστώμενη δόση σε συνθήκες αγρού (1x) 100 ml/5L H₂O που

ισοδυναμεί με 1 ml/50 ml H₂O ή 0,2 ml/10 ml H₂O. Το αρχικό διάλυμα είναι πολύ παχύρρευστο και για να παρασκευαστούν 10ml 1x σε 15ml Falcon, θα πρέπει να γίνει πολύ αργή αναρρόφηση των 0,2 ml με P -1000 (συστήνεται να κοπεί η άκρη του tip). Το ειδικό βάρος είναι ~1g/ml και έτσι μπορεί να υπάρξει ακρίβεια στη μέτρηση της ποσότητας (τα 0,2 ml θα πρέπει να ζυγίζουν 0,2 g). Το GF-120 στη συνιστώμενη δόση περιέχει αρκετό υλικό προσέλευσης, ωστόσο με τις διαδοχικές αραιώσεις του spinosad η συγκέντρωση του προσελκυστικού αραιώνεται και πρέπει να αντικαθίσταται. Χρησιμοποιείται Entomela σε συγκέντρωση 6%, προστίθενται 3 ml Entomela σε 50 ml νερό (ποσότητα για περίπου 10 αραιώσεις spinosad). Το ιξώδες είναι υψηλό και στο Entomela και ακολουθείται η ίδια τακτική των αραιώσεων, όπως προαναφέρεται για το spinosad. Αρχικά, σε ένα falcon 15ml προστίθενται 5 ml 1x διάλυμα εντομοκτόνου και 5ml 6% Entomela (είναι η δόση ½x). Στη συνέχεια, χρησιμοποιούνται κάθε φορά 5ml από την προηγούμενη αραιώση και προστίθενται 5 ml διαλύματος 6% Entomela, ώστε σε κάθε νέο διάλυμα να έχουμε τη μισή ποσότητα (συγκέντρωση) από την προηγούμενη αραιώση, ενώ η συγκέντρωση του Entomela διατηρείται σταθερή στο 6%.

Ο ακόλουθος Πίνακας 1 συνοψίζει τις αραιώσεις:

Πίνακας 1: Αραιώσεις βιοδοκιμών μέσω τροφής-κατάποσης με GF-120		
Δόση	GF-120	6% Entomela
(½) x (A)	5 ml +GF-120 1x	5 ml
(¼) x (B)	5 ml + A	5 ml
(1/8) x (C)	5 ml +B	5 ml
(1/16) x (D)	5 ml +C	5 ml
(1/32) x (E)	5 ml +D	5 ml
(1/64) x (F)	5 ml +E	5 ml
(1/128) x (G)	5 ml +F	5 ml
(1/256) x (H)	5 ml +G	5 ml
(1/512)x (I)	5 ml +H	5 ml
(1/1024)x (J)	5 ml +I	5 ml

2.2 Βιοδοκιμές με τοπική εφαρμογή

Για κάθε συγκέντρωση εντομοκτόνου, τοποθετούνται περίπου 20 μύγες σε μικρούς κλωβούς (~10 x 10 cm²). Για τις βιοδοκιμές τα ενήλικα έντομα (μισά αρσενικά και μισά θηλυκά) θα πρέπει να είναι ηλικίας 4-7 ημερών χωρίς να αλλάζει κάτι στη διατροφή τους. Οι αραιώσεις του spinosad παρασκευάζονται με διάλυση σε ακετόνη (όπως περιγράφεται παρακάτω) και διατηρούνται σε σκοτεινά δοχεία (ή σε erpendorf που καλύπτεται με φύλλο αλουμινίου) στους 4 °C για περίπου ένα μήνα. Τα έντομα (1 κλουβί/φορά) ακινητοποιούνται είτε με CO₂ ή με την τοποθέτησή τους σε ένα κρύο κουτί (2-4°C) για μικρό χρονικό διάστημα (5-10 min). Οι αναισθητοποιημένες μύγες τοποθετούνται σε τρυβλίο Petri και τους χορηγείται 1μl από τις αντίστοιχες δόσεις spinosad στο μεσονώτο τους. Έπειτα, εισάγονται στους κλωβούς και μετά από 24 ώρες προσδιορίζεται/καταμετράται ο αριθμός των νεκρών και ζωντανών εντόμων.

2.2.1 Προετοιμασία των δόσεων

Το σκεύασμα που χρησιμοποιείται είναι το spinosad technical (Dow AgroSciences), είναι στερεάς μορφής και περιέχει σπινουσίνη A και σπινουσίνη D σε ποσοστό 82.1% και 13.6% αντίστοιχα. Οι δύο ουσίες είναι διαλυτές και η αρχική συγκέντρωση (1x), θα πρέπει να έχει 240ng δραστικής ουσίας ανά μl. Για να παρασκευαστούν 5 ml διαλύματος συγκέντρωσης 1x, σε σωλήνα falcon (15 ml) ζυγίζονται 0.0012g Spinosad σκόνη, προστίθενται 5 ml ακετόνης και γίνεται διάλυση με καλή ανάδευση (vortex). Για τις επόμενες αραιώσεις αναμειγνύονται 0,5 ml μιας αραιώσης Spinosad με 0,5 ml ακετόνης ώστε να προκύψει το ½x της προηγούμενης συγκέντρωσης. Οι αραιώσεις συνοψίζονται στον Πίνακα 2.

Στατιστική ανάλυση: Το πρόγραμμα NCSS (<http://www.ncss.com>) χρησιμοποιήθηκε για τη στατιστική ανάλυση των βιοδοκιμών. Το στατιστικό πακέτο Probit χρησιμοποιείται για την ανάλυση των βιοδοκιμών με τα εισερχόμενα δεδομένα να είναι η δόση του εντομοκτόνου, ο αριθμός των εντόμων που χρησιμοποιήθηκαν στη βιοδοκιμή και τέλος, ο αριθμός των εντόμων που παρουσίασαν απόκριση

ενδιαφέροντος (π.χ., επέζησαν της δόσης του εντομοκτόνου). Τα εξερχόμενα αποτελέσματα περιλαμβάνουν τα γραφήματα και δεδομένα που περιγράφουν τα όρια εμπιστοσύνης της αποτελεσματικής δόσης (95% Confidence Limits). Έπειτα, γίνεται μαθηματικός υπολογισμός του Resistance Ratio των εξεταζόμενων πληθυσμών των εντόμων.

- Το μοριακό τους βάρος προτιμάται να είναι μικρό. Τα μικρού μοριακού βάρους πλασμίδια έχουν μεγάλη ικανότητα μετασχηματισμού και το αντίστροφο.
- Οι πλασμιδιακοί φορείς που χρησιμοποιούνται στην κλωνοποίηση μπορούν να διαχωριστούν σε τρεις ομάδες με βάση τα άκρα που παρουσιάζουν δηλαδή, συμπληρωματικά, τυφλά και άκρα θυμίνης (χρησιμοποιούνται στην κλωνοποίηση προϊόντων PCR).

Δόση	Δ/μα Spinosad	Ακετόνη
1/2x	0.5 ml διάλυμα 1x	0.5 ml
1/4x	0.5 ml διάλυμα 1/2x	0.5 ml
1/8x	0.5 ml διάλυμα 1/4x	0.5 ml
1/16	0.5 ml διάλυμα 1/8x	0.5 ml
1/32	0.5 ml διάλυμα 1/16x	0.5 ml
1/64	0.5 ml διάλυμα 1/32x	0.5 ml
1/128	0.5 ml διάλυμα 1/64x	0.5 ml
1/256	0.5 ml διάλυμα 1/128x	0.5 ml

3. Πλασμιδιακή κλωνοποίηση

3.1 Πλασμίδιο

Τα πλασμίδια είναι μικρά, κυκλικά, δίκλιωνα μόρια DNA που μπορούν να αναπτύσσονται ημι-αυτόνομα σε βακτήρια. Ένα τυπικό πλασμίδιο-φορέας κλωνοποίησης μπορεί να περιέχει:

- Μια περιοχή *ori* (origin of replication) για ανεξάρτητη έναρξη της αντιγραφής, ώστε να μπορεί να αντιγράφεται στο βακτηριακό κύτταρο ανεξάρτητα από το βακτηριακό χρωμόσωμα.
- Ένα γονίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα σε ένα (ή και περισσότερα) αντιβιοτικά για δυνατότητα εργαστηριακής επιλογής (π.χ. Amp, Tet, Kan) (Bolivar et al., 1977; Bernard, 1995).
- Ένα γονίδιο αναφοράς, συνήθως το γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης, που επιτρέπει την ταυτοποίηση των βακτηρίων που έχουν προσλάβει το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο.
- Μια περιοχή πολυσυνδέτη. Η περιοχή αυτή περιέχει τις θέσεις αναγνώρισης πολλών ενζύμων περιορισμού ώστε να μπορεί να καταταμηθεί και να ενσωματώσει ένα ξένο τμήμα DNA.

3.2 Συμπληρωματικά ή τυφλά άκρα

Η διαδικασία περιλαμβάνει κατάτμηση με την κατάλληλη ενδονουκλεάση περιορισμού σε συγκεκριμένη θέση του πολυσυνδέτη ώστε να δημιουργηθούν τα επιθυμητά άκρα και απομάκρυνση των ακραίων φωσφορικών ομάδων ώστε να αποτραπεί η επανακυκλοποίηση του γραμμοποιημένου πλασμιδίου. Η αποφωσφορυλίωση του φορέα πραγματοποιείται με το ένζυμο αλκαλική φωσφατάση, μια διμερή γλυκοπρωτεΐνη (CI- Calf Intestinal), η οποία καταλύει την αφαίρεση των φωσφορικών ομάδων από τα 5' άκρα του πλασμιδίου, εμποδίζοντας με αυτόν τον τρόπο το σχηματισμό φωσφοδιεστερικών δεσμών με τα ελεύθερα 3' άκρα του και συνεπώς την επανακυκλοποίησή του (Seeburg et al., 1977; Ullrich et al., 1977).

3.3 Φορέας T- άκρων

Η διαδικασία περιλαμβάνει την κατάτμηση του πλασμιδίου με ενδονουκλεάση περιορισμού σε θέση του πολυσυνδέτη η οποία δημιουργεί τυφλά άκρα και την επώαση του γραμμοποιημένου φορέα με Taq πολυμεράση παρουσία dTTPs, ώστε να προστεθούν στα 3' άκρα βάσεις θυμίνης (3'-T overhangs). Η μέθοδος εκμεταλλεύεται την ιδιότητα των κοινών Taq DNA πολυμερασών (μη επιδιορθωτικού ελέγχου- non proof reading) να προσθέτει δεοξυαδενοσίνες στο 3' άκρο των δίκλωνων DNA μορίων (Aslanidis and de Jong, 1990) με αποτέλεσμα η υποκλωνοποίηση των προϊόντων PCR να πραγματοποιείται σε γραμμικό πλασμίδιο που έχει προεξέχοντα 3'-T άκρα.

3.4 Αντίδραση σύνδεσης μορίων DNA

Η κατασκευή ενός ανασυνδυασμένου πλασμιδίου στην πιο απλή της μορφή περιλαμβάνει μια διαμοριακή αντίδραση, στην οποία το ένα άκρο ενός γραμμικού πλασμιδιακού φορέα συνδέεται με το ένα άκρο του ενθέματος με τη δράση DNA λιγάσης για το σχηματισμό μιας DNA χίμαιρας και ακολουθείται από κυκλοποίηση με την πρόσδεση των δύο εναπομείναντων άκρων. Η σύνδεση πραγματοποιείται με το σχηματισμό τεσσάρων φωσφοδιεστερικών δεσμών μεταξύ των 5' φωσφορικών καταλοίπων (5'-P) και των 3' υδροξυλομάδων (3'-OH) στην περίπτωση όπου ο φορέας δεν έχει υποστεί αποφωσφορλίωση (διαφορετικά σχηματίζονται δύο δεσμοί). Ο σχηματισμός των δεσμών αυτών in vitro καταλύεται από τα ένζυμα: α. DNA λιγάση της *E. coli* και β. DNA λιγάση του βακτηριοφάγου T4 με ταυτόχρονη υδρόλυση ενός μορίου NAD και ενός μορίου ATP, αντίστοιχα. Η T4 DNA λιγάση είναι το ένζυμο που χρησιμοποιείται κυρίως διότι έχει την ικανότητα να καταλύει τη σύνδεση άκρων όλων των ειδών (τυφλά, προεξέχοντα 3' ή 5') (Sgaramella & Khorana, 1972; Sgaramella & Ehrlich, 1978) σε αντίθεση με τη λιγάση της *E. coli* που καταλύει την σύνδεση μόνο τυφλών άκρων.

Στις αντιδράσεις αυτές χρησιμοποιούνται τεχνικά πλασμίδια που φέρουν ιδιαίτερα χαρακτηριστικά. Τα τεχνικά πλασμίδια, μεγέθους περίπου τις 3000 bp, περιέχουν ένα γονίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα σε κάποιο κοινό αντιβιοτικό (π.χ. αμπικιλίνη) και μία περιοχή πολυσυνδέτη μεγέθους περίπου 100 νουκλεοτιδίων που περιλαμβάνει θέσεις αναγνώρισης ενζύμων περιορισμού. Η αλληλουχία αυτή επιτρέπει την κλωνοποίηση στο πλασμίδιο τμημάτων DNA με συμπληρωματικά άκρα. Ο φορέας που χρησιμοποιείται είναι ο pBluescript II, ο οποίος έχει τροποποιηθεί ώστε να έχει προεξέχοντα άκρα θυμίνης. Έτσι ο φορέας έχει συμπληρωματικά άκρα με προϊόντα PCR που θέλουμε να κλωνοποιήσουμε καθώς η Taq πολυμεράση έχει την ιδιότητα να προσθέτει μία αδενίνη στο τέλος της αντιγραφής (Clark, 1988).

3.5 pBluescript II KS(+)

Ο συγκεκριμένος φορέας χαρακτηρίζεται από τη μεγάλη ποικιλία θέσεων αναγνώρισης ενζύμων

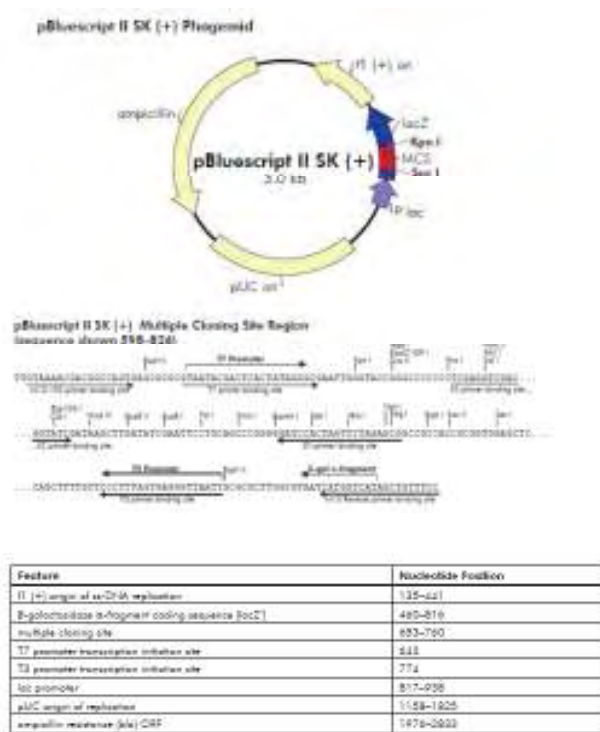
περιορισμού για την κλωνοποίηση των ενθεμάτων και την παρουσία των υποκινητών/εκκινητών T3 και T7 εκατέρωθεν της θέσης κλωνοποίησης. Γι' αυτό χρησιμοποιείται ευρέως για την κλωνοποίηση μορίων DNA με σκοπό είτε την ανάλυση του προτύπου τμηματοποίησης τους από ενδονουκλεάσες περιορισμού, είτε τον προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής τους σύστασης με εκκινητές T3 και T7, είτε την in vitro μεταγραφή τους από RNA πολυμεράσες που αναγνωρίζουν αυτούς τους υποκινητές. Επιπλέον, η θέση κλωνοποίησης βρίσκεται στην κωδική περιοχή του γονιδίου LacZ, με αποτέλεσμα να επιτρέπεται η επιλογή των ανασυνδυασμένων βακτηριακών αποικιών ανιχνεύοντας τη β-γαλακτοσιδάση (παρουσία X-gal) στις μη ανασυνδυασμένες αποικίες (Εικόνα 21).

Κατά τη διάρκεια της αντίδρασης σύνδεσης τόσο τα εξωγενή τμήματα DNA όσο και τα πλασμίδια έχουν την τάση επανακυκλοποίησης προς τον σχηματισμό τυχαίων oligομερών. Γι αυτό κρίνεται απαραίτητη η προσθήκη κατάλληλης αναλογίας ενθέματος/φορέα. Η ποσότητα του ενθέματος που απαιτείται σε ng, εξαρτάται από τον τύπο του πλασμιδίου και υπολογίζεται από τον τύπο:

$$\text{ng ενθέματος} = \frac{\text{ποσότητα φορέα ng} \times \text{μέγεθος ενθέματος (Kb)}}{\text{μέγεθος φορέα (Kb)}} \times 3/1$$

Σημείωση: Η αναλογία μπορεί να φτάσει και 8/1.

Η αντίδραση επηρεάζεται από μία σειρά από παραμέτρους όπως η θερμοκρασία, η συγκέντρωση των ιόντων, το είδος των άκρων του DNA, η σχετική συγκέντρωση των άκρων DNA και η συγκέντρωση και το μοριακό βάρος των κομματιών DNA.



Εικόνα 21: Γραφική αναπαράσταση του πλασμιδιακού φορέα pBluescript II KS(+). Ο φορέας φέρει πολλαπλές θέσεις κλωνοποίησης των ενθεμάτων (MCS) στην κωδική περιοχή του γονιδίου της β-γαλακτοσιδάσης (LacZ), υποκινητές/εκκινητές T3 και T7, θέσεις έναρξης της αντιγραφής (f1 και PUC), υποκινητή του γονιδίου LacZ και γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη (Amp^R), ως δείκτης επιλογής.

3.6 Αντίδραση σύνδεσης

DNA: Φορέας Bluescript II	3:1 – 8:1
Buffer 10 x T4 λιγάσης	1x
T4 λιγάση (1u/μl, Fermentas)	1unit
ddH ₂ O	-
Τελικός	10 μl

- Σε σωληνάκι erppendorf προστίθενται 1,2 μl φορέα pBluescript II συγκέντρωσης 35 ng/μl, 1 μl buffer T4 λιγάσης, 1unit T4 λιγάση, κατάλληλη ποσότητα ενθέματος, ddH₂O ώστε να συμπληρωθεί ο τελικός όγκος της αντίδρασης.
- Το μείγμα αναδεύεται και επωάζεται στους 22°C για 2,5 ώρες.
- Το ένζυμο απενεργοποιείται είτε με θέρμανση στους 65°C για 15 λεπτά είτε ψύχεται στους -20°C.

3.7 Κλωνοποίηση σε πλασμιδιακούς φορείς-μετασχηματισμός βακτηρίων με ανασυνδυασμένα πλασμίδια

Η ανάπτυξη των τεχνικών εισαγωγής ανασυνδυασμένου DNA σε κοινούς εργαστηριακούς οργανισμούς, όπως το βακτήριο *E.coli*, επέτρεψε την αποτελεσματική πραγματοποίηση των τεχνικών κλωνοποίησης. Χωρίς την εισαγωγή τους σε βακτήρια, τα μόρια DNA που έχουν σχηματιστεί *in vitro* με DNA λιγάση, θα καταστρέφονταν μέσα σε λίγες ώρες. Οι μικροοργανισμοί από τη φύση τους έχουν την ικανότητα να ανταλλάσσουν γενετικό υλικό. Η ανταλλαγή γενετικής πληροφορίας μεταξύ βακτηρίων γίνεται με σύζευξη, επαγωγή και μετασχηματισμό. Για να πραγματοποιηθεί η κλωνοποίηση χρησιμοποιήθηκε ο μετασχηματισμός.

Μετασχηματισμός καλείται η κληρονομήσιμη αλλαγή στις ιδιότητες ενός βακτηριακού στελέχους που προέρχεται από τη μεταφορά DNA ενός άλλου βακτηρίου. Η απελευθέρωση τμημάτων DNA που προκύπτει από λύση και θάνατο κυττάρων, προσφέρει μια φυσική πηγή γενετικού υλικού για ανασυνδυασμό κατά την αύξηση των μικροοργανισμών στο φυσικό τους περιβάλλον. Ο γενετικός αυτός μετασχηματισμός έχει παρατηρηθεί σε μια πληθώρα βακτηρίων που κατά τη διάρκεια της αύξησης εισέρχονται σε ένα στάδιο δεκτικότητας στο οποίο δύνανται να προσλάβουν εξωγενές DNA. Δεκτικά βακτηριακά κύτταρα είναι σε θέση να προσδέσουν νουκλεϊκά οξέα σε μορφή που είναι ανθεκτική στη δράση νουκλεασών. Σε διάφορα στελέχη βακτηρίων έχουν βρεθεί πρωτεΐνες που προσδέονται στο DNA και που η λειτουργία τους είναι αναγκαία για την αρχική φάση του μετασχηματισμού. Μετά την πρόσληψή του από ένα βακτηριακό κύτταρο, το DNA εισέρχεται σε μία περίοδο που λέγεται εκλειπτική φάση κατά την οποία παραμένει ανθεκτικό στη δράση νουκλεασών αλλά δεν εκφράζεται η γενετική του πληροφορία. Κατά τη διάρκεια της περιόδου αυτής γίνεται ανασυνδυασμός του DNA με ομόλογες αλληλουχίες στο βακτηριακό χρωμόσωμα. Μετά την ολοκλήρωση του ανασυνδυασμού, η γενετική πληροφορία που βρίσκεται ενσωματωμένη στο βακτηριακό

χρωμόσωμα μπορεί να εκφραστεί έχοντας σαν αποτέλεσμα την εμφάνιση του λειτουργικού μετασηματισμένου κυττάρου.

3.7.1 Παρασκευή δεκτικών κυττάρων για κλωνοποίηση

3.7.1.1 Υλικά

- LB Broth
 - NaCl
 - ddH₂O
 - glycerol stock DH5α
 - glycerol 10%
- μικροβιολογικός κρίκος
- Τρυβλία, Falcon, κυψελίδες για ηλεκτροδιάτρηση, κυψελίδες για φωτομέτρηση, κωνικές φιάλες, σωλήνες
 - Bacto-tryptone
 - Bacto-yeast extract
 - NaCl
 - KCl δ/μα 250mM pH:7.2 αποστειρωμένο
 - MgCl₂2M
 - Glucose 1M
 - LB άγαρ
 - Stock αμικιλίνης (100mg/lit)
 - Φορέας pUC-19
 - X-gal,IPTG

3.7.1.2 Μέθοδος

➤ Παρασκευή θρεπτικού υλικού για την ανάπτυξη των κυττάρων LB Broth (χωρίς αμικιλίνη): Για την παρασκευή ~20 κυττάρων σε μία κωνική φιάλη προστίθενται 1,5gr LB Broth, 0,5gr NaCl και 100ml ddH₂O και το διάλυμα αποστειρώνεται.

➤ Σε αποστειρωμένο σωλήνα προστίθεται 1ml θρεπτικού υλικού και ακολουθεί ενοφθαλμισμός των DH5α δεκτικών κυττάρων από το στοκ γλυκερόλης με μικροβιολογικό κρίκο.

➤ Στη συνέχεια τα κύτταρα επωάζονται σε 210 rpm και 37°C κατά τη διάρκεια της νύκτας.

➤ Έπειτα, προστίθεται 1ml καλλιέργειας ανά 100ml θρεπτικού υλικού σε κωνική φιάλη και ακολουθεί

επώαση στους 37°C με ανάδευση σε 180 rpm για 2,5 ώρες.

➤ Ακολούθως, πραγματοποιείται φωτομέτρηση στα 600nm (επιθυμητή τιμή 0,46-0,6). Ως τυφλό δείγμα χρησιμοποιείται 1ml θρεπτικό υλικό.

➤ Το θρεπτικό υλικό μοιράζεται σε 2x50ml Falcon και τοποθετούνται στον πάγο. Πραγματοποιείται φυγοκέντριση σε 4200g για 15 λεπτά, στους 4°C.

➤ Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα αρχικά επαναδιαλύεται σε 500μl ddH₂O ανά falcon και προστίθεται ddH₂O μέχρι τα 50ml. Επαναλαμβάνεται φυγοκέντριση σε 4200g για 15 λεπτά, στους 4°C.

➤ Το υπερκείμενο απορρίπτεται γρήγορα (για να μη ξεκολλήσουν τα κύτταρα) και το ίζημα επαναδιαλύεται σε 500μl ddH₂O ανά falcon και προστίθεται ddH₂O μέχρι τα 50ml.

➤ Επαναλαμβάνεται φυγοκέντριση σε 4200g για 15 λεπτά, στους 4°C και το υπερκείμενο απορρίπτεται γρήγορα ενώ το ίζημα επαναδιαλύεται σε 4ml 10% glycerol.

➤ Ακολουθεί φυγοκέντριση σε 4200g για 10 λεπτά, στους 2°C και το υπερκείμενο απορρίπτεται.

➤ Προστίθενται 250μl 10% glycerol ανά falcon, αναδιαλύεται το ίζημα και μοιράζονται 40μl ανά tube.

➤ Τα κύτταρα αποθηκεύονται στους -80°C.

3.8 Παρασκευή SOC medium

	Vτελ 1000ml	Vτελ 50ml
ddH ₂ O	950ml	47.5ml
Bacto-tryptone	20gr	1gr
Bacto-yeast extract	5gr	0.25gr
NaCl	0.5gr	0.025gr
KCl solution 250mM pH 7.2	10ml	0.5ml
MgCl ₂ 2M	5ml	0.25ml
Glucose 1M	20ml	1ml

*Αποθήκευση στους -20°C

3.9 Παρασκευή θρεπτικού υποστρώματος LB άγαρ

Παρασκευή LB άγαρ (40gr/lit): για 3 πιάτα ζυγίζονται 3,6gr LB άγαρ και 90ml ddH₂O και μετά από καλή ανάδευση το διάλυμα αποστειρώνεται. Όταν η θερμοκρασία του θρεπτικού χαμηλώσει αρκετά, προστίθενται 90μl από το stock αμικιλίνης (100mg/lit). Σε τρυβλίο petriτοποθετείται 30ml LB άγαρ μέχρι το θρεπτικό να στερεοποιηθεί.

3.10 Μέθοδοι μετασχηματισμού

Οι πρώτες προσπάθειες για μετασχηματισμό του βακτηρίου *E. coli* ήταν ανεπιτυχείς, υποδηλώνοντας ότι αυτό το βακτήριο δεν κατέχει το φυσικό μηχανισμό του μετασχηματισμού. Σύντομα όμως βρέθηκε ότι η ικανότητα εισαγωγής εξωγενούς DNA στο στέλεχος *E. coli* μπορούσε να επαχθεί τεχνητά. Το 1970 οι Mandel και Higa έδειξαν ότι βακτήρια κατεργασμένα με παγωμένο διάλυμα χλωριούχου ασβεστίου (CaCl_2) αν θερμανθούν για μικρό χρονικό διάστημα, μπορούν να μετασχηματιστούν με DNA βακτηριοφάγου λ, ενώ το 1982 η ερευνητική ομάδα των Neuman κατάφερε την εισαγωγή DNA σε ευκαρυωτικά κύτταρα με τη μέθοδο της ηλεκτροδιάτρησης.

3.10.1 Μετασχηματισμός με ηλεκτροδιάτρηση

Η ηλεκτροδιάτρηση είναι μία χημική μέθοδος που αναπτύχθηκε στο τέλος της δεκαετίας του 80 (Wirth, 1989) και στηρίζεται στη δημιουργία υδατικών πόρων στην λιπιδιακή διπλοστοιβάδα με την εφαρμογή ενός σύντομου ηλεκτρικού παλμού. Οι αλλαγές στην μεμβράνη μπορεί να είναι αντιστρεπτές ή μη, ανάλογα με το μέγεθος και την διάρκεια του παλμού (Prausnitz, 1995). Χρησιμοποιείται για την εισαγωγή DNA σε δεκτικά κύτταρα μέσω της κυτταρικής μεμβράνης. Το εξωγενές DNA υπάρχει σε ένα μεγάλο ποσοστό των κυττάρων ως εξωχρωματικό γενετικό υλικό ενώ σε ένα μικρό ποσοστό ενσωματώνεται στο γονιδίωμα τους, ώστε να μεταβιβάζεται στην συνέχεια από γενιά σε γενιά (Watson 2007). Η διαδικασία περιλαμβάνει την ανάπτυξη κυττάρων έως το μέσο της εκθετικής φάσης και διαδοχικές πλύσεις σε διάλυμα χαμηλής ιονικής ισχύος, ώστε να μειωθεί η ιονική ισχύς του εναιωρήματος. Στη συνέχεια με εφαρμογή εξωτερικού ηλεκτρικού πεδίου προκαλείται αύξηση στην ηλεκτρική αγωγιμότητα και διαπερατότητα της πλασματικής μεμβράνης, επιτρέποντας έτσι την είσοδο του DNA. Η συγκεκριμένη μέθοδος δεν απαιτεί το σχηματισμό σφαιροπλαστών. Τα κύτταρα αναδιλύονται σε διάλυμα γλυκερόλης 10% σε συγκέντρωση 3×10^{10} κύτταρα/ml και διατηρούνται σε θερμοκρασία -80°C . Η απόδοση κυμαίνεται από 10^9 έως 10^{10} αποικίες/μg DNA και εξαρτάται από

παράγοντες όπως η ένταση του ηλεκτρικού πεδίου, το μήκος του ηλεκτρικού παλμού και η συγκέντρωση του DNA (Dower et al., 1988).

Ο μηχανισμός εισαγωγής του DNA στο κύτταρο είτε με θερμικό σοκ είτε με ηλεκτροδιάτρηση βασίζεται στη σχετικά ασθενή φύση των υδροφοβικών/υδροφιλικών αλληλεπιδράσεων της φωσφολιπιδικής διπλοστοιβάδας αλλά και στην ικανότητα της να ανασυγκροτείται αυθόρμητα μετά τη διαταραχή της. Στην περίπτωση του θερμικού σοκ η διαφορά θερμοκρασίας που δημιουργείται εσωτερικά και εξωτερικά της μεμβράνης του κυττάρου προκαλεί την απελευθέρωση λιπιδίων και πρωτεϊνών από την εξωτερική μεμβράνη, ενώ στην ηλεκτροδιάτρηση η εφαρμογή του ηλεκτρικού πεδίου προκαλεί αλλαγή στο δυναμικό της πλασματικής μεμβράνης, η οποία στη συνέχεια φορτίζεται. Και στις δύο περιπτώσεις προκαλείται τοπική αναδιάταξη των λιπιδίων με αποτέλεσμα τη δημιουργία υδρόφοβων πόρων που σταδιακά μετατρέπονται σε υδρόφιλους. Δια μέσω αυτών μπορούν να περάσουν τα αρνητικά φορτισμένα μόρια DNA που βρίσκονται στο διάλυμα που περιβάλλει τα κύτταρα. Καθώς συμβαίνει αυτή η μετακίνηση, η μεμβράνη αποφορτίζεται και οι πόροι αρχίζουν να κλείνουν, με αποτέλεσμα την αποκατάσταση της φωσφολιπιδικής διπλοστοιβάδας (Panja et al., 2008). Ένα σημαντικό στοιχείο είναι η δομή/μορφή του DNA που εισέρχεται στα κύτταρα. Έχει βρεθεί ότι το κυκλικό πλασμιδιακό DNA είναι 10-100 φορές πιο αποτελεσματικό από το γραμμικό DNA του ίδιου πλασμιδίου, για το μετασχηματισμό του βακτηρίου *E. coli*. Τα κυκλικά μόρια DNA είναι ανθεκτικά στη δράση εξωνουκλεασών των βακτηρίων, ενώ τα γραμμικά μόρια υφίστανται αποικοδόμηση των ελευθέρων άκρων τους. Μετασχηματισμός με γραμμικά μόρια DNA συνεπάγεται, εκτός από την είσοδό τους στα κύτταρα και τη μετατροπή τους σε κυκλικά ώστε να επιτευχθεί η αντιγραφή του πλασμιδίου. Η κυκλοποίηση αυτή εμποδίζεται από την αλλαγή των άκρων των γραμμικών μορίων. Γι' αυτό το λόγο επιτυχής κυκλοποίηση και αντιγραφή γραμμικού πλασμιδιακού DNA σε ένα βακτηριακό κύτταρο προσδιορίζεται από τον ανταγωνισμό μεταξύ της δράσης της DNA λιγάσης που φτιάχνει το κυκλικό μόριο και των

εξωνουκλεασών που αποικοδομούν τα άκρα του μορίου.

3.10.1.1 Υλικά

- Συσκευή Ηλεκτροδιάτρησης (electroporator)
- ~40μl δεκτικά κύτταρα *E. coli* για ηλεκτροδιάτρηση
- Κυψελίδες/ κυβέτες για ηλεκτροδιάτρηση διαμέτρου 0,2 cm
- Πάγος
- Ανασυνδυασμένο DNA
- Διάλυμα SOC medium
- Δοκιμαστικός σωλήνας
- Φλόγιστρο
- Τρυβλία petri
- LB άγαρ
- Stock αμπικιλίνης (100μg/ml)
- X-gal (20mg/ml)
- IPTG (200mg/ml)
- Επωαστήρας με ανάδευση στους 37°C

3.10.1.2 Μέθοδος

- Eppendorf που περιέχει ~40μl δεκτικά κύτταρα *E. coli* για ηλεκτροδιάτρηση αφαιρείται από τη θερμοκρασία φύλαξης του (-80°C) και τοποθετείται σε πάγο.
- Στα κύτταρα προστίθεται το ανασυνδυασμένο DNA σε ποσότητα 10pg- 25ng, 2μl από την 1/10 αραιώση από την αντίδραση σύνδεσης. Το δείγμα αναδεύεται ελαφρά και τοποθετείται στον πάγο για 1 λεπτό.
- Το δείγμα μεταφέρεται σε παγωμένη κυψελίδα και τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτροδιάτρησης όπου εφαρμόζεται ηλεκτρικός παλμός 13,8kV/cm για 5-6 msec.
- Στο δείγμα προστίθεται γρήγορα 1ml διαλύματος SOC medium και μεταφέρεται σε δοκιμαστικό σωλήνα.
- Ο σωλήνας τοποθετείται για 45 λεπτά σε επωαστήρα στους 37°C με ανάδευση (180 rpm).
- Τρυβλία petri σταθερού LB άγαρ με αμπικιλίνη παρασκευάζονται υπό ασηπτικές συνθήκες παρουσία φλόγιστρον.

- Σε ποσότητα ~150-250μl κυττάρων προστίθενται 30μl X-gal και 3μl IPTG και το διάλυμα επιστρώνεται σε τρυβλίο.
- Τα τρυβλία τοποθετούνται ανεστραμμένα σε επωαστήρα με θερμοκρασία 37°C για 12-16 ώρες.

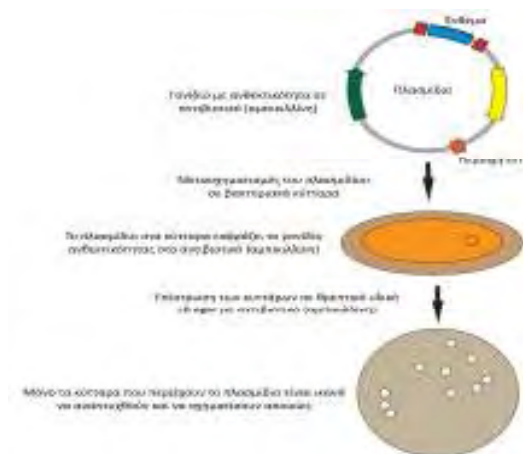
3.11 Ταυτοποίηση ανασυνδυασμένων κλώνων

Η επιλογή των μετασηματισμένων κλώνων, αυτών που έχουν προσλάβει το πλασμίδιο, ανασυνδυασμένο ή μη πραγματοποιείται με την παρουσία του αντιβιοτικού που υπάρχει στο θρεπτικό μέσο των τρυβλίων. Η επιλογή των βακτηρίων που έχουν προσλάβει ανασυνδυασμένο πλασμίδιο πραγματοποιείται με τον έλεγχο της α-συμπληρωματικότητας. Τα πλασμίδια φορείς που χρησιμοποιούνται στην α-συμπληρωματικότητα φέρουν: ένα τμήμα DNA της *E. coli* που περιέχει τις ρυθμιστικές αλληλουχίες και την κωδική πληροφορία των πρώτων 146 αμινοξέων του γονιδίου της β-γαλακτοσιδάσης (*lacZ*) και την αλληλουχία του πολυσυνδέτη (polylinker) ενσωματωμένη (στο ίδιο ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης) στο γονίδιο *lacZ*. Ο πολυσυνδέτης δεν διακόπτει το αναγνωστικό πλαίσιο αλλά απλώς προσθέτει κάποια αμινοξέα στο προϊόν του γονιδίου. Οι φορείς αυτοί χρησιμοποιούνται σε βακτηριακά στελέχη τα οποία κωδικοποιούν το καρβοξυτελικό τμήμα της β-γαλακτοσιδάσης. Με τον τρόπο αυτό ούτε οι φορείς, ούτε τα κύτταρα μπορούν από μόνα τους να δώσουν μια ενεργή μορφή, μπορούν όμως να συνδυαστούν και να δώσουν μια ενζυμικά ενεργή πρωτεΐνη (Ullman et al., 1967). Τα *lac*⁺ βακτήρια γίνονται εύκολα αντιληπτά λόγω της δημιουργίας μπλε αποικιών παρουσία του χρωμογόνου υποστρώματος X-gal (Horwitz et al., 1964). Συνεπώς, εάν το πλασμίδιο δεν έχει ανασυνδυαστεί το γονίδιο *lacZ* εκφράζεται κανονικά και σε συνδυασμό με τα γονίδια βακτηρίου-ξενιστή επιτρέπει το μεταβολισμό της ουσίας X-gal και της δημιουργίας μπλε αποικιών. Αντίθετα, εάν το πλασμίδιο είναι ανασυνδυασμένο το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης του γονιδίου *lacZ* διακόπτεται, το X-gal δεν μεταβολίζεται και ως αποτέλεσμα οι αποικίες που παράγονται έχουν χρώμα λευκό. Έτσι, παρουσία X-gal και IPTG, που λειτουργούν ως επαγωγείς σε ορισμένα βακτηριακά στελέχη στο θρεπτικό μέσο των

τρυβλίων, οι αποικίες που περιέχουν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο παρουσιάζουν λευκό χρώμα, ενώ αυτές που περιέχουν το κανονικό πλασμίδιο είναι κατά κανόνα μπλε. Ο πλήρης έλεγχος των ανασυνδυασμένων κλώνων πραγματοποιείται με απομόνωση του πλασμιδιακού DNA, κατάτμηση με τα κατάλληλα ένζυμα περιορισμού που διαχωρίζουν το κλωνοποιημένο DNA από τον φορέα του καθώς και με προσδιορισμό της πρωτοδιάταξης του ενθέματος.

3.12 Τιτλοδότηση δεκτικών κυττάρων DH5α

Μετασχηματισμός με ηλεκτροδιάτρηση δεκτικών κυττάρων (40 µl) με 2 µl φορέα pBluescript II συγκέντρωσης 35 ng/µl. Προστίθενται 500 µl SOC και γίνεται αραιώση του διαλύματος 1/100. Σε 2 µl, 4 µl και 8 µl από τα μετασχηματισμένα βακτήρια προστίθενται 198 µl, 196 µl, 192 µl H₂O (τελικός όγκος 200 µl), X-gal (30 µl από stock 20 mg/ml) και IPTG (3µl από stock 200 mg/ml). Ακολουθεί επίστρωση σε τρυβλία με θρεπτικό LB άγαρ και επώαση στους 37°C για περίπου 16 ώρες. Έπειτα, καταμετρούνται οι αποικίες και γίνεται αναγωγή σε μονάδες rfu/µg.



Εικόνα 22: Σχηματική απεικόνιση της πλασμιδιακής κλωνοποίησης.

4. Απομόνωση νουκλεϊκών οξέων

4.1 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

Η πλήρης και αποτελεσματική απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτηριακά κύτταρα περιλαμβάνει: την ανάπτυξη βακτηριακών κυττάρων, τη λύση των κυττάρων και την απομόνωση του πλασμιδιακού DNA. Συνεπώς, απαιτεί την αποτελεσματική αποδιάταξη του κυτταρικού τοιχώματος, την τήρηση συνθηκών οι οποίες είτε αναστέλλουν, είτε καταστρέφουν τα διάφορα αποικοδομητικά ένζυμα που απελευθερώνονται κατά τη λύση των βακτηριακών κυττάρων και τέλος, το διαχωρισμό του πλασμιδιακού DNA από το χρωμοσωμικό DNA και τις πρωτεΐνες. Οι δύο βασικότερες μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA είναι η αλκαλική λύση (Alkali lysis) και η απομόνωση μέσω βρασμού (Boiling lysis). Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε είναι των Birnboim & Doly (1979) και Ish-Horowicz & Burke (1981), της αλκαλικής λύσης με μικρές τροποποιήσεις. Αρχικά, γίνεται καλλιέργεια των βακτηρίων τα οποία στη συνέχεια συλλέγονται με φυγοκέντριση ώστε να απομακρυνθεί το θρεπτικό μέσο καλλιέργειας (LB amp). Ακολουθεί αναδιάλυση των κυττάρων σε διάλυμα το οποίο περιέχει Tris για τη διατήρηση του pH, EDTA για την αποσταθεροποίηση της κυτταρικής μεμβράνης και την παρεμπόδιση της δράσης νουκλεασών και γλυκόζη για τη διατήρηση της οσμωτικότητας. Στη συνέχεια, γίνεται λύση των κυττάρων σε διάλυμα που περιέχει SDS το οποίο διαλυτοποιεί τα φωσφολιπίδια και τα πρωτεϊνικά συστατικά της μεμβράνης και NaOH το οποίο καταστρέφει τους δεσμούς H⁺ και Van der Waals της δίκλωνης δομής του DNA και των πρωτεϊνών. Η εξουδετέρωση της αντίδρασης λύσης πραγματοποιείται με την προσθήκη οξικού καλίου και οξικού οξέος. Το σύμπλοκο οξικού καλίου με το SDS (KDS) είναι αδιάλυτο στο διάλυμα και οι μετουσιωμένες πρωτεΐνες, το χρωμοσωμικό DNA και τα κυτταρικά υπολείμματα κατακρημνίζονται σε σύμπλοκα αλάτων-απορρυπαντικών. Το πλασμιδιακό DNA παραμένει σε διαλυτή μορφή στο υπερκείμενο του διαλύματος και συλλέγεται έπειτα από κατακρήμνιση με αιθανόλη. Το ίζημα επαναδιαλύεται σε ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει RNAάση ώστε να γίνει αποικοδόμηση του βακτηριακού RNA.

- Το μείγμα κατακρημνίζεται με ισοπροπανόλη (1V) και το ίζημα αναδιαλύεται σε 50μl ddH₂O.

5. Υβριδοποίηση

Η υβριδοποίηση στυπώματος επινοήθηκε το 1975 από τον Ed Southern, ο οποίος συνδύασε την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα με την υβριδοποίηση ώστε να γίνεται ανίχνευση αλληλουχιών. Κατά τη μέθοδο αυτή, το γονιδιωματικό DNA πέπτεται με ένα ή περισσότερα ένζυμα περιορισμού και τα τμήματα που προκύπτουν διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα εμβαπτίζεται σε αλκαλικό διάλυμα, ώστε να γίνει αποδιάταξη στα μόρια του DNA. Ακολουθεί η μεταφορά των μορίων σε νάilon μεμβράνη και έπειτα ένας σημασμένος ανιχνευτής συμπληρωματικός ως προς τις αναζητούμενες αλληλουχίες υβριδοποιείται με τα θραύσματα DNA που έχουν ακινητοποιηθεί στη νάilon μεμβράνη (Lewin, GENES VII).

5.1 Σήμανση ανιχνευτών

Οι ανιχνευτές είναι μονόκλωνα μόριο νουκλεϊνικού οξέος DNA και η σήμανση τους βοηθά στο να εντοπίζονται. Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της σήμανσης των ανιχνευτών με τη μέθοδο τυχαίων εκκινήτων. Για τη σήμανση των δίκλωνων μορίων DNA ακολουθήθηκε ένα τροποποιημένο πρωτόκολλο του DecaLabelTM DNA Labelling kit (Fermentas).

➤ Σε eppendorf τοποθετείται το DNA που θα σημασθεί (100-1000ng) και 1x από το ρυθμιστικό διάλυμα της πολυμεράσης με δεξανουκλεοτίδια. Ακολουθεί βρασμός του δείγματος για 10 λεπτά στους 100°C ώστε να γίνει η αποδιάταξη του και στη συνέχεια επωάζεται στον πάγο για 1 λεπτό.

➤ Προστίθεται στη συνέχεια το μείγμα μη σημασμένων νουκλεοτιδίων dNTPs [(dATP, dCTP, dGTP: 0,33mM each)- dTTP], biotin-11-dUTP (0,035mM) και η DNA πολυμεράση klenow exo⁻ (5 units).

➤ Ακολουθεί ανάδευση με πιπέτα και το μείγμα επωάζεται στους 37°C για 12-16 ώρες.

5.2 Μεταφορά σε νάilon μεμβράνη

Στο στάδιο αυτό, γίνεται αποδιάταξη των νουκλεϊνικών οξέων ώστε να γίνουν μονόκλωνα σε σταθερό υπόστρωμα (μεμβράνη) όπου και ακινητοποιούνται. Με τη χρήση των σημασμένων ανιχνευτών τα ακινητοποιημένα μόρια αποτελούν στόχους περαιτέρω ανάλυσης μέσω της υβριδοποίησης. Για τη μεταφορά σε νάilon μεμβράνη από πήκτωμα αγαρόζης ακολουθήθηκε η τριχοειδής μεταφοράς (Lichtenstein et al 1990, Chomczynski, 1992). Με μια συγκεκριμένη κατασκευή γίνεται η μεταφορά ενός ρυθμιστικού διαλύματος από μια περιοχή υψηλού δυναμικού σε μια περιοχή χαμηλού δυναμικού. Το διάλυμα μεταφοράς παρασύρεται μέσα στο πήκτωμα και τη μεμβράνη λόγω τριχοειδών φαινομένων και έτσι παρασύρεται και το μονόκλωνο DNA. Η μεταφορά επιτυγχάνεται λόγω ιονικών αλληλεπιδράσεων καθώς το DNA είναι αρνητικά φορτισμένο και η νάilon μεμβράνη είναι θετικά φορτισμένη. Η ξήρανση της μεμβράνης είτε με έκθεση σε ακτινοβολία UV, είτε σε υψηλή θερμοκρασία κρίνεται απαραίτητη για τη σταθεροποίηση των νουκλεϊκών οξέων σε αυτή.

5.2.1 Υλικά

- Πήκτωμα αγαρόζης 1.5%
- TBE buffer 0.5x
- Νάilon μεμβράνη
- Λαβίδες τύπου Millipore, με πεπλατυσμένες άκρες
- Δηθητικό χαρτί Whatman 3MM
- Απορροφητικά φύλλα χαρτιού
- Διάλυμα 0.2N HCl
- Διάλυμα Αποδιάταξης: 1.5M NaCl, 0.5M NaOH
- Διάλυμα Εξουδετέρωσης: 1.5M NaCl, 0.5M Tris-HCl pH:7.5
- Διάλυμα 20x SSC: 0.3M Sodium Citrate pH:7,3M NaCl
- Βάρος ~500gr
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης
- Ακτινοβολία UV

- Χάρακας
- Επωαστήρας (στους 80°C)
- Ladder
- Γέφυρα για το Southern

5.2.2 Μέθοδος

- Αρχικά, το πήκτωμα αγαρόζης αποτυπώνεται σε φωτογραφία με τη χρήση χάρακα ώστε να μπορέσει να εκτιμηθεί το ακριβές τμήμα που υβριδοποιείται.
- Σε περίπτωση που το DNA έχει μεγαλύτερο μέγεθος από 15 kb πραγματοποιείται ένα στάδιο επώασης του πηκτώματος με ανάδευση σε διάλυμα 0,2N HCl για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Έτσι επιτυγχάνεται μερική υδρόλυση του DNA και μεταφορά των θραυσμάτων του (Wahl et al., 1979).
- Στη συνέχεια το πήκτωμα επωάζεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου με διάλυμα αποδιάταξης για 15 λεπτά. Το διάλυμα αφαιρείται και επαναλαμβάνεται μια φορά ακόμη το συγκεκριμένο βήμα.
- Το διάλυμα αποδιάταξης αφαιρείται και στο πήκτωμα προστίθεται διάλυμα εξουδετέρωσης. Ακολουθεί επώαση υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά και το βήμα επαναλαμβάνεται μια ακόμη φορά.
- Ακολουθεί επώαση του πηκτώματος σε διάλυμα 6x SSC υπό ανάδευση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Το πήκτωμα τοποθετείται σε γέφυρα με διηθητικό χαρτί Whatman 3MM όπου οι άκρες του εμποτίζονται με διάλυμα 10x SSC.
- Πάνω στο πήκτωμα τοποθετείται η νάιλον μεμβράνη που αρχικά διαβρέχεται με ddH₂O και έπειτα με 6x SSC. Χρειάζεται προσοχή ώστε να μην δημιουργηθεί κενό ή αέρας κατά την τοποθέτηση της μεμβράνης. Ο χειρισμός στη μεμβράνη γίνεται προσεκτικά και μόνο με λαβίδες.
- Στη συνέχεια, τοποθετούνται πάνω από τη μεμβράνη 2 φύλλα διηθητικού χαρτιού Whatman 3MM βρεγμένα με ddH₂O, έπειτα 2 ακόμη φύλλα Whatman και στη συνέχεια απορροφητικά χαρτιά μικρότερου μεγέθους κατά 5mm της μεμβράνης.

- Για να λειτουργήσει η κατασκευή εξασφαλίζοντας την επαφή πηκτώματος-μεμβράνης, στην κορυφή τοποθετείται αντίβαρο ~500gr.
- Ακολουθεί επώαση 16-18 ωρών για να ολοκληρωθεί η μεταφορά και αφαιρούνται τα απορροφητικά και τα διηθητικά χαρτιά. Πάνω στη μεμβράνη σημειώνεται ο προσανατολισμός και τα πηγαδάκια με τα δείγματα.
- Η μεμβράνη τοποθετείται για 2 ώρες στους 80°C για τη σταθεροποίηση του DNA και δύναται να φυλαχθεί σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι την επόμενη χρήση της.

5.3 Υβριδοποίηση του ανιχνευτή σε μεμβράνη

Στο στάδιο αυτό αρχικά πραγματοποιείται η προυβριδοποίηση με σκοπό τη μείωση δυσμορφιών του φόντου (background) και την κάλυψη των κενών θέσεων της μεμβράνης από τα μεγάλα μεγέθους μόρια DNA. Η χρήση του διαλύματος Denhardt's, του SDS, αλλά και του salmon sperm DNA (ssDNA) βοηθούν στην προυβριδοποίηση καθώς εμποδίζουν τη μη ειδική σύνθεση των ανιχνευτών στη μεμβράνη. Έπειτα ακολουθεί η υβριδοποίηση όπου σχηματίζονται υβρίδια μεταξύ των νουκλεοτιδικών αλυσίδων.

5.3.1 Υλικά

- Σωλήνες υβριδοποίησης
- Salmon sperm DNA (10mg/ml)
- ddH₂O σε σημείο βρασμού 100°C
- Διάλυμα Προυβριδοποίησης: 6x SSC, 5x Denhardt's, 0.5% SDS
- Διάλυμα Υβριδοποίησης: 6x SSC, 5x Denhardt's, 0.5% SDS και σημασμένος ανιχνευτής
- Επωαστήρας (στους 65°C)
- Διάλυμα 20x SSC: 0.3M Sodium Citrate pH:7, 3M NaCl
- Διάλυμα 50xDenhardt's: 1% φικόλλη, 1% PVP, 1% BSA (διατηρείται στους -20°C)
- Διάλυμα SDS 10%

5.3.2 Μέθοδος

- Παρασκευάζεται διάλυμα προυβριδοποίησης (τα ml του διαλύματος υπολογίζονται από το εμβαδόν της μεμβράνης x 0.2).
- Το salmon sperm DNA τοποθετείται στο ddH₂O στους 100°C για 10 λεπτά ώστε να γίνει η αποδιάταξη του και έπειτα προστίθεται στο διάλυμα προυβριδοποίησης σε συγκέντρωση 100 µg/ml.
- Η μεμβράνη τοποθετείται στον σωλήνα υβριδοποίησης που περιέχει το διάλυμα προυβριδοποίησης με το ssDNA.
- Στη συνέχεια ο σωλήνας εισάγεται στον επωαστήρα για 2 ώρες στους 65°C (θερμοκρασία υβριδοποίησης του ανιχνευτή*) και αναδεύεται με περιστροφή.
- Ο ανιχνευτής θερμαίνεται στους 100°C για 10 λεπτά για να αποδιαταχτεί.
- Το διάλυμα προυβριδοποίησης αφαιρείται και στο σωλήνα προστίθεται νέο διάλυμα υβριδοποίησης και ο ανιχνευτής.
- Τέλος, ο σωλήνας εισάγεται στον επωαστήρα και η υβριδοποίηση πραγματοποιείται για 16-18 ώρες στους 65°C και αναδεύεται με περιστροφή.

*Η θερμοκρασία υβριδοποίησης του ανιχνευτή είναι ένα σημαντικό βήμα καθώς το ποσοστό σχηματισμού των υβριδίων καθορίζεται από τις συνθήκες υβριδοποίησης. Στην περίπτωση υβριδοποίησης DNA:DNA υβριδίων η άριστη θερμοκρασία πρέπει να είναι 25°C χαμηλότερη από τη θερμοκρασία τήξης (T_m) του υβριδίου. Το T_m είναι η θερμοκρασία όπου η μισή ποσότητα του ολιγονουκλεοτιδίου είναι σε μονόκλωνη μορφή και επηρεάζεται από την αναλογία των βάσεων (GC), τη συγκέντρωση του άλατος και το μέγεθος του ανιχνευτή. Υπολογίζεται από την εξίσωση: $T_m = 81.5^\circ\text{C} + 16.6 \log M + 0.41(\% \text{ G+C}) - 500/n$ όπου M είναι η συγκέντρωση των ιόντων άλατος Na⁺ και n είναι το σύνολο του νουκλεοτιδίων του υβριδίου.

5.4 Ανίχνευση σήματος

Για την ανίχνευση του σήματος πραγματοποιούνται συνολικά τρία βήματα: η απομάκρυνση του ανιχνευτή που δεν έχει συνδεθεί στη μεμβράνη, η πρόσδεση της στρεπταβιδίνης στη βιοτίνη και η ανίχνευση του

σήματος. Η χρήση διαλυμάτων με σταδιακά μειωμένες συγκεντρώσεις SSC (άλατα) σε συνδυασμό με την κατάλληλη ποσότητα SDS (απορρυπαντικού), βοηθά στην απομάκρυνση μη συνδεδεμένου ή μερικώς υβριδοποιημένου ανιχνευτή. Το σύμπλοκο στρεπταβιδίνης-αλκαλικής φωσφατάσης προσδένεται στη βιοτίνη με την προσθήκη του σε διάλυμα με αποβουτυρωμένο γάλα, το οποίο αποτρέπει τη δημιουργία μη ειδικών θέσεων σύνδεσης του αντισώματος. Η ανίχνευση του σήματος εξαρτάται από την ισχύ του συμπλόκου στρεπταβιδίνης-βιοτίνης. Η στρεπταβιδίνη είναι συνδεδεμένη με την αλκαλική φωσφατάση και με τη χρήση των BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate) και NBT καταλύεται μια χρωμογόνος αντίδραση. Το BCIP αποτελεί το υπόστρωμα για την αλκαλική φωσφατάση η οποία το υδρολύει σε 5-bromo-4-chloro-3-indoxyl και παρουσία του ατμοσφαιρικού οξυγόνου δημιουργεί μια μπλε χρωστική (5,5'-dibromo-4,4'-dichloro-indigo). Επίσης, οξειδώνεται από το NBT, το οποίο μετά από αναγωγή σχηματίζει ίζημα χρώματος σκούρο μπλε (Horwitz, 1966).

5.4.1 Υλικά

- Falcon 50ml
- Δοχείο ανάδευσης
- Διάλυμα πλύσης I: 2x SSC, 0.1% SDS
- Διάλυμα πλύσης II: 0.2x SSC, 0.1% SDS
- Διάλυμα A: 0.1M Tris pH:7.5, 0.15M NaCl
- Διάλυμα Blocking 10%: 10gr σκόνη αποβουτυρωμένο γάλα/ 100 ml διαλύματος A
- Διάλυμα B: διάλυμα A, 1% διάλυμα Blocking
- Διάλυμα B με αντίσωμα: 5µl στρεπταβιδίνη/ 10 ml διαλύματος B
- Διάλυμα C: 0.1M Tris pH:9.5, 0.1M NaCl, 0.05M MgCl₂ και 50µl NBT, 35µl BCIP/10ml
- Διάλυμα ανίχνευσης σήματος: διάλυμα C, 50µl NBT και 35µl BCIP/10ml δ/τος C
- Επωαστήρας (στους 65°C)
- Στρεπταβιδίνη-αλκαλική φωσφατάση
- BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate)
- NBT (nitroblue tetrazolium)
- ddH₂O
- Αναδευτήρας (Shaker)

5.4.2 Μέθοδος

- Το διάλυμα υβριδοποίησης που περιέχει τον ανιχνευτή αδειάζεται σε falcon και διατηρείται στους -20°C για μελλοντική χρήση.
- Η μεμβράνη τοποθετείται στο δοχείο ανάδευσης με διάλυμα πλύσης I και αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά. Το διάλυμα απορρίπτεται και το βήμα επαναλαμβάνεται.
- Στη μεμβράνη εισάγεται το διάλυμα πλύσης II και αναδεύεται για 20 λεπτά στη θερμοκρασία υβριδοποίησης. Το διάλυμα απορρίπτεται και το βήμα επαναλαμβάνεται.
- Ακολουθεί επώαση για 1 λεπτό στο διάλυμα A για να γίνει εξισορρόπηση της μεμβράνης.
- Στο δοχείο ανάδευσης τοποθετείται διάλυμα B και η μεμβράνη επωάζεται για 30 λεπτά με ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου.
- Το διάλυμα απορρίπτεται και προστίθεται το διάλυμα B με το αντίσωμα και ακολουθεί επώαση με ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά.
- Έπειτα, γίνεται μια πλύση της μεμβράνης με το διάλυμα A για 15 λεπτά υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου και το βήμα επαναλαμβάνεται.
- Η μεμβράνη εξισορροπείται με το διάλυμα C όπου και επωάζεται για 2-3 λεπτά.
- Στη συνέχεια προστίθεται το διάλυμα ανίχνευσης του σήματος και η εμφάνιση παύει με 2-3 πλύσεις με ddH₂O.
- Η μεμβράνη δύναται να αποχρωματιστεί μετά την εμφάνιση με διάλυμα διμεθυλφορμαμίδιου (DMF) και επώαση στους 50°C για 10 λεπτά

6. RNA Sequencing

6.1 Απομόνωση RNA

Το RNA απομονώνεται από τους ιστούς του εντόμου *Bactrocera oleae* που πρόκειται να αναλυθούν με RNA sequencing. Για τη μελέτη γονιδίων που εμπλέκονται σε μηχανισμούς ανθεκτικότητας του εντόμου στο εντομοκτόνο spinosad χρησιμοποιήθηκαν κεφάλια από τον εργαστηριακό και από τον ανθεκτικό στο spinosad πληθυσμό

Bactrocera oleae. Αντίστοιχα, για τη μελέτη γονιδίων που εμπλέκονται σε συστήματα φυλοδιαχωρισμού του δάκου χρησιμοποιήθηκαν όργανα αναπαραγωγής από αρσενικά και θηλυκά έντομα του εργαστηριακού πληθυσμού. Συγκεκριμένα, από τα αρσενικά έντομα απομονώθηκαν όρχεις (testes). Αντίστοιχα, από τα θηλυκά έντομα απομονώθηκαν σπερματοθήκες (spermathecae) και βοηθητικοί αδένες (Female Accessory Glands, FAGs).

Επιπρόσθετα, για την αλληλούχηση του ολικού γονιδιώματος του εντόμου *Bactrocera oleae* απομονώθηκε RNA από το στάδιο του αυγού, της προνύμφης και της νύμφης. Το υλικό αυτό θα αποτελέσει τη μήτρα σύγκρισης και επεξεργασίας με νέα δεδομένα στην ανάλυση νέων RNA sequencing.

6.1.1 Υλικά

- TRIzol® Reagent (Ambion-Invitrogen)
- DEPC-treated water
- Παγωμένο PBS
- 70% αιθανόλη
- Ισοπροπροπανάλη
- Χλωροφόρμιο
- Turbo DNA-free™ Kit (Ambion)
- Πάγος
- Ψυχόμενη φυγόκεντρος
- Υδατόλουτρο σε θερμοκρασία: 55°C
- Συσκευή μικροφυγοκέντρησης
- Eppendorfs (1,5ml)
- Vortex
- Νυστέρι
- Έμβολα
- Αγαρόζη
- TBE 5x Buffer: Tris-base 54gr, βορικό οξύ 27,5gr, 0,5M EDTA 20ml
- Βρωμιούχο αιθίδιο 10mg/ml
- 6x Loading Dye (0,25% μπλε της βρωμοφαινόλης, 0,25% κυανό της ξυλόλης, 15% φικόλλη ddH₂O)
- 331 Ladder (Fermentas)
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης
- Falcon 50ml/15ml
- Μίξερ χειρός
- DEPC treated water

- Στερεοσκόπιο
- Πλακάκι
- Απαγωγός

6.1.2 Μέθοδος

➤ Τα έντομα από τον κάθε πληθυσμό τοποθετούνται ξεχωριστά σε falcon για 5-10 λεπτά στους -20°C ώστε να αναισθητοποιηθούν και να διευκολυνθεί η απομόνωση των επιμέρους ιστών.

➤ Το κάθε έντομο τοποθετείται σε πλακάκι στο στερεοσκόπιο με ~10μl PBS όπου γίνεται τομή με νυστέρι και απομόνωση του υπό εξέταση ιστού. Τα δείγματα τοποθετούνται σε erppendorf και αμέσως στον πάγο. Στο τέλος οι ιστοί των εντόμων συγκεντρώνονται και ζυγίζονται και για κάθε 50-100mg ιστού απαιτείται η χρήση 1ml TRIzol.

➤ Μετά την προσθήκη της απαιτούμενης ποσότητας TRIzol σε κάθε ιστό (στις απομονώσεις της παρούσας μελέτης προστίθενται 500μl TRIzol) και ακολουθεί ομογενοποίηση με το έμβολο αρχικά και έπειτα με μίξερ χειρός. Στη συνέχεια τα έμβολα ξεπλένονται με ίση ποσότητα από την αρχική του TRIzol (500μl).

➤ *Προσοχή: ο όγκος του ιστού δεν πρέπει να ξεπερνά το 10% του όγκου του TRIzol.

➤ Τα erppendorfs διατηρούνται σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά ώστε να γίνει πλήρης διάχυση των νουκλεοτιδίων και ακολουθεί φυγοκέντριση στους 4°C σε 12000rpm για 15 λεπτά.

➤ Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο erppendorf και προστίθενται 200μl χλωροφόρμιου (για 1ml TRIzol® Reagent γίνεται προσθήκη 0,2ml χλωροφόρμιου). Γίνεται έντονη ανάδευση και το δείγμα διατηρείται για 2-3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

➤ Ακολουθεί φυγοκέντριση στους 4°C σε 12000g στροφές για 15 λεπτά.

➤ Το διάλυμα διαχωρίζεται σε τρεις φάσεις: την χαμηλή φάση η οποία αποτελεί την οργανική φάση και στην οποία περιέχονται οι πρωτεΐνες, τη μεσόφαση στην οποία περιέχεται το DNA και τέλος την άνω φάση η οποία αποτελεί την υδατική φάση (άχρωμη) όπου περιέχεται το RNA.

➤ *Η υδατική φάση αποτελεί περίπου το 45% του συνολικού όγκου.

➤ Η υδατική φάση μεταφέρεται με προσοχή σε νέο erppendorf, προστίθενται 500μl ισοπροπανόλης και έπειτα ακολουθεί ανάδευση με απαλές κινήσεις

➤ *Για κάθε 1ml TRIzol προστίθεται 0,5ml ισοπροπανόλης.

➤ Ακολουθεί επώαση του δείγματος σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά και στη συνέχεια ακολουθεί φυγοκέντριση στους 4°C σε 12000g στροφές για 45 λεπτά.

➤ Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα ξεπλένεται με 1000μl αιθανόλης 75% (για 1ml TRIzol προστίθεται 1ml αιθανόλη). Το RNA σχηματίζει ένα gel-like ίζημα.

➤ Ακολουθεί ελαφριά ανάδευση και φυγοκέντριση στους 4°C σε 7500g στροφές για 5 λεπτά.

➤ Το υπερκείμενο αφαιρείται και επαναλαμβάνεται η πλύση του ιζήματος με 1000μl αιθανόλης 75%.

➤ Ακολουθεί ελαφριά ανάδευση και φυγοκέντριση στους 4°C σε 12000g στροφές για 5 λεπτά.

➤ Το τελευταίο βήμα των πλύσεων επαναλαμβάνεται συνολικά τρεις φορές.

➤ Το ίζημα τοποθετείται στον απαγωγό για 7-10 λεπτά μέχρι να εξατμιστεί η αιθανόλη. Στο στάδιο αυτό γίνεται αποχρωματισμός του ιζήματος.

➤ *Προσοχή: το ίζημα δεν πρέπει να στεγνώσει τελείως γιατί δυσκολεύει η επαναδιάλυση του.

➤ Σε κάθε ίζημα προστίθενται 44μl DEPC-treated water και τα δείγματα τοποθετούνται στο υδατόλουτρο στους 55°C για ~10 λεπτά μέχρι να διαλυθεί.

➤ Σε πήκτωμα αγαρόζης 1% γίνεται ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων με το RNA στα 100V για 45-60 λεπτά και τέλος γίνεται ποσοτικοποίηση του RNA.

➤ Ακολουθεί το στάδιο καθαρισμού του RNA και απομάκρυνσης τυχόν υπολειμμάτων DNA με τη χρήση του kit Turbo DNA-free.

➤ Σε ποσότητα ~1000ng RNA προστίθεται 0,1 V Turbo DNase Buffer 10x μαζί με 1μl TurboDNase (2u/μl) και αναδεύεται ήπια.

➤ Το διάλυμα επωάζεται για 25 λεπτά στους 37°C.

➤ Προστίθεται 0,1 V DNase Inactivation Reagent και το διάλυμα αναδεύεται καλά.

➤ Το διάλυμα αφήνεται για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, όπου και αναδεύεται περιστασιακά.

➤ Τέλος, ακολουθεί φυγοκέντριση σε 10.000g για 1,5 λεπτό και το υπερκείμενο (το καθαρό πλέον RNA) μεταφέρεται σε νέο eppendorf.

6.2 Κατασκευή RNAβιβλιοθηκών

☞ Προσδιορισμός του RIN (RNA Integrity Number) και απομόνωση του mRNA

Η διαδικασία βασίζεται στο πρωτόκολλο SOLiD® Total RNA-Seq Kit. Αρχικά, στο ολικό RNA των δειγμάτων που θα εξεταστούν γίνεται έλεγχος της ποιότητάς του με τη χρήση ενός αλγόριθμου που παρέχει πληροφορίες για την ακεραιότητα του ευκαρυωτικού RNA που βρίσκεται σε ένα δείγμα. Χρησιμοποιείται ένα σύστημα βαθμολόγησης από το 1 έως το 10, με την τιμή 1 να αντιπροσωπεύει τα τελείως αποικοδομημένα δείγματα RNA και την τιμή 10 να αντιπροσωπεύει τα εντελώς ακέραια δείγματα. Ο αλγόριθμος αυτός είναι ο RIN (RNA Integrity Number) και η τιμή του θα πρέπει να είναι μεγαλύτερη από 7. Οι μετρήσεις συνήθως πραγματοποιούνται σε συσκευή Agilent 2100 Bioanalyzer όπου πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση σε ειδικά chip και μικρές ποσότητες RNA διαχωρίζονται με βάση το μοριακό τους βάρος και εντοπίζονται από τον φθορισμό που εκπέμπουν έπειτα από έκθεση σε ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία που εκπέμπεται από laser. Τα αποτελέσματα οπτικοποιούνται σε ένα ηλεκτροφερόγραμμα και η ποσότητα του φθορισμού που καταγράφεται σχετίζεται με την ποσότητα του RNA που αντιστοιχεί σε ένα συγκεκριμένο μέγεθος. Ο αριθμός RIN προκύπτει από την ανάλυση του ηλεκτροφερογράμματος (Mueller et al, 2004, Schroeder et al, 2006).

Σύμφωνα με το πρωτόκολλο της συγκεκριμένης τεχνικής με την πλατφόρμα Applied Biosystems SOLiD, για τη κατασκευή των RNA βιβλιοθηκών απαιτούνται 100-500ng poly-A RNA ή 200-500ng ολικού RNA απαλλαγμένο από το rRNA. Στην παρούσα διατριβή, χρησιμοποιήθηκε αρχική ποσότητα ολικού RNA 20μg. Για την απομόνωση του mRNA χρησιμοποιούνται μαγνητικά σφαιρίδια στα οποία είναι προσδεμένα oligo-dT μόρια και ακολουθεί

ο τεμαχισμός του RNA, είτε ενζυμικά με το ένζυμο RNase III, είτε με χημική υδρόλυση με τη χρήση ρυθμιστικών διαλυμάτων που περιέχουν δισθενή ιόντα (Mg^{+2} , Zn^{+2}) (Forconi and Herschlag, 2009). Μετά από τον τεμαχισμό του RNA προκύπτουν μόρια ποικίλου μήκους, με τα περισσότερα να έχουν μήκος 100-200 nt και τα παραγόμενα μόρια καθαρίζονται και ποσοτικοποιούνται.

☞ Σύνθεση cDNA μορίων

Κατά το στάδιο της σύνθεσης των μορίων cDNA απαιτείται η σύνδεση ειδικών μορίων προσαρμογών (Adaptor A + Adaptor B) που είναι δίκλιωνα RNA/DNA μόρια και τα οποία έχουν στο ένα τους άκρο μία μονόκλινη αλληλουχία εκφυλισμένων νουκλεοτιδίων και στο άλλο άκρο μία καθορισμένη αλληλουχία απαραίτητη για τη διαδικασία της αλληλούχησης. Η σύνδεση των Adaptors γίνεται με υβριδοποίηση της εκφυλισμένης αλληλουχίας στο 5' άκρο ή στο 3' άκρο των τμημάτων RNA με την παρουσία του ενζύμου της λιγάσης. Για τη σύνδεση αυτή είναι απαραίτητη η ύπαρξη 5'-PO και 3'-OH στα άκρα του μορίου και συνεπώς προηγείται ένα στάδιο επεξεργασίας των τμημάτων RNA με μία πολυνουκλεοτιδική κινάση ή και ορισμένες φορές με μία φωσφατάση ανάλογα με τον τρόπο τεμαχισμού του RNA. Ο Adaptor A συνδέεται στο 5' άκρο του μορίου ώστε η αλληλούχηση να γίνεται με κατεύθυνση 5'→3', ενώ ο Adaptor B συνδέεται στο 3' άκρο για την αλληλούχηση με κατεύθυνση 3'→5'. Με την σύνδεση και των δύο Adaptors σε ένα μόριο έχει ως αποτέλεσμα την αλληλούχηση του μορίου και προς τις δύο κατευθύνσεις. Με την αντίστροφη μεταγραφή παράγονται τα μόρια cDNA και ακολουθεί επεξεργασία με ριβονουκλεάση ώστε να απομακρυνθούν τα μη συνδεδεμένα μόρια των Adaptors.

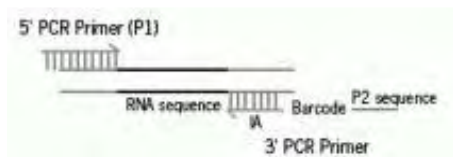
☞ Καθαρισμός και επιλογή με βάση το μέγεθος των μορίων cDNA

Στο συγκεκριμένο στάδιο πραγματοποιείται καθαρισμός των προϊόντων από τα παραπροϊόντα και γίνεται επιλογή εκείνων με το ιδανικό μέγεθος (200-250bp). Η διαδικασία πραγματοποιείται με τη χρήση παραμαγνητικών σφαιριδίων στα οποία

συγκρατούνται μόρια DNA με συγκεκριμένο μήκος, επιτρέποντας την απομάκρυνση παραπροϊόντων όπως εκκινητές, άλατα, dNTPs και μόρια με διαφορετικό από το επιθυμητό μήκος. Εφαρμόζονται δύο ή περισσότεροι κύκλοι όπου γίνεται προσθήκη των σφαιριδίων, σε διαφορετικές συγκεντρώσεις κάθε φορά. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, όπου επιθυμείται η απομόνωση τμημάτων μήκους 200-250bp, αρχικά πραγματοποιείται ένας κύκλος όπου προστίθενται διάλυμα σφαιριδίων σε συγκέντρωση 1,8 x, κατά τον οποίο στα σφαιρίδια συγκρατούνται τμήματα μεγαλύτερα από 100bp. Έπειτα, ακολουθεί πλύση των σφαιριδίων και έκλυση των μορίων cDNA με την προσθήκη νερού, η οποία αλλάζει το pH και οδηγεί στην αποκόλληση τους από τα σφαιρίδια. Τέλος, ακολουθεί ένας δεύτερος κύκλος προσθήκης διαλύματος σφαιριδίων σε συγκέντρωση 1,6x που οδηγεί στην απομόνωση των μορίων που είναι μεγαλύτερα από 150bp, συμβάλλοντας στην αύξηση του ποσοστού των μορίων με το επιθυμητό μήκος.

☞ Ενίσχυση των μορίων cDNA

Η ενίσχυση των μορίων cDNA πραγματοποιείται με τη σύνδεση σε αυτά ειδικά κατασκευασμένων 5' και 3' PCR εκκινητών. Ο 5' PCR εκκινητής περιέχει μία αλληλουχία εκκινητή (P1) ειδική για την emulsion PCR που ακολουθεί σε επόμενο στάδιο ενώ ο 3' εκκινητής περιέχει μία αντίστοιχη αλληλουχία (P2), μία αλληλουχία «barcode» και ένα εσωτερικό μόριο προσαρμογέα (IA) απαραίτητο για την αλληλούχηση του «barcode». Οι αλληλουχίες «barcode» αποτελούν εργαλείο για την ταυτοποίηση των cDNA βιβλιοθηκών (SOLiD™ RNA Barcoding Kit) (Εικόνα 23).



Εικόνα 23: Σχηματική απεικόνιση μορίου cDNA στο οποίο είναι συνδεδεμένοι οι 5' και 3' PCR εκκινητές.

6.2.1 Μέθοδος

➤ Από κάθε εξεταζόμενο ιστό λαμβάνεται ολικό RNA συγκέντρωσης 20μg.

➤ Με τη χρήση κιτ και μέσω των oligo-dT σφαιριδίων απομονώνεται από το ολικό RNA το mRNA.

*Στο στάδιο αυτό πραγματοποιείται ποσοτικοποίηση με το Nanodrop και πρέπει το Mrna να είναι ~5% από το ολικό RNA.

➤ Τα μόρια του mRNA ατεμαχίζονται σύμφωνα με την αντίδραση:

☞ Στο mRNA προστίθεται 20% fragmentation buffer (Tris-acetate, KOAc, MgOA) και το δείγμα τοποθετείται για 5 λεπτά στους 94°C. Έπειτα, προστίθεται 10% stop solution (0,5M EDTA) και το δείγμα καθαρίζεται σε στήλη με τη χρήση του κιτ Ribominus concentration module (Invitrogen).

➤ Ακολουθεί ο συνδυασμός αντιδράσεων με ένζυμα ώστε να μπορεί να γίνει επεξεργασία των 5' άκρων και αποφωσφορυλίωση των 3' άκρων των μορίων. Συγκεκριμένα:

☞ Στο mRNA προστίθεται το ένζυμο φωσφατάση, το buffer του ενζύμου και RNase Inhibitor και η αντίδραση πραγματοποιείται με ένα βήμα στους 37°C για 30 λεπτά και ένα βήμα στους 65°C για 5 λεπτά.

☞ Μετά το τέλος της αντίδρασης στο δείγμα προστίθενται το ένζυμο Polynucleotide Kinase, το buffer του ενζύμου, ATP, RNase Inhibitor και νερό απαλλαγμένο RNase. Το μείγμα επωάζεται στους 37°C για 1 ώρα.

☞ Το δείγμα καθαρίζεται και πάλι με στήλη με τη χρήση κιτ και στο τελικό βήμα γίνεται επαναδιάλυση σε νερό.

*Ακολουθεί ποσοτικοποίηση με Nanodrop και Qubit και για να συνεχιστεί το πρωτόκολλο απαιτείται η συγκέντρωση του mRNA να είναι ~50ng/3μl.

➤ Στη συνέχεια γίνεται η σύνδεση των μορίων με τους αντάπτορες και πιο αναλυτικά:

☞ Στο mRNA προστίθενται το SOLiD adaptor mix, το hybridization solution και το δείγμα επωάζεται στους 65°C για 10 λεπτά και έπειτα στους 16°C για 5 λεπτά.

☞ Έπειτα, προστίθεται το ligation enzyme mix και το ligation buffer και η αντίδραση πραγματοποιείται για 16 ώρες στους 16°C.

➤ Ακολουθεί η σύνθεση cDNA από το mRNA:

☞ Η αντίδραση γίνεται με την προσθήκη σε κάθε δείγμα mRNA μείγματος που περιέχει: dNTP mix, SOLiD RT primer, 10x RT buffer και nuclease free water. Το μείγμα επωάζεται στους 70°C για 5 λεπτά και αμέσως μετά τοποθετείται σε πάγο.

☞ Στο δείγμα προστίθενται 200 units Array Script Reverse Transcriptase, ακολουθεί ανάδευση με vortex και το μείγμα επωάζεται στους 42°C για 30 λεπτά.

➤ Στο συντιθέμενο cDNA έπειτα ακολουθεί αρχικά η διαδικασία καθαρισμού από περιττά υλικά της αντίδρασης όπως τα διμερή προϊόντα των εκκινητών αλλά και της επιλογής του κατάλληλου μεγέθους του cDNA. Χρησιμοποιείται κιτ με σφαιρίδια και μαγνητική βάση στήριξης (rack).

☞ Στο cDNA προστίθενται τα σφαιρίδια σε αναλογία 1:1,8 και το μείγμα επωάζεται με ήπια ανάδευση για 5 λεπτά. Έπειτα, τοποθετείται στη μαγνητική βάση μέχρι το διάλυμα να γίνει διάφανο.

☞ Το υπερκείμενο συλλέγεται και απορρίπτεται και ακολουθούν δύο πλύσεις με 70% αιθανόλη. Τέλος, τα σφαιρίδια αναδιαλύονται σε νερό ώστε να απελευθερωθεί το DNA και συλλέγεται το υπερκείμενο.

☞ Η ίδια διαδικασία επαναλαμβάνεται και με αναλογία 1,6 των σφαιριδίων και συλλέγεται το υπερκείμενο από το τελευταίο βήμα όπου γίνεται η απελευθέρωση του DNA στο νερό.

➤ Ακολουθεί αντίδραση ενίσχυσης του cDNA μέσω PCR. Οι εκκινητές είναι της SOLiD και οι αλληλουχίες τους είναι άγνωστες. Ωστόσο, στο 3' άκρο υπάρχουν πέντε βάσεις που είναι γνωστές (barcode) και είναι χρήσιμες για την ανάγνωση των νουκλεοτιδίων κατά την αλληλούχιση. Συγκεκριμένα, η αντίδραση PCR περιέχει:

☞ Νερό απαλλαγμένο νουκλεασών, dNTPs mix, 10x PCR buffer, SOLiD 5' PCR Primer, SOLiD 3' PCR Primer, AmpiTaq DNA polymerase και το δείγμα DNA.

☞ Οι συνθήκες της αντίδρασης είναι:

95°C για 5 λεπτά

95°C για 30 δευτερόλεπτα

62°C για 30 δευτερόλεπτα

72°C για 30 δευτερόλεπτα

72°C για 7 λεπτά

} 15 κύκλους

➤ Τέλος, ακολουθεί ένα βήμα καθαρισμού του δείγματος με το κιτ Purelink PCR micro-Invitrogen

και το DNA ποσοτικοποιείται αρχικά με το Qubit και αποθηκεύεται στους -20°C.

➤ Η διαδικασία ολοκληρώνεται με την ποσοτικοποίηση μέσω Bioanalyser που αποτελεί το πρόδρομο βήμα της αλληλούχισης με το SOLiD ABI analyser.

6.3. Αλληλούχιση των RNA βιβλιοθηκών

Η αλληλούχιση των RNA βιβλιοθηκών πραγματοποιήθηκε εξ ολοκλήρου στο Ινστιτούτο Φλέμινγκ από την ομάδα του καθηγητή Ραγκούση Ιωάννη.

Αρχικά, έγινε PCR ενίσχυση σε γαλάκτωμα (emulsion PCR), έπειτα ακολούθησε η καταγραφή του σήματος μέσω του χρωματικού κώδικα σύμφωνα με την τεχνολογία του ABI SOLiD. Η διαδικασία της αλληλούχισης δύναται να πραγματοποιηθεί προς μία κατεύθυνση αλλά και προς τις δύο κατευθύνσεις ώστε να εξασφαλιστεί μεγαλύτερη εγκυρότητα των αποτελεσμάτων. Σε αυτό το σκοπό συνεισφέρει και η αλληλούχιση της αλληλουχίας «barcode» όπου ταυτοποιούνται οι κλώνοι που βρίσκονται σε κάθε μαγνητικό σφαιρίδιο. Τέλος, ακολουθεί επεξεργασία των αποτελεσμάτων μέσω βιοπληροφορικής ανάλυσης (Mardis, 2008, SOLiD™ 4 System SETS Software, User Guide).

6.4 Σύνθεση cDNA με τη χρήση ολικού RNA

6.4.1 Υλικά

- Πάγος
- RNA (1μg), DNA-free
- Εκκινητή τυχαίων εξαμερών 300ng (ισομοριακό μείγμα N₅A, N₅G, N₅C και N₅T)
- Σωληνάκια eppendorf
- ddH₂O
- 200 units MMLV Reverse Transcriptase (Geneon)
- 5x ρυθμιστικό διάλυμα της MMLV Reverse Transcriptase (Geneon)
- 40 mM μείγμα dNTPs
- 40 units RNase Inhibitor (GeneOn)

6.4.2 Μέθοδος

- Το cDNA παρασκευάζεται σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή της MMLV Reverse Transcriptase.
- Σε σωληνάκι erppendorf αναμιγνύεται το RNA μαζί με τον εκκινητή σε τελικό όγκο 10μl και το δείγμα τοποθετείται στους 70°C για 10 λεπτά και έπειτα στον πάγο για 5 λεπτά.
- Σε νέο σωληνάκι erppendorf φτιάχνεται το μείγμα I όπου προστίθενται το ρυθμιστικό διάλυμα της MMLV Reverse Transcriptase, το ένζυμο MMLV Reverse Transcriptase, το μείγμα των dNTPs, τον RNase Inhibitor και ddH₂O σε τελικό όγκο 20μl.
- Το δείγμα αναμιγνύεται με το μείγμα I και τοποθετείται στους 45°C για 45 λεπτά και έπειτα στους 70°C για 10 λεπτά για να απενεργοποιηθεί το ένζυμο.
- Το cDNA είναι έτοιμο προς χρήση και δύναται να φυλαχθεί στους -20°C.

6.5 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση είναι μια μέθοδος που χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό, την αναγνώριση και τον καθαρισμό κομματιών DNA. Πρόκειται για γρήγορη τεχνική, ικανή να διαχωρίσει τμήματα DNA που δεν μπορούν να διαχωριστούν με άλλες τεχνικές. Κυρίως βασίζεται στην μετανάστευση φορτισμένων μορίων υπό την επιρροή ενός ηλεκτρικού φορτίου. Το DNA μπορεί να προσδιοριστεί άμεσα στο πήκτωμα καθώς οι ζώνες του χρωματίζονται με βρωμιούχο αιθίδιο (φθορίζουσα χρωστική που παρεμβάλλεται ανάμεσα στις βάσεις). Συνεπώς, με τη χρήση υπεριώδους φωτός δύναται να είναι ορατό DNA ακόμη και χαμηλής συγκέντρωσης (1ng). Επιπρόσθετα, το πρότυπο των ζωνών που δημιουργείται επιτρέπει τον προσδιορισμό του μεγέθους σύμφωνα με τους μάρτυρες μοριακού βάρους. Η κινητική ικανότητα του DNA κατά την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης εξαρτάται κυρίως από το μέγεθος του DNA, τη συγκέντρωση της αγαρόζης, την στερεοδιάταξη του DNA, την ένταση του ρεύματος, την παρουσία χρωστικών και τη σύσταση και την ιοντική ισχύ του διαλύματος ηλεκτροφόρησης.

6.5.1 Υλικά

- Αγαρόζη
- TBE (Tris-borate-EDTA) ή TAE (Tris-acetate-EDTA)
- Κωνική Φιάλη
- Ζυγός
- Φούρνος
- ddH₂O
- Βρωμιούχο αιθίδιο
- Καλούπι
- Χτενάκια
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης
- Χρωστική (Loading Dye 6x)
- Ακτινοβολία UV

6.5.2 Μέθοδος

➤ Η ποσότητα της αγαρόζης που απαιτείται για την δημιουργία του πηκτώματος ζυγίζεται και τοποθετείται σε φιάλη. Η συγκέντρωση της αγαρόζης στο πήκτωμα καθορίζεται κυρίως από το μέγεθος του DNA που θα αναλυθεί.

*Για το διαχωρισμό μεγάλων μορίων DNA χρησιμοποιούνται χαμηλές συγκεντρώσεις αγαρόζης (0,4% - 1,2% w/v) ενώ για την ανάλυση μορίων μικρού μεγέθους χρησιμοποιούνται υψηλές συγκεντρώσεις αγαρόζης (μέχρι 2,5 % w/v).

➤ Έπειτα προστίθεται το διάλυμα ηλεκτροφόρησης, TAE (Tris-acetate-EDTA) ή TBE (Tris-borate-EDTA).

*Το TAE έχει λιγότερη ρυθμιστική ικανότητα και εξαντλείται εύκολα σε παρατεταμένες ηλεκτροφορήσεις.

➤ Ακολουθεί θέρμανση του διαλύματος έως ότου να γίνει τελείως διαυγές. Το διάλυμα ψύχεται μέχρι να φτάσει θερμοκρασία ~50°C.

➤ Προστίθεται βρωμιούχο αιθίδιο (1μg/ml) και το διάλυμα τοποθετείται στο καλούπι της συσκευής ηλεκτροφόρησης για να τηχθεί εφόσον προηγουμένως έχουν τοποθετηθεί σε αυτό τα χτενάκια με κάθετη κατεύθυνση.

➤ Σε κάθε δείγμα προστίθεται χρωστική 1x και έπειτα τοποθετούνται στα πηγαδάκια του πηκτώματος.

➤ Ακολουθεί ηλεκτροφόρηση σε οριζόντια συσκευή με σταθερή τάση και η παρακολούθηση της διαδικασίας ή η ποσοτικοποίηση των ζωνών του DNA γίνεται με έκθεση του πηκτώματος σε ακτινοβολία UV.

6.6 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (PAGE)

6.6.1 Υλικά

- Ακρυλαμίδιο
- Bis-ακρυλαμίδιο
- ddH₂O
- TBE
- Ποτήρι ζέσεως
- APS 10%
- TEMED
- Κατακόρυφη συσκευή ηλεκτροφόρησης
- Μήτρα πολυμερισμού, τζάμια, χτενάκι
- Αντικολλητική σιλικόνη
- Χρωστική 6x (Loading dye)

6.6.2 Μέθοδος

➤ Για την παρασκευή διαλύματος 50% πολυακρυλαμιδίου χρειάζονται 29 μέρη ακρυλαμιδίου και 1 μέρος Bis-ακρυλαμίδιο.

➤ Σε ένα ποτήρι ζέσεως προστίθενται 72,5gr ακρυλαμίδιο, 2,5gr Bis-ακρυλαμίδιο και 60ml ddH₂O. Το διάλυμα αναδεύεται με θέρμανση, διηθείται και προστίθεται ddH₂O μέχρι V_{τελ}=150ml.

*Τα 100ml διαλύματος περιέχουν 50gr ακρυλαμίδιο
⇒ Τα 150ml διαλύματος περιέχουν 75gr ακρυλαμίδιο.

➤ Για την παρασκευή πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου 12%, V_{τελ}: 70ml προστίθενται:

Πολυακρυλαμίδιο 50%	17ml
TBE 5x	14ml
ddH ₂ O	39ml
TEMED	70μl
APS 10%	700μl

*Το TEMED και το APS 10% χρησιμοποιούνται για να γίνει ο πολυμερισμός του πηκτώματος.

➤ Έπειτα, το διάλυμα τοποθετείται στη μήτρα πολυμερισμού όπου έχει προηγηθεί επάλειψη με σιλικόνη στα τζάμια.

➤ Τοποθετείται το χτενάκι και το πήκτωμα παραμένει σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να πολυμεριστεί (περίπου 2 ώρες).

➤ Στη συσκευή ηλεκτροφόρησης τοποθετείται η μήτρα και TBE 1x.

➤ Σε κάθε δείγμα DNA προστίθεται 1x χρωστική και τοποθετούνται στα πηγαδάκια.

➤ Ακολουθεί ηλεκτροφόρηση σε σταθερή τάση, 160V για 5 ώρες.

6.7 Εμφάνιση πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου με χρώση με νιτρικό άργυρο

➤ Παρασκευάζεται το διάλυμα fix solution: σε ddH₂O προστίθεται 2% αιθανόλη και 0,0125% οξικό οξύ.

➤ Το πήκτωμα τοποθετείται σε δοχείο που περιέχει το fix solution και αναδεύεται για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το υγρό αφαιρείται και προστίθεται εκ νέου fix solution όπου και επαναλαμβάνεται το βήμα.

➤ Το διάλυμα αφαιρείται και ακολουθεί μια πλύση για 1 λεπτό με ddH₂O.

➤ Παρασκευάζεται το staining solution: σε ddH₂O προστίθεται σκόνη AgNO₃ (1gr/l).

➤ Το πήκτωμα τοποθετείται σε δοχείο με το staining solution και αναδεύεται για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

➤ Το διάλυμα αφαιρείται και ακολουθούν δύο πλύσεις με ddH₂O διάρκειας ενός λεπτού η καθεμία.

➤ Παρασκευάζεται το developing solution: σε ddH₂O προστίθεται 1,5% w/v NaOH, 0,005% w/v NaBH₄ και 0,5% v/v φορμαλδεΐδη.

➤ Το πήκτωμα τοποθετείται στο δοχείο με το developing solution και αναδεύεται μέχρι να γίνει η εμφάνιση των ζωνών.

➤ Με την ολοκλήρωση της εμφάνισης, για να διακοπεί η αντίδραση προστίθεται ddH₂O και ακολουθεί πλύση για 3 λεπτά.

6.8 Εμφάνιση πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου με χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο

- Μόλις ολοκληρωθεί η ηλεκτροφόρηση, το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου εμβαπτίζεται σε διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου 1μg/μl για 30 λεπτά με ανάδευση σε shaker σε θερμοκρασία δωματίου.
- Έπειτα, ακολουθεί η εμφάνιση του πηκτώματος με τη χρήση ακτινοβολίας UV και το αποτέλεσμα αποτυπώνεται σε φωτογραφία.

6.9 Ανάκτηση DNA από πήκτωμα αγαρόζης

- Για την ανάκτηση του DNA χρησιμοποιείται το gel extraction kit GF-1 (Geneon) με τις οδηγίες του κατασκευαστή.
- Έπειτα από την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης οι ζώνες που αντιστοιχούν στα μόρια DNA αποκόπτονται με νυστέρι.
- Οι ζώνες τοποθετούνται σε eppendorf και ζυγίζονται. Προστίθεται 1V από το buffer GB για έναν όγκο του πηκτώματος (για 0,1gr πηκτώματος προστίθενται 100μl buffer GB).
- * Το buffer GB περιέχει άλατα γουανιδίνης, που βοηθούν στη δέσμευση του DNA στη στήλη.
- Το δείγμα φυγοκεντρείται στιγμιαία ώστε το πήκτωμα να τοποθετηθεί στον πάτο του eppendorf και να διαβρέχεται πλήρως από το buffer GB.
- Επωάζεται στο υδατόλουτρο στους 50°C μέχρι το πήκτωμα να διαλυτοποιηθεί εντελώς ενώ ανά τακτά διαστήματα το eppendorf αναδεύεται.
- Το διάλυμα μεταφέρεται στη στήλη (κολονίτσα) και φυγοκεντρείται σε θερμοκρασία δωματίου, σε 10000 g στροφές για 1 λεπτό.
- Το υγρό απορρίπτεται και επαναλαμβάνεται το βήμα της φυγοκέντρησης σε περίπτωση που περίσσεψε διάλυμα από το προηγούμενο στάδιο.
- Στη στήλη προστίθενται 750μl Wash Buffer και ακολουθεί φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία δωματίου, σε 10000 g στροφές για 1 λεπτό.
- Το υγρό που συλλέγεται στο eppendorf απορρίπτεται.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία δωματίου, σε 10000 g στροφές για 1 λεπτό για να αφαιρεθεί η περίσσεια της αιθανόλης.
- *Το βήμα είναι απαραίτητο καθώς η παρουσία της αιθανόλης μπορεί να επηρεάσει την ποιότητα του

DNA και πιθανόν να αναστείλει ενζυμικές αντιδράσεις.

- Η στήλη τοποθετείται σε καθαρό eppendorf και προστίθενται 30-50μl elution buffer, TE buffer ή αποστειρωμένο νερό και επωάζεται για 2 λεπτά.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία δωματίου, σε 10000 g στροφές για 1 λεπτό για να ελευθερωθεί το DNA.
- Το DNA φυλάσσεται στους 4°C ή στους -20°C.

6.10 Ανάκτηση DNA από πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου

- Αρχικά απομονώνονται οι ζώνες του DNA με νυστέρι, τοποθετούνται σε eppendorfs και έπειτα ζυγίζονται.
- Με τη χρήση εμβόλου η γέλη ομογενοποιείται και προστίθεται elution buffer (0,5M ammonium acetate, 10mM magnesium acetate, 1mM EDTA, 0,1% SDS) ποσότητας 2V του αρχικού όγκου του πηκτώματος.
- Τα eppendorfs καλύπτονται με parafilm και επωάζονται στους 37°C για ~12-16 ώρες.
- Πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στο δείγμα για 1 λεπτό σε 12.000 rpm και το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο eppendorf.
- Στο ίζημα προστίθενται 500μl elution buffer, γίνεται ανάδευση με vortex και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 1 λεπτό σε 12.000rpm.
- Το υπερκείμενο ενώνεται με το υπερκείμενο από το προηγούμενο βήμα.
- Οι στήλες έκλουσης του DNA περιέχουν υαλοβάμβακα σε ένα eppendorf 500μl με μια οπή στον πάτο του και το οποίο εσωκλείεται σε ένα eppendorf 1,5 ml.
- Στη στήλη προστίθενται σταδιακά έως 500μl του δείγματος και ακολουθεί φυγοκέντρηση για μισό λεπτό σε χαμηλή ταχύτητα.
- Μόλις ολοκληρωθεί η διαδικασία στο τελικό διάλυμα που συλλέγεται γίνεται κατακρήμνιση του DNA με την προσθήκη γλυκογόνου και 2,5V αιθανόλη 100%.
- Το ίζημα επαναδιαλύεται στον επιθυμητό όγκο ddH₂O.

7. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης PCR (Polymerase Chain Reaction)

Η PCR ανακοινώθηκε για πρώτη φορά στην επιστημονική κοινότητα στα μέσα της δεκαετίας του '80 (Saiki et al., 1985; Mullis et al., 1986; Mullis & Faloona, 1987) ενώ το 1993 ο Dr. Kary Banks Mullis τιμήθηκε με το βραβείο Νόμπελ Χημείας για την συμβολή του στην ανακάλυψη της μεθόδου. Πρόκειται για μια τεχνική γρήγορη, εύκολη και οικονομική που επιτρέπει τον πολλαπλασιασμό *in vitro* επιλεγμένων αλληλουχιών DNA. Η μέθοδος είναι εξαιρετικά ευαίσθητη και επιλεκτική καθώς υπάρχει δυνατότητα ανίχνευσης μιας αλληλουχίας από ένα μόριο DNA (Li et al 1990). Βασίζεται στην επαναλαμβανόμενη αντιγραφή ενός τμήματος DNA με τη βοήθεια μιας ειδικής θερμοανθεκτικής πολυμεράσης (taq DNA πολυμεράση), δύο ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών σχεδιασμένων σε γνωστές αλληλουχίες και ενός διαλύματος δεοξυριβονουκλεοτιδίων. Η DNA πολυμεράση έχει μοριακό βάρος 94 kDa, απομονώνεται από το θερμοφίλο βακτήριο *Thermus aquaticus* (Saiki et al., 1988) και επιτρέπεται η χρήση της σε υψηλές θερμοκρασίες κατά την αντίδραση (υβριδισμός και επιμήκυνση). Η βέλτιστη θερμοκρασία πολυμερισμού είναι μεταξύ 75-80°C και η ταχύτητα σύνθεσης είναι 150 νουκλεοτίδια/μόριο ενζύμου το δευτερόλεπτο. Το ζεύγος των εκκινητών καθορίζει τα όρια του τμήματος DNA που θα ενισχυθούν και η βέλτιστη συγκέντρωση τους στην αντίδραση πρέπει να κυμαίνεται από 0,4-0,6 μM καθώς μεγαλύτερες συγκεντρώσεις μπορεί να προκαλέσουν την σύνθεση διμερών και την ενίσχυση μη ειδικών προϊόντων. Οι εκκινητές θα πρέπει να έχουν μήκος 18-24 νουκλεοτιδίων και η κατανομή τους να είναι τυχαία όπου η περιεκτικότητα G/C να κυμαίνεται μεταξύ 40-60%. Επίσης, θα πρέπει να μην εμφανίζουν συμπληρωματικότητα στο 3' ή 5' άκρο τους ώστε να αποφεύγεται η παραγωγή μη ειδικών προϊόντων αλλά και των διμερών. Οι εκκινητές δεν πρέπει να περιέχουν εσωτερικές παλίνδρομες αλληλουχίες όπως επίσης και επαναλήψεις 3 ή περισσότερων C ή G στο 3' άκρο τους και θα πρέπει να έχουν παρόμοιες θερμοκρασίες τήξης (melting temperature, T_m). Το διάλυμα ελεύθερων 5' τριφωσφορικών

δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs: dATP, dCTP, dGTP και dTTP) πρέπει να περιέχει συγκέντρωση 0,2mM από το καθένα για να περιοριστεί η πιθανότητα εισαγωγής λάθους νουκλεοτιδίου. Επιπρόσθετα, η κατάλληλη συγκέντρωση διαλύματος $MgCl_2$ αποτελεί απαραίτητο παράγοντα για την αντίδραση καθώς τα ιόντα Mg^{+2} είναι απαραίτητα για τη δράση της πολυμεράσης με βέλτιστη συγκέντρωση μεταξύ 1,5-2,0mM ενώ υψηλότερες συγκεντρώσεις μπορεί να προκαλέσουν τον πολυμερισμό λάθους νουκλεοτιδίων αλλά και τη δημιουργία μη ειδικών προϊόντων (Harris & Jones, 1997). Τέλος, απαραίτητος παράγοντας για την αντίδραση είναι το ρυθμιστικό διάλυμα της taq πολυμεράσης (buffer) καθώς έτσι διατηρούνται σταθερά το pH και η ιοντική ισχύς με την παρουσία tris-HCl και NaCl ή KCl αντίστοιχα.

Συνεπώς, για την εκτέλεση της αντίδρασης, αρχικά το δείγμα DNA (στόχος) αναμιγνύεται μαζί με το ζεύγος των εκκινητών, την ειδική πολυμεράση και τα δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs). Ακολουθεί το στάδιο της αποδιάταξης του DNA στους 94-95°C και στη συνέχεια το δείγμα ψύχεται στους 50-65°C ώστε οι εκκινητές να υβριδοποιηθούν με τις μονόκλωνες αλυσίδες του DNA. Τέλος, ακολουθεί επιμήκυνση των εκκινητών και πολυμερισμός στους 72°C και τα προαναφερόμενα στάδια επαναλαμβάνονται ~35-40 φορές μέχρι να συντεθεί αρκετή ποσότητα του προϊόντος. Ο αριθμός των κλώνων που προκύπτουν είναι 2^n όπου n είναι ο αριθμός των κύκλων.

7.1 Υλικά

- DNA στόχος (20-40ng)
- Ζεύγος εκκινητών (10pmol/μl ο καθένας)
- Τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (10mM το καθένα)
- Ένζυμο Taq DNA πολυμεράσης (5units/μl)
- Ρυθμιστικό διάλυμα της Taq DNA πολυμεράσης (1x)
- Ιόντα Mg^{+2} (25mM)
- ddH₂O
- PCR tubes (200μl)
- Πιπέτα
- Vortex
- Πάγος

- Φυγόκεντρος

7.2 Μέθοδος

➤ Τα αντιδραστήρια τοποθετούνται σε πάγο ώστε να διατηρηθούν και να μειωθεί η πιθανότητα αλλοίωσης της αντίδρασης.

➤ Σε PCR tube τοποθετούνται το DNAστόχος, το ρυθμιστικό διάλυμα (1x), τα τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (40mM), οι εκκινητές (0,4-0,6 μM ο καθένας), το MgCl₂ (1,5mM), το ένζυμο της Taq DNA πολυμεράσης (1 unit) και ddH₂O μέχρι να συμπληρωθεί ο τελικός όγκος της αντίδρασης.

➤ Το tube τοποθετείται σε συσκευή θερμικού κυκλοποιητή υπό τις συνθήκες:

Αρχική αποδιάταξη: 94°C, 2-4 λεπτά

Αποδιάταξη: 94°C, 30 δευτερόλεπτα

Υβριδισμός: T_m-5°C, 30 δευτερόλεπτα

Επιμήκυνση: 72°C, ~1 λεπτό/kb

} 30 κύκλους

Τελική επιμήκυνση: 72°C, 5 λεπτά

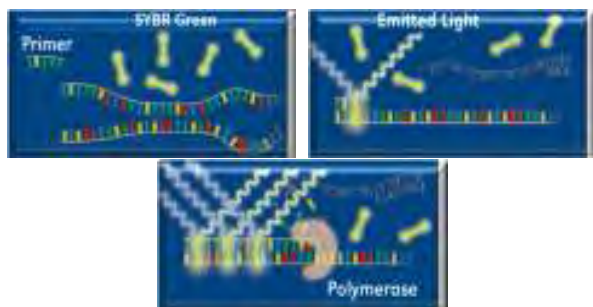
➤ Τα προϊόντα της αντίδρασης αναλύονται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης ή και σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου.

8. PCR πραγματικού χρόνου (Real time PCR, q-PCR)

Κατά την PCR πραγματικού χρόνου ανιχνεύονται όλα τα δίκλινα μόρια DNA που ενισχύονται με την αντίδραση. Συνεχείς μετρήσεις της ποσότητας του προϊόντος πραγματοποιείται σε όλη τη διάρκεια της αντίδρασης, που γίνονται αντιληπτές μέσω της παρακολούθησης της αύξησης του φθορισμού της φθορίζουσας ουσίας. Ο φθορισμός μετρείται σε κάθε κύκλο της PCR, με αποτέλεσμα να προκύπτει μια καμπύλη ενίσχυσης (amplification plot). Η αύξηση του σήματος φθορισμού είναι ανάλογη του συντιθέμενου προϊόντος και έχει άμεση συσχέτιση με την ποσότητα του αρχικού υποστρώματος. Η καμπύλη ενίσχυσης διακρίνεται σε τρεις φάσεις: την εκθετική, τη γραμμική και τη φάση κορεσμού. Κατά

την εκθετική φάση η αποδοτικότητα είναι της τάξης του 100% και σε κάθε κύκλο της αντίδρασης πραγματοποιείται διπλασιασμός του προϊόντος καθώς όλα τα απαραίτητα για την PCR συστατικά βρίσκονται σε περίσσεια. Κατά τη γραμμική φάση κάποια από τα αντιδραστήρια αρχίζουν να εξαντλούνται ενώ παράλληλα γίνεται σταδιακή συσσώρευση αναστολέων. Στη συγκεκριμένη φάση, η αντίδραση της ενίσχυσης επιβραδύνεται καθώς μειώνεται η αποδοτικότητά της και τελικά σταματάει όπου και η καμπύλη φθορισμού φτάνει σε σημείο κορεσμού (plateau). Το σημείο κορεσμού διαφέρει ανάλογα με το κάθε δείγμα και εξαρτάται από τις κινητικές των αντιδράσεών τους. Οι μετρήσεις για την ποσοτικοποίηση αφορούν την εκθετική φάση της αντίδρασης και η παράμετρος που χρησιμοποιείται για την ποσοτικοποίηση αποτελεί η τιμή Ct (threshold cycle). Πρόκειται για τον αριθμό των κύκλων της αντίδρασης ενίσχυσης που απαιτούνται ώστε η τιμή του παρατηρούμενου φθορισμού να προσεγγίζει ένα συγκεκριμένο όριο (threshold). Η τιμή του ορίου αυτού ορίζεται πάνω από την αντίστοιχη του μη-ειδικού σήματος (background). Η τιμή Ct είναι αντιστρόφως ανάλογη της αρχικής ποσότητας του υποστρώματος: όσο μικρότερη είναι η τιμή Ct τόσο υψηλότερη είναι η συγκέντρωση του αρχικού υποστρώματος (Bustin et al., 2005; Kubista et al., 2006). Η φθορίζουσα χρωστική που χρησιμοποιείται ευρέως είναι η SYBR green I που ενσωματώνεται σε δίκλινο μόριο DNA (dsDNA), διεγείρεται με ακτινοβολία μήκους κύματος 497 nm και εκπέμπει στα 520 nm ενώ όταν βρίσκεται ελεύθερη σε διάλυμα δεν φθορίζει. Η ενσωμάτωσή της SYBR green I στο DNA κατά τη διάρκεια της αντίδρασης έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή φθορισμού και η ένταση του φθορισμού είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του παραγόμενου προϊόντος. Βασικό πλεονέκτημα της SYBR green I είναι η δυνατότητα να χρησιμοποιείται με οποιοδήποτε ζεύγος εκκινητών καθιστώντας την ιδιαίτερα οικονομική μέθοδο σε σχέση με τη χρήση κάποιου άλλου ειδικού ανιχνευτή. Επίσης, σε κάθε μόριο DNA που συντίθεται δεσμεύονται πολλά μόρια χρωστικής με αποτέλεσμα την ενίσχυση του προκύπτοντος σήματος (Εικόνα 24). Το σημαντικότερο μειονέκτημα είναι πως η SYBR green I προσδένεται σε όλα τα συντιθέμενα δίκλινα μόρια

DNA κατά τη διάρκεια της αντίδρασης, όπως τα πιθανά διμερή των εκκινητών και τα μη ειδικά προϊόντα, οδηγώντας σε λάθος εκτίμηση των αποτελεσμάτων. Ωστόσο, με το σωστό σχεδιασμό των εκκινητών, τη βελτιστοποίηση των συνθηκών της αντίδρασης αλλά και με τη μελέτη των καμπύλων αποδιάταξης (melting curves) μετά το τέλος της αντίδρασης δύναται η δυνατότητα ελαχιστοποίησης του σφάλματος.



Εικόνα 24: Σχηματική αναπαράσταση της λειτουργίας της χρωστικής SYBR green I. Η περίσσεια ελεύθερης χρωστικής στο διάλυμα δεν παράγει φθορισμό. Κατά την ενσωμάτωση της χρωστικής στο DNA και παράλληλα με τη διέγερση της σε ακτινοβολία κατάλληλου μήκους κύματος, έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή φθορισμού. Η ένταση του φθορισμού είναι ανάλογη με την συγκέντρωση του παραγόμενου προϊόντος.

8.1.1 Υλικά

- cDNA
- Ζεύγος εκκινητών (400nM ο καθένας)
- iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix (Biorad) (2x)
- ddH₂O
- Hard-Shell 96-well 480 PCR plates (Biorad)
- 0,2 ml PCR tube strips, Low profile (Biorad)
- Πιπέτα
- Πάγος
- Θερμοκυκλοποιητής CFX Connect real-time PCR (Biorad)

8.1.2 Μέθοδος

➤ Σε 0,2 ml PCR tube strips ή σε πιάτα 96 θέσεων τοποθετείται η επιθυμητή συγκέντρωση των δειγμάτων cDNA (5μl από αραιώση 1:10 του αρχικού) με τους εκκινητές, το μείγμα της SYBR Taq (1x) και το ddH₂O ώστε ο τελικός όγκος της αντίδρασης να είναι 15μl.

➤ Το δείγμα τοποθετείται στον θερμοκυκλοποιητή στις συνθήκες αντίδρασης:

Αρχική αποδιάταξη: 94°C, 4 λεπτά

Αποδιάταξη: 94°C, 30 δευτερόλεπτα

Υβριδισμός: T_m-5°C, 30 δευτερόλεπτα

} 40 κύκλους

*Το στάδιο της τελικής επιμήκυνσης δεν απαιτείται καθώς οι συνθήκες της αντίδρασης είναι επαρκείς για την ενίσχυση του επιθυμητού τμήματος στόχου DNA που δεν ξεπερνά τα 180 ζεύγη βάσεων.

Melting curve study: 55°C → 95°C, με σταδιακή αύξηση της θερμοκρασίας 0,5°C/0,05 λεπτό

8.2 Σύνθεση ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών

Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση γενετικών τόπων του δάκου μέσω PCR και qPCR κατασκευάστηκαν σύμφωνα με τη χρήση του διαδικτυακού προγράμματος Primer Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) και βασίστηκαν στο γονιδίωμα συγγενικών ειδών όπως της *Drosophila melanogaster* (flybase.org), του *Bactrocera dorsalis* αλλά και στο τρανσκριπτόμα του δάκου *Bactrocera oleae* όπως προέκυψε μετά από την RNA-seq ανάλυση (Sagri et al., 2014).

Οι παράμετροι που χρησιμοποιήθηκαν για την σύνθεση εκκινητών για την PCR είναι: το μέγεθός τους να κυμαίνεται από 20-22bp και το τμήμα ενίσχυσης του γονιδιώματος ~1000-1200bp. Για τη σύνθεση των εκκινητών της real time PCR λήφθηκαν οι εξής παράμετροι: το μέγεθος τους να είναι μεταξύ 18-23bp ανά εκκινητή, το τμήμα ενίσχυσης να είναι μεταξύ 80-150 bp, το ποσοστό των GC να είναι 40-60% και ο μέγιστος αριθμός GC στο 3' άκρο του εκκινητή να είναι 3. Στα αποτελέσματα, παρατίθενται οι εκκινητές στο σύνολο τους.

8.3 Κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων PCR πραγματικού χρόνου

Κατά την εξέλιξη ενός πειράματος PCR πραγματικού χρόνου δύναται να προκύψουν πιθανές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων που κυρίως οφείλονται σε διαφορετική συγκέντρωση του αρχικού υποστρώματος (cDNA) ή σε διαφορές στην απόδοση κατά την αντίδραση ενίσχυσης. Η κανονικοποίηση των δεδομένων ως προς το ενδογενές γονίδιο (γονίδιο αναφοράς, reference gene) απαιτείται για τη διόρθωση των διαφορών. Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της σχετικής ποσοτικοποίησης που προκύπτει από την εξίσωση $2^{-\Delta\Delta CT}$, όπου $\Delta\Delta CT = \Delta CT$ δείγματος - ΔCT αναφοράς. Η ΔCT του δείγματος είναι η κανονικοποιημένη τιμή CT για κάθε δείγμα ως προς την αντίστοιχη τιμή του γονιδίου αναφοράς, ενώ η τιμή ΔCT αναφοράς είναι η κανονικοποιημένη τιμή CT για το δείγμα αναφοράς. Εξ ορισμού, για το δείγμα αναφοράς ισχύει ότι $2^{-\Delta\Delta CT} = 2^0 = 1$, οπότε η διαφορά στην έκφραση του γονιδίου στόχου στο δείγμα αναφοράς σε σχέση με τον εαυτό του ισούται με 1. Οι αντίστοιχες εξισώσεις για τα υπόλοιπα δείγματα δείχνουν πόσες φορές είναι αυξημένη ή μειωμένη η γονιδιακή έκφραση του γονιδίου-στόχου στα δείγματα αυτά σε σχέση με το δείγμα αναφοράς (Livak and Schmittgen, 2001; Eurogentec 2004).

Στατιστική ανάλυση PCR πραγματικού χρόνου: Η ανάλυση της Real-time PCR αρχικά πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό CFX της Biorad. Η στατιστική ανάλυση ολοκληρώθηκε με τη χρήση του υπολογιστικού λογισμικού Excel (Microsoft Office) όπου πραγματοποιήθηκαν οι υπολογισμοί βασικών στατιστικών παραμέτρων (μέσος όρος, τυπικό σφάλμα, γεωμετρικός μέσος, τυπική απόκλιση και t-test) με τη χρήση των γνωστών συναρτήσεων. Επίσης με τη χρήση του στατιστικού προγράμματος GraphPad Prism ver.6 (GraphPad Software, Inc.) πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση των σημαντικά διαφορετικών μέσων όρων (μικρά γράμματα: a, b, c) που έχουν υπολογιστεί με σύγκριση ανά ζεύγη (Tukey's ή Kruskal-Wallis τεστ). Όλες οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με το Ln μετασχηματισμό των δεδομένων. Σε όλες τις περιπτώσεις, τα εισερχόμενα δεδομένα των γενετικών τόπων ήταν με τη μορφή της σχετικής έκφρασης (Relative Expression).

8.4. Επιλογή του κατάλληλου γονιδίου αναφοράς (Housekeeping genes)

8.4.1 Μέθοδος

- Αρχικά, από τις γνωστές αλληλουχίες που προέκυψαν από το τρανσκριπτόμα του δάκου, συντίθενται ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές για τα υπό εξέταση γονίδια αναφοράς.
- Έπειτα, απομονώνεται ολικό RNA από τον κάθε εξεταζόμενο ιστό και στη συνέχεια ακολουθεί απομάκρυνση υπολειμμάτων DNA.
- Ακολούθως, κατασκευάζεται το cDNA για κάθε δείγμα και ακολουθεί PCR πραγματικού χρόνου.
- Για κάθε ιστό ξεχωριστά πραγματοποιείται αντίδραση εις τριπλούν για όλα τα εξεταζόμενα γονίδια αναφοράς.
- Ακολουθεί επεξεργασία των αποτελεσμάτων όπου και προκύπτει η σχετική έκφραση των γονιδίων.
- Τέλος, γίνεται επεξεργασία με τα στατιστικά προγράμματα (geNorm, NormFinder, BestKeeper και refFinder) με σκοπό τον προσδιορισμό των κατάλληλων γονιδίων αναφοράς για κάθε ιστό σε πιθανή μελέτη μέσω PCR πραγματικού χρόνου (Εικόνα 25).



Εικόνα 25: Σχηματική απεικόνιση της μελέτης προσδιορισμού των κατάλληλων γονιδίων αναφοράς. Από τα δεδομένα της τρανσκριπτομικής ανάλυσης του δάκου εντοπίζονται τα γονίδια αναφοράς που είναι γνωστά σύμφωνα με μελέτες σε άλλους οργανισμούς. Έπειτα από επεξεργασία των αποτελεσμάτων της PCR πραγματικού χρόνου με γνωστούς αλγόριθμους προκύπτει ο κατάλληλος συνδυασμός γονιδίων αναφοράς για το δικό μας πείραμα.

Στατιστική ανάλυση: Τα αποτελέσματα της Real-time PCR αρχικά αναλύθηκαν με το CFX software (Biorad). Η κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων ολοκληρώθηκε με τη χρήση των προγραμμάτων NormFinder (Andersen et al., 2004), geNorm

[(Biogazelle, qbaseplus) (Vandesompele et al., 2002)], BestKeeper (Pfaffl et al., 2004) και το RefFinder(<http://www.leonxie.com/referencegene.php>) όπου και προέκυψε ο κατάλληλος συνδυασμός των γονιδίων αναφοράς. Το πρόγραμμα geNorm είναι μια βάση δεδομένων όπου τα δεδομένα της ποσοτικής PCR εισάγονται με τη μορφή των Cq και από την επεξεργασία του αλγόριθμου εξέρχονται τα αποτελέσματα με τις τιμές των παραγόντων V και M (αναλυτική περιγραφή στο κεφάλαιο των Αποτελεσμάτων). Το NormFinder είναι ένας αλγόριθμος που συνδυάζεται και μπορεί να χρησιμοποιηθεί στο υπολογιστικό λογισμικό Excel (Microsoft Office). Τα δεδομένα εισέρχονται με τη μορφή του Expression και το αποτέλεσμα εξέρχεται μέσω της παραμέτρου stability value, (όσο μικρότερη είναι η τιμή της, τόσο πιο σταθερό είναι το γονίδιο αναφοράς). Το πρόγραμμα BestKeeper είναι ένας excel-based αλγόριθμος όπου τα δεδομένα εισέρχονται με τη μορφή των Cq, έπειτα γίνεται η κατάταξη των γονιδίων σύμφωνα με τις τιμές Standard Deviation (SD) και Coefficient of Variation (CV). Το πιο κατάλληλο γονίδιο αναφοράς είναι εκείνο που έχει τις μικρότερες τιμές SD και CV. Τέλος, το διαδικτυακό πρόγραμμα refFinder είναι μια εφαρμογή που επεξεργάζεται τα δεδομένα τα οποία εισέρχονται με τη μορφή των Cq και κατατάσσει όλα τα πιθανά γονίδια αναφοράς σύμφωνα με τη σταθερότητα της έκφρασης των γονιδίων βασιζόμενο στην κατάταξη των προγραμμάτων geNorm, Normfinder, BestKeeper και τα συγκριτικά προγράμματα της μεθόδου delta-delta Ct. Ο υπολογισμός ενός γεωμετρικού μέσου είναι το εξερχόμενο αποτέλεσμα, όσο μικρότερος είναι ο αριθμός αυτός, τόσο πιο σταθερό είναι το γονίδιο.

Συγκέντρωση BSA (mg/ml)	BSA 10 mg/ml (μl)	Rehydration Buffer (μl)	Διάλυμα Bradford (μl)
0	0	20,0	980
0,2	0,4	19,6	980
0,4	0,8	19,2	980
0,6	1,2	18,8	980
0,8	1,6	18,4	980
1,0	2,0	18,0	980

9. Πρωτεομική Ανάλυση

9.1 Απομόνωση πρωτεϊνών από το έντομο *Bactrocera oleae*

Για την πρωτεομική ανάλυση στο δάκο της ελιάς, μελετήθηκε το πρωτεϊνικό προφίλ μεταξύ αρσενικών και θηλυκών εντόμων του εργαστηριακού πληθυσμού.

9.1.1 Υλικά

- Πάγος
- Νυστέρι
- Γάντια
- Φυγόκεντρος
- Eppendorfs
- Έμβολα
- Μίξερ χειρός
- Μικροπιπέτες
- **Rehydration Buffer** [7M Urea: 0,841gr, 2M Thiourea: 0,304gr, 2% CHAPS: 0,04gr, 10mg/ml DTT: 0,02gr, IPG buffer (0,2%): 20μl, Bromophenol blue: 3μl και dH₂O έως 2ml]

9.1.2 Μέθοδος

- Αρχικά, απομονώνονται 20 κεφάλια από τα αρσενικά έντομα και 20 κεφάλια από θηλυκά έντομα και τοποθετούνται σε ξεχωριστά eppendorfs.
- Έπειτα, προστίθεται ποσότητα 500 μl Rehydration Buffer και το δείγμα ομογενοποιείται με τη χρήση εμβόλου και μίξερ χειρός.
- Τα δείγματα τοποθετούνται στους 4°C για 12-16 ώρες.
- Πραγματοποιείται φυγοκέντριση των δειγμάτων σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα σε 13.000 rpm
- Το υπερκείμενο συλλέγεται σε νέο eppendorf.

9.2 Φωτομετρικός ποσοτικός προσδιορισμός Bradford

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών ενός δείγματος πραγματοποιείται η μέθοδος Bradford. Οι πρωτεΐνες κατά την αντίδραση τους με την περίσσεια του αντιδραστήριου σχηματίζουν μια έγχρωμη ένωση. Σε συγκεκριμένο εύρος φάσματος των συγκεντρώσεων η ποσότητα της σχηματιζόμενης έγχρωμης ένωσης είναι ανάλογη της ποσότητας της αρχικής ουσίας. Η κατασκευή πρότυπης καμπύλης συσχέτισης της οπτικής πυκνότητας με τη συγκέντρωση των πρωτεϊνών με την χρήση δειγμάτων γνωστής συγκέντρωσης πρωτεΐνης είναι απαραίτητη για την ποσοτικοποίηση του δείγματος.

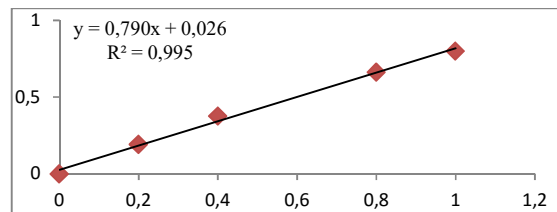
9.2.1 Υλικά

- Rehydration buffer
- Φωτόμετρο σε 595nm
- BSA (10 mg/ml)
- Vortex
- Μικροπιπέτες
- Eppendorfs
- Διάλυμα Bradford
- Υπολογιστικό φύλλο excel

9.2.2 Μέθοδος

- Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης χρησιμοποιείται η πρωτεΐνη BSA σε γνωστές συγκεντρώσεις.
- Είναι απαραίτητο να προστίθεται σε κάθε νέα καμπύλη το αντίστοιχο διάλυμα με το οποίο έχει γίνει η απομόνωση των πρωτεϊνών. Επομένως, χρησιμοποιείται το Rehydration buffer.
- Σε κάθε δείγμα αρχικά γίνεται καθαρισμός και επαναδιάλυση σε Rehydration buffer. Έπειτα, τα δείγματα αραιώνονται σε αναλογία 1/5 και 1/10 με Rehydration buffer για την βελτιστοποίηση των μετρήσεων.
- Συνολικά, παρασκευάζονται 6 διαδοχικές συγκεντρώσεις (1ml) με τη χρήση της πρωτεΐνης BSA όπου και στην καμπύλη που θα προκύψει θα γίνει η σύγκριση των τιμών των εξεταζόμενων δειγμάτων.
- Αναλυτικά:

- Στη συνέχεια τα δείγματα αναδεύονται με τη χρήση vortex και επωάζονται για 10 min σε σκοτεινό θάλαμο.
- Πραγματοποιείται φωτομέτρηση στα 595nm.
- Κατασκευάζεται η πρότυπη καμπύλη και γίνεται ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών σύμφωνα με την πρότυπη εξίσωση (Εικόνα 26).



Εικόνα 26: Πρότυπη καμπύλη

9.3. Κατακρήμνιση/Καθαρισμός πρωτεϊνών

9.3.1 TCA/Ice-cold acetone

Ο συνδυασμός των δύο αντιδραστηρίων (TCA και ακετόνη) βελτιστοποιεί τα αποτελέσματα της κατακρήμνισης των πρωτεϊνών σε σχέση με την ξεχωριστή χρήση τους. Τα μειονεκτήματα της μεθόδου είναι η δυσκολία στην επαναδιάλυση του ιζήματος και η ενδεχόμενη αποικοδόμηση μερικών πρωτεϊνών εξαιτίας του χαμηλού pH του διαλύματος.

9.3.1.1 Υλικά

- Ακετόνη
- TCA
- Φυγόκεντρος
- Vortex
- Rehydration buffer
- Eppendorfs
- Μικροπιπέτες

9.3.1.2 Μέθοδος

- Σε eppendorf που περιέχει το πρωτεϊνικό δείγμα προστίθεται παγωμένη ακετόνη και TCA 100% σε αναλογίες: 1:8:1 αντίστοιχα.
- Το μείγμα επωάζεται για 1 ώρα στους -20°C.
- Ακολουθεί φυγοκέντρωση σε 14.000 rpm για 15 λεπτά στους 4°C και το υπερκείμενο απορρίπτεται.

➤ Στο ίζημα προστίθεται 1ml παγωμένης ακετόνης και αναδεύεται με vortex.

➤ Έπειτα γίνεται φυγοκέντριση στις 14.000 rpm για 15 λεπτά στους 4°C και το υπερκείμενο απορρίπτεται.

➤ Το βήμα επαναλαμβάνεται συνολικά τρεις φορές, το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει.

*Ο χρόνος δεν θα πρέπει να ξεπερνά τα 5-10 λεπτά καθώς η υπέρβαση του προκαλεί δυσκολία στην επαναδιάλυση του ιζήματος.

➤ Τέλος, το ίζημα επαναδιαλύεται στον επιθυμητό όγκο με Rehydration buffer

9.3.2 Φαινόλη/ Παγωμένη ακετόνη (Phenol/Ice-cold acetone)

Η συγκεκριμένη μέθοδος χρησιμοποιείται των πρωτεϊνών από ένα δείγμα DNA. Απομακρύνοντας το DNA από το αρχικό δείγμα έχει το αντίθετο αποτέλεσμα, που είναι το επιθυμητό, την κατακρήμνιση των πρωτεϊνών. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην αλληλεπίδραση της λιγότερο πολικής φαινόλης με τις υδρόφοβες αλυσίδες των πρωτεϊνών και ουσιαστικά της πρόκλησης μόνιμης μετουσίωσης των πρωτεϊνών. Συνεπώς, οι υδρόφοβες αλυσίδες στρέφονται προς το εξωτερικό περιβάλλον του διαλύματος ενώ οι πολικές αλυσίδες στρέφονται στο εσωτερικό για να προστατευθούν από το ακατάλληλο περιβάλλον. Ως αποτέλεσμα, οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται από το DNA και έτσι στο διάλυμα οι πρωτεΐνες βρίσκονται στη φάση της φαινόλης (κάτω φάση) ενώ το DNA με τους πολυσακχαρίτες βρίσκεται στην υδατική φάση (πάνω φάση).

9.3.2.1 Υλικά

- Ακετόνη
- Φαινόλη
- Πάγος
- Φυγόκεντρος
- Rehydration buffer
- Eppendorfs
- Μικροπιπέτες
- Υδατόλουτρο στους 70° C

9.3.2.2 Μέθοδος

➤ Σε 1V πρωτεϊνικό δείγμα προστίθεται 1/2V φαινόλης (water-saturated phenol mix) και το μείγμα θερμαίνεται σε υδατόλουτρο στους 70° C για 10 λεπτά.

➤ Το διάλυμα επωάζεται για 5 λεπτά σε πάγο και το δείγμα φυγοκεντρείται σε 5.000 rpm για 10 λεπτά στους 4°C.

*Στο στάδιο αυτό γίνεται ο διαχωρισμός των δύο φάσεων. Οι πρωτεΐνες βρίσκονται στην κάτω φάση (φαινολική).

➤ Η υδατική φάση συλλέγεται σε νέο eppendorf και παράλληλα διατηρείται η φαινολική φάση. Στην υδατική φάση επαναλαμβάνουμε τα παραπάνω βήματα με την προσθήκη φαινόλης.

➤ Μετά τη φυγοκέντριση διαχωρίζεται η υδατική από τη φαινολική φάση και συλλέγεται μόνο η φαινολική φάση.

➤ Ενώνονται οι δύο φαινολικές φάσεις και προστίθενται 2ml παγωμένης ακετόνης.

➤ Το διάλυμα επωάζεται για 3 ώρες στους -20°C.

➤ Ακολουθεί φυγοκέντριση σε 14.000 rpm για 30 λεπτά στους 4°C και το υπερκείμενο απορρίπτεται.

➤ Στο ίζημα γίνεται πλύση με 200μl 80% παγωμένης ακετόνης και το δείγμα φυγοκεντρείται σε 14000 rpm για 10 λεπτά στους 4°C.

➤ Συνολικά, το βήμα των πλύσεων επαναλαμβάνεται έξι φορές.

➤ Το υπερκείμενο απορρίπτεται και στο ίζημα γίνεται πλύση με 200μl 100% παγωμένης ακετόνης.

➤ Γίνεται φυγοκέντριση σε 14000 rpm για 10 λεπτά στους 4°C, το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει.

* Ο χρόνος δεν θα πρέπει να ξεπερνά τα 5-10 λεπτά καθώς η υπέρβαση του προκαλεί δυσκολία στην επαναδιάλυση του ιζήματος.

➤ Τέλος, το ίζημα επαναδιαλύεται στον επιθυμητό όγκο με Rehydration buffer

9.3.3 2D cleanup-kit (Biorad)

Με τη χρήση του συγκεκριμένου kit διευκολύνεται η προετοιμασία δειγμάτων με χαμηλή αγωγιμότητα καθιστώντας τα κατάλληλα για την ισοηλεκτρική εστίαση αλλά και την δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση.

Επιπρόσθετα, επιτυγχάνεται η συμπίκνωση των πρωτεϊνών από διαλύματα που είναι ιδιαίτερα αραιά καθιστώντας δυνατή την ανίχνευση των κηλίδων για τις πρωτεΐνες μεγάλου φορτίου. Παράλληλα, βελτιώνεται το αποτέλεσμα της δισδιάστατης ηλεκτροφόρησης καθώς μειώνονται οι οριζόντιες γραμμές στο φόντο του πηκτώματος, ενώ ταυτόχρονα απομακρύνει ουσίες όπως ιονικά απορρυπαντικά, άλατα, νουκλεϊκά οξέα και φαινολικές ενώσεις που αποτελούν παρεμποδιστές στην εστίαση ισοηλεκτρικού σημείου των πρωτεϊνών

9.3.3.1 Υλικά

- 2D clean-up (Biorad)
- HPLC H₂O
- Πάγος
- Φυγόκεντρος
- Rehydration buffer
- Eppendorfs
- Μικροπιπέτες
- Απαγωγός

9.3.3.2 Μέθοδος

- Σε eppendorf μεταφέρονται 1-500μg πρωτεΐνης σε διάλυμα τελικού όγκου 100μl.
- *Ποσότητες πρωτεΐνης μεγαλύτερες των 500μg ενδέχεται να μειώσουν την αποτελεσματικότητα του καθαρισμού οδηγώντας σε χαμηλής ποιότητας IEF.
- Στο δείγμα προστίθενται 300μl precipitating agent 1, γίνεται ανάδευση με vortex και έπειτα το διάλυμα επωάζεται σε πάγο για 15 λεπτά.
- Στη συνέχεια, στο δείγμα προστίθενται 300μl precipitating agent 2 και γίνεται ανάδευση με vortex.
- Το διάλυμα φυγοκεντρείται για 15-20 λεπτά σε 12.000g.
- Το υπερκείμενο απορρίπτεται και στο ίζημα προστίθενται 40μl wash reagent 1.
- Ακολουθεί φυγοκέντριση για 5 λεπτά σε 12.000 g και το υπερκείμενο απορρίπτεται.
- Στο ίζημα προστίθενται 25μl HPLC H₂O και γίνεται ανάδευση με vortex για 10-20 δευτερόλεπτα.
- Έπειτα, προστίθενται 1ml wash reagent 2 και 5μl wash 2 additive και το δείγμα αναδεύεται με vortex για 1 λεπτό.

- Το διάλυμα επωάζεται για 30 λεπτά στους -20°C με συχνές αναδεύσεις κατά τη διάρκεια της επώασης σε vortex για 30 δευτερόλεπτα.
- Το δείγμα φυγοκεντρείται για 5 λεπτά σε 12.000 g και το υπερκείμενο απορρίπτεται.
- Το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει στον απαγωγό σε θερμοκρασία δωματίου και από λευκό χρώμα μετατρέπεται σε διαφανές.
- * Η διάρκεια του βήματος δεν πρέπει να ξεπεράσει τα 5 λεπτά διότι θα είναι δύσκολη η επαναδιάλυση του ιζήματος.
- Τέλος, το ίζημα επαναδιαλύεται σε rehydration buffer και δύναται να χρησιμοποιηθεί απευθείας για την ηλεκτροφόρηση πρώτης διάστασης (IEF) ειδήλλως φυλάσσεται στους -20°C.

9.4. Ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων

Ο συνδυασμός της ισοηλεκτρικής εστίασης με την SDS-PAGE είναι μια ισχυρή τεχνική για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών. Κατά την ισοηλεκτρική εστίαση, οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται με βάση το ισοηλεκτρικό τους σημείο (pI), δηλαδή το pH στο οποίο το ολικό ηλεκτρικό φορτίο τους ισούται με μηδέν. Ενώ, με την SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται με βάση το μοριακό τους βάρος υπό την επίδραση ηλεκτρικού φορτίου.

9.4.1 Ηλεκτροφόρηση πρώτης διάστασης-Ισοηλεκτρική εστίαση (IEF)

- Στο πρώτο βήμα της ισοηλεκτρικής εστίασης πραγματοποιείται το στάδιο της ενυδάτωσης (rehydration). Το διάλυμα ενυδάτωσης περιέχει:
 - 🧪 Ουρία (urea): ουδέτερη χαοτροπική ουσία που διαλυτοποιεί και μετουσιώνει τις πρωτεΐνες.
 - 🧪 Θειουρία (Thiourea): σε συνδυασμό με την ουρία χρησιμοποιείται για την βελτίωση της διαλυτοποίησης ιδιαίτερα των υδροφοβικών πρωτεϊνών.
 - 🧪 Chaps: απορρυπαντικό με μηδενικό ηλεκτρικό φορτίο που διαλυτοποιεί τις υδροφοβες πρωτεΐνες και μειώνει τη δημιουργία συσσωματωμάτων των διαφορετικών πρωτεϊνών.
 - 🧪 Διθειοθρεϊτόλη (DTT): αναγωγική ουσία που χρησιμοποιείται για την διάσπαση των δισουλφιδικών δεσμών και τη διατήρηση των πρωτεϊνών μέσω της

ενυδάτωσης τους σε αποδιαταγμένη κατάσταση. (Προστίθεται πάντα τελευταίο λίγο πριν την διανομή του δείγματος στο strip).

✚ Αμφολύτες (IPG Buffer): βελτιώνει τον διαχωρισμό των πρωτεϊνών, αυξάνει την διαλυτότητα τους και συμβάλει στην ομοιόμορφη κατανομή της αγωγιμότητας κατά μήκος του strip.

✚ Κυανό της βρωμοφαινόλης: η συγκεκριμένη χρωστική χρησιμοποιείται για την παρακολούθηση της εξέλιξης της πορείας της ισοηλεκτρικής εστίασης.

9.4.1.1 Υλικά:

- IPG strips μήκους 17cm, pH 3-10
- IPG strips μήκους 7 cm, pH 3-10
- IPG buffer
- Chaps
- Mineral oil
- Tray για την επώαση των strips
- Συσκευή PROTEAN IEF και focusing tray
- Λαβίδες
- Χαρτάκια για ηλεκτρόδια
- ddH₂O
- Rehydration buffer: $V_{\text{πρωτεΐνης}} (\mu\text{l}) = m(\text{φορτώματος})\mu\text{g}/C$ (υπολογίζεται από την καμπύλη Bradford) (μg/μl), 2% chaps: 0,04gr*V (Rehydration buffer) μl/2000μl διαλυμένα σε Rehydration buffer, 10mg/ml DTT:0,02gr* V (Rehydration buffer) μl/2000μl διαλυμένα σε Rehydration buffer, 0,2% IPG buffer: 20μl* V (Rehydration buffer) μl/2000μl Rehydration buffer

9.4.1.2 Μέθοδος

➤ Αρχικά, παρασκευάζεται το διάλυμα ενυδάτωσης και στην παρούσα εργασία στο στάδιο αυτό φορτώνονται για τα strip 17cm, 350μg πρωτεΐνης σε 300μl rehydration buffer και για τα strip 7cm, 100μg πρωτεΐνης σε 125μl rehydration buffer.

**Σημείωση:* Κατά το στάδιο της ενυδάτωσης του strip πρέπει πάντα να φορτώνονται ίσες ποσότητες πρωτεϊνών όταν μελετώνται δυο διαφορετικά στελέχη.

➤ Το διάλυμα ανακινείται ελαφρά και απλώνεται με προσοχή κατά μήκος της θέσης διαδρόμου στην

ειδική θήκη (tray) ώστε να αποφευχθεί η δημιουργία φυσαλίδων.

➤ Με τη χρήση λαβίδας τα IPG strips τοποθετούνται προσεκτικά, με την πλευρά του πηκτώματος να ακουμπά στο δείγμα.

➤ Το δείγμα αφήνεται περίπου 20 λεπτά να απορροφηθεί από το πήκτωμα και έπειτα το strip καλύπτεται με 1-2 ml mineral oil για να αποφευχθεί η εξάτμιση του δείγματος.

➤ Τέλος, εφόσον το tray σφραγιστεί με το καπάκι αφήνεται για 12-16 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.

➤ Για το στάδιο της ηλεκτροφόρησης, αρχικά σε κάθε ηλεκτρόδιο της συσκευής τοποθετούνται δύο εμποτισμένα χαρτάκια με απιονισμένο νερό.

➤ Έπειτα, με τη χρήση λαβίδας το strip τοποθετείται στον διάδρομο της συσκευής PROTEAN IEF focusing tray με προσοχή στους πόλους και στη φορά του πηκτώματος.

➤ Το strip καλύπτεται με 1-2ml mineral oil και ξεκινά η ηλεκτροφόρηση πρώτης διάστασης.

➤ Οι συνθήκες ισοηλεκτρικής εστίασης για τα IPG strips (17 cm) είναι:

- Step 1: RAPID, 250V, 2h-4h
- Step 2:RAPID, 1000 V, 1h
- Step 3: GRADIENT, 6000V, 4h
- Step 4: RAPID, 6000V, 60000 Vhrs
- Step 5: RAPID, 500V, 1min
- Step 6: RAPID, 500V, 20h

*Στο πρώτο βήμα η ένταση του ρεύματος δεν πρέπει να ξεπερνά τα 10μΑ/ gel.

9.4.2 Ηλεκτροφόρηση δεύτερης διάστασης -SDS πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE)

9.4.2.1 Υλικά

- Γάντια
- ddH₂O
- Συσκευή κάθετης ηλεκτροφόρησης (καλούπι, χτενάκια κτλ)
- Σφικτήρες
- Κάρτα ευθυγράμμισης
- Μικροπιπέτες
- Μεμβράνη

- Απορροφητικό χαρτί
- Αγαρόζη 0,8% (100ml): 0,8gr αγαρόζη, 10ml running buffer 10x, 90 ml ddH₂O
- Running buffer 10x (1lt): 30gr Tris, 144gr glycine, 100ml 10% SDS και ddH₂O μέχρι το 1lt
- Πήκτωμα διαχωρισμού-**separating gel 12%** (**Υτελ: 70ml**): HPLC H₂O (23,45ml), 1,5 M Tris pH 8,8 (17,5ml), 10% SDS (0,7ml), 30% bis acrylamide (28ml), 10% APS (0,35ml), TEMED (0,035ml)
- Πήκτωμα συσσώρευσης- **stacking gel 4%** (**Υτελ: 20ml**): HPLC H₂O (14,7ml), 1 M Tris pH 6,8 (2,5ml), 10% SDS (0,2ml), 30% bis acrylamide (2,6ml), 10% APS (0,1ml) και TEMED (0,02ml).
- Equilibration buffer: 1M Tris pH 6,8 (2ml), Urea (14,414gr), 100% glycerol (12ml), 10% SDS (4ml), Bromophenol blue (0,020ml) και ddH₂O μέχρι τα 40ml. *Ποσότητα για 2 strips
- DTT
- Iodoacetamide
- Τρυβλία Petri
- Λαβίδες
- Marker: 161-0363, Biorad

9.4.2.2 Μέθοδος

- Για την προετοιμασία ενός μεγάλου πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου αρχικά, τοποθετούνται τα spacers στα πλαϊνά των δύο μεγάλων τζαμιών (small inner plate και larger outer plate) για να σφραγιστούν όλες οι πλευρές και να αποφευχθούν οι διαρροές.
- Έπειτα, τα δύο τζάμια στερεώνονται ανάμεσα σε δύο σφικτήρες (clamps) και γίνεται ευθυγράμμιση τους με την κάρτα ευθυγράμμισης (alignment card).
- Τέλος, για καλύτερη στεγανοποίηση απλώνεται αγαρόζη 0,8% κατά μήκος στα σφουγγαράκια της οριζόντιας βάσης και τοποθετούνται τα τζάμια.
- Γίνεται έλεγχος για τυχόν διαρροή με σταδιακή προσθήκη ddH₂O το οποίο και απορρίπτεται.
- *Το βήμα αυτό πρέπει να ολοκληρωθεί γρήγορα καθώς η παραμονή του νερού αρκετή ώρα μπορεί να προκαλέσει αραίωση του στεγανού της αγαρόζης και κατά συνέπεια διαρροή.
- Παρασκευάζονται τα πηκτώματα διαχωρισμού (separating gel) και συσσώρευσης (stacking gel).

- Στο καλούπι με τα τζάμια αρχικά προστίθεται το πηκτωμα διαχωρισμού (separating gel) μέχρι περίπου 3cm κάτω από την επιφάνεια του μεγάλου τζαμιού.
- Με τη χρήση πιπέτας προστίθεται ddH₂O κατά μήκος του εσωτερικού των τζαμιών για να ευθυγραμμιστεί η επιφάνεια του πηκτώματος. Το πηκτωμα αφήνεται να στερεοποιηθεί για περίπου 30 λεπτά-1ώρα.
- Έπειτα, μόλις το πηκτωμα στερεοποιηθεί αφαιρείται το ddH₂O και η εναπομένουσα υγρασία αφαιρείται με τη χρήση διηθητικού χαρτιού.
- Ακολούθως, προστίθεται το πηκτωμα συσσώρευσης (stacking gel) ως την κορυφή των τζαμιών μέχρι να γίνει υπερχειλίση και αμέσως τοποθετείται το ειδικό ενιαίο χτενάκι που θα αποτελέσει το πηγαδάκι όπου θα τοποθετηθεί το strip.
- Το πηκτωμα αφήνεται να στερεοποιηθεί για 30 λεπτά και έπειτα η όλη κατασκευή καλύπτεται με εμποτισμένα με νερό χαρτιά και διάφανη μεμβράνη τα πηκτώματα τοποθετούνται στους 4°C για 16-18h ώστε να επιτευχθεί ο πολυμερισμός του πολυακρυλαμιδίου.
- Για την προετοιμασία των IPG strips για τη δεύτερη διάσταση αρχικά παρασκευάζεται το equilibration buffer.
- Στα 20 ml equilibration buffer προστίθενται 0,15 gr DTT και το διάλυμα είναι το **Equilibration buffer I**.
- Στα υπόλοιπα 20ml equilibration buffer προστίθενται 0,9 gr iodoacetamide και το διάλυμα είναι το **Equilibration buffer II**.
- Το focusing tray εξάγεται από τη συσκευή ισοηλεκτρικής εστίασης και με προσοχή με τη χρήση λαβίδας απομακρύνεται το IPG strip.
- Σε τρυβλίο Petri προστίθεται αρχικά το equilibration buffer I και έπειτα το strip με την πλευρά του gel να έρχεται σε επαφή με το διάλυμα και αναδεύεται για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Με τη χρήση λαβίδας το strip τοποθετείται σε νέο τρυβλίο που περιέχει το equilibration buffer II και αναδεύεται για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Στο πηκτωμα πολυακρυλαμιδίου αφαιρείται με προσοχή το χτενάκι από το πηκτωμα συσσώρευσης και στη συνέχεια προστίθεται 1ml running buffer 1x.

- Πάντα με τη χρήση λαβίδας προσαρμόζουμε το ακριβές μέγεθος του strip αφαιρώντας τα πλαστικά του άκρα και τοποθετείται με την πλευρά του πηκτώματος του strip προς την πλευρά που είναι το μικρό τζάμι. Επίσης, το (+) του strip τοποθετείται προς την πλευρά του μάρτυρα (marker).
- Τοποθετούνται 10-15μl μάρτυρα και το πήκτωμα σφραγίζεται με αγαρόζη 0,8%.
- Μεταφέρονται τα τζάμια μέσα στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και το upper buffer chamber γεμίζεται με running buffer 1x και γίνεται έλεγχος για διαρροή.
- Στο lower buffer chamber προστίθεται running buffer 1x μέχρι να καλυφθεί η κάτω πλευρά του πηκτώματος.
- Ρυθμίζεται η ηλεκτροφόρηση στα 8mA/ πήκτωμα για λίγα λεπτά (ώστε να γίνει εκ νέου έλεγχος για διαρροή) και έπειτα στα 30mA/ πήκτωμα για 6-7ώρες. *Η ρύθμιση των συνθηκών ηλεκτροφόρησης μπορεί να τροποποιηθεί και σε 10mA/πήκτωμα για 16-18 ώρες ανάλογα με τις απαιτήσεις των χρόνων του πειράματος.

9.4.3 Χρώση πηκτωμάτων των πρωτεϊνών με νιτρικό άργυρο (Silver Stain)

Πρόκειται για μέθοδο υψηλής ευκρίνειας που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση των πρωτεϊνών έπειτα από ηλεκτροφόρηση με πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου. Τα πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι το χαμηλό της κόστος και η συμβατότητα με τη φασματομετρία μάζας.

9.4.3.1 Υλικά

- Γάντια
- Νυστέρι
- Δοχείο ανάδευσης
- Μεμβράνη
- Αναδευτήρας (shaker)
- ddH₂O
- **Fixation solution** [50% EtOH, 12% AcOH και 0,25% formaldehyde (37%)]: 50 ml EtOH, 12 ml acetic acid, 38 ml ddH₂O και 25μl formaldehyde (η φορμαλδεΐδη πρέπει να προστεθεί αμέσως πριν τη χρήση του fixation solution)

- **Wash solution** (50% EtOH, 50% ddH₂O): 50 ml EtOH και 50 ml ddH₂O
- **Sensitize solution** (0,1% Na₂S₂O₃ sodium thiosulphate): 5mg Na₂S₂O₃·5H₂O και 50 ml ddH₂O
- **Stain solution** (1% AgNO₃): 50mg AgNO₃ και 50 ml ddH₂O, διατηρείται στους 4°C
- **Developer solution** (3% Na₂CO₃): 1,5 gr Na₂CO₃, 1ml Διάλυμα (Stain), 49 ml ddH₂O και 25μl φορμαλδεΐδη (η φορμαλδεΐδη πρέπει να προστεθεί αμέσως πριν τη χρήση του developer solution)
- **Stopper solution** (1% EDTA): EDTA 0,5g και 50 ml ddH₂O.

9.4.3.2 Μέθοδος

- Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, το μικρό τζάμι αφαιρείται και το πήκτωμα συσσώρευσης (stacking gel) κόβεται με νυστέρι και απορρίπτεται.
- Στη συνέχεια γίνεται εμφάνιση των πρωτεϊνών για το πήκτωμα διαχωρισμού (separating gel).
- Αρχικά, το fixation solution τοποθετείται σε ένα δοχείο μαζί με το πήκτωμα και ακολουθεί ανάδευση για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.
- Το διάλυμα απορρίπτεται, προστίθεται το wash solution και το πήκτωμα αναδεύεται για 20 λεπτά.
- Το διάλυμα απορρίπτεται και ακολουθούν άλλες τρεις πλύσεις με το wash solution ανά 20 λεπτά η καθεμία.
- Στο δοχείο με το πήκτωμα προστίθεται το sensitize solution και ακολουθεί ανάδευση για 1 λεπτό.
- Μετά την αφαίρεση του διαλύματος ακολουθούν δύο-τρεις πλύσεις με ddH₂O για 20 δευτερόλεπτα η καθεμία.
- Απορρίπτεται το υπερκείμενο και στο πήκτωμα προστίθεται το stain solution και αναδεύεται για 30 λεπτά.
- Το διάλυμα απορρίπτεται και ακολουθούν δύο-τρεις πλύσεις με ddH₂O διάρκειας 20 δευτερόλεπτα η καθεμία.
- Στο πήκτωμα προστίθεται το developer solution και ακολουθεί απαλή ανάδευση μέχρι την εμφάνιση των κηλίδων των πρωτεϊνών.
- Έπειτα, το διάλυμα απορρίπτεται και στο δοχείο προστίθεται το stopper solution και το πήκτωμα αναδεύεται για 20 λεπτά.

➤ Τέλος, ακολουθεί μια πλύση με ddH₂O και το πήκτωμα φωτογραφίζεται και φυλάσσεται στους 4°C μέσα σε μεμβράνη.

9.4.4 Χρώση με Coomassie

Η μέθοδος βασίζεται στην ικανότητα των μορίων της χρωστικής να ενώνονται με τις πρωτεΐνες μέσω ιονικών αλληλεπιδράσεων που δημιουργούνται ανάμεσα σε ομάδες σουλφονικών οξέων και θετικών πρωτεϊνικών αμινομάδων, αλλά και μέσω έλξεων Van der Waals. Η χρωστική Coomassie R-250 δύναται να ανιχνεύει μικρές ποσότητες πρωτεϊνών (≥0.1μg).

9.4.4.1 Υλικά

- Γάντια
- Νυστέρι
- Δοχείο ανάδευσης
- Μεμβράνη
- Αναδευτήρας (shaker)
- Διάλυμα χρώσης με Coomassie (40% methanol, 10% acetic acid, Coomassie R 250 και ddH₂O)
- Διάλυμα αποχρωματισμού (40% methanol, 10% acetic acid και ddH₂O)

9.4.4.2 Μέθοδος

➤ Μετά το πέρας του χρόνου ηλεκτροφόρησης, το μικρό τζάμι αφαιρείται και το πήκτωμα συσώρευσης (stacking gel) κόβεται και απορρίπτεται. Το πήκτωμα διαχωρισμού (separating gel) τοποθετείται σε ένα δοχείο και προστίθεται το διάλυμα χρώσης με Coomassie.

➤ Ακολουθεί ήπια ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 15-30 λεπτά.

➤ Η χρωστική απορρίπτεται και γίνεται μια πλύση με ddH₂O.

➤ Έπειτα, προστίθεται το διάλυμα αποχρωματισμού και το πήκτωμα παραμένει μέχρι να γίνει η εμφάνιση των κηλίδων ή ζωνών των πρωτεϊνών.

➤ Το πήκτωμα φυλάσσεται σε μεμβράνη στους 4°C.

9.5 Πέψη σε πήκτωμα (In-gel digestion)

Η μέθοδος της πέψης σε πήκτωμα προηγείται και απαιτείται για την επεξεργασία με φασματομετρία μάζας. Τα βασικά στάδια της μεθόδου είναι: ο αποχρωματισμός, η αλκυλίωση των κυστεϊνών των πρωτεϊνών, η πρωτεολυτική πέψη των πρωτεϊνών και η εξαγωγή των παραγόμενων πεπτιδίων. Ακολούθως, πραγματοποιείται η ταυτοποίηση των πρωτεϊνών σύμφωνα με τη μάζα τους και μοτίβο τους.

*Το στάδιο της πρωτεολυτικής πέψης των πρωτεϊνών πραγματοποιείται με το ένζυμο θρυψίνη, όπου γίνεται πέψη του δεσμού στο καρβοξυτελικό άκρο των αμινοξέων αργινίνη και λυσίνη.

9.5.1 Υλικά

- Γάντια
- Πάγος
- Νυστέρι
- Μικροπιπέτα
- Eppendorfs 1,5 ml
- Low binding PCR tubes
- Μεμβράνη
- Πλάκα γυάλινη
- HPLC H₂O
- K₃Fe(CN)₆ 60mM
- Na₂S₂O₃ 200Mm
- AmBic (Ammonium bicarbonate)
- Speed vacuum
- Επωαστήρας σε 37°C
- Φυγόκεντρος
- Vortex
- Αναδευτήρας (shaker)
- Διάλυμα θρυψίνης 20μg/μl (100μl HCl 1Mm, 900 μl AmBic 40 mM σε 9% ACN)
- ACN (acetonitrile)
- Formic Acid 5%
- MS buffer (ACN 2%, Formic Acid 0,1% και HPLC H₂O)

9.5.2 Μέθοδος

- Αρχικά, τα εξεταζόμενα πηκτώματα συγκρίνονται και γίνεται εντοπισμός των κηλίδων των πρωτεϊνών.
- Γίνεται αποκοπή των κηλίδων (spots) και τοποθετούνται σε erpendorfs.
- Σε κάθε κηλίδα προστίθενται 150μl $K_3Fe(CN)_6$ 60mM και 150μl $Na_2S_2O_3$ 200mM εάν έχει προηγηθεί χρώση με silver stain ή 300μl (50% methanol και 100mM AmBic) εάν έχει γίνει χρώση των πρωτεϊνών με Coomassie.
- Ακολουθεί ανάδευση με vortex μέχρι να αποχρωματιστούν τα spots.
- Το υπερκείμενο απορρίπτεται και σε κάθε erpendorf προστίθενται 200μl HPLC H_2O .
- Έπειτα, γίνονται πολλές πλύσεις μέχρι το διάλυμα από κίτρινο χρώμα να γίνει διαυγές. Το HPLC H_2O αφαιρείται.
- Σε γυάλινη πλάκα που καλύπτεται με μεμβράνη τοποθετούνται τα spots χωριστά και κόβονται σε μικρά κομμάτια.
- Προστίθενται 400μl HPLC H_2O , ακολουθεί γρήγορη φυγοκέντριση (quick spin) και το υπερκείμενο απορρίπτεται.
- Έπειτα, προστίθενται 500μl 50% ACN, γίνεται ανάδευση (shaker) για 5 λεπτά και ακολουθεί γρήγορη φυγοκέντριση.
- Το υπερκείμενο απορρίπτεται και προστίθενται 500μl 100% ACN. Το δείγμα αναδεύεται για 5 λεπτά και μετά φυγοκεντρείται (quick spin) για 5 λεπτά.
- Μετά την απόρριψη του υπερκειμένου, προστίθενται 250μl 100mM AmBic και ακολουθεί ανάδευση για 5 λεπτά και το υπερκείμενο ΔΕΝ απορρίπτεται.
- Προστίθενται 250μl 100% ACN, το δείγμα αναδεύεται για 5 λεπτά και φυγοκεντρείται (quick spin) για 5 λεπτά. Το υπερκείμενο απορρίπτεται.
- Τα δείγματα τοποθετούνται σε συσκευή speedvacuum για 30 λεπτά.
- Προστίθενται 20μl από διάλυμα θρυψίνης 20μg/μl και το δείγμα φυγοκεντρείται για 30 δευτερόλεπτα.
- Έπειτα, το δείγμα τοποθετείται για 15 λεπτά σε πάγο, χωρίς να αφαιρεθεί η θρυψίνη.
- Τέλος, προστίθενται 50μl AmBic 40 mM σε 9% ACN και το δείγμα τοποθετείται στους 37°C για 14-16 ώρες.
- Πραγματοποιείται φυγοκέντριση στα δείγματα σε μέγιστες στροφές (quick spin) και το υπερκείμενο

συλλέγεται και τοποθετείται σε low binding PCR tubes.

- Στο ίζημα (κομμάτια του πηκτώματος) προστίθενται 50μl AmBic 50 mM και μετά από γρήγορη φυγοκέντριση το υπερκείμενο συλλέγεται και προστίθεται στο ήδη συλλεχθέν από το προηγούμενο βήμα.
- Γίνεται προσθήκη 50μl ACN100% στο ίζημα και αναδεύεται για 15 λεπτά. Έπειτα από γρήγορη φυγοκέντριση το υπερκείμενο συλλέγεται και προστίθεται στα προηγούμενα συλλεχθέντα υπερκείμενα.
- Στο ίζημα προστίθενται 50μl FormicAcid 5% και ακολουθεί ανάδευση για 15 λεπτά. Μετά από γρήγορη φυγοκέντριση το υπερκείμενο συλλέγεται και προστίθεται στα προηγούμενα συλλεχθέντα υπερκείμενα.
- Τέλος, προστίθενται 50μl ACN100% στο ίζημα και αναδεύεται για 15 λεπτά. Το δείγμα φυγοκεντρείται και το υπερκείμενο συλλέγεται και προστίθεται μαζί με τα προηγούμενα υπερκείμενα.
- Το συνολικό διάλυμα με τα συλλεγόμενα υπερκείμενα τοποθετείται σε συσκευή speed vacuum μέχρι να εξατμιστεί όλο το διάλυμα.
- Τέλος, προστίθενται 15μl MS buffer και το δείγμα αποθηκεύεται στους -80 °C.

9.6 Πεπτιδωμική ανάλυση

9.6.1 Απομόνωση μικρών πεπτιδίων

Η πεπτιδωμική ανάλυση αφορά τη μελέτη μικρών πεπτιδίων και πραγματοποιήθηκε στα δύο φύλα του δάκου, με δεδομένα που προέρχονται από ιστούς του αναπαραγωγικού συστήματος των αρσενικών εντόμων (βοηθητικοί αδένες μικρού και μεγάλου μεγέθους, όρχεις και σπερματοδόχος κύστη) αλλά και των θηλυκών εντόμων (σπερματοθήκες, μήτρα και βοηθητικοί αδένες). Ωστόσο, για την βέλτιστη σύγκριση των αποτελεσμάτων συλλέχθηκαν και οι ιστοί εντέρων από αρσενικά και θηλυκά έντομα.

9.6.1.1 Υλικά

- Στερεοσκόπιο
- Γάντια
- Πάγος

- Πλακάκι
- Λαβίδες
- Νυστέρι
- Μικροπιπέτα
- Eppendorfs 1,5 ml
- ddH₂O
- Υγρό άζωτο
- Μεθανόλη (methanol)
- Οξικό οξύ (acetic acid)
- Υδατόλουτρο υπερήχων (water bath sonicator)
- Speed vacuum
- Φυγόκεντρος
- Έμβολα
- Μίξερ χειρός
- TFA (Trifluoro acetic acid)
- ACN (acetonitrile)
- Φίλτρα εκχύλισης τύπου C18 (C18 extraction disc Varian, Darmstadt, Germany)

9.6.1.2 Μέθοδος

- Αρχικά, πραγματοποιείται απομόνωση των ιστών του αναπαραγωγικού συστήματος και του εντέρου σε στερεοσκόπιο από 20 αρσενικά και 20 θηλυκά έντομα από τον εργαστηριακό πληθυσμό. Συνολικά, από κάθε φύλο συλλέγονται τέσσερα γκρουπ των είκοσι ατόμων (τεχνικές επαναλήψεις των δειγμάτων).
- Με τη χρήση λαβίδας το έντομο τοποθετείται σε πλακάκι που περιέχει ~10ml ddH₂O όπου και με τη χρήση νυστεριού και λαβίδας γίνεται τομή και απομόνωση των ιστών του αναπαραγωγικού συστήματος.
- Έπειτα, με τη χρήση μικροπιπέτας οι ιστοί τοποθετούνται σε eppendorf 1,5ml και φυλάσσονται σε πάγο μέχρι να ολοκληρωθούν και τα 20 άτομα.
- Απευθείας, τα eppendorfs τοποθετούνται σε υγρό άζωτο και φυλάσσονται στους -80°C.
- Παρασκευάζεται το διάλυμα εξαγωγής των πεπτιδίων (extraction solution: methanol/water/acetic acid σε αναλογίες 90/9/1).
- Σε κάθε δείγμα προστίθενται 100μl του extraction solution και ακολουθεί ομογενοποίηση των ιστών με τη χρήση εμβόλων και μίξερ χειρός.
- Στη συνέχεια, τα δείγματα τοποθετούνται σε υδατόλουτρο με υπερήχους για 5 λεπτά.

- Έπειτα, ακολουθεί φυγοκέντριση στα δείγματα για 10 λεπτά, σε 7.500g και σε θερμοκρασία δωματίου, το υπερκείμενο συλλέγεται σε νέο eppendorf και τοποθετείται στον πάγο.
- Στο ίζημα προστίθενται 50μl του extraction solution και ομογενοποιείται όπως περιγράφεται παραπάνω και τοποθετείται σε υδατόλουτρο υπερήχων για 5 λεπτά. Ακολουθεί φυγοκέντριση για 10 λεπτά, σε 7.500g, σε θερμοκρασία δωματίου και το υπερκείμενο συλλέγεται και προστίθεται στο προηγούμενο υπερκείμενο και επανατοποθετείται στον πάγο.
- Το τελευταίο βήμα επαναλαμβάνεται μια ακόμη φορά και ο τελικός όγκος του πεπτιδικού διαλύματος για κάθε δείγμα αντιστοιχεί σε ~200μl.
- Τέλος, τα δείγματα τοποθετούνται σε συσκευή speed vacuum μέχρι να εξατμιστεί το διάλυμα.
- Τα λυοφιλιωμένα δείγματα, επαναδιαλύονται σε 20μl 0,1% TFA και για την απομάκρυνση των αλάτων από το διάλυμα χρησιμοποιούνται τα φίλτρα εκχύλισης τύπου C18. Η ενεργοποίηση των φίλτρων γίνεται με διάλυμα 80%ACN/0,1% TFA.
- Ακολουθεί μια πλύση του φίλτρου με 0,1% TFA και στη συνέχεια τοποθετείται το δείγμα όπου τα πεπτιδία εκλύονται με διάλυμα 70% ACN/ 0,1% TFA.
- Το δείγμα τοποθετείται σε συσκευή speed vacuum μέχρι να εξατμιστεί το διάλυμα και στη συνέχεια το λυοφιλιωμένο ίζημα επαναδιαλύεται σε 20μl 0,1% TFA.
- Ακολουθεί ανάλυση σε Maldi tof-tof system και τα αποτελέσματα επεξεργάζονται με το πρόγραμμα MASCOT.

9.7 Βιοχημική ανάλυση α-εστερασών και β-εστερασών σε ευαίσθητα και ανθεκτικά έντομα *B. oleae*

Οι εστεράσες σχετίζονται με μηχανισμούς αποτοξίνωσης των οργανισμών και περιλαμβάνουν πολλά ένζυμα που ενεργοποιούνται σε κάποιο συγκεκριμένο υπόστρωμα. Το α-naphthyl acetate και το β-naphthyl acetate υδρολύονται ενζυμικά απελευθερώνοντας μια ελεύθερη ένωση ναφθόλης και σε συνδυασμό με μια διαζωνική ένωση σχηματίζονται

κατάλοιπα μαύρου χρώματος σε θέσεις μη ειδικές ως προς την δράση των εστερασών.

9.7.1 Υλικά

- Νυστέρι
- Έμβολα
- Πιάτο 96 θέσεων
- Φυγόκεντρος
- Φωτόμετρο στα 630nm
- Μικροπιπέτες
- Eppendorfs
- Buffer ομογενοποίησης pH:7,4 (77,4 ml 1M Na₂HPO₄, 22,6 ml 1M NaH₂PO₄ και 0,5% Triton)
- Stock α-naphthyl acetate και β- naphthyl acetate (186,2 Mg)
- Fast blue solution: 0,476 gr fast blue και 50 ml phosphate buffer 0,1M

9.7.2 Μέθοδος

- Απομονώνονται 5 κεφάλια από αρσενικά έντομα και 5 κεφάλια από θηλυκά έντομα από τον εργαστηριακό πληθυσμό και επίσης ο ίδιος αριθμός από τον ανθεκτικό στο spinosad πληθυσμό.
- Σε κάθε κεφάλι χωριστά προστίθενται 200 μl buffer ομογενοποίησης και το δείγμα ομογενοποιείται.
- Ακολουθεί φυγοκέντριση σε μέγιστες στροφές για 10 λεπτά και το υπερκείμενο συλλέγεται.
- Σε πιάτο 96 θέσεων προστίθενται 20 μl από κάθε δείγμα μαζί με το υπόστρωμα (α-naphthyl acetate ή β-naphthyl acetate ανάλογα με τον προσδιορισμό των α- ή β-εστερασών αντίστοιχα) και μετρώνται οι χρόνοι 5 λεπτά, 15 λεπτά και 30 λεπτά, 45 λεπτά, 60 λεπτά, 75 λεπτά, 90 λεπτά, 105 λεπτά και 120 λεπτά.
- Σε κάθε θέση του πιάτου (σε κάθε δείγμα) προστίθενται 50 μl Fast blue και ακολουθεί φωτομέτρηση στα 630nm.
- Τα αποτελέσματα επεξεργάζονται σε υπολογιστικό φύλλο excel.



ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

A. Ανάλυση γονιδιακής έκφρασης μέσω τρανσκριπτομικής στο δάκο της ελιάς

A.1. Η προ-τρανσκριπτομικής ανάλυσης μελέτη στο δάκο, γενικά

Το βασικό κομμάτι της παρούσας διδακτορικής διατριβής έρευνας αφορά την τρανσκριπτομική ανάλυση του εντόμου, *Bactrocera oleae* αλλά και σε ένα μικρότερο ποσοστό την πρωτεομική ανάλυσή του. Ωστόσο, μέχρι την εκπλήρωση των συγκεκριμένων αναλύσεων προηγήθηκε μια διαφορετική προσέγγιση. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε *in silico* διερεύνηση γενετικών τόπων που εμπλέκονται σε συστήματα φυλοδιαχωρισμού με βάση το γονιδίωμα συγγενικών ειδών του δάκου της ελιάς, όπως η *Drosophila melanogaster*, η *Ceratitis capitata*, αλλά και τη μύγα *Bactrocera dorsalis*. Παράλληλα, ακολούθησε μια ολοκληρωμένη πειραματική διαδικασία που περιγράφεται αναλυτικά παρακάτω, ώστε να γίνει απομόνωση των συγκεκριμένων γονιδίων στο δάκο της ελιάς. Επιπλέον, μια νέα προσπάθεια διερεύνησης του τρανσκριπτώματος του δάκου και που περιγράφεται αναλυτικά στο Παράρτημα αποτέλεσε η εφαρμογή της μεθόδου SAGE. Όλα τα παραπάνω βήματα ήταν σημαντικά κομμάτια για τη διερεύνηση του γονιδιώματος του δάκου με τις μέχρι τότε συνθήκες. Παρ' όλα αυτά, το καθοριστικό κομμάτι στην όλη προσπάθεια αποτέλεσε η νέα προσέγγιση της ανάλυσης RNA-seq (Next Generation Sequencing) που εφαρμόστηκε για πρώτη φορά στο έντομο *Bactrocera oleae*. Μέσω της συγκεκριμένης προσέγγισης, καταφέραμε να εντοπίσουμε γενετικούς τόπους που εκφράζονται διαφορετικά μεταξύ αρσενικών και θηλυκών ατόμων δάκου καθώς και μεταξύ ευαίσθητων και ανθεκτικών στο εντομοκτόνο spinosad ατόμων δάκου, με τελικό σκοπό τη διερεύνηση μηχανισμών και μονοπατιών που εμπλέκονται στο φυλοδιαχωρισμό αλλά και την ανθεκτικότητα στο εντομοκτόνο spinosad στο δάκο της ελιάς. Επιπρόσθετα, μέσω της πρωτεομικής αλλά και της πεπτιδομικής ανάλυσης που επίσης εφαρμόστηκαν για πρώτη φορά για τα δεδομένα του εντόμου, έγινε εντοπισμός γενετικών τόπων και

πρωτεϊνών που εκφράζονται μόνο σε αρσενικά ή μόνο σε θηλυκά άτομα δάκου αντίστοιχα. Τέλος, πραγματοποιήθηκε η μελέτη επιλογής του κατάλληλου γονιδίου αναφοράς (Housekeeping genes) σε ιστούς του εντόμου *Bactrocera oleae* που αποτέλεσε ένα χρήσιμο εργαλείο για την παρούσα έρευνα στο κομμάτι της qRT-PCR (validation, λειτουργική ανάλυση) ενώ παράλληλα μπορεί να αποτελέσει ένα χρήσιμο εργαλείο και για μελλοντικές μελέτες του εντόμου.

A.1.2. Southern υβριδοποίηση σε γονίδια φυλοδιαχωρισμού του δάκου με βάση το γονιδίωμα της *Drosophila*

Η *in silico* διερεύνηση του γονιδιώματος της μύγας του ξυδιού *Drosophila melanogaster* στη βάση δεδομένων Flybase για γονίδια που σχετίζονται με φυλοδιαχωρισμό, αποκάλυψε περίπου 80 γενετικούς τόπους. Τα γονίδια αυτά εδράζονται όλα στο χρωμόσωμα X και δύο στο χρωμόσωμα 4. Για τους 14 γενετικούς τόπους σχεδιάστηκαν εκκινητές και ακολούθως πραγματοποιήθηκε ενίσχυση αρσενικών και θηλυκών δάκων μέσω PCR (Πίνακας 3). Ωστόσο μόνο σε τέσσερις από τις PCR παρατηρήθηκε διαφορετική ενίσχυση ανάμεσα σε αρσενικά και θηλυκά άτομα, γεγονός που δημιούργησε ενδιαφέρον για περαιτέρω ανάλυση.

Το γονίδιο *Muc4B* δίνει προϊόν ενίσχυσης 920 bp που διακρίνεται εμφανώς στην περίπτωση του template DNA της *D.melanogaster*. Η ενίσχυση DNA δάκου έχει ως αποτέλεσμα ένα παρεμφερές πρότυπο τόσο σε αρσενικά όσο και σε θηλυκά άτομα και μείγμα ατόμων, με τη διαφορά ότι η ένταση των ζωνών είναι μεγαλύτερη στα αρσενικά έντομα. Δεδομένων των συνθηκών, μετά από την υβριδοποίηση κατά Southern το γονίδιο *Muc4B* εμφάνισε σήμα μόνο στη *D.melanogaster* σε ζώνη 920 bp. Είναι αξιοπρόσεκτο πως τα θηλυκά έντομα δάκου έδωσαν σήμα σε μια ζώνη που δεν ήταν εμφανής στην PCR, περίπου στις 3000bp.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Πίνακας 3: Οι γενετικοί τόποι, οι αλληλουχίες των εκκινητών καθώς και οι βιολογική εξέλιξη για τα γονίδια που σχετίζονται με το φυλοδιαχωρισμό

Γονίδιο	Biological progress	primer F	primer R	Προϊόν PCR (bp)
<i>JYalpha</i>	Sperm motility	TTTCTAAGCAGGCGGCAGAT	CGGAAGCATATCAGTGCCGA	233
<i>Hcf</i>	egg, ovary, egg chamber	GCGCAAGTTTGTGACCCAT	GGTGTTTCGAGAGCGAGAGAG	927
<i>fs(1)N</i>	Chorion containing egg shell formation	TGAGGCTGGCATTTCAGGAG	CCACAGAGTCAACGGCTTCT	476
<i>Png</i>	Egg activation	CTCGAGATGGAAGTGGGTGA	TCGTAGAGGACTAGCCCCAG	617
<i>ph-p</i>	germanium-derived female germ line, ovarian follicle cell stack formation	CAGGAGGCACTCTCCCTTG	CCTTCCCTGTGTCCAATCCC	827
<i>Phl</i>	ovarian follicle of cell development	AACATGTGACCCGCGAGAAT	GGCACTCTATTGGCACACCT	841
<i>Gas 8</i>	Sperm motility	TGTTTCGAGGTAGAGGAGCGA	TTGCGTCCAGAAGGACATT	487
<i>rox1</i>	dosage complex assembly involved in dosage compensation by hyperactivation of X chromosome	GGCATCCCTCGAAAGGAAA	GATGGCCTTCAGTTGGTGGGA	517
<i>fas2</i>	imaginal disc derived male genitalia development	TCCGGTTTTCTCATGGGAGC	ACACTGTACGCCAGAATGGG	372*
<i>Femcoat</i>	Egg shell chorion assembly	GGATTGGTTCGAGGGCAAGA	GTGTCCTGGTCTGTTCCTG	291
<i>Muc4B</i>	Egg shell chorion assembly	GTCCACCACACAAGCAGGTA	GTGGCTTGGAATCTCGTTC	920*
<i>Peb</i>	embryo development ending in birth or egg hatching	GCGGATCTGCCCTAGACTTC	GCAGTGTTCACAGCAAAGG	494*
<i>Ctp</i>	spermatid differentiation, gamete generation, spermatogenesis	GTTACCCATGCGGCAACTTA	TTCCCGTTAGAAATCCGGCA	846*
<i>sisA</i>	primary sex determination, sex determination	GAGAGCAGTCACAGACCACG	GGGCATCCTTGACATCCGAA	379

*Με αστερίσκο αποκονίζονται τα γονίδια που παρουσιάζουν διαφορετική έκφραση μεταξύ αρσενικών και θηλυκών ατόμων δάκου

Το αναμενόμενο προϊόν της ενίσχυσης PCR για τον γενετικό τόπο *fas2* είναι 372bp, κάτι που επιβεβαιώνεται από την ενίσχυση γονιδιωματικού DNA της *D. melanogaster* (Εικόνα 27). Το ίδιο πρότυπο εμφανίζεται από την ενίσχυση γονιδιωματικού DNA αρσενικών ατόμων δάκου. Είναι αξιοσημείωτο ότι η συγκεκριμένη ζώνη δεν εμφανίζεται στην ενίσχυση DNA από θηλυκά άτομα δάκου. Για περαιτέρω επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων ενίσχυσης έγινε ανάλυση υβριδοποίησης κατά Southern. Στην Εικόνα 27 παρατηρείται ότι το γονίδιο της *Drosophila* δίνει σήμα και στο DNA του δάκου όπου πιο έντονη χρώση παρατηρείται στα αρσενικά σε σύγκριση με το θηλυκά έντομα. Το αποτέλεσμα επιβεβαιώνει πλήρως τις εκτιμήσεις της αντίδρασης PCR.

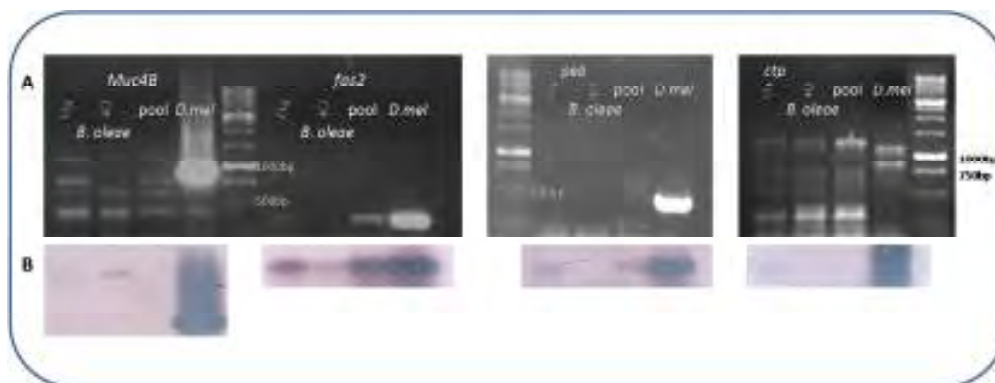
Το προϊόν ενίσχυσης του γονιδίου *peb* της *D. melanogaster* είναι 494 bp. Η ενίσχυση γονιδιωματικού DNA δάκου αποφέρει περισσότερα προϊόντα, ενώ η ζώνη ~500 bp εμφανίζεται στα αρσενικά έντομα αλλά και στο pool DNA του δάκου. Ωστόσο, ένα ιδιαίτερο πρότυπο ζωνών εμφανίζεται στα θηλυκά όπου ενισχύεται και μια ζώνη ~1250bp. Κατά την κατά Southern υβριδοποίηση, όμως, μόνο η ζώνη ~500 bp στα αρσενικά άτομα εμφάνισε σήμα, επιβεβαιώνοντας το αποτέλεσμα της PCR. Τέλος, ο γενετικός τόπος *ctp* ενισχύει προϊόν 846 bp στην *Drosophila*, ωστόσο παρατηρείται και η ενίσχυση περισσότερων προϊόντων. Πρότυπο ενίσχυσης πολλαπλών προϊόντων παρατηρείται και στο DNA του δάκου, όμως το πρότυπο αυτό είναι διαφορετικό από εκείνο της *Drosophila*. Η υβριδοποίηση κατά

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Southern επιβεβαιώνει μόνο τη ζώνη των ~850 bp της *Drosophila* (Εικόνα 27).

Για τους υπόλοιπους γενετικούς τόπους έγινε ακριβώς η ίδια διαδικασία. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε PCR όπου ενισχύθηκε το DNA από αρσενικά, θηλυκά άτομα δάκου αλλά και από μείγμα ατόμων καθώς επίσης και από γονιδιωματικό DNA της *D. melanogaster*. Στις περισσότερες περιπτώσεις δεν ενισχύθηκε το αναμενόμενο προϊόν. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι οι αλληλουχίες που επιλέχθηκαν για

την ενίσχυση των γενετικών αυτών τόπων είναι αρκετά διαφοροποιημένες ανάμεσα στη *D. melanogaster* και το *B. oleae*. Υπήρχαν περιπτώσεις που παρατηρήθηκε η ενίσχυση του αναμενόμενου προϊόντος στο γενετικό υλικό του δάκου, ωστόσο στην υβριδοποίηση κατά Southern το γονίδιο δεν εμφάνισε σήμα υβριδοποίησης παρά μόνο στην *Drosophila*.



Εικόνα 27: (Α) Τα προϊόντα ενίσχυσης κατά την αντίδραση PCR για τους γενετικούς τόπους *Muc4B*, *fas2*, *peb*, και *ctp* για το DNA μόνο από αρσενικά έντομα δάκου, μόνο από θηλυκά και από ανάμειξη αυτών (pool) αλλά και της *D. melanogaster*. Στο κάτω τμήμα (Β) απεικονίζονται τα αποτελέσματα της υβριδοποίησης κατά Southern. Για το γενετικό τόπο *Muc4B* διακρίνεται το σήμα από τη ζώνη στη *D. melanogaster* αλλά στο γενετικό υλικό μόνο των θηλυκών εντόμων δάκου παρατηρείται μια μοναδική ζώνη όπου δίνει σήμα αν και δεν είναι εμφανής στο πήκτωμα από την ηλεκτροφόρηση. Το γονίδιο *fas2* έδωσε σήμα στη *Drosophila* αλλά και στο DNA του δάκου όπου η πιο έντονη χρώση παρατηρείται στα αρσενικά σε σύγκριση με το θηλυκά έντομα. Το γονίδιο *peb* έδωσε σήμα στη *Drosophila* και μόνο στα αρσενικά έντομα ενώ όχι στα θηλυκά. Ο γενετικός τόπος *ctp* επιβεβαιώνεται στην *Drosophila* αλλά και για το DNA από μόνο αρσενικούς δάκους όπου παρατηρείται το σήμα.

Α.1.3. Βιβλιογραφική αναζήτηση γονιδίων εμπλεκόμενων σε συστήματα φυλοδιαχωρισμού

Η μετέπειτα μελέτη αφορά τη βιβλιογραφική έρευνα για γονίδια που συνδέονται με το φυλοδιαχωρισμό συγκριτικά με άλλους οργανισμούς όπως το συγγενικό είδος *Ceratitis capitata*, τη *Drosophila melanogaster* αλλά και τη μύγα *Bactrocera dorsalis*. Αρχικά, έγινε εντοπισμός των γονιδίων *CtxC1*, *CtxC2*, *CtxA2* (*C. capitata*), *B2 tubulin* (*B. dorsalis*) και *SPR* (*D. melanogaster*), σχεδιασμός εκκινητών (Πίνακας 4) που βασίστηκε στο γονιδίωμα του εκάστοτε συγγενικού είδους και τελικά ακολούθησε ενίσχυση PCR. Ωστόσο, η ενίσχυση των γενετικών τόπων στο γονιδιωματικό DNA του δάκου απέφερε περισσότερα

προϊόντα. Στη συνέχεια, σύμφωνα με το μέγεθος του προϊόντος, μελετήθηκαν και αποκόπηκαν συγκεκριμένες ζώνες για κάθε γονίδιο και απομονώθηκε το DNA. Ακολούθησε κλωνοποίηση, απομόνωση των αποικιών και αλληλούχηση. Έπειτα από την επεξεργασία των αποτελεσμάτων της αλληλούχησης μέσω του προγράμματος Blast, έγινε επιβεβαίωση του αποτελέσματος μόνο για το γονίδιο *B2 tubulin* (Εικόνα 29). Τέλος, πραγματοποιήθηκε μελέτη μέσω υβριδοποίησης κατά Southern όπου το παραπάνω αποτέλεσμα επιβεβαιώθηκε πλήρως. Με βάση το γονιδίωμα των τριών συγγενικών ειδών απομονώθηκαν συνολικά πέντε γονίδια και η τελική έκβαση απέφερε την απομόνωση και την αλληλουχία

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

του γενετικού τόπου *B2 tubulin* για το δάκο, *Bactrocera oleae* (Εικόνα 28).

Συγκεκριμένα, για το γενετικό τόπο *CtxC1* σχεδιάστηκαν εκκινητές σύμφωνα με το γονίδιο της *CeratotoxinC1* της *C.capitata* (Πίνακας 4). Το αποτέλεσμα της PCR απέφερε την ενίσχυση προϊόντος 1.066 bp για το γονιδίωμα της μύγας της Μεσογείου ενώ για το DNA του δάκου ενισχύθηκαν δύο ζώνες μεγέθους 650bp και 1000bp. Το συγκεκριμένο πρότυπο ενίσχυσης παρατηρήθηκε μόνο όταν πραγματοποιήθηκε ενίσχυση για το γενετικό υλικό από μείγμα αρσενικών και θηλυκών ατόμων δάκου. Ενώ, όταν ενισχύθηκε γενετικό υλικό από ξεχωριστά αρσενικά και θηλυκά άτομα δάκου δεν παρατηρήθηκαν προϊόντα (Εικόνα 28). Οι δύο ζώνες που ενισχύθηκαν μεγέθους 650bp και 1000bp, μελετήθηκαν περαιτέρω καθώς αποκόπηκαν, απομονώθηκε το DNA, πραγματοποιήθηκε κλωνοποίηση, αλληλούχιση και τελικά επεξεργασία των αλληλουχιών με το πρόγραμμα Blast. Τα προϊόντα του γενετικού τόπου *CeratotoxinC1* (*CtxC1*) που ενισχύθηκε από το γονιδίωμα του δάκου δεν εμφάνισε ομολογία με τον γονίδιο της Μεσογειακής μύγας. Ωστόσο, η επιβεβαίωση του αποτελέσματος επήλθε έπειτα από την υβριδοποίηση κατά Southern που παρατηρήθηκε εμφάνιση σήματος μόνο στο γενετικό υλικό της *C.capitata*. Για το γενετικό υλικό του δάκου δεν παρατηρήθηκε εμφάνιση του σήματος (Εικόνα 28) και επομένως ο συγκεκριμένος γενετικός τόπος και η αλληλουχία του δεν ήταν εφικτό να απομονωθούν για το έντομο.

Ομοίως, και στην περίπτωση του γενετικού τόπου *Ceratotoxin C2* (*CtxC2*) ακολουθήθηκε η ίδια πειραματική διαδικασία. Το προϊόν ενίσχυσης από την PCR ήταν μεγέθους 1.182bp για την *C.capitata* ενώ για το γονιδιωματικό DNA του *B. oleae* ενισχύθηκαν δύο ζώνες μεγέθους 1.100 και 700bp. Το συγκεκριμένο πρότυπο ζωνών για τον δάκο παρατηρήθηκε όταν ενισχύθηκε DNA που προήλθε από θηλυκά έντομα. Από την επεξεργασία των αλληλουχιών δεν βρέθηκε ομολογία μεταξύ του γενετικού τόπου *CtxC2* της Μεσογειακής μύγας και του τόπου που προέκυψε στο *B. oleae*. Ενώ, από την επεξεργασία μέσω Blast της αλληλουχίας που

προέκυψε για το δάκο παρατηρήθηκε ομολογία με ιδιαίτερα χαμηλό ποσοστό (37%) με το γενετικό τόπο ονομαστού δάκου. Η υβριδοποίηση κατά Southern για το γονίδιο *CtxC2* επιβεβαίωσε το παραπάνω αποτέλεσμα καθώς παρατηρήθηκε εμφάνιση σήματος μόνο στη Μεσογειακή μύγα (Εικόνα 28).

Το ίδιο αποτέλεσμα παρατηρήθηκε κατά τη μελέτη του γενετικού τόπου *CeratotoxinA2* (*CtxA2*). Από την PCR ενισχύθηκε προϊόν 600bp για τη μύγα της Μεσογείου, ενώ για τον δάκο της ελιάς παρατηρήθηκε ενίσχυση δύο ζωνών μεγέθους 1200 και 300 bp (Εικόνα 28). Η επεξεργασία των αλληλουχιών δεν επέστρεψε ομολογία με τον γενετικό τόπο *CtxA2* με μηδενικό ποσοστό ομολογίας στην αντιπαράθεση των δύο αλληλουχιών. Από την υβριδοποίηση κατά Southern ταυτοποιήθηκε το παραπάνω αποτέλεσμα, καθώς η εμφάνιση του σήματος αφορούσε μόνο το γενετικό υλικό της *C. capitata* (Εικόνα 28).

Από την ενίσχυση του γενετικού τόπου *SPR* (*sex peptide receptor*) παρατηρήθηκε προϊόν μεγέθους 434bp για τη *D. melanogaster*. Από την ενίσχυση γονιδιωματικού DNA από ξεχωριστά αρσενικά και θηλυκά άτομα *B. oleae* παρατηρήθηκαν περισσότερα προϊόντα μεγέθους 1200 και 750 bp ενώ, όταν ενισχύθηκε DNA από μείγμα αρσενικών και θηλυκών ατόμων τα προϊόντα που ενισχύθηκαν ήταν μεγέθους 750 και 350bp. Οι προαναφερόμενες ζώνες απομονώθηκαν και μελετήθηκαν ξεχωριστά ωστόσο κατά την επεξεργασία και την αντιπαράθεση των αλληλουχιών του δάκου με τον γενετικό τόπο *SPR* δεν εμφανίστηκε ομολογία. Το αποτέλεσμα επιβεβαιώθηκε από την υβριδοποίηση κατά Southern όπου παρατηρήθηκε εμφάνιση σήματος μόνο για το γενετικό υλικό της *D. melanogaster* (Εικόνα 28).

Τέλος, μελετήθηκε ο γενετικός τόπος *B2tubulin* της *Bactrocera dorsalis*. Το προϊόν της PCR ενίσχυσης για το γονιδιωματικό DNA του εντόμου *B. dorsalis* ήταν μεγέθους 1.153 bp ενώ για το DNA από ξεχωριστά αρσενικά και θηλυκά άτομα αλλά και από μείγμα αρσενικών και θηλυκών ατόμων *B. oleae* ήταν μεγέθους 1.081bp. Μέσω του Blast πραγματοποιήθηκε ομοπαράθεση των αλληλουχιών του δάκου και του γενετικού τόπου *B2tubulin* όπου

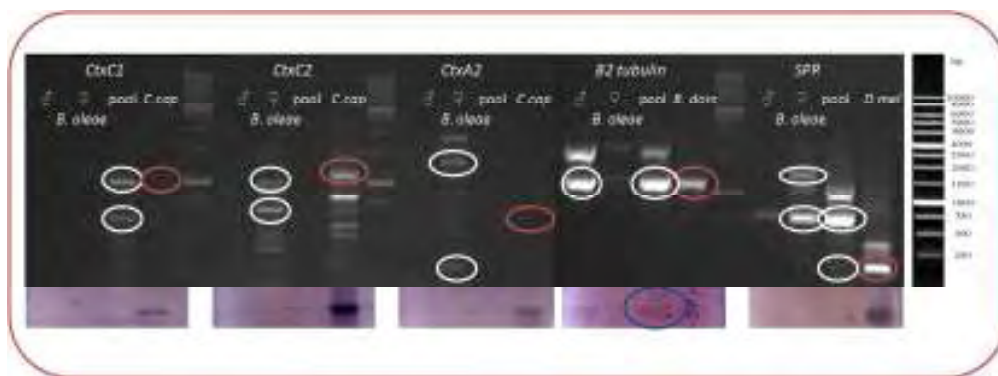
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

παρατηρήθηκε πλήρης ομολογία (Εικόνα 29). Το ποσοστό της ομολογίας της αλληλουχίας του δάκου με το γονίδιο *B2tubulin* είναι 99%. Στην Εικόνα 29 παρατείνεται η αλληλουχία του γενετικού τύπου που προέκυψε από το DNA του δάκου, μεγέθους 1.081bp.

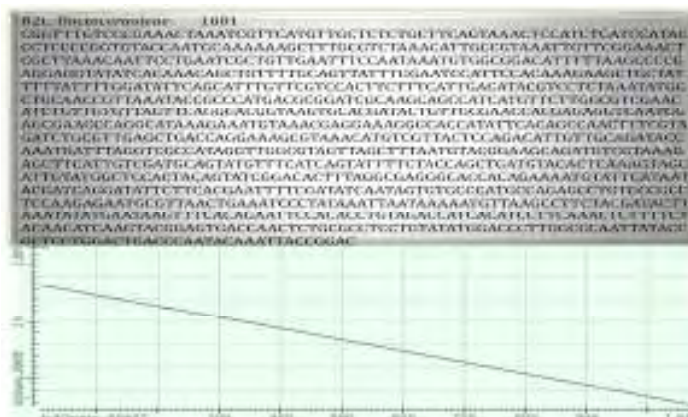
Το παραπάνω αποτέλεσμα ταυτοποιήθηκε και επιβεβαιώθηκε πλήρως από την υβριδοποίηση κατά Southern καθώς παρατηρήθηκε σήμα από κοινού σε *B. dorsalis* και *B. oleae* (Εικόνα 28).

Πίνακας 4: Οι αλληλουχίες των εκκινητών για τα γονίδια που σχετίζονται με το φυλοδιαχωρισμό

Γονίδιο	Forwardprimer (5'-3')	ReversePrimer (5'-3')	Προϊόν ενίσχυσης (bp)
<i>CtxC1</i>	TTTCGAGCCGTTTGAGGTGA	AGCTTTAGGAACCCACCCAGC	1.066
<i>CtxC2</i>	TCACACCACCTAAACTCCGC	AGAAAGGACAGCCTTCGCAA	1.182
<i>CtxA2</i>	TCTAATGCGTAGCCTTGTTGGA	TTATCCTACAAGACCGGCTGC	600
<i>B2tubulin</i>	GGCACTATGGACTCGGTACG	TTCATCAGCGGTCGCTTCTT	1.153
<i>SPR</i>	ATGGCGTTTTTGAGCAGCAG	TGCCCTTCCTGCTGATCATC	434



Εικόνα 28: Τα προϊόντα ενίσχυσης PCR για τους γενετικούς τύπους *CtxC1*, *CtxC2*, *CtxA2*, *B2 tubulin* και *SPR* απεικονίζονται με κόκκινο χρώμα για το έντομο όπου βασίστηκε ο σχεδιασμός των εκκινητών. Με λευκό χρώμα εμφανίζονται οι ζώνες που ενισχύθηκαν για το γενετικό υλικό του δάκου. Στο κάτω τμήμα απεικονίζονται τα αποτελέσματα της υβριδοποίησης κατά Southern, όπου σε όλες τις μεμβράνες παρατηρείται εμφάνιση του σήματος μόνο στα έντομα control ενώ μόνο στην περίπτωση του γονιδίου *B2 tubulin* υπάρχει σήμα στο γενετικό υλικό του δάκου (μπλε χρώμα). Στη δεξιά πλευρά της εικόνας εμφανίζεται ο μάρτυρας που χρησιμοποιήθηκε για την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων με τις διαβαθμίσεις των μεγεθών των ζωνών του.



Εικόνα 29: Η αλληλουχία του γονιδίου *B2 tubulin* του δάκου μεγέθους 1.081 bp όπως προέκυψε από την αλληλούχηση του γονιδιώματος του εντόμου και το γράφημα όπου απεικονίζεται η ομολογία μεταξύ του γονιδίου *B2 tubulin* σε *Bactrocera dorsalis* και σε *Bactrocera oleae*.

A.2 Next Generation Sequencing-RNA seq ανάλυση στο έντομο *Bactrocera oleae*

Η παρούσα μελέτη αφορά στον εντοπισμό γονιδίων που εμπλέκονται σε μηχανισμούς ανθεκτικότητας του δάκου στο εντομοκτόνο spinosad, αλλά και γονιδίων που εμπλέκονται στο φυλοδιαχωρισμό μεταξύ αρσενικών και θηλυκών εντόμων. Για το σκοπό αυτό απομονώθηκε ποσότητα RNA ~10 μg από τα έντομα και στη συνέχεια ακολούθησε η κατασκευή βιβλιοθηκών και η αλληλούχηση μέσω της τεχνικής RNA sequencing. Συγκεκριμένα, στο πλαίσιο της μελέτης των εμπλεκόμενων γονιδίων στην ανθεκτικότητα στο εντομοκτόνο spinosad ιστός που χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση του RNA είναι το κεφάλι, δεδομένου ότι η έκφραση της ανθεκτικότητας εντοπίζεται ότι σχετίζεται με το νευρικό σύστημα του εντόμου. Συνολικά, συλλέχθηκαν τα κεφάλια από 40 έντομα από τον ευαίσθητο εργαστηριακό πληθυσμό (LAB) και από 40 έντομα από τον πληθυσμό με ανθεκτικότητα στο εντομοκτόνο spinosad (SPIN) και ακολούθησε η απομόνωση του RNA. Για την αναζήτηση γονιδίων που εμπλέκονται στο φυλοδιαχωρισμό, συλλέχθηκαν για μελέτη γονάδες από αρσενικά και θηλυκά έντομα του εργαστηριακού πληθυσμού (LAB). Αναλυτικότερα, από ~300 θηλυκά έντομα έγινε συλλογή των σπερματοθηκών και των βοηθητικών αδένων (female accessory glands, FAGs) ενώ από ~150 αρσενικά έντομα συλλέχθηκαν οι όρχεις και ακολούθησε απομόνωση του RNA. Για την ποσοτικοποίηση του RNA τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αгарόζης 1%. Στη συνέχεια, ακολούθησε RNA sequencing στο Ινστιτούτο Φλέμινγκ μέσω της πλατφόρμας Solid ABI, όπου και πρόέκυψαν πολλά νέα δεδομένα για πρώτη φορά για το συγκεκριμένο έντομο. Συνολικά, κατασκευάστηκαν και αναλύθηκαν τέσσερις βιβλιοθήκες (MALE, FEMALE, LAB, SPIN) και σε καθεμία εφαρμόστηκε αλληλούχηση paired-end με μεγέθη ανάγνωσης των βάσεων 35nt και 50nt με

αποτέλεσμα συνόλου 122,623,894 read pairs. Ακολούθως, τα reads από τις τέσσερις βιβλιοθήκες ενώθηκαν και με τη χρήση του προγράμματος συναρμολόγησης SOAP *de novo* δημιουργήθηκε ένα δίκτυο αναφοράς με τη συναρμολόγηση των μεταγράφων. Έπειτα, από στοίχιση των 69,359 συναρμολογούμενων αλληλουχιών (contigs) *B. oleae* έγινε υπομνηματοποίηση (annotation) αυτών με αντιπαράθεση στη βάση δεδομένων NCBI των πρωτεϊνών non-redundant (Nr) και τη χρήση του blastx. Η συλλογή των annotations έγινε με τη χρήση του εργαλείου BLAST2GO (Götz et al., 2008). Χρησιμοποιώντας ως όριο το E-value $\leq 1e^{-6}$, έγινε στοίχιση 20,207 (29.13%) των contigs. Από τα 69,359 contigs, τα 23,042 (33.22%) είχαν επακριβή ομολογία με το τρανσκρίπτομα του δάκου σύμφωνα με την έρευνα των Pavlidi et al., 2013 (E-value $\leq 1e^{-6}$, (Πίνακας 5).

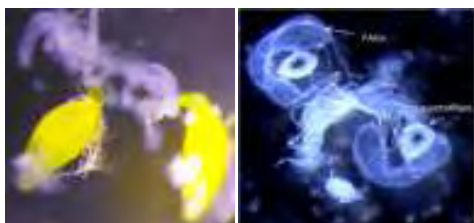
A.2.1 Διαφορική έκφραση γονιδίων μεταξύ αρσενικών και θηλυκών εντόμων *Bactrocera oleae*.

Το πρώτο τμήμα της παρούσας διατριβής έχει σκοπό την ανακάλυψη γονιδίων με διαφορική έκφραση στο αναπαραγωγικό σύστημα αρσενικών και θηλυκών δάκων (Εικόνα 30). Η σύγκριση των δεδομένων έγινε με τη χρήση του προγράμματος Cuffdiff και με αυστηρό κριτήριο q value < 0,05. Ως αποτέλεσμα, προέκυψαν 1568 γονίδια με διαφορική έκφραση μεταξύ αρσενικών και θηλυκών εντόμων εκ των οποίων τα 1238 γονίδια είχαν υπερέκφραση στα αρσενικά έντομα και 330 γονίδια είχαν υπερέκφραση στα θηλυκά έντομα. Με πιο εξειδικευμένη ανάλυση (blast) προσδιορίστηκαν και αναλύθηκαν συνολικά δώδεκα γενετικοί τόποι, δέκα γονίδια με υπερέκφραση στα αρσενικά άτομα δάκου και δύο γονίδια με υπερέκφραση στα θηλυκά άτομα δάκου (Πίνακας 6). Στο γράφημα MA-plot απεικονίζεται η σύγκριση των γονιδίων μεταξύ αρσενικών και θηλυκών δάκων με q value < 0,05 και οι κουκίδες με κόκκινο χρώμα αντιστοιχούν στα γονίδια με διαφορική έκφραση (Εικόνα 31).

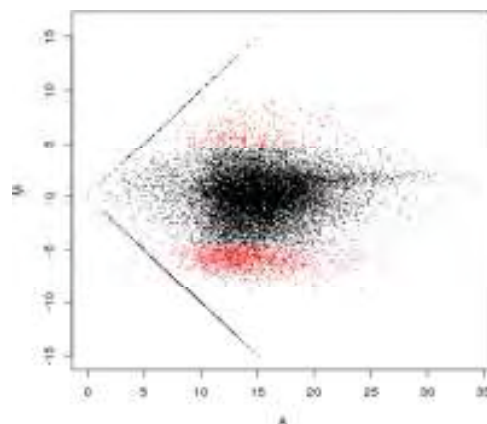
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Πίνακας 5: Sequencing and assembly summary		
Total number of paired reads		122,623,894
Total number of bases		10,423,030,990
LAB sample	number of paired reads	26,713,286
	number of bases	2,270,629,310
SPIN sample	number of paired reads	36,252,803
	number of bases	3,081,488,255
FEMALE sample	number of paired reads	36,962,061
	number of bases	3,141,775,185
MALE sample	number of paired reads	22,695,744
	number of bases	1,929,138,240
Large contigs (≥500 bp)		
Number of contigs		1,573
Number of bases		1,035,345
Average contig size		658
N50*		633
Largest contig size		2,301
All contigs (≥ 100 bp)		
Number of contigs		69,359
Number of bases		12,709,410

*Το μήκος των Contigs, όπου όλα τα contigs του εν λόγω μήκους ή μεγαλύτερου μέχρι τουλάχιστον το μισό του συνόλου των μηκών όλων των contigs



Εικόνα 30: Το αναπαραγωγικό σύστημα του δάκου. Αριστερά, με το κίτρινο χρώμα απεικονίζονται οι όρχεις (testes) του εντόμου, ενώ οι ιστοί που τους περιβάλλουν είναι βοηθητικοί αδένες (MAGs, Male Accessory Glands). Δεξιά απεικονίζεται το αναπαραγωγικό σύστημα των θηλυκών ατόμων δάκου όπου επισημαίνονται οι σπερματοθήκες και οι βοηθητικοί αδένες (FAGs, Female Accessory Glands).

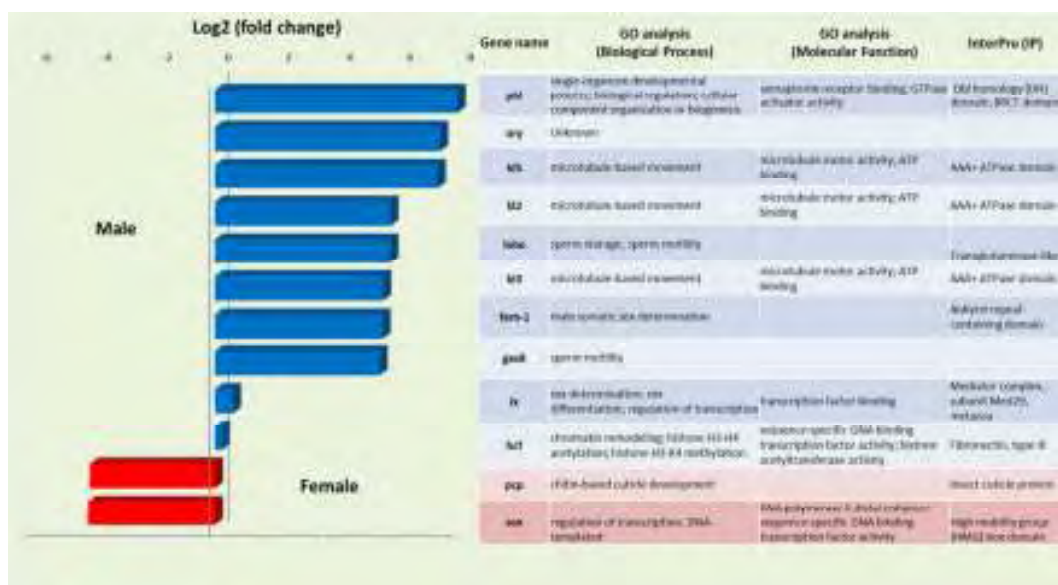


Εικόνα 31: Στο γράφημα M-A plot απεικονίζονται τα στατιστικά σημαντικά, διαφορικής έκφρασης γονίδια (κουκκίδες με κόκκινο χρώμα) μεταξύ αρσενικών και θηλυκών εντόμων *B. oleae* με q-value < 0.05.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Πίνακας 6: Γονίδια με υπερ- και υπό- έκφραση σε όργανα αναπαραγωγής αρσενικών και θηλυκών εντόμων *Bactrocera oleae*

Gene ID	Up regulated genes (male)	Value 1	Value 2	Log 2 (fold change)	Test stat	P value	Q value
NP_729307	<i>pebble, Pbl</i>	0	566,11	1,80E+308	1,80E+308	0,097354	0,352686
ABY85291	<i>occludin-related Y protein, ory</i>	1,1052	189,6	7,42252	-3,99028	6,60E-005	0,00545
ABY85406	<i>kl-5</i>	0,657877	106,855	7,34362	-3,95309	7,71E-005	0,005629
NP_001015505	<i>male fertility factor, kl2</i>	15,2995	845,489	5,78823	-3,15304	0,001616	0,023737
NP_001036757	<i>Lost boys</i>	9,50091	521,999	5,77984	-3,45001	0,000561	0,01257
ADU59484	<i>kl3</i>	10,9498	510,399	5,54265	-3,0221	0,00251	0,032063
XP_001657331	<i>sex-determining protein fem-1</i>	14,4974	668,797	5,5277	-3,23506	0,001216	0,019606
XP_002106058	<i>growth arrest specific protein 8 (Gas8)</i>	93,2458	4017,83	5,42924	-3,26123	0,001109	0,018515
XP_001958759	<i>intersex, ix</i>	205,691	311,356	0,598088	-0,383324	0,70148	0,881075
XP_001865453	<i>host cell factor C1, Hcf</i>	68,848	80,6936	0,22904	-0,145204	0,88455	0,958453
	Down regulated genes						
XP_002074845	<i>pupal cuticle protein 78E, Pcp</i>	202,017	11,6785	-4,11255	2,57639	0,009984	0,08585
XP_002002501	<i>Sox</i>	370,943	20,5678	-4,17274	2,38664	0,017003	0,125229



Εικόνα 32: Στατιστικώς σημαντικά διαφορικής έκφρασης γονίδια που υπερεκφράζονται σε όργανα αναπαραγωγής του αρσενικού και θηλυκού εργαστηριακού στελέχους του *B. oleae* σύμφωνα με το Log₂ (fold change) ως αποτέλεσμα της ανάλυσης μέσω RNA-seq όπως περιγράφονται στο αριστερό τμήμα του γραφήματος. Στο δεξί τμήμα του γραφήματος περιγράφεται η ταξινόμηση των γονιδίων σύμφωνα με το Gene Ontology (GO) και συγκεκριμένα η βιολογική διαδικασία, η μοριακή λειτουργία και η κατηγοριοποίηση μέσω του InterPro.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

A.2.2 επικύρωση (Validation) με qRT-PCR σε αρσενικά και θηλυκά έντομα

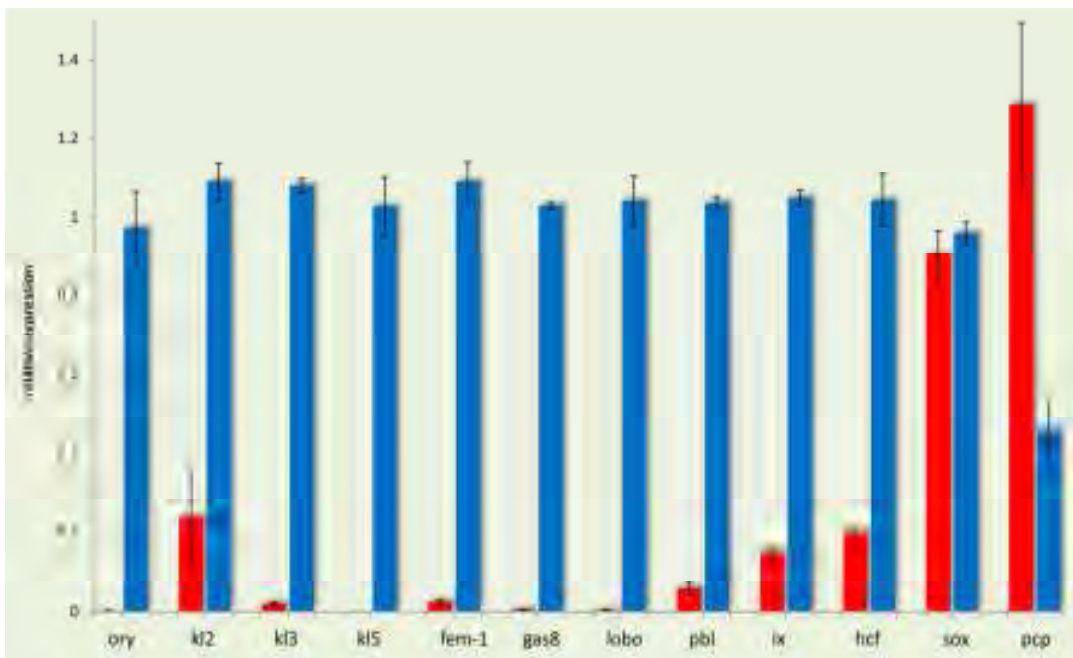
Η πειραματική διαδικασία που ακολούθησε την RNA-seq ανάλυση περιελάμβανε την επιβεβαίωση (validation) για τα γονίδια με διαφορεική έκφραση ανάμεσα σε αρσενικά και θηλυκά άτομα του εργαστηριακού πληθυσμού *B.oleae*. Η επιβεβαίωση κρίθηκε αναγκαία αφού η RNA seq ανάλυση έγινε χωρίς επαναλήψεις. Έτσι, αρχικά απομονώθηκαν τα όργανα αναπαραγωγής από αρσενικά (όρχεις) και θηλυκά έντομα (σπερματοθήκες και βοηθητικοί αδένες, FAGs). Έπειτα, ακολούθησε απομόνωση RNA από τους ιστούς και συγκεκριμένα αναλύθηκαν δύο ομάδες από σαράντα ζεύγη αναπαραγωγικών οργάνων η καθμία (βιολογική επανάληψη του πειράματος). Στη συνέχεια έγινε σύνθεση cDNA και τέλος πραγματοποιήθηκε qRT-PCR. Συνολικά, μελετήθηκαν τα δέκα γονίδια: *kl2* (male fertility factor *kl2*), *kl3* (male fertility factor *kl3*), *kl5* (male fertility

factor kl5), *ory* (occludin-related Y protein), *fem-1* (sex-determining protein *fem-1*), *gas8* (growth arrest specific protein 8), *lobo* (lost boys), *ix* (intersex), *pbl* (pebble) και *hcf* (host cell factor C1) που στην RNA-seq ανάλυση παρουσίασαν υπερέκφραση στα αρσενικά έντομα και τα δύο γονίδια *sox* και *pcp* (*rupal cuticle protein 78E*) που παρουσίασαν υπερέκφραση στα θηλυκά έντομα. Οι εκκινητές παρουσιάζονται στον Πίνακα 7. Από τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την qRT-PCR, επιβεβαιώθηκε σημαντική διαφορά αυξημένης έκφρασης στα αρσενικά έντομα για τα γονίδια *kl2*, *kl3*, *kl5*, *ory*, *fem-1*, *gas8*, *lobo*, *pbl*, *hcf* και για το γονίδιο *pcp* με υπερέκφραση στα θηλυκά έντομα ενώ ελάχιστες διαφορές παρατηρήθηκαν μεταξύ των αρσενικών και θηλυκών εντόμων για το γονίδιο *ix*. Μόνο για το γονίδιο *sox* δεν διαπιστώθηκε το αναμενόμενο αποτέλεσμα (Εικόνα 33).

Πίνακας 7: Αλληλουχίες εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν κατά την επιβεβαίωση μέσω qRT-PCR

Gene	Forward primer (5'-3')	Reverse Primer (5'-3')	Amplicon size (bp)
<i>kl2</i>	GTTACATTGAGTACCTCCAG	GAGTTTTGAAGAGACCATTC	90
<i>kl3</i>	CGC TCT TGT ACA ACT GTA TG	TAC CTA TGG CAA TAT GTC AC	105
<i>kl5</i>	CAA TTG CGA TGT GAC TAA G	CCT TAA GAA AAG CAT CAG C	137
<i>Ory</i>	CGT CTT CTT GTA TTT CTT GG	GAA CTA CGT AAG GAT CAA CG	111
<i>gas8</i>	AGA TGG AGC GTG AAC GTG AAG	CGT GAT CCT TGT GAC GAA CC	126
<i>Lobo</i>	CTG CAA TGG TAG TAT CTG G	GAT CTC TTT GAT TTG GTG TG	89
<i>fem-1</i>	ACA AGA GAA GAC TGC CCT AC	TGA CTT GCT CCT TTA ATG C	146
<i>Ix</i>	CTG TCG CCA TTA CGT GAG TC	CGT CGC GTT TAA GAT TAT CTG C	94
<i>Pbl</i>	TAC CGA GTC CAA CTA TGT G	TAT TGA GTA AAG CGT CGT TG	98
<i>Hcf</i>	CAA CGT GTT AAT CTT GAG C	TCA CTC CAA TCA CTA GCA C	83
<i>Pcp</i>	GTG AGG TGG CCT TCT TCA GG	GCA GGT GCA TCA ATT GTT AGT C	124
<i>Sox</i>	AGC ACA GCG GCT GAA TTT TG	AGT CAC AGT CCG AGC GAT TC	92
<i>Rpl19</i>	CTT CAC GTA CTT TAT GCC TTC	GCA AGG GTA ATG TGT TCA A	126

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



Εικόνα 33: Σχετική έκφραση για τα γονίδια που εμπλέκονται στο φυλοδιαχωρισμό έπειτα από την επιβεβαίωση μέσω qRT-PCR σε όργανα αναπαραγωγής από αρσενικά (όρχεις) και θηλυκά (σπερματοθήκες, FAGs) έντομα. Η έκφραση στα αρσενικά έντομα απεικονίζεται με μπλε χρώμα ενώ στα θηλυκά έντομα απεικονίζεται με κόκκινο χρώμα. Το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των δύο βιολογικών επαναλήψεων φαίνεται στο γράφημα. Σε όλα τα γονίδια εκτός των *sox* και *rcp* η έκφραση μεταξύ θηλυκών και αρσενικών εντόμων ήταν σημαντικά διαφορετική όπως προσδιορίστηκε με t-τεστ ($p < 0.05$).

A.2.2.1 Γονίδια με υπερέκφραση στα όργανα αναπαραγωγής των αρσενικών ατόμων *B. oleae*

Η qRT-PCR επιβεβαίωσε την αυξημένη έκφραση των γονιδίων *kl2*, *kl3*, *kl5* και *ory* (γονίδια που είναι συνδεδεμένα με το Y χρωμόσωμα στη *Drosophila*) στους όρχεις από τα αρσενικά άτομα δάκου (Εικόνα 33). Η έκφραση του γονιδίου *kl2* ήταν υψηλότερη για τα αρσενικά έντομα σε σύγκριση με τα θηλυκά με τιμή έκφρασης 1,09 για τα αρσενικά και 0,237 για τα θηλυκά άτομα δάκου. Ομοίως, για το γονίδιο *kl3* η σχετική έκφραση του ήταν 1,079 για τα αρσενικά έντομα και 0,018 για τα θηλυκά έντομα. Το γονίδιο *kl5* είχε τιμές σχετικής έκφρασης 1,027 για τα αρσενικά έντομα και σχεδόν μηδενική (0,00003) για τα θηλυκά έντομα. Τέλος, η έκφραση του γονιδίου *ory* για τα αρσενικά άτομα δάκου είχε τιμή 0,972 ενώ στα θηλυκά άτομα ήταν σχεδόν μηδενική (0,0022). Ένα γονίδιο που εμπλέκεται στη σπερματογένεση και δύο γονίδια που σχετίζονται με την κινητικότητα του

σπέρματος αποδείχθηκε να είναι διαφορετικά υπερεκφραζόμενα στους ιστούς των αρσενικών ατόμων δάκου, τόσο στην τρανσκριπτομική ανάλυση αλλά και έπειτα από την qRT-PCR (Εικόνες 32, 33). Πιο αναλυτικά, η έκφραση του γονιδίου *sex-determining protein fem-1 (fem-1)*, ήταν υψηλότερη στα αρσενικά άτομα δάκου με τιμή 1,09 σε σύγκριση με τα θηλυκά όπου η έκφραση ήταν σχεδόν μηδενική (0,023). Το γονίδιο *growth arrest-specific protein 8 (Gas8)*, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία δεν έχει μελετηθεί σε έντομα. Στο δάκο, η έκφραση του γονιδίου *Gas8* ήταν υψηλότερη στα αρσενικά άτομα σε σύγκριση με τα θηλυκά άτομα καθώς οι τιμές σχετικής έκφρασης ήταν 1,029 και 0,0057 αντίστοιχα. Σύμφωνα με την επιβεβαίωση (validation), το γονίδιο *lost boys (lobo)*, εμφάνισε υψηλότερη έκφραση στα αρσενικά έντομα σε σύγκριση με τα θηλυκά με τιμές σχετικής έκφρασης 1,0416 και 0,00401 αντίστοιχα. Διαφορά στην έκφραση παρατηρήθηκε για το γονίδιο *ix* (γονίδιο καθορισμού του φύλου) μεταξύ των δύο

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

φύλων στη μύγα της ελιάς. Στα θηλυκά άτομα το γονίδιο έχει σχετική έκφραση 0,145 ενώ στα αρσενικά έχει 1,0487. Στη μύγα της ελιάς η έκφραση του γονιδίου *Pbl* για τα όργανα αναπαραγωγής των αρσενικών ατόμων (όρχεις) βρέθηκε αυξημένη 1,0352 σε σύγκριση με τα όργανα αναπαραγωγής των θηλυκών ατόμων (FAGs και σπερματοθήκες) που είχε τιμή 0,0573. Η ανάλυση μέσω της τρανσκριπτομικής του γονιδίου *Host cell factor C1 (Hcf)* στους ιστούς της μύγας της ελιάς έδειξε ~0,2 φορές υψηλότερη έκφραση στα αρσενικά έντομα. Το συγκεκριμένο αποτέλεσμα επιβεβαιώθηκε κατά τη qRT-PCR, όπου παρατηρήθηκαν υψηλότερα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *Hcf* στα αρσενικά άτομα (1,0429) σε σύγκριση με τα θηλυκά άτομα δάκου (0,2003) (Εικόνα 33).

A.2.2.2 Γονίδια με υπερέκφραση στα θηλυκά όργανα αναπαραγωγής του *B. oleae*

Η ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης μέσω της τρανσκριπτομικής έδειξε επίσης τετραπλάσια υπερέκφραση του γονιδίου *sox* στους ιστούς των θηλυκών εντόμων, το αποτέλεσμα όμως δεν επιβεβαιώθηκε μετά από τη qRT-PCR. Το γονίδιο έχει παρόμοιες τιμές σχετικής έκφρασης σε αρσενικά (0,959) και θηλυκά άτομα δάκου (0,903). Σύμφωνα με την επιβεβαίωση μέσω qRT-PCR επιβεβαιώθηκε η υπερέκφραση του γονιδίου *pupal cuticle protein (pcp)* στα όργανα αναπαραγωγής των θηλυκών εντόμων (FAGs και σπερματοθήκες) σε σύγκριση με τα όργανα αναπαραγωγής των αρσενικών εντόμων (όρχεις) με τιμές σχετικής έκφρασης 1,285 για τα θηλυκά και 0,459 για τα αρσενικά άτομα αντίστοιχα. Ωστόσο, δεδομένου ότι στο δάκο τα όργανα αναπαραγωγής συλλέχθηκαν όταν τα θηλυκά ήταν παρθένα, δεν μπορεί να δοθεί μια εύλογη εξήγηση για την υπερ-έκφραση των *pcps*.

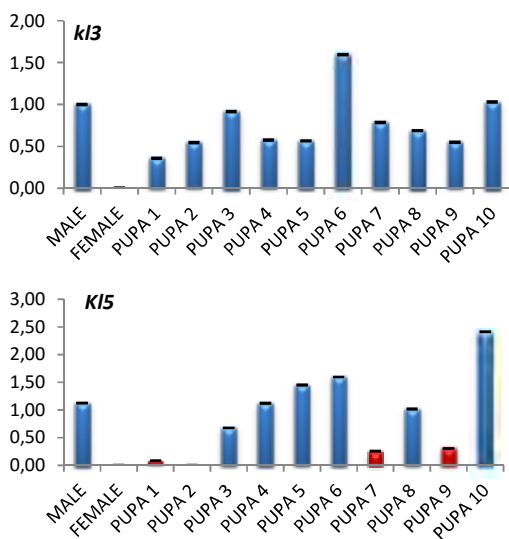
A.2.3 Μελέτη γονιδίων που εμπλέκονται στο φυλοδιαχωρισμό σε αναπτυξιακά στάδια του εντόμου *Bactrocera oleae*

Σύμφωνα με τα δεδομένα που προέκυψαν από την ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης μέσω της τρανσκριπτομικής στο δάκο της ελιάς αλλά και την

επιβεβαίωση (validation) παρατηρείται ότι υπάρχουν αρκετά γονίδια με σχεδόν μηδενική έκφραση στο ένα εκ των δύο φύλων του εντόμου. Πρόκειται επομένως για ένα σημαντικό εργαλείο που δίνει τη δυνατότητα ώστε να γίνει εκτίμηση του φυλοδιαχωρισμού σε πρώιμα στάδια του εντόμου (αυγό, προνύμφη και νύμφη) όπου εκ των πραγμάτων δεν μπορεί να γίνει διαχωρισμός των δύο φύλων μορφολογικά. Με βάση την αναζήτηση στη Flybase διαπιστώθηκε ο ακριβής προσδιορισμός της έκφρασης των εξεταζόμενων γονιδίων σε καθένα από τα αναπτυξιακά στάδια του εντόμου. Το αποτέλεσμα επιβεβαιώθηκε για το δάκο της ελιάς μέσω qRT-PCR όπου, για παράδειγμα, τα γονίδια *kl3* και *kl5* εκφράζονται εκτός από τα ενήλικα άτομα, μόνο στη νύμφη. Αντίστοιχα, το γονίδιο *pcp* εκφράζεται στα ενήλικα έντομα αλλά και στο στάδιο της προνύμφης. Ενώ, τα γονίδια *Hcf*, *Pbl*, *Gas8*, *sox*, *ix*, *ory* και *Yp2* έχουν έκφραση στο στάδιο του αυγού εκτός από το στάδιο του ενήλικου ατόμου. Στην παρούσα έρευνα συλλέχθηκαν αυγά σε συγκεκριμένο χρονικό διάστημα (μέσα στα πρώτα 15 λεπτά από τη στιγμή γέννησης τους) και έπειτα τέθηκαν να εξελιχθούν στο στάδιο της προνύμφης και νύμφης. Όπως περιγράφεται αναλυτικά στην ενότητα Υλικά και Μέθοδοι, αρχικά έγινε απομόνωση του RNA, έπειτα σύνθεση του cDNA και τέλος ακολούθησε qRT-PCR. Αρχικά, μελετήθηκαν τα γονίδια *kl3* και *kl5* για το στάδιο της νύμφης (pupa), όπου συνολικά μελετήθηκε το προφίλ έκφρασης των γονιδίων σε δέκα ξεχωριστές νύμφες. Παράλληλα, εξετάστηκε η σχετική έκφραση των γονιδίων σε αρσενικά και θηλυκά όργανα αναπαραγωγής. Για την ανάλυση των γονιδίων που υπερεκφράζονται στα αρσενικά άτομα, στους ξεχωριστούς ιστούς των αναπτυξιακών σταδίων (αυγό, προνύμφη και νύμφη) θεωρούμε ότι εκείνα που έχουν τιμή σχετικής έκφρασης <30% της τιμής των αρσενικών αντιστοιχούν σε θηλυκά άτομα. Αντίστοιχα, στην περίπτωση των γενετικών τόπων που υπερεκφράζονται στα θηλυκά έντομα, εκείνοι οι ξεχωριστοί ιστοί των αναπτυξιακών σταδίων (αυγό, προνύμφη και νύμφη) που έχουν τιμή σχετικής έκφρασης <30% της τιμής των θηλυκών εντόμων, αντιστοιχούν σε αρσενικά έντομα. Ωστόσο, οι αποκλίσεις που παρατηρούνται οφείλονται κυρίως στο γεγονός ότι συγκρίνουμε ενήλικα αρσενικά και θηλυκά έντομα με άγνωστα διαφορετικού σταδίου

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

(π.χ. αναπτυξιακά στάδια) του εντόμου. Το γονίδιο *kl3* έχει σχεδόν μηδενική έκφραση στα θηλυκά έντομα (0,002) ενώ στα αρσενικά η σχετική έκφραση του είναι 1,0. Στις νύμφες παρατηρείται ένα εύρος έκφρασης από 0,356-1,593. Στην περίπτωση που οι τιμές έκφρασης των νυμφών είναι μεγαλύτερες από 0,3, πιθανά αυτές να αντιστοιχούν σε αρσενικά άτομα, ενώ οι μικρότερες σε θηλυκά άτομα. Συνεπώς, στις δέκα νύμφες που αναλύθηκαν, καταλήγουμε ότι πρόκειται για νύμφες αρσενικών ατόμων. Ομοίως, για το γονίδιο *kl5* η έκφρασή του στα αρσενικά έντομα είναι 1,123 ενώ στα θηλυκά είναι 0,0002 (μηδενική έκφραση). Οι τιμές έκφρασης των νυμφών που είναι μεγαλύτερες από 0,672 πιθανά αντιστοιχούν σε αρσενικά άτομα και οι μικρότερες σε θηλυκά άτομα. Σε έξι νύμφες η σχετική έκφραση κυμαίνεται από 0,675 έως 2,409 που αντιστοιχούν σε νύμφες αρσενικών εντόμων και σε τέσσερις νύμφες το εύρος τιμών είναι 0-0,30 που αντιστοιχούν σε νύμφες θηλυκών ατόμων (Εικόνα 34).

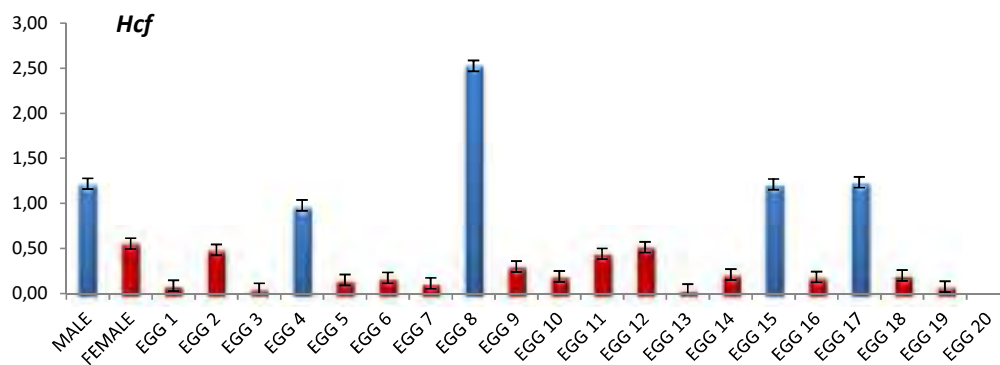


Εικόνα 34: Σχετική έκφραση για τα γονίδια *kl3*, *kl5* έπειτα από qRT-PCR σε όργανα αναπαραγωγής από αρσενικά (όρχεις) και θηλυκά (σπερματοθήκες, FAGs) άτομα δάκου και σε δέκα ξεχωριστές νύμφες (pupa1-10). Η έκφραση στα αρσενικά άτομα απεικονίζεται με μπλε χρώμα ενώ στα θηλυκά άτομα απεικονίζεται με κόκκινο χρώμα όπως επίσης φαίνεται το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου δύο τεχνικών επαναλήψεων.

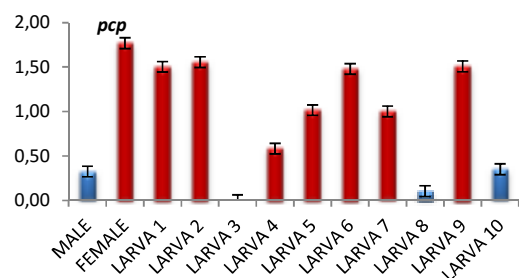
Στη συνέχεια εξετάστηκε το γονίδιο *Host cell factor (Hcf)* και η έκφρασή του σε είκοσι ξεχωριστά αυγά καθώς επίσης και σε όργανα αναπαραγωγής από αρσενικά και θηλυκά άτομα. Όπως προκύπτει στην Εικόνα 35 η σχετική έκφραση του γονιδίου στα αρσενικά είναι 1,219 ενώ στα θηλυκά είναι 0,555. Για το καθένα αυγό είχαμε διαφορετικές τιμές σχετικής έκφρασης με εύρος από 0,044 έως 2,526. Δεδομένου ότι το γονίδιο έχει υψηλότερη έκφραση στα αρσενικά σε σχέση με τα θηλυκά έντομα και σύμφωνα με τα αποτελέσματα της qRT-PCR παρατηρείται ότι στο σύνολο των εμβρύων που αναλύθηκαν τα δεκαέξι αυγά που έχουν την χαμηλότερη έκφραση, μάλλον πρόκειται να είναι από θηλυκά άτομα (κόκκινο χρώμα στήλης). Ενώ, τα τέσσερα αυγά που είχαν τις υψηλότερες τιμές σχετικής έκφρασης και απεικονίζονται με μπλε χρώμα στηλών μάλλον πρόκειται να είναι από αρσενικά άτομα δάκου.

Το γονίδιο *pcp* αρχικά μελετήθηκε σε όργανα αναπαραγωγής από αρσενικά και θηλυκά άτομα σε δέκα ξεχωριστές νύμφες, ωστόσο η έκφραση του ήταν ιδιαίτερα χαμηλή με τιμές από 0-0,311 μη δίνοντας σαφή αποτελέσματα (τα δεδομένα δεν εμφανίζονται). Από την ανάλυση όμως του γονιδίου για το στάδιο της προνύμφης, τα αποτελέσματα που προέκυψαν αποδεικνύουν ότι πρόκειται για ένα γονίδιο με υψηλότερη έκφραση στα θηλυκά άτομα (1,768) σε σύγκριση με τα αρσενικά (0,325). Οι τρεις από τις δέκα προνύμφες είχαν χαμηλή έκφραση με εύρος τιμών 0,0013- 0,3505 επομένως ενδέχεται να είναι προνύμφες αρσενικών ατόμων δάκου ενώ οι επτά προνύμφες που είχαν υψηλή έκφραση 0,583-1,555 μάλλον να είναι θηλυκών ατόμων δάκου (Εικόνα 36).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

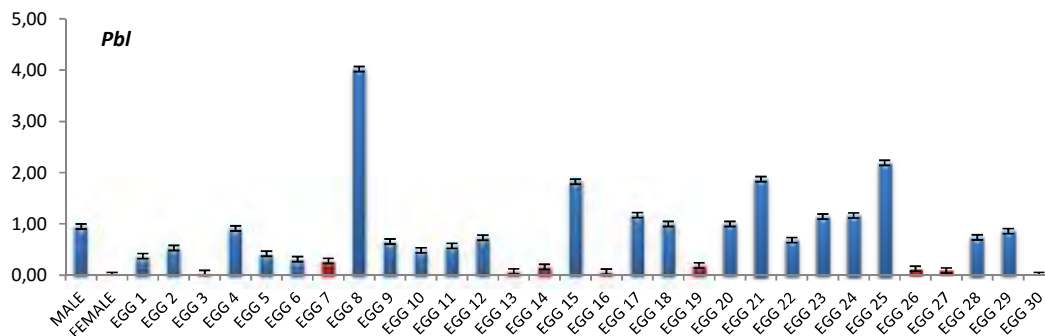


Εικόνα 35: Σχετική έκφραση για το γονίδιο *Hcf* έπειτα από qRT-PCR σε όργανα αναπαραγωγής από αρσενικά (όρχεις) και θηλυκά (σπερματοθήκες, FAGs) άτομα δάκου και σε είκοσι ξεχωριστά αυγά (egg 1-20). Η έκφραση στα αρσενικά άτομα απεικονίζεται με μπλε χρώμα ενώ στα θηλυκά απεικονίζεται με κόκκινο χρώμα όπως επίσης φαίνεται το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου δύο τεχνικών επαναλήψεων.



Εικόνα 36: Σχετική έκφραση για το γονίδιο *rcp* έπειτα από qRT-PCR σε όργανα αναπαραγωγής από αρσενικά (όρχεις) και θηλυκά (σπερματοθήκες, FAGs) έντομα και σε δέκα ξεχωριστές προνύμφες (larva 1-10). Η έκφραση στα αρσενικά άτομα απεικονίζεται με μπλε χρώμα ενώ στα θηλυκά απεικονίζεται με κόκκινο χρώμα.

Στη συνέχεια, μελετήθηκε το γονίδιο *Pbl* σε τριάντα ξεχωριστά αυγά όπως επίσης και στα όργανα αναπαραγωγής αρσενικών και θηλυκών ατόμων δάκου. Το συγκεκριμένο γονίδιο έχει υψηλότερη έκφραση στα αρσενικά (0,948) ενώ στα θηλυκά η έκφραση είναι σχεδόν μηδενική (0,003). Όπως απεικονίζεται, στα είκοσι ένα από τα τριάντα ξεχωριστά αυγά το εύρος τιμών της σχετικής έκφρασης κυμαίνεται από 0,315-4,021 ενώ στα υπόλοιπα εννιά αυγά η έκφραση ήταν σχεδόν μηδενική (0-0,276). Πρόκειται για ένα γονίδιο που εκφράζεται στα αρσενικά έντομα, συνεπώς για τα 21/30 αυγά μάλλον πρόκειται να είναι από αρσενικά άτομα δάκου ενώ τα 9/30 ενδέχεται μάλλον να είναι από θηλυκά έντομα (Εικόνα 37).

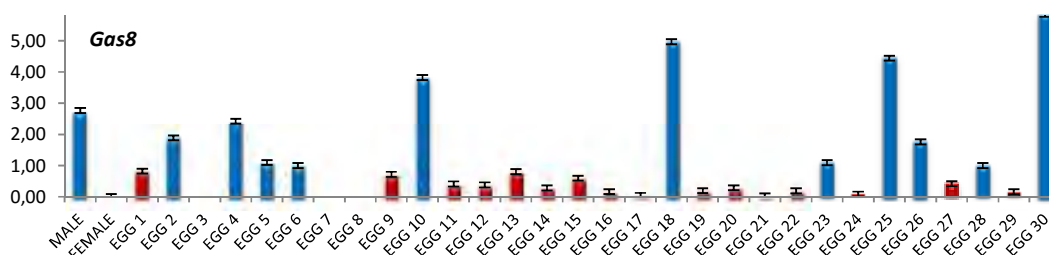


Εικόνα 37: Σχετική έκφραση για το γονίδιο *Pbl* έπειτα από qRT-PCR σε όργανα αναπαραγωγής από αρσενικά (όρχεις) και θηλυκά (σπερματοθήκες, FAGs) άτομα δάκου όπως επίσης και σε τριάντα ξεχωριστά αυγά (egg 1-30). Η έκφραση στα αρσενικά άτομα απεικονίζεται με μπλε χρώμα ενώ στα θηλυκά απεικονίζεται με κόκκινο χρώμα.

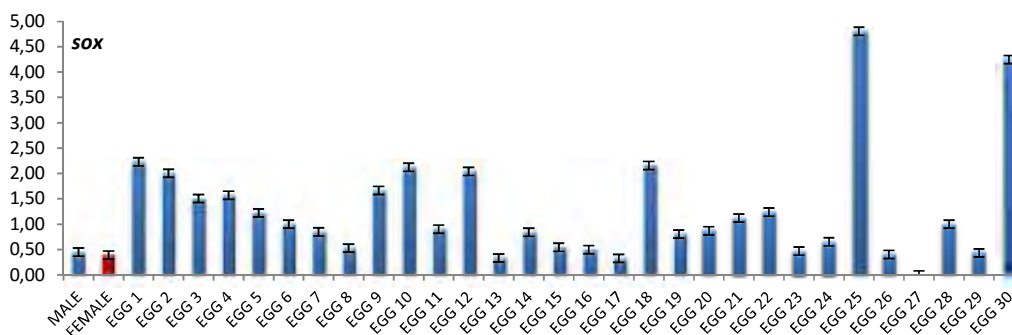
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Ομοίως, για το γονίδιο *Gas8* παρατηρείται σχετική έκφραση μόνο στα αρσενικά έντομα με τιμή 2,764 ενώ στα θηλυκά η έκφραση είναι μηδενική. Στα έντεκα από τα τριάντα αυγά παρατηρούνται οι υψηλότερες τιμές έκφρασης (1,000-5,842, μπλε μπάρες) ενώ σε δεκαεννιά από τα τριάντα αυγά η έκφραση ήταν σχεδόν μηδενική με εύρος τιμών από 0-0,8203 (κόκκινες μπάρες). Δεδομένου ότι το γονίδιο εκφράζεται στα αρσενικά έντομα υποθέτουμε ότι τα 11/30 αυγά μάλλον είναι από αρσενικά έντομα και τα 19/30 αυγά μάλλον από θηλυκά άτομα δάκου (Εικόνα 38). Το γονίδιο *sox* έχει σχετική έκφραση στα αρσενικά άτομα 0,447 και στα θηλυκά άτομα δάκου 0,391. Επομένως, εφόσον η έκφραση του γονιδίου

είναι παρόμοια στα δύο φύλα δεν μπορεί να υπάρξει σαφής προσδιορισμός εάν πρόκειται για αυγά από αρσενικά ή θηλυκά άτομα δάκου. Ωστόσο, παρατηρώντας ότι σε ένα μόνο αυγό η έκφραση του γονιδίου είναι μηδενική ενώ στα υπόλοιπα είκοσι εννιά το εύρος τιμών της σχετικής έκφρασης κυμαίνεται μεταξύ 0,331-4,804 υποθέτουμε ότι τα 29/30 αυγά μάλλον είναι από αρσενικά άτομα ενώ 1/30 από θηλυκά άτομα δάκου. Την υπόθεση συμπληρώνει ότι η τιμές σχετικής έκφρασης των αυγών που είναι μεγαλύτερες από 0,134 αντιστοιχούν σε αρσενικά άτομα ενώ οι μικρότερες σε θηλυκά άτομα (Εικόνα 39).



Εικόνα 38: Σχετική έκφραση για το γονίδιο *Gas8* έπειτα από qRT-PCR σε όργανα αναπαραγωγής από αρσενικά (όρχεις) και θηλυκά (σπερματοθήκες, FAGs) άτομα δάκου και σε τριάντα ξεχωριστά αυγά (egg 1-30). Η έκφραση στα αρσενικά άτομα απεικονίζεται με μπλε χρώμα ενώ στα θηλυκά άτομα δάκου απεικονίζεται με κόκκινο χρώμα.

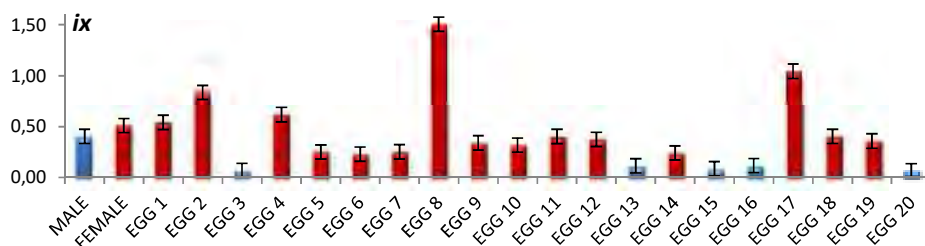


Εικόνα 39: Σχετική έκφραση για το γονίδιο *sox* έπειτα από qRT-PCR σε όργανα αναπαραγωγής από αρσενικά (όρχεις) και θηλυκά (σπερματοθήκες, FAGs) άτομα δάκου και σε τριάντα ξεχωριστά αυγά (egg 1-30). Η έκφραση στα αρσενικά άτομα απεικονίζεται με μπλε χρώμα ενώ στα θηλυκά απεικονίζεται με κόκκινο χρώμα.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στη συνέχεια μελετήθηκε το γονίδιο *ix* που είχε υψηλότερη έκφραση στα θηλυκά έντομα (0,511) σε σχέση με τα αρσενικά έντομα (0,403). Επομένως, εφόσον και στο γονίδιο αυτό η έκφραση είναι περίπου στα ίδια επίπεδα για τα αρσενικά και τα θηλυκά άτομα δάκου, με μικρή υπερέκφραση στα θηλυκά, θεωρούμε ότι οι τιμές έκφρασης στα αυγά που είναι $\leq 0,153$ ($\pm 30\%$), αντιστοιχούν σε αυγά μάλλον από θηλυκά έντομα. Αντίστοιχα, τιμές σχετικής έκφρασης

ίσες ή και χαμηλότερες από 0,153 ενδέχεται να αντιστοιχούν σε αυγά που είναι μάλλον από αρσενικά άτομα δάκου. Συγκεκριμένα, στα είκοσι ξεχωριστά αυγά που αναλύθηκαν, τα δεκαπέντε είχαν την υψηλότερη έκφραση με εύρος τιμών 0,229- 1,505 (κόκκινες μπάρες) ενώ τα πέντε εμφάνισαν χαμηλότερη έκφραση με τιμές από 0,066-0,117 (μπλε μπάρες) (Εικόνα 40). Συνεπώς, τα 15/20 αυγά πιθανόν να είναι από θηλυκά έντομα ενώ τα 5/20 από αρσενικά έντομα.



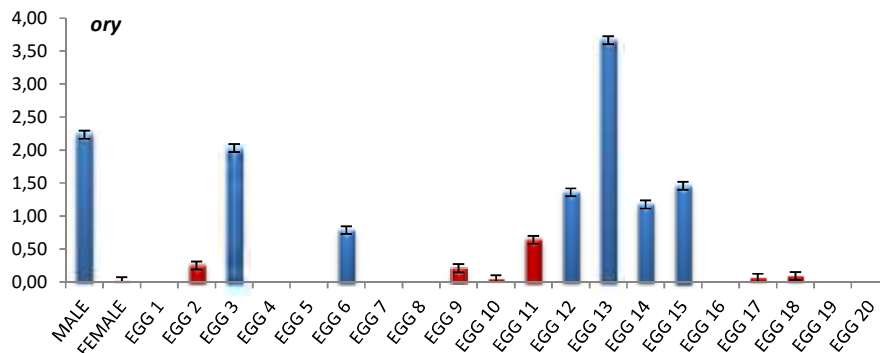
Εικόνα 40: Σχετική έκφραση για το γονίδιο *ix* έπειτα από qRT-PCR σε όργανα αναπαραγωγής από αρσενικά (όρχεις) και θηλυκά (σπερματοθήκες, FAGs) άτομα δάκου και σε είκοσι ξεχωριστά αυγά (egg 1-20). Η έκφραση στα αρσενικά έντομα απεικονίζεται με μπλε χρώμα ενώ στα θηλυκά έντομα απεικονίζεται με κόκκινο χρώμα.

Το γονίδιο *ory* εκφράζεται μόνο στα αρσενικά έντομα με τιμή σχετικής έκφρασης 2,232 ενώ στα θηλυκά έντομα έχει σχεδόν μηδενική έκφραση (0,014). Οι τιμές σχετικής έκφρασης στα αυγά που είναι μεγαλύτερες από 0,669 αντιστοιχούν σε αρσενικά άτομα, και οι μικρότερες τιμές σε θηλυκά άτομα. Κατά τη qRT-PCR σε είκοσι ξεχωριστά αυγά προέκυψε σχετική έκφραση σε έξι από αυτά με εύρος τιμών 0,785- 3,663 (μπλε στήλες) και στα υπόλοιπα δεκατέσσερα η έκφραση του γονιδίου ήταν σχεδόν μηδενική με εύρος τιμών 0-0,639 (κόκκινες στήλες) (Εικόνα 41). Από τα παραπάνω προκύπτει ότι μάλλον τα 7/20 αυγά είναι αρσενικών ατόμων ενώ τα 13/20 θηλυκών ατόμων δάκου.

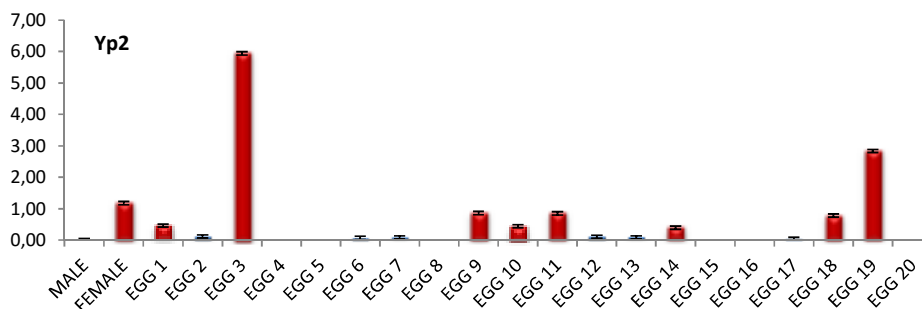
Τέλος, μελετήθηκε το γονίδιο *Yolk protein 2 (Yp2)* το οποίο προέκυψε από την ανάλυση των ευαίσθητων

και ανθεκτικών στο spinosad εντόμων καθώς βρέθηκε να εκφράζεται μόνο στα θηλυκά έντομα. Αναλυτικά, στα θηλυκά όργανα αναπαραγωγής η σχετική έκφραση του γονιδίου είναι 1,176 ενώ στα αρσενικά είναι 0,0003. Σε οκτώ από τα είκοσι αυγά παρατηρήθηκε υψηλή έκφραση το γονιδίου με εύρος τιμών 0.397-5.942 (κόκκινες μπάρες) ενώ στα υπόλοιπα δώδεκα αυγά η έκφραση κυμαίνεται από 0-0.119 (μπλε μπάρες) (Εικόνα 42). Επομένως, για τα 8/20 αυγά μάλλον πρόκειται για αυγά θηλυκών ατόμων ενώ τα 12/20 αυγά είναι μάλλον αρσενικών εντόμων.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



Εικόνα 41: Σχετική έκφραση για το γονίδιο *org* έπειτα από qRT-PCR σε όργανα αναπαραγωγής από αρσενικά (όρχεις) και θηλυκά (σπερματοθήκες, FAGs) άτομα δάκου και σε είκοσι ξεχωριστά αυγά (egg 1-20). Η έκφραση στα αρσενικά έντομα απεικονίζεται με μπλε χρώμα ενώ στα θηλυκά έντομα απεικονίζεται με κόκκινο χρώμα.



Εικόνα 42: Σχετική έκφραση για το γονίδιο *Yp2* έπειτα από qRT-PCR σε όργανα αναπαραγωγής από αρσενικά (όρχεις) και θηλυκά (σπερματοθήκες, FAGs) άτομα δάκου και σε είκοσι ξεχωριστά αυγά (egg 1-20). Η έκφραση στα αρσενικά έντομα απεικονίζεται με μπλε χρώμα ενώ στα θηλυκά απεικονίζεται με κόκκινο χρώμα.

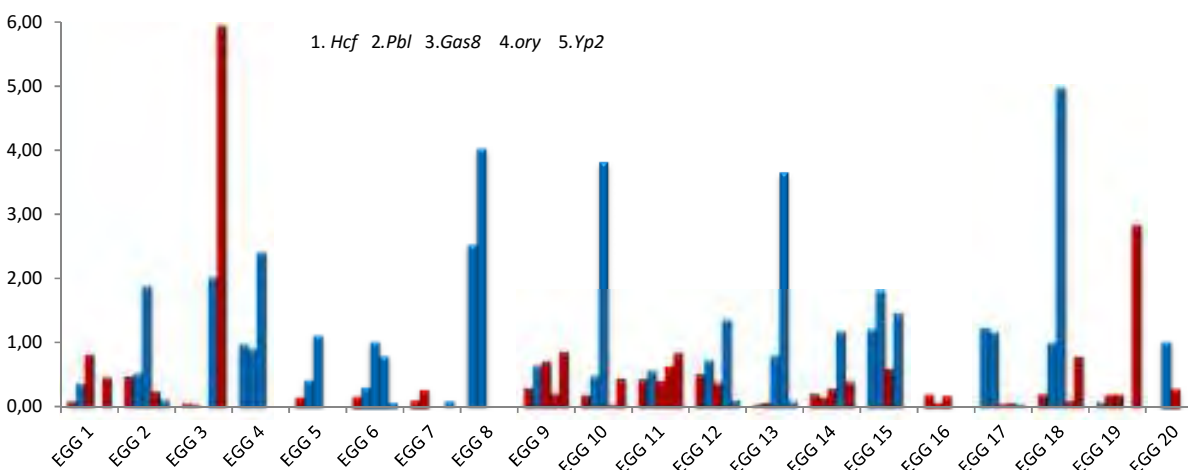
Από την ανάλυση των παραπάνω γονιδίων προέκυψαν δεδομένα που μπορούν να δώσουν πληροφορίες για καθένα γονίδιο ξεχωριστά. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε παράλληλη σύγκριση των δεδομένων των γονιδίων που είχαν εμφανή τα αποτελέσματα προσδιορισμού του φύλου του εντόμου σε πρώιμο αναπτυξιακό στάδιο. Από την ανάλυση εξαιρέθηκαν τα γονίδια *sox* και *ix* καθώς οι τιμές σχετικής έκφρασης τόσο για τα αρσενικά αλλά και για τα θηλυκά άτομα δάκου ήταν παρόμοιες, χωρίς να μπορούσαμε να έχουμε σαφή προσδιορισμό του φύλου στο στάδιο του αυγού του εντόμου. Η

παράλληλη σύγκριση πραγματοποιήθηκε με τα δεδομένα των γονιδίων *Hcf*, *Pbl*, *Gas8*, *org* και *Yp2* σε είκοσι ξεχωριστά αυγά, και σε όλες τις αντιδράσεις χρησιμοποιήθηκαν τα ίδια αυγά (Εικόνα 43), στην προσπάθεια εξαγωγής μιας συνολικότερης συμφωνίας (consensus) για το φύλο των αυγών. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ανάλυσης και συγκρίνοντας την έκφραση κάθε γονιδίου χωριστά σε καθένα αυγό προκύπτει ότι τα αυγά 2, 4, 5, 6, 8, 10, 13, 15, 17, 18 είναι αρσενικών ατόμων (10/20). Αντίστοιχα, τα αυγά 1, 7, 9, 11, 16, 19 είναι θηλυκών ατόμων (6/20). Ωστόσο, για τα αυγά 3, 12, 14, 20 δεν μπορεί να

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

υπάρξει ένα ξεκάθαρο συμπέρασμα εάν είναι από αρσενικά ή θηλυκά άτομα (Εικόνα 43). Παρ' όλα αυτά, η συγκριτική ανάλυση μπορεί να αποτελέσει ασφαλέστερο κριτήριο ανάλυσης φυλοειδικών

γονιδίων σε πρώιμα στάδια ανάλυσης και να αποτελέσει ένα χρήσιμο εργαλείο σε μελλοντικές μελέτες.



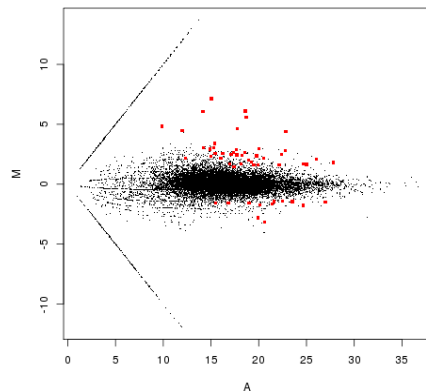
Εικόνα 43: Συγκριτική ανάλυση της σχετικής έκφρασης για τα γονίδια *Hcf*, *Pbl*, *Gas8*, *ory* και *Yp2* έπειτα από qRT-PCR σε είκοσι ξεχωριστά αυγά (egg 1-20). Σε κάθε αυγό η σειρά εμφάνισης των γονιδίων είναι ίδια και παρουσιάζεται στο υπόμνημα. Με κόκκινο χρώμα απεικονίζονται οι στήλες που αντιστοιχούν στα θηλυκά, ενώ με μπλε χρώμα είναι τα αυγά των αρσενικών ατόμων.

A.2.4 Διαφορική έκφραση μεταξύ ευαίσθητων και ανθεκτικών στο spinosad εντόμων *Bactrocera oleae*.

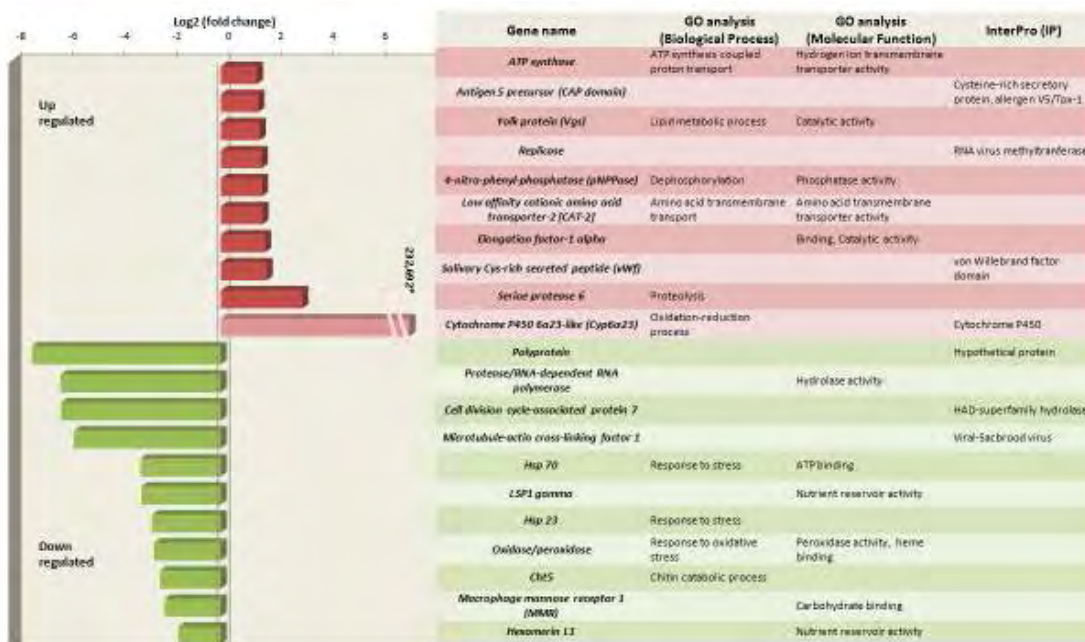
Όσον αφορά τη μελέτη γονιδίων που εμπλέκονται σε μηχανισμούς ανθεκτικότητας στο εντομοκτόνο spinosad ομοίως χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Cuffdiff με $q \text{ value} < 0,05$ για τη εύρεση γονιδίων με διαφορική έκφραση μεταξύ του εργαστηριακού (ευαίσθητου) και του ανθεκτικού πληθυσμού. Από την σύγκριση πρόεκυψαν 52 γονίδια με διαφορική έκφραση μεταξύ των δύο στελεχών εκ των οποίων 12 γονίδια με υπερέκφραση στα ανθεκτικά έντομα και 40 γονίδια με υποέκφραση στα ανθεκτικά έντομα (ή

αλλιώς υπερέκφραση στα ευαίσθητα έντομα). Με πιο εξειδικευμένη ανάλυση (blast) εντοπιστήκαν πολλά μετάγραφα να αντιστοιχούν στον ίδιο γενετικό τόπο και έτσι συνολικά προσδιορίστηκαν και αναλύθηκαν 9 γονίδια με υπερέκφραση στον ανθεκτικό πληθυσμό και 11 γονίδια με υπερέκφραση στον ευαίσθητο πληθυσμό. Στο γράφημα MA-plot απεικονίζεται η σύγκριση των γονιδίων μεταξύ ευαίσθητων και ανθεκτικών εντόμων με $q \text{ value} < 0,05$ και οι κουκίδες με κόκκινο χρώμα αντιστοιχούν στα γονίδια με διαφορική έκφραση (Εικόνα 44).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



Εικόνα 44: Στο γράφημα M-A plot απεικονίζονται τα στατιστικώς σημαντικά, διαφορικής έκφρασης γονίδια μεταξύ ευαίσθητων-ανθεκτικών εντόμων *B. oleae* με q -value < 0.05. Οι κουκκίδες με κόκκινο χρώμα αντιστοιχούν στα γονίδια που υπερεκφράζονται στο ανθεκτικό στέλεχος, ενώ με μαύρο χρώμα εκείνα που υποεκφράζονται αντίστοιχα.



Εικόνα 45: Στατιστικώς σημαντικά διαφορικής έκφρασης γονίδια που υπερεκφράζονται σε κεφάλια ευαίσθητων και ανθεκτικών στο sprinosad εντόμων *B. oleae* σύμφωνα με το Log2 (fold change) ως αποτέλεσμα της ανάλυσης μέσω RNA-seq όπως περιγράφονται στο αριστερό τμήμα του γραφήματος. Στο δεξί τμήμα του γραφήματος περιγράφεται η ταξινόμηση των γονιδίων σύμφωνα με το Gene Ontology (GO) και συγκεκριμένα η βιολογική διαδικασία, η μοριακή λειτουργία και η κατηγοριοποίηση μέσω του InterPro.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Πίνακας 8: Γονίδια με υπερ- και υπό- έκφραση σε κεφάλια από ανθεκτικά έντομα *Bactrocera oleae* στο spinosad

Gene ID	Down regulated genes	Value 1	Value 2	Log2 (fold change)	Test stat	P value	Q value
ADQ64613	<i>Polyprotein</i>	2177	144.785	-723.229	512.206	3,02E-04	0.0003415
ADD18747	<i>Protease/RNA-dependent RNA polymerase</i>	1099.04	155.255	-614.546	11.997	0	0
ZP_16884880	<i>Cell division cycle-associated protein 7</i>	5204.91	746.411	-612.376	432.191	1,55E-02	0.0087779
BAC16565	<i>Microtubule-actin cross-linking factor 1</i>	4549.53	921.072	-562.626	395.804	7,56E-02	0.0292091
ACB55606	<i>Hsp 70</i>	391.859	465.059	-307.485	650.018	8,02E-08	3,93E-04
XP_001988642	<i>LSP1 gamma</i>	566.45	68.808	-30.413	403.256	5,52E-02	0.0236484
XP_002024748	<i>Hsp 23</i>	1021.13	164.312	-263.566	612.076	9,31E-07	2,93E-03
XP_001988524	<i>Oxidase/peroxidase</i>	671.482	113.775	-256.117	529.689	1,18E-04	0.0001442
XP_001996031	<i>Cht5</i>	402	801.518	-232.639	459.795	4,27E-03	0.0031335
XP_002065996	<i>Macrophage mannose receptor 1 (MMR)</i>	2581.58	579.39	-215.565	562.352	1,87E-05	3,44E-02
YP_004278174	<i>Hexamerin L1</i>	3791.13	1226.37	-162.823	385.374	0.0001163	0.0416731
Gene ID	Up regulated genes	Value 1	Value 2	Log2 (fold change)	Test stat	P value	Q value
AFA34424	<i>ATP synthase</i>	1485.46	3895.48	139.089	-378.977	0.0001508	0.0471474
XP_002075502	<i>Antigen 5 precursor (CAP domain)</i>	2104.4	5739.95	144.763	-391.983	8.86E-005	0.0333719
P27587	<i>Yolk protein (Vgs)</i>	6843.39	19371.7	150.117	-403.518	5.46E-005	0.0236484
YP_002455928	<i>Replicase</i>	196.181	585.103	157.651	-402.096	5.80E-005	0.0236484
XP_002066000	<i>4-nitro-phenyl-phosphatase (pNPPase)</i>	416.663	1251.52	158.673	-416.827	3.07E-005	0.0161004
XP_001956475	<i>Low affinity cationic amino acid transporter 2 (CAT-2)</i>	122.13	370.706	160.186	-404.038	5.34E-005	0.0236484
YP_002455904	<i>Elongation factor-1 alpha</i>	589.465	1917.54	170.178	-452.092	6.16E-006	0.0041108
XP_002009350	<i>Salivary Cys-rich secreted peptide (vWf)</i>	2761.73	9367.91	176.216	-454.731	5.43E-006	0.0038004
XP_002010361	<i>Serine protease 6</i>	424.956	3725.73	313.214	-55.226	3.34E-008	4.91E-005
XM_004534804	<i>Cytochrome P450 6a23-like (Cyp6a23)</i>	232.692	1089.17	222.674	-354.831	0.0003877	0.109514

A.2.5 επικύρωση (Validation) με qRT-PCR σε ευαίσθητα-ανθεκτικά έντομα *Bactrocera oleae*

Η διαφορετική έκφραση στα διάφορα γονίδια που εντοπίστηκαν μέσω RNAseq (Πίνακας 8, Εικόνα 45) στη συνέχεια επικυρώθηκαν με qRT-PCR (Εικόνα 46). Όπως ήδη αναφέρθηκε, η επιβεβαίωση κρίθηκε

αναγκαία καθώς η RNA-seq ανάλυση έγινε σε ένα μοναδικό δείγμα, χωρίς δηλαδή βιολογικές επαναλήψεις. Αρχικά, από τις αλληλουχίες από το τρανσκριπτόμα του δάκου σχεδιάστηκαν ειδικοί εκκινητές για καθένα γονίδιο με σημαντικά διαφορετική έκφραση (Πίνακας 9). Έπειτα, ακολούθησε απομόνωση των κεφαλιών από τους

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

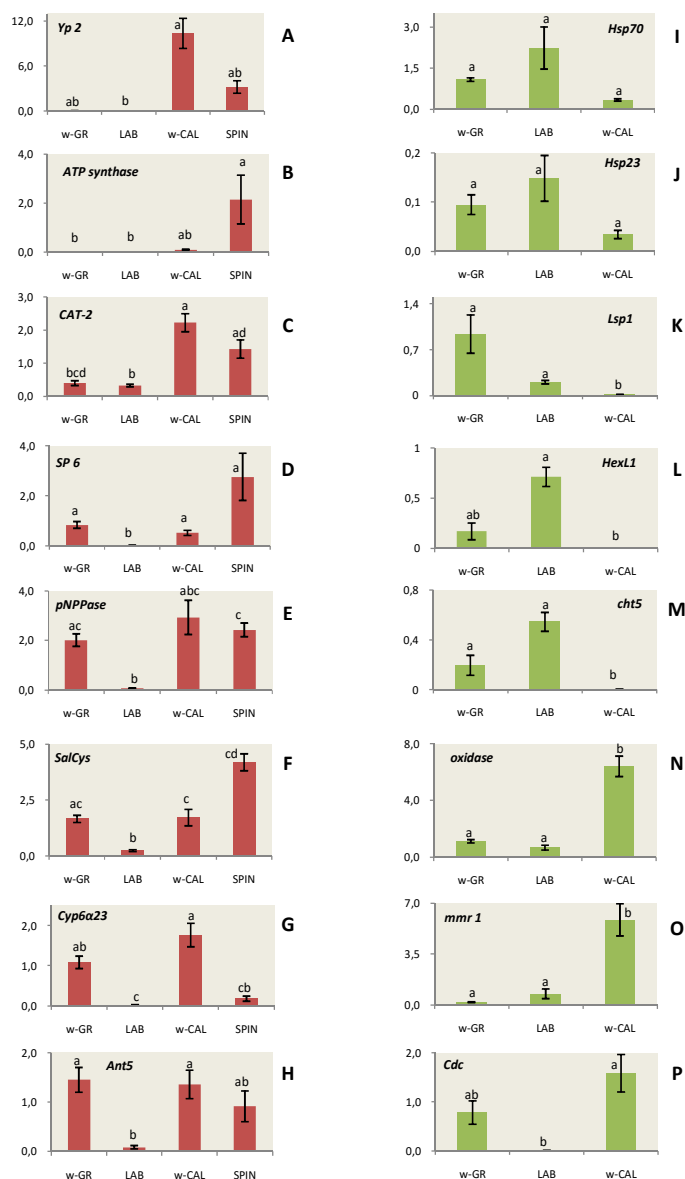
ευαίσθητους και τους ανθεκτικούς στο spinosad πληθυσμούς δάκου. Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε απομόνωση του RNA, σύνθεση του cDNA και τελικά επικύρωση μέσω qRT-PCR ώστε να γίνει επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων της ανάλυσης της γονιδιακής έκφρασης μέσω τρανσκριπτομικής.

Συνολικά, μελετήθηκαν δύο ευαίσθητοι και δύο ανθεκτικοί στο spinosad πληθυσμοί του εντόμου *B. oleae*, και από κάθε στέλεχος συνολικά μελετήθηκαν έξι διαφορετικά κεφάλια, τρία από τα αρσενικά έντομα και τρία από τα θηλυκά έντομα (Εικόνα 46).

Πίνακας 9: Αλληλουχίες εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την επιβεβαίωση μέσω qRT-PCR

Gene	Forward primer (5'-3')	Reverse Primer (5'-3')	Amplicon size (bp)	Efficiency (E)	R ²
<i>4-nitro-phenyl-phosphatase (pNPPase)</i>	CGGCAGTGACATAGTGC TG	GCACATCGCTCAACTGA TTG	80	98.9%	0.999
<i>Antigen 5 precursor (CAP domain)</i>	CCTGTGTA AAAAGTGACC AAG	GATTCGTCTTACTGTGG AG	100	100.1%	0.998
<i>ATP synthase</i>	CTCACTCATTTACACCA AC	GAAAGCCTATAATCACT GC	87	101.4%	1.0
<i>Cell division cycle-associated protein 7</i>	CGGACGGGTGAGTAATG TCTG	GCGACGTTATGCGGTAT TAGC	83	109.2%	0.997
<i>Cht5</i>	CGACTTGTGCACTCATC TGG	ATGCTTTTGCCGAGTT GTG	133	104.3%	0.995
<i>Cytochrome P450 6a23-like (Cyp6a23)</i>	TGCAGGTGTGCATTGGA CTCAC	AGCGTCCACTCGCAGT TTTATG	141	93.3%	0.994
<i>Hexamerin L1</i>	AAAATATCAGTGAACAG CGCGAAG	ACGCAAAATAACCGCA AAATC	70	98.3%	0.991
<i>Hsp 70</i>	CGGCGTTAGCTTATGGT CTG	GTCGCACGCACTTCAAA TAGC	133	102.7%	0.995
<i>Hsp23</i>	AGCATTGGGTAAGCCAG AGAG	GAAATGGGCGACATCCA TCG	82	107.0%	0.999
<i>Low affinity cationic amino acid transporter 2 (CAT-2)</i>	AGGGTCTTGGGGACTAT CCG	AACGAGACGACTCCTTG GC	93	108.9%	0.998
<i>LSP1 gamma</i>	TCGAAGTAGTTGCTGCG AGTG	CGATTTCTCCTGGGATC ACG	96	96.1%	0.985
<i>Macrophage mannose receptor 1 (MMR)</i>	TGTCGAATACTGGTCTC GCATC	CCAAACCCATCGTCTGT TGTC	83	98.1%	0.997
<i>Oxidase/ peroxidase</i>	GCAAGGCACCAACCAAC AAG	AACAGTACTCAGGCGCA GAC	141	96.6%	0.988
<i>Rpl19</i>	CTTCACGTACTTTATGCC TTC	GCAAGGGTAATGTGTTT AA	126	97.3%	0.999
<i>Salivary Cys-rich secreted peptide (vWf)</i>	AATCTCTGCCAAAACCTT GCC	CTAACAAATCGTACGTTT CAC	110	96.5%	0.989
<i>Serine protease 6</i>	ATTCTAGTGGTCTGCT GTAG	ATTCGGAAGACTACTGT CG	86	94.0%	0.986
<i>Yolk protein 2 (Vgs)</i>	CTAGCCGTTCTAACAAAC C	TTCGAAGTTGCGTATGA C	83	98.9%	0.984

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



Εικόνα 46: Σχετική έκφραση των γονιδίων που ενδέχεται να συνδέονται στην ανθεκτικότητα στο spinosad. Οι μπάρες με κόκκινο χρώμα υποδηλώνουν τα γονίδια με υπερέκφραση, *Yolk protein 2* (*Yp2*, σχήμα A), *ATP synthase FO subunit 6* (*ATP synthase*, σχήμα B), *Low affinity cationic amino acid transporter 2* (*CAT-2*, σχήμα C), *Serine protease 6* (*SP6*, σχήμα D), *4-nitrophenylphosphatase* (*pNPPase*, σχήμα E), *Salivary Cys-rich secreted peptide-vWF* (*SalCys*, σχήμα F), *Cytochrome P450 6a23-like* (*Cyp6a23*, σχήμα G) και *Antigen 5 precursor* (*Ant5*, σχήμα H), για το μέσο όρο από τρία αρσενικά και τρία θηλυκά έντομα ξεχωριστά έπειτα από validation μέσω qRT-PCR. Ωστόσο, μόνο για το γονίδιο *Yolk protein 2* η αξιολόγηση βασίστηκε στην έκφραση των θηλυκών εντόμων καθώς στα αρσενικά δεν υπάρχει έκφραση του γονιδίου. Οι μπάρες με πράσινο χρώμα αντιστοιχούν στα γονίδια με υποέκφραση *Heat-shock protein 70* (*Hsp70*, σχήμα I), *Heat-shock protein 23* (*Hsp23*, σχήμα J), *Larval serum protein 1* (*LSP1*, σχήμα K), *Hexamerin1* (*HexL1*, σχήμα L), *Chitinase 5* (*Cht5*, σχήμα M), *Oxidase/peroxidase* (*oxidase*, σχήμα N), *Macrophage mannose receptor 1* (*mmr1*, σχήμα O), *Cell division cycle-associated protein 7* (*Cdc*, σχήμα P), για το μέσο όρο από τρία αρσενικά και τρία θηλυκά έντομα έπειτα από qRT-PCR. Στις μπάρες επίσης απεικονίζεται και το τυπικό σφάλμα, ενώ δίπλα του τα μικρά γράμματα δείχνουν τους σημαντικά διαφορετικούς μέσους όρους που έχουν υπολογιστεί με σύγκριση ανά ζεύγη (είτε με το Tukey's ή το Kruskal-Wallis τεστ). Όλες οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με το Ln μετασχηματισμό των δεδομένων εκτός του γονιδίου *macrophage mannose receptor 1*

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Οι τέσσερις πληθυσμοί των εντόμων που αναλύθηκαν μέσω qRT-PCR ήταν ο ευαίσθητος εργαστηριακός πληθυσμός δάκου (LAB) όπου διατηρείται και εκτρέφεται με συγκεκριμένες συνθήκες υγρασίας, θερμοκρασίας και διατροφής στο εργαστήριο μας απουσίας οποιασδήποτε χρήσης χημικών και εντομοκτόνων, ο ευαίσθητος φυσικός πληθυσμός από την περιοχή της Αγριάς του Βόλου όπου δεν γίνονται καθόλου ψεκασμοί (w-GR), ο εργαστηριακός ανθεκτικός στο spinosad πληθυσμός (SPIN) όπου εκτρέφεται με τις ίδιες συνθήκες με τον πληθυσμό LAB με τη διαφορά ότι η διατροφή του βασίζεται σε συνεχώς αυξανόμενες δόσεις του εντομοκτόνου spinosad και τέλος, ο φυσικός ανθεκτικός στο spinosad πληθυσμός από την Καλιφόρνια (w-CAL) όπου έχει βρεθεί να εμφανίζει υψηλή ανθεκτικότητα στο εντομοκτόνο λόγω συνεχούς χρήσης του συγκεκριμένου φαρμάκου. Συνολικά, μελετήθηκαν δεκαέξι γενετικοί τόποι. Τα οκτώ γονίδια *Yolk protein 2 (Yp2)*, *ATP synthase FO subunit 6 (ATPsynthase)*, *Low affinity cationic amino acid transporter 2 (CAT-2)*, *Serine protease 6 (SP6)*, *4-nitrophenylphosphatase (pNPPase)*, *Salivary Cys-rich secreted peptide- vWF (SalCys)*, *Cytochrome P450 6a23-like (Cyp6a23)* και *Antigen 5 precursor (Ant5)* που κατά την ανάλυση RNA-seq παρουσιάζουν υπερέκφραση στα ανθεκτικά στο spinosad έντομα. Αλλά και τα οκτώ γονίδια *Heat-shock protein 70 (Hsp70)*, *Heat-shock protein 23 (Hsp23)*, *Larval serum protein 1 (LSP1)*, *HexamerinL1 (HexL1)*, *Chitinase 5 (Cht5)*, *Oxidase/peroxidase (oxidase)*, *Macrophage mannose receptor 1 (mmr1)* και *Cell division cycle-associated protein 7 (Cdc)* παρουσιάζουν υποέκφραση στα ανθεκτικά στο spinosad έντομα (ή υπερέκφραση στο ευαίσθητο πληθυσμό του δάκου). Από τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την qRT-PCR, επιβεβαιώθηκε σημαντική διαφορά αυξημένης έκφρασης στα ανθεκτικά στο spinosad έντομα για τα γονίδια *Yp2*, *ATPsynthase*, *CAT-2*, *SP6*, *Cyp6a23*, *pNPPase*, *SalCys*. Επίσης, παρατηρήθηκε αυξημένη έκφραση στα ευαίσθητα έντομα για τα γονίδια που υποεκφράζονται στα ανθεκτικά στο spinosad έντομα *LSP1*, *HexL1* και *Cht5*. Ενώ, για τα γονίδια *Hsp70* και *Hsp23* αν και η έκφραση των ευαίσθητων εντόμων ήταν αυξημένη συγκριτικά με τον ανθεκτικό πληθυσμό, δεν επιβεβαιώθηκε στατιστικά σημαντική

διαφορά. Τέλος, για τα γονίδια *Ant5*, *oxidase*, *mmr1* και *cdc* δεν διαπιστώθηκε το αναμενόμενο αποτέλεσμα (Εικόνα 46).

A.2.5.1 Γονίδια με υπερέκφραση σε κεφάλια του ανθεκτικού στο spinosad πληθυσμού

Το γονίδιο *Yolk protein 2 (Yp2)* δεν εμφάνισε σχετική έκφραση στους πληθυσμούς των ευαίσθητων εντόμων (LAB, w-GR), ενώ η έκφραση στα ανθεκτικά έντομα κυμαίνεται μεταξύ 0,0075-5,656 και 3,265-17,178 για τον πληθυσμό SPIN και τον w-CAL, αντίστοιχα. Όπως είναι αναμενόμενο, η υψηλότερη έκφραση για την ανθεκτικότητα στο spinosad παρατηρείται μόνο στα θηλυκά έντομα καθώς το γονίδιο *Yp2* δεν εκφράζεται στα αρσενικά (Εικόνα 46, A). Ομοίως, η σχετική έκφραση του γονιδίου *ATP synthase FO subunit 6* στις ευαίσθητες μύγες των πληθυσμών LAB και w-GR κυμαίνεται περίπου στο ίδιο εύρος τιμών, κοντά στο μηδέν. Οι τιμές έκφρασης για τους δύο ανθεκτικούς πληθυσμούς (w-CAL, SPIN) ήταν υψηλότερες (Εικόνα 46, B), ενώ σε ένα αρσενικό άτομο από το στέλεχος SPIN παρουσίασε αξιοσημείωτη υψηλή τιμή έκφρασης (12,124). Η έκφραση του γονιδίου *Low affinity cationic amino acid transporter 2* ήταν 0,399 και 0,328 στους πληθυσμούς w-GR και LAB αντίστοιχα, ενώ η έκφραση στους ανθεκτικούς πληθυσμούς ήταν σημαντικά αυξημένη σε 2,222 και 1,428 για τους w-CAL και SPIN (Εικόνα 46, C). Το γονίδιο *Serine Protease 6 (SP6)* βρέθηκε επίσης με σημαντική υπερέκφραση στον πληθυσμό SPIN (2,763) σε σύγκριση με το στέλεχος LAB (0,016), ενώ η έκφραση στους φυσικούς πληθυσμούς ήταν σχετικά χαμηλή (0,838 για τον w-GR και 0,519 για τον w-CAL) (Εικόνα 46, D). Η έκφραση του γονιδίου *4-nitrophenylphosphatase (pNPPase)* ήταν σημαντικά υψηλότερη στον πληθυσμό w-CAL σε σύγκριση με τον LAB (2,937 έναντι 0,064), ενώ για τον w-GR ήταν ενδιάμεση (2,016) αλλά μη σημαντικά διαφορετική από τον πληθυσμό w-CAL (Εικόνα 46, E). Το ίδιο πρότυπο ισχύει για τα γονίδια *Salivary Cys-rich secreted peptide (vWFdomain)* και *antigen 5 precursor* (Εικόνα 46, F;H). Τέλος, για το γονίδιο *cytochrome P450 6a23-like (Cyp6a23)* ενώ η

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

έκφραση για τον πληθυσμό SPIN ήταν υψηλότερη από τον πληθυσμό LAB (0,179 έναντι 0,019) αλλά και για τον w-CAL ήταν υψηλότερη από τον w-GR (1,762 έναντι 1,083), οι διαφορές δεν βρέθηκαν στατιστικώς σημαντικές (Εικόνα 46,G).

A.2.5.2 Γονίδια με υποέκφραση σε κεφάλια του ανθεκτικού στο spinosad πληθυσμού

Η λειτουργική ανάλυση για τα γονίδια με υποέκφραση πραγματοποιήθηκε για τους πληθυσμούς LAB, w-GR και w-CAL καθώς το στέλεχος SPIN δεν ήταν πλέον διαθέσιμο. Η σχετική έκφραση των γονιδίων *Hsp* δεν είχε σημαντική διαφορά σε πολλές ομάδες από τα έντομα. Η έκφραση του *Hsp70* ήταν 1.082, 2.236 και 0.337 για τους πληθυσμούς w-GR, LAB και w-CAL, αντίστοιχα, ενώ η έκφραση του *Hsp23* ήταν 0.095, 0.149 και 0.034 (Εικόνα 46 I; J). Το γονίδιο *Larval serum protein 1 (Lsp1)*, είχε σημαντική υποέκφραση στα έντομα του πληθυσμού w-CAL σε σύγκριση από κοινού με τα έντομα των πληθυσμών w-GR και LAB (0,012 έναντι 0,937 και 0,203) (Εικόνα 46, K). Ομοίως, το γονίδιο HexamerinL1 εμφάνισε υψηλότερη έκφραση στους ευαίσθητους πληθυσμούς (LAB: 0,713, w-GR: 0,17), ενώ στον ανθεκτικό πληθυσμό w-CAL η έκφραση ήταν 0,001 (Εικόνα 46, L). Η υποέκφραση ήταν ακόμη πιο έντονη για το γονίδιο *chitinase 5* του ανθεκτικού πληθυσμού w-CAL (0,002) σε σύγκριση με τους w-GR (0,197) και LAB (0,545) (Εικόνα 46, M). Το πρότυπο έκφρασης για το γονίδιο *oxidase/oxidase* δεν επιβεβαίωσε τα αποτελέσματα του RNAseq, καθώς η έκφραση του ανθεκτικού πληθυσμού w-CAL ήταν υψηλότερη από τους ευαίσθητους πληθυσμούς w-GR και LAB (6,148 έναντι 1,129 και 0,685) (Εικόνα 46, N). Παρόμοια εικόνα στο πρότυπο έκφρασης παρατηρήθηκε για τα γονίδια *Macrophage mannose receptor 1 (MMR)* (5,856 έναντι 0,196 και 0,776) και *cell division cycle associated protein7 (Cdc)* (1,585 έναντι 0,784 και 0,0102) (Εικόνα 46, O; P).

A.2.6 Λειτουργική ανάλυση πληθυσμών *B. oleae* σε χρονικά σημεία (time points) για τη μελέτη της ανθεκτικότητας στο spinosad

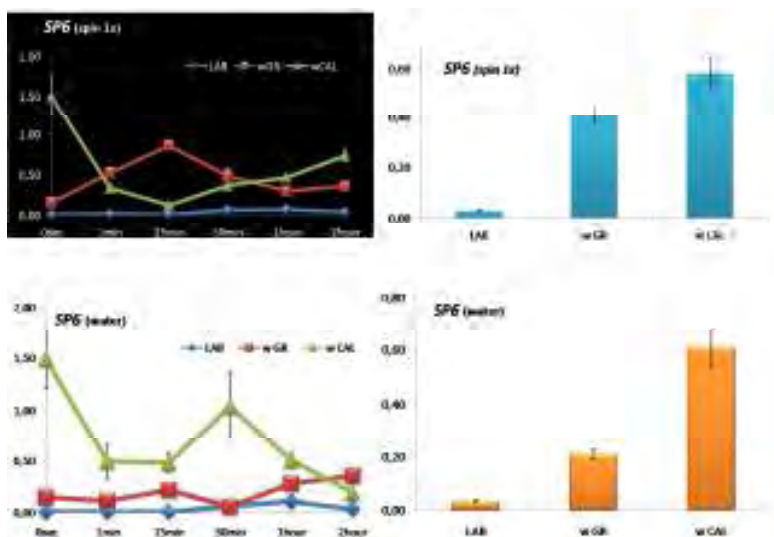
Η παρούσα πειραματική ενότητα βασίστηκε στα αποτελέσματα των γονιδίων που συνδέονται με την ανθεκτικότητα του δάκου στο spinosad και εμφάνισαν υψηλή έκφραση στους εξεταζόμενους πληθυσμούς του εντόμου. Ωστόσο, κατά τη συγκεκριμένη μελέτη, προέκυψαν πολλά ερωτήματα που προσπαθήσαμε να διερευνήσουμε περαιτέρω. Για παράδειγμα, τα έντομα που χρησιμοποιήθηκαν στην αρχική ανάλυση προέρχονται από διαφορετικά και μη προσδιορισμένα χρονικά σημεία. Με βασικό μέλημα την κατανόηση του τρόπου αλλά και του ρυθμού δράσης του εντομοκτόνου, ένα εύλογο ερώτημα αποτέλεσε ποιά είναι η έκφραση των γονιδίων που συνδέονται με την ανθεκτικότητα κατά την πρώτη επαφή του εντομοκτόνου με το έντομο. Επίσης, ποια είναι η μετέπειτα εξέλιξη στον οργανισμό μέχρι την στιγμή που θα θανατωθεί. Ακόμη, πώς και εάν μεταβολίζεται το φάρμακο από τον οργανισμό του εντόμου και αν αυτό γίνεται αντιληπτό από μια τέτοια έρευνα. Για τη διερεύνηση των παραπάνω θεμάτων, πραγματοποιήθηκε λειτουργική ανάλυση σε διαφορετικά χρονικά σημεία, ατόμων από τον εργαστηριακό πληθυσμό LAB αλλά και από φυσικούς πληθυσμούς ευαίσθητους (Αγριά, Βόλος w-GR) και ανθεκτικούς (Tux, Καλιφόρνια w-CAL).

Συγκεκριμένα, για κάθε πληθυσμό ξεχωριστά, έπειτα από νηστεία και μετά από κατανάλωση του εντομοκτόνου spinosad σε συγκέντρωση 1x, απομονώθηκε το κεφάλι των εντόμων στα χρονικά στάδια των 0sec, 15min, 30min, 1hour και 2hours. Παράλληλα, σύμφωνα με την RNA-seq ανάλυση και την μετέπειτα qRT-PCR, για τους γενετικούς τόπους με ιδιαίτερη σημασία καθώς εμπλέκονται σε μηχανισμούς ενεργειακού μεταβολισμού (*SP6*, *ATPsynthase*, *CAT-2*, *Cyp6a23*, *Yp2*) πραγματοποιήθηκε μια ακόμη πειραματική μελέτη. Τα έντομα από τους τρεις πληθυσμούς, έπειτα από νηστεία κατανάλωσαν νερό και απομονώθηκε το κεφάλι τους για τα ίδια χρονικά σημεία όπως και με την κατανάλωση του spinosad 1x. Συνολικά, χρησιμοποιήθηκαν 3 αρσενικά και 3 θηλυκά έντομα για κάθε χρονικό στάδιο με κατάποση νερού και εντομοκτόνου αντίστοιχα. Συνεπώς, από κάθε πληθυσμό αναλύθηκαν 72 έντομα από τα οποία και απομονώθηκε το RNA. Στη συνέχεια, έγινε η σύνθεση

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

του cDNA και ακολούθησε qRT-PCR. Αρχικά, μελετήθηκε ο γενετικός τόπος *Serine protease 6* (*SP6*) όπου η ανάλυση στα χρονικά στάδια της μίας ώρας και 2 ωρών μετά την κατάποση του spirin 1x επιβεβαίωσε τα αποτελέσματα του RNA-seq. Η έκφραση του γονιδίου *SP6* για τον ανθεκτικό πληθυσμό (w-CAL) ήταν μεγαλύτερη σε σχέση με τους δύο ευαίσθητους πληθυσμούς (LAB, w-GR). Στα υπόλοιπα χρονικά σημεία (1min, 15min και 30min) ωστόσο, η έκφραση του *SP6* ήταν μεγαλύτερη στον ευαίσθητο φυσικό πληθυσμό (w-GR) σε σύγκριση με τους άλλους δύο πληθυσμούς, όπου επιβιώνεται το αποτέλεσμα της ανάλυσης RNA-seq. Λαμβάνοντας υπόψη τα δεδομένα για τα έντομα από τους τρεις πληθυσμούς έπειτα από την κατανάλωση του spirin 1x, έγινε υπολογισμός του μέσου όρου της έκφρασης όλων των χρονικών σημείων (Εικόνα 47). Η έκφραση του γενετικού τόπου *SP6* είναι για τον ανθεκτικό πληθυσμό, w-CAL (0,578), ενώ για τους δύο ευαίσθητους πληθυσμούς είναι 0,413 για τον w-GR και 0,029 για τον LAB. Η διαφορά στην έκφραση

μεταξύ των πληθυσμών w-CAL και LAB είναι εμφανής, επιβεβαιώνοντας τα αποτελέσματα της ανάλυσης RNA-seq. Για το γονίδιο *SP6* όταν τα έντομα κατανάλωσαν νερό, παρατηρήθηκε το ίδιο αποτέλεσμα με εκείνο έπειτα από την κατανάλωση του spirin 1x με τη διαφορά ότι η έκφραση του γονιδίου στον πληθυσμό w-GR ήταν μικρότερη (0,209). Η έκφραση του ευαίσθητου εργαστηριακού πληθυσμού (LAB) ήταν 0,035 και του ανθεκτικού, φυσικού πληθυσμού w-CAL ήταν 0,609 επιβεβαιώνοντας τα αποτελέσματα του RNA-seq. Μελετώντας ξεχωριστά όλα τα χρονικά σημεία η έκφραση του γονιδίου *SP6* ήταν υψηλότερη για το φυσικό ανθεκτικό πληθυσμό w-CAL σε σύγκριση με τους ευαίσθητους πληθυσμούς. Κατά το χρονικό σημείο των 30min η διαφορά της έκφρασης του γενετικού τόπου είναι ιδιαίτερα υψηλή καθώς η σχετική έκφραση για τον πληθυσμό w-CAL είναι ~1,0 ενώ για τους πληθυσμούς LAB και wGR είναι σχεδόν μηδενική (Εικόνα 47).



Εικόνα 47: Σχετική έκφραση για το γονίδιο *Serine Protease 6* έπειτα από qRT-PCR σε κεφάλια από διαφορετικά άτομα δάκου (τρία αρσενικά και τρία θηλυκά άτομα) για τους πληθυσμούς LAB, w-GR και w-CAL έπειτα από κατάποση spirin 1x και νερού σε 6 διαφορετικά χρονικά σημεία: 0sec, 1min, 15min, 30min, 1hour και 2hours. Στο δεξί τμήμα της εικόνας παρουσιάζεται ο μέσος όρος της σχετικής έκφρασης της προηγούμενης ανάλυσης.

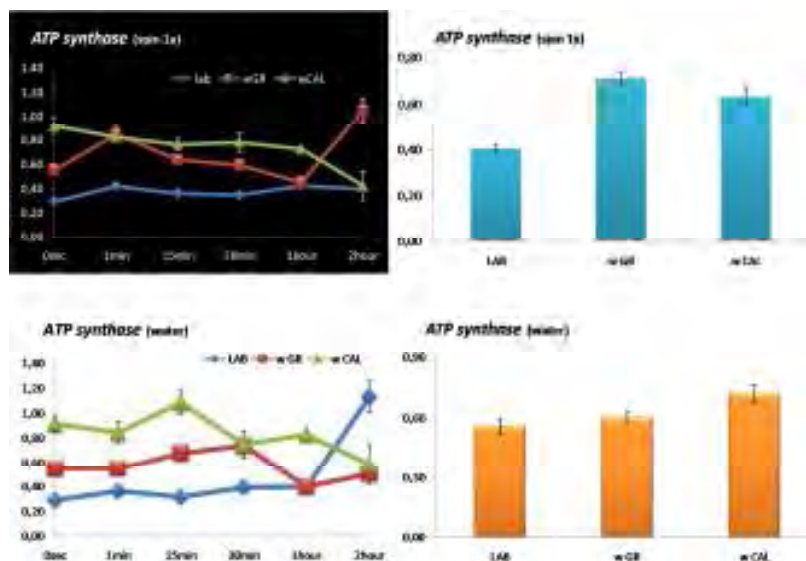
Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα αποτελέσματα από τη μελέτη του γενετικού τόπου *ATP synthase*

καθώς, έπειτα από την κατανάλωση του spirin 1x σχεδόν σε όλα τα χρονικά σημεία η έκφραση του ήταν

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

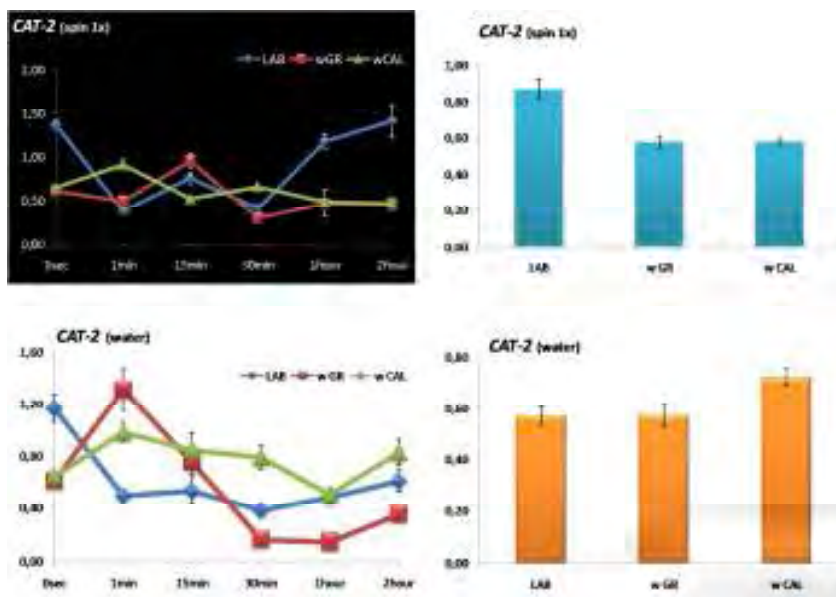
υψηλότερη για τον ανθεκτικό πληθυσμό (w-CAL) εκτός από τα χρονικά σημεία του 1min και 2hours όπου η υψηλότερη έκφραση παρατηρήθηκε στον πληθυσμό w-GR. Από τον υπολογισμό του μέσου όρου της σχετικής έκφρασης του γονιδίου *ATPsynthase* προέκυψε ότι η υψηλότερη έκφραση εντοπίζεται στον πληθυσμό w-GR (0,711) σε σύγκριση με τον πληθυσμό w-CAL (0,631). Ακριβώς τα αντίθετα αποτελέσματα προέκυψαν όταν στα έντομα χορηγήθηκε μόνο νερό καθώς η έκφραση του γονιδίου *ATPsynthase* για τον πληθυσμό w-CAL ήταν υψηλότερη σε όλα τα χρονικά σημεία, εκτός εκείνου των 2hours όπου η υψηλότερη έκφραση παρατηρείται για τον ευαίσθητο πληθυσμό LAB. Αντίστοιχα, από τον υπολογισμό του μέσου όρου της σχετικής έκφρασης του γονιδίου *ATPsynthase* παρατηρείται μια ομοιομορφία στα επίπεδα έκφρασης σε όλους τους πληθυσμούς με τιμές 0,058 για τον LAB, 0,603 για τον w-GR και 0,718 για τον w-CAL (Εικόνα 48). Όπως προκύπτει, από τη συγκεκριμένη πειραματική μελέτη παρατηρείται επιβεβαίωση και ταυτοποίηση των πρότερων αποτελεσμάτων τόσο του RNA-seq αλλά και της qRT-PCR.

Μικρές διαφορές παρατηρήθηκαν επίσης στους τρεις πληθυσμούς για τον γενετικό τόπο *CAT-2* έπειτα από την κατανάλωση του spin 1x, εκτός του πληθυσμού LAB όπου η έκφραση του ήταν υψηλότερη κατά τα σημεία 0sec, 1hour και 2hours συγκριτικά με τους πληθυσμούς w-GR και w-CAL. Ωστόσο, κατά την ανάλυση του μέσου όρου της έκφρασης, η έκφραση του γονιδίου *CAT-2* για τον πληθυσμό LAB ήταν 0,869, για τον w-GR 0,574 και για τον w-CAL 0,577. Όσον αφορά την περίπτωση που τα έντομα κατανάλωσαν νερό, η έκφραση του γονιδίου *CAT-2* σε όλα τα χρονικά στάδια ήταν μεγαλύτερη στον ανθεκτικό πληθυσμό w-CAL σε σχέση με τους πληθυσμούς LAB και w-GR εκτός από τα σημεία 0sec (υψηλότερη έκφραση είχε ο LAB) και 1min (υψηλότερη έκφραση είχε ο w-GR). Παρατηρώντας τη διαφορά στην έκφραση του γονιδίου κατά την ανάλυση των μέσων όρων, επιβεβαιώνονται τα αποτελέσματα του RNA-seq και της qRT-PCR διότι για τον πληθυσμό LAB η έκφραση ήταν 0,571, για τον w-GR ήταν 0,572 και για τον w-CAL ήταν 0,721 (Εικόνα 49).



Εικόνα 48: Σχετική έκφραση για το γονίδιο *ATPsynthase* έπειτα από qRT-PCR σε κεφάλια από διαφορετικά άτομα δάκου (τρία αρσενικά και τρία θηλυκά άτομα) για τους πληθυσμούς LAB, w-GR και w-CAL έπειτα από κατάποση spinosad 1x και νερού σε 6 διαφορετικά χρονικά σημεία: 0sec, 1min, 15min, 30min, 1hour και 2hours. Στο δεξί τμήμα της εικόνας παρουσιάζεται ο μέσος όρος της σχετικής έκφρασης της προηγούμενης ανάλυσης.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



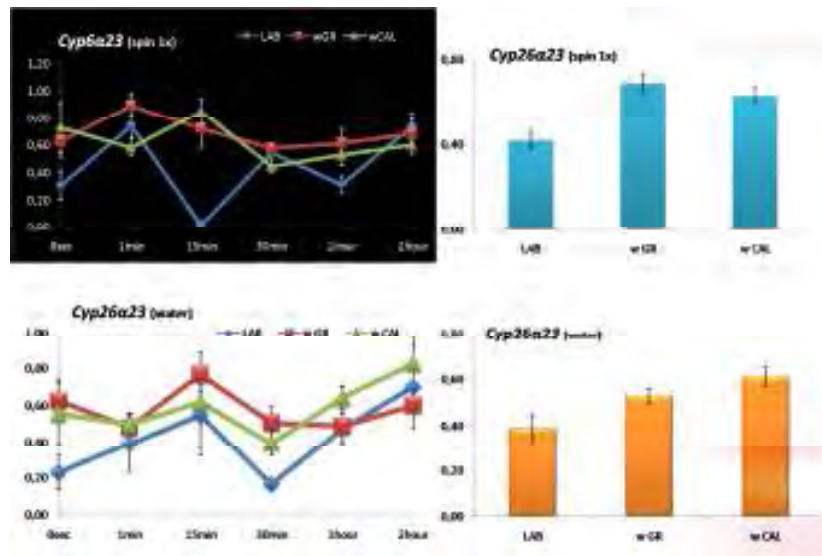
Εικόνα 49: Σχετική έκφραση για το γονίδιο *Low affinity cationic amino acid transporter 2 (CAT-2)* έπειτα από qRT-PCR σε κεφάλια από διαφορετικά άτομα δάκου (τρία αρσενικά και τρία θηλυκά άτομα) για τους πληθυσμούς LAB, w-GR και w-CAL έπειτα από κατάποση spinosad 1x και νερού σε 6 διαφορετικά χρονικά σημεία: 0sec, 1min, 15min, 30min, 1hour και 2hours. Στο δεξί τμήμα της εικόνας παρουσιάζεται ο μέσος όρος της σχετικής έκφρασης της προηγούμενης ανάλυσης.

Ο γενετικός τύπος *Cyrbα23* ανήκει στην οικογένεια των P450s μονοοξυγενασών και από τη μελέτη της ανθεκτικότητας στο spinosad σε χρονικά σημεία, παρατηρήθηκε ιδιαίτερα αυξημένη έκφραση του γονιδίου στον ευαίσθητο, φυσικό, πληθυσμό w-GR σε σύγκριση με τους LAB και w-CAL. Το τελικό αποτέλεσμα, από την ανάλυση του μέσου όρου έκφρασης του γονιδίου στους υπό εξέταση πληθυσμούς έπειτα από την κατανάλωση του spin 1x, αποδεικνύει τιμές έκφρασης 0,419 για τον πληθυσμό LAB, 0,689 για τον πληθυσμό w-GR και 0,633 για τον w-CAL. Στην συγκεκριμένη περίπτωση, τα αποτελέσματα του πειράματος δεν επιβεβαιώθηκαν με εκείνα του validation του RNA-seq. Ωστόσο, όταν στα έντομα χορηγήθηκε νερό, η έκφραση του γονιδίου στα χρονικά σημεία 1hour και 2hours ήταν υψηλότερη για τον πληθυσμό w-CAL επιβεβαιώνοντας τα αποτελέσματα του RNA-seq. Στα υπόλοιπα χρονικά σημεία η έκφραση του *Cyrbα23* ήταν υψηλότερη για τον πληθυσμό w-GR. Από την ανάλυση των μέσων όρων της έκφρασης του γονιδίου, ο πληθυσμός LAB είχε τιμή έκφρασης 0,389, ο w-GR 0,528 και ο w-CAL 0,611 που οδηγεί

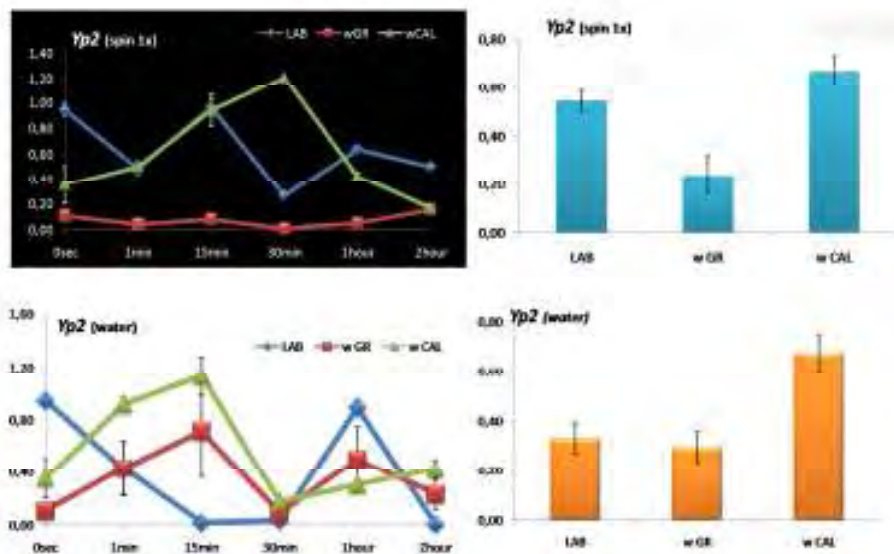
σε επιβεβαίωση με τα αποτελέσματα της RNA-seq ανάλυσης (Εικόνα 50).

Σε έντομα που χορηγήθηκε το spinosad 1x, το γονίδιο *Yolk protein 2 (Yp2)* είχε υψηλότερη έκφραση στον πληθυσμό w-CAL για το χρονικό σημείο 30 min σε σύγκριση με τους πληθυσμούς LAB και w-GR. Στα υπόλοιπα χρονικά σημεία, υψηλότερη έκφραση του γονιδίου παρατηρήθηκε για τον πληθυσμό LAB. Από την ανάλυση των μέσων όρων της έκφρασης του γονιδίου, ο πληθυσμός LAB είχε τιμή έκφρασης 0,544, ο w-GR 0,24 και ο w-CAL 0,671. Συνεπώς, τα δεδομένα της λειτουργικής ανάλυσης δεν ταυτοποιούνται με τα αποτελέσματα του RNA-seq. Στην περίπτωση που στα έντομα χορηγήθηκε νερό, η έκφραση του γονιδίου *Yolk protein 2 (Yp2)* ήταν υψηλότερη στον ανθεκτικό πληθυσμό w-CAL σε όλα τα χρονικά σημεία εκτός εκείνου της 1hour όπου η υψηλότερη έκφραση παρατηρήθηκε στον πληθυσμό LAB. Ωστόσο, στην ανάλυση των μέσων όρων, η έκφραση του γενετικού τύπου για τον πληθυσμό LAB ήταν 0,331, του w-GR 0,296 και του w-CAL 0,672 επιβεβαιώνοντας τα αποτελέσματα της λειτουργικής ανάλυσης και του RNA-seq (Εικόνα 51).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



Εικόνα 50: Σχετική έκφραση για το γονίδιο *Cyp26a23* έπειτα από qRT-PCR σε κεφάλια από διαφορετικά άτομα δάκου (τρία αρσενικά και τρία θηλυκά άτομα) για τους πληθυσμούς LAB, w-GR και w-CAL έπειτα από κατάποση *spinosad* 1x και νερού σε 6 διαφορετικά χρονικά σημεία: 0sec, 1min, 15min, 30min, 1hour και 2hours. Στο δεξί τμήμα της εικόνας παρουσιάζεται ο μέσος όρος της σχετικής έκφρασης της προηγούμενης ανάλυσης.



Εικόνα 51: Σχετική έκφραση για το γονίδιο *Yolk protein 2* έπειτα από qRT-PCR σε κεφάλια από διαφορετικά άτομα δάκου (τρία αρσενικά και τρία θηλυκά άτομα) για τους πληθυσμούς LAB, w-GR και w-CAL έπειτα από κατάποση *spinosad* 1x και νερού σε 6 διαφορετικά χρονικά σημεία: 0sec, 1min, 15min, 30min, 1hour και 2hours. Στο δεξί τμήμα της εικόνας παρουσιάζεται ο μέσος όρος της σχετικής έκφρασης της προηγούμενης ανάλυσης.

Τα αποτελέσματα της λειτουργικής ανάλυσης για *ATPsynthase*, *CAT-2*, *Cyp6a23* και *Yolk protein 2* τους γενετικούς τόπους *Serine protease 6 (SP6)*, (*Yp2*) έπειτα από χορήγηση νερού στα έντομα των

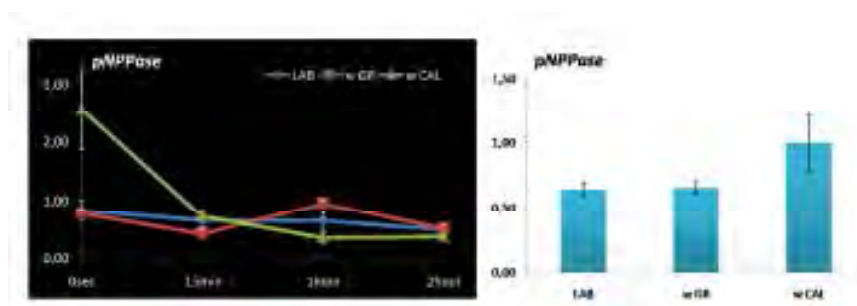
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

πληθυσμών ήταν ταυτόσημα με τα αποτελέσματα της ανάλυσης του RNA-seq. Για τη μελέτη των υπόλοιπων γονιδίων που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα στο spinosad εστιάσαμε στην ανάλυση τους όταν στα έντομα χορηγήθηκε μόνο το spinosad 1x για τα χρονικά σημεία 0sec, 15 min, 1hour και 2hours, με κίνητρο την σταθερότητα στις αρχικές απορίες και την αναζήτηση του τρόπου δράσης του εντομοκτόνου σε διάφορα χρονικά σημεία.

Η υψηλότερη έκφραση του γονιδίου *pNPPase* παρατηρήθηκε στον πληθυσμό w-CAL στα χρονικά σημεία 0sec και 15 min, ενώ στα χρονικά σημεία 1hour και 2hours η υψηλότερη έκφραση του γονιδίου παρατηρήθηκε για τον πληθυσμό w-GR. Από τη μελέτη των μέσων όρων της έκφρασης του γονιδίου για κάθε πληθυσμό ξεχωριστά, ο LAB είχε τιμή έκφρασης 0,643, ο w-GR 0,653 και ο w-CAL 0,995 (Εικόνα 52). Τα αποτελέσματα της λειτουργικής ανάλυσης για τον γενετικό τόπο *pNPPase* ταυτοποιούνται με τα αποτελέσματα της RNA-seq ανάλυσης.

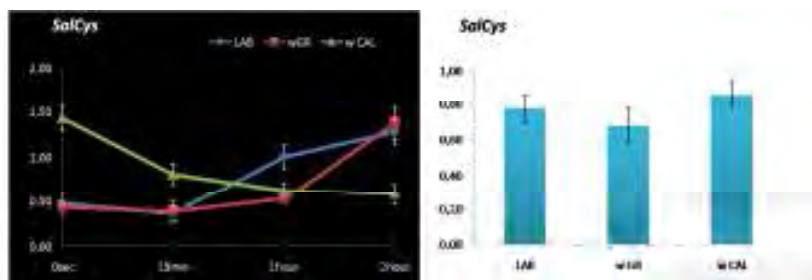
Το γονίδιο *SalCys* είχε υψηλότερη έκφραση στα σημεία 0sec και 15 min στον πληθυσμό w-CAL, ενώ στο χρονικό σημείο 1hour ο πληθυσμός LAB είχε την υψηλότερη έκφραση. Στο χρονικό σημείο 2 hours ο πληθυσμός w-GR είχε την υψηλότερη έκφραση του γονιδίου σε σύγκριση με τους άλλους δύο πληθυσμούς. Στην ανάλυση των μέσων όρων, ο LAB είχε τιμή έκφρασης 0,778, ο w-GR 0,679 και ο w-CAL 0,863 (Εικόνα 53). Συνεπώς, το γονίδιο *SalCys* υπερεκφράζεται στον ανθεκτικό πληθυσμό επιβεβαιώνοντας τα αποτελέσματα της αρχικής ανάλυσης μέσω RNA-seq.

Τέλος, όσον αφορά το γονίδιο *ant5*, η έκφραση του στον πληθυσμό w-GR ήταν υψηλότερη κατά τα χρονικά σημεία 15 min και 1hour, ενώ για τα χρονικά σημεία των 0sec και 2hours η υψηλότερη έκφραση του συγκεκριμένου γενετικού τόπου παρατηρήθηκε στον πληθυσμό w-GR. Η ανάλυση των μέσων όρων της έκφρασης του *ant5* έδειξε για τον πληθυσμό LAB τιμή έκφρασης 0,085, για τον w-GR 0,749 και για τον w-CAL 0,606 (Εικόνα 54). Τα αποτελέσματα δεν ταυτίζονται με εκείνα της ανάλυσης RNA-seq.

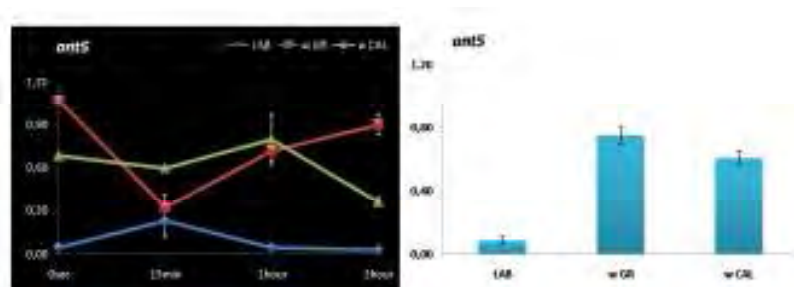


Εικόνα 52: Σχετική έκφραση για το γονίδιο *pNPPase* έπειτα από qRT-PCR σε κεφάλια από διαφορετικά άτομα δάκου (τρία αρσενικά και τρία θηλυκά άτομα) για τους πληθυσμούς LAB, w-GR και w-CAL έπειτα από κατάποση spinosad 1x σε 4 διαφορετικά χρονικά σημεία: 0sec, 15min, 1hour και 2hours. Στο δεξί τμήμα της εικόνας παρουσιάζεται ο μέσος όρος της σχετικής έκφρασης της προηγούμενης ανάλυσης.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



Εικόνα 53: Σχετική έκφραση για το γονίδιο *SalCys* έπειτα από qRT-PCR σε κεφάλια από διαφορετικά άτομα δάκου (τρία αρσενικά και τρία θηλυκά άτομα) για τους πληθυσμούς LAB, w-GR και w-CAL έπειτα από κατάποση spinosad 1x σε 4διαφορετικά χρονικά σημεία: 0sec, 15min, 1hour και 2hours. Στο δεξί τμήμα της εικόνας παρουσιάζεται ο μέσος όρος της σχετικής έκφρασης της προηγούμενης ανάλυσης.



Εικόνα 54: Σχετική έκφραση για το γονίδιο *ant5* έπειτα από qRT-PCR σε κεφάλια από διαφορετικά άτομα δάκου (τρία αρσενικά και τρία θηλυκά άτομα) για τους πληθυσμούς LAB, w-GR και w-CAL έπειτα από κατάποση spinosad 1x σε 4διαφορετικά χρονικά σημεία: 0sec, 15min, 1hour και 2hours. Στο δεξί τμήμα της εικόνας παρουσιάζεται ο μέσος όρος της σχετικής έκφρασης της προηγούμενης ανάλυσης.

Στη συνέχεια μελετήθηκαν και τα γονίδια με υποέκφραση στο ανθεκτικό στο spinosad στέλεχος εντόμων (SPIN) όπως προέκυψαν κατά την ανάλυση του RNA-seq. Τα γονίδια *Hsp70* και *Hsp23* είχαν υψηλότερη έκφραση στον πληθυσμό LAB σε όλα τα χρονικά σημεία εκτός του 1hour όπου η υψηλότερη έκφραση παρατηρήθηκε για τον πληθυσμό w-GR. Σε όλα τα χρονικά σημεία, η έκφραση των γονιδίων για τον ανθεκτικό πληθυσμό w-GR ήταν σχεδόν μηδενική και χαμηλότερη των δύο ευαίσθητων πληθυσμών. Παράλληλα, και από την ανάλυση των μέσων όρων της έκφρασης των γονιδίων για τους πληθυσμούς LAB, w-GR και w-CAL επιβεβαιώνονται τα αποτελέσματα της ανάλυσης RNA-seq. Πιο συγκεκριμένα, η έκφραση του *Hsp70* για τον πληθυσμό LAB ήταν 0,651, για τον w-GR 0,314 και για τον w-CAL 0,033. Αντίστοιχα, για το γονίδιο

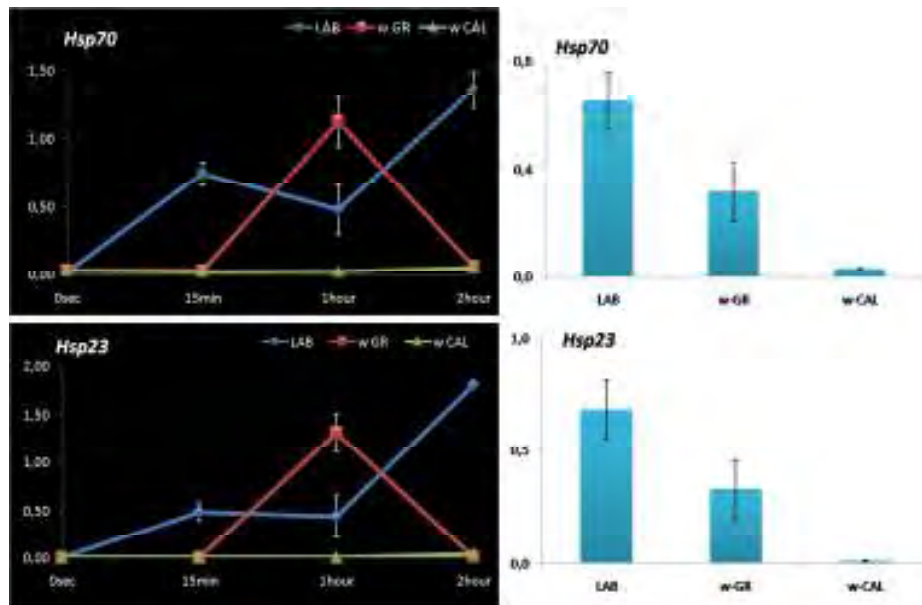
Hsp23 για τον πληθυσμό LAB ήταν 0,682, για τον w-GR 0,329 και για τον w-CAL 0,009 (Εικόνα 55).

Η ανάλυση για το γονίδιο *Lsp1* επιβεβαιώνει τα αποτελέσματα της ανάλυσης RNA-seq καθώς σε όλα τα χρονικά σημεία η έκφραση του γονιδίου ήταν υψηλότερη για τον πληθυσμό LAB σε σύγκριση με τους πληθυσμούς w-GR και w-CAL. Στην ανάλυση των μέσων όρων της έκφρασης του γονιδίου *Lsp1* σε κάθε πληθυσμό ξεχωριστά, ο πληθυσμός LAB είχε τιμή έκφρασης 0,233, ο w-GR 0,104 και ο w-CAL 0,012. Ομοίως, η έκφραση του γονιδίου *HexL1* ήταν υψηλότερη στον πληθυσμό LAB σε όλα τα χρονικά σημεία σε σύγκριση με τους άλλους δύο πληθυσμούς. Η τιμή έκφρασης του γονιδίου στον πληθυσμό LAB ήταν 1,069, στον w-GR 0,782 και στον w-CAL 0,305 κατά τη μελέτη του μέσου όρου της έκφρασης του *HexL1* (Εικόνα 56). Μελετώντας το γονίδιο *cht5*, η

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

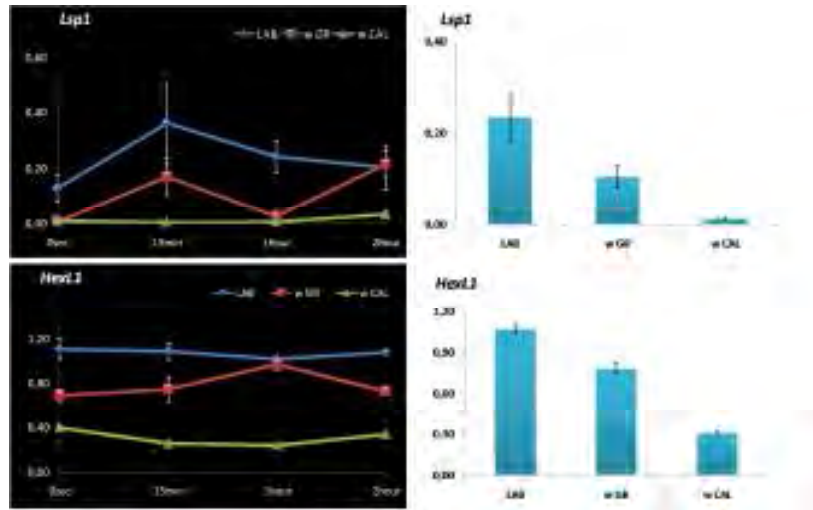
υψηλότερη έκφραση παρατηρήθηκε στον πληθυσμό w-GR σε όλα τα χρονικά σημεία. Αναλύοντας τους μέσους όρους της έκφρασης του γονιδίου για κάθε πληθυσμό ξεχωριστά, ο πληθυσμός LAB είχε τιμή έκφρασης 0,374, ο w-GR 0,632 και ο w-CAL 0,089 (Εικόνα 57). Τα αποτελέσματα ταυτίζονται και επιβεβαιώνουν τα αποτελέσματα της RNA-seq ανάλυσης. Τα γονίδια *oxidase*, *mmr1* και *cdc* δεν επιβεβαίωσαν τα αποτελέσματα της RNA-seq ανάλυσης καθώς η έκφραση τους ήταν υψηλότερη στον πληθυσμό w-CAL σε όλα τα χρονικά σημεία.

Συγκεκριμένα, για το γονίδιο *oxidase*, η έκφραση του για τον LAB, ήταν 0.848, για τον w-GR 0,655 και για τον w-CAL 0,965. Για το γονίδιο *mmr1*, η έκφραση του στον πληθυσμό LAB ήταν 0,574, στον w-GR 0,582 και στον w-CAL 1,281. Τέλος, η έκφραση του γονιδίου *cdc* για τον πληθυσμό LAB ήταν 0,001, για τον w-GR 0,862 και για τον w-CAL 1,082 (Εικόνα 58).

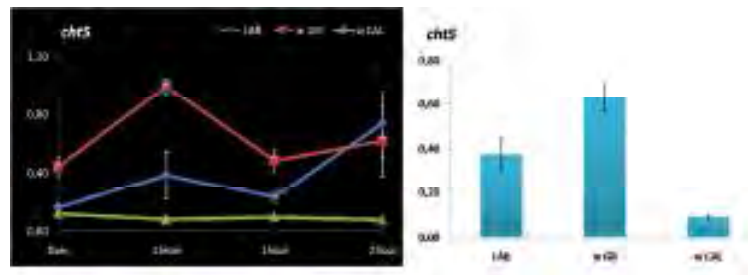


Εικόνα 55: Σχετική έκφραση για τα γονίδια *Hsp70* και *Hsp23* έπειτα από qRT-PCR σε κεφάλια από διαφορετικά άτομα δάκου (τρία αρσενικά και τρία θηλυκά άτομα) για τους πληθυσμούς LAB, w-GR και w-CAL έπειτα από κατάποση *sriposad* 1x σε 4 διαφορετικά χρονικά σημεία: 0sec, 15min, 1hour και 2hours. Στο δεξί τμήμα της εικόνας παρουσιάζεται ο μέσος όρος της σχετικής έκφρασης της προηγούμενης ανάλυσης.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

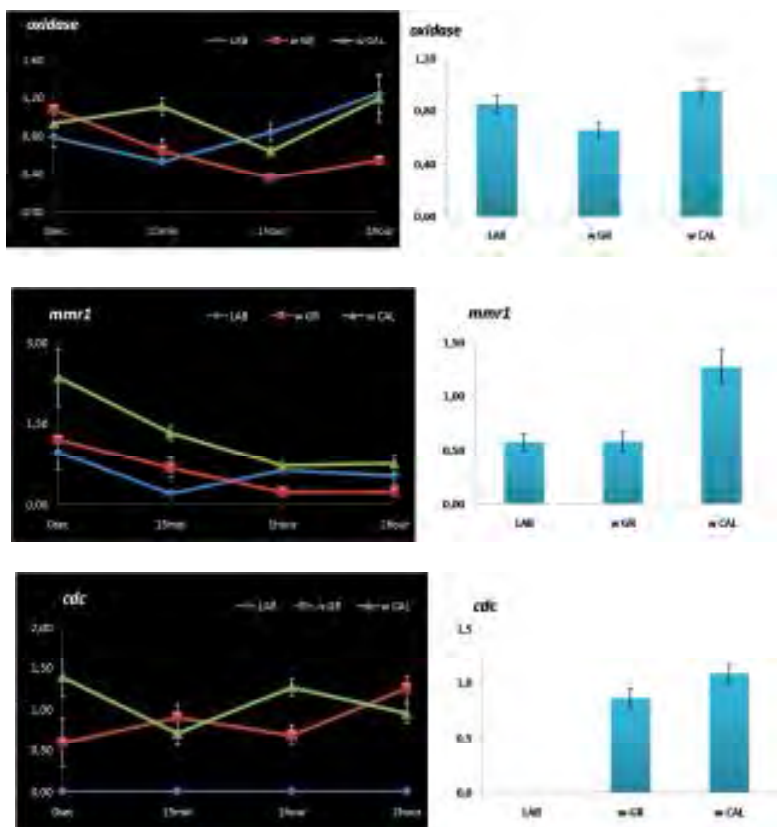


Εικόνα 56: Σχετική έκφραση για τα γονίδια *Lsp1* και *Hex11* έπειτα από qRT-PCR σε κεφάλια από διαφορετικά άτομα δάκου (τρία αρσενικά και τρία θηλυκά άτομα) για τους πληθυσμούς LAB, w-GR και w-CAL έπειτα από κατάποση spinosad 1x σε 4διαφορετικά χρονικά σημεία: 0sec, 15min, 1hour και 2hours. Στο δεξί τμήμα της εικόνας παρουσιάζεται ο μέσος όρος της σχετικής έκφρασης της προηγούμενης ανάλυσης.



Εικόνα 57: Σχετική έκφραση για το γονίδιο *cht5* έπειτα από qRT-PCR σε κεφάλια από διαφορετικά άτομα δάκου (τρία αρσενικά και τρία θηλυκά άτομα) για τους πληθυσμούς LAB, w-GR και w-CAL έπειτα από κατάποση spinosad 1x σε 4διαφορετικά χρονικά σημεία: 0sec, 15min, 1hour και 2hours. Στο δεξί τμήμα της εικόνας παρουσιάζεται ο μέσος όρος της σχετικής έκφρασης της προηγούμενης ανάλυσης.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



Εικόνα 58: Σχετική έκφραση για τα γονίδια *oxidase*, *mmr1* και *cdc* έπειτα από qRT-PCR σε κεφάλια από διαφορετικά άτομα δάκου (τρία αρσενικά και τρία θηλυκά άτομα) για τους πληθυσμούς LAB, w-GR και w-CAL έπειτα από κατάποση spinosad 1x σε 4διαφορετικά χρονικά σημεία: 0sec, 15min, 1hour και 2hours. Στο δεξί τμήμα της εικόνας παρουσιάζεται ο μέσος όρος της σχετικής έκφρασης της προηγούμενης ανάλυσης.

A.3 Επιλογή του κατάλληλου γονιδίου αναφοράς (Housekeeping genes)

Για την επιλογή του ή των κατάλληλων γονιδίων αναφοράς ώστε να γίνει ορθήκανονικοποίηση στα αποτελέσματα της PCR πραγματικού χρόνου, συνολικά μελετήθηκαν εννέα γονίδια αναφοράς γνωστά από τη βιβλιογραφία σύμφωνα με παρόμοιες μελέτες σε άλλους οργανισμούς. Τα γονίδια εξετάστηκαν σε πλήθος ιστών του εντόμου *B. oleae* με σκοπό τον προσδιορισμό του καταλληλότερου γονιδίου αναφοράς για την qRT-PCR. Οι δεκατρείς ιστοί για τους οποίους εξετάστηκε η έκφραση των γονιδίων αναφοράς είναι κεφάλι, θώρακας, κοιλία, αυγό, προνύμφη, νύμφη, κεραία, σιαγόνες, ωσθήτης, ωσθήκες, όρχεις, MAGs και FAGs (Πίνακας 10). Η έκφραση ενός γονιδίου αναφοράς συνήθως διαφέρει ανάμεσα στους διαφορετικούς οργανισμούς. Για το

σκοπό αυτό, χρειάστηκε μια ενδεδειγμένη μελέτη για την ταυτοποίηση των γονιδίων αναφοράς στο δάκο της ελιάς και στον εκάστοτε εξεταζόμενο ιστό. Τα γονίδια που εξετάστηκαν είναι: *actin3*, *ubx*, *tbp*, *RPE*, *RPL19*, *α -TUB*, *β -TUB*, *14-3-3zeta* και *GAPDH*. Αρχικά, απομονώθηκε το RNA από τους δεκατρείς ιστούς, ακολούθησε σύνθεση του cDNA και τέλος qRT-PCR. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε μέσω των αλγορίθμων geNorm, NormFinder, refFinder και BestKeeper.

Σύμφωνα με το πρόγραμμα geNorm, χρησιμοποιούνται δυο παράμετροι για την εύρεση του κατάλληλου γονιδίου αναφοράς, ο παράγοντας M και ο παράγοντας V. Ο παράγοντας M είναι εκείνος που καθορίζει τη σειρά κατάταξης των υποψηφίων γονιδίων αναφοράς από το λιγότερο σταθερό έως το πιο σταθερό γονίδιο. Όσο μικρότερη είναι η τιμή του

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

M, τόσο πιο σταθερο είναι το γονίδιο αναφοράς (Vandesompele et al., 2002). Αντίστοιχα, ο παράγοντας V καθορίζει τον κατάλληλο αριθμό των γονιδίων αναφοράς που πρέπει να χρησιμοποιηθούν για την κανονικοποίηση. Για τον παράγοντα V οριοθετείται η τιμή 0,15 (cut-off value) όπου στην περίπτωση που οι τιμές των υποψηφίων γονιδίων αναφοράς είναι μικρότερες, δεν συνίσταται η χρήση επιπλέον γονιδίου για την ορθή κανονικοποίηση. Για παράδειγμα, αν η τιμή του V2/3 είναι 0,22 ο παράγοντας κανονικοποίησης προτείνει να περιέχονται 3 γονίδια αναφοράς. Στην περίπτωση της ανάλυσης που η τιμή του V3/4 είναι 0,14 δεν χρειάζεται να χρησιμοποιηθεί και τέταρτο γονίδιο αναφοράς για την ορθή κανονικοποίηση.

Σύμφωνα με την ανάλυση του προγράμματος geNorm, για την ορθή κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων της qRT-PCR στα αναπτυξιακά στάδια του δάκου και πιο συγκεκριμένα για το αυγό, ο ιδανικός αριθμός γονιδίων αναφοράς είναι 4 ($V4/5=0.136$). Τα γονίδια αυτά είναι τα *ubx* ($M=0,508$), *14-3-3zeta* ($M=0,556$), *tbp* ($M=0,601$) και *RPE* ($M=0,658$). Για το στάδιο της προνύμφης, ιδανικά πρέπει να χρησιμοποιηθούν 2 γονίδια αναφοράς ($V2/3=0,149$), τα *RPE* ($M=0,451$) και *14-3-3zeta*. Τέλος, για το στάδιο της νύμφης δύο γονίδια αναφοράς χρειάζονται να χρησιμοποιηθούν για τη σωστή κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων της qRT-PCR ($V2/3=0,149$), τα γονίδια *RPE* ($M=0,508$) και *ubx* ($M=0,508$) (Εικόνα 59).

Πίνακας 10: Οι δεκατρείς εξεταζόμενοι ιστοί του εντόμου *B. oleae*

Ανάλυση	Ιστόι	Ποσότητα
Στάδια ανάπτυξης	Αυγό	10 άτομα
	Προνύμφη	10 άτομα
	Νύμφη	10 άτομα
Ιστοί σώματος	Κεφάλι	10 άτομα
	Θώρακας	10 άτομα
	Κοιλιά	10 άτομα
Αναπαραγωγικό σύστημα	MAGS	10 άτομα (1 ζεύγος MAGs/μύγα)
	Όρχεις	10 άτομα (1 ζεύγος όρχεων/μύγα)
	FAGS	10 άτομα (1 ζεύγος FAGs/μύγα)
	Ωοθήκη	10 άτομα (1 ζεύγος ωοθηκών/μύγα)
Οσφρητικό σύστημα	Σιαγόνες	8 ομάδες (4 μύγες/ομάδα)
	Κεραία	8 ομάδες (4 μύγες/ομάδα)
Αναπαραγωγικό σύστημα	Ωοθέτης	8 ομάδες (4 μύγες/ομάδα)

Ο προσδιορισμός του κατάλληλου γονιδίου αναφοράς στα όργανα αναπαραγωγής του δάκου ήταν από τα σημαντικότερα κομμάτια του συγκεκριμένου πειράματος, καθώς η λειτουργική ανάλυση που ακολούθησε την RNA-seq ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τους ιστούς όρχεις στα αρσενικά και FAGs (σπερματοθήκες και βοηθητικοί αδένες) στα θηλυκά έντομα. Συγκεκριμένα, τα αποτελέσματα από την ανάλυση του αλγορίθμου geNorm για τον ιστό των MAGs του δάκου έδειξαν

ότι ο ιδανικός αριθμός γονιδίων αναφοράς είναι τρία ($V3/4= 0,366$), τα γονίδια *tbp* ($M=0,989$), *ubx* ($M=0,995$) και *RPE* ($M=1,047$). Για τους όρχεις, συνίσταται η χρήση επίσης τριών γονιδίων αναφοράς ($V3/4=0,157$), των *14-3-3zeta* ($M=0,534$), *RPL19* ($M=0,538$) και *α -TUB* ($M=0,584$). Μελετώντας τον ιστό των ωοθηκών, ο ιδανικός αριθμός γονιδίων αναφοράς που πρέπει να χρησιμοποιηθούν για την σωστή κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων της qRT-PCR είναι δύο ($V2/3=0,122$), τα οποία είναι τα

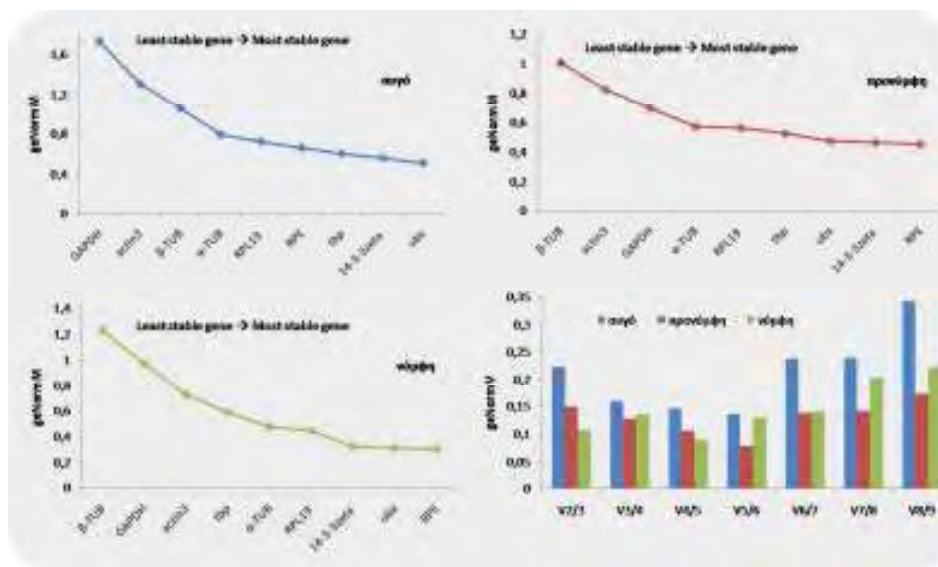
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

GAPDH (M=0,285) και *RPE* (M=0,281). Τέλος, για τα FAGs προσδιορίστηκε ιδανικά η χρήση πέντε γονιδίων αναφοράς λαμβάνοντας υπόψη την τιμή του $M \leq 1,5$ εφόσον οι μικρότερες τιμές του V προσδιορίστηκαν στα V5/6 και V6/7. Τα γονίδια είναι τα *14-3-3zeta* (M=0,989), *RPL19* (M=0,805), *α -TUB* (M=0,910), *GAPDH* (M=1,196) και *actin3* (M=1,396) (Εικόνα 60).

Στη συνέχεια μελετήθηκαν το κεφάλι, ο θώρακας και η κοιλιά του δάκου ως προς τον αριθμό των γονιδίων για την ιδανική κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων της qRT-PCR. Συγκεκριμένα, για το κεφάλι σε μία αντίδραση qRT-PCR, τα κατάλληλα γονίδια αναφοράς είναι δύο ($V2/3=0,108$) το *14-3-3zeta* (M=0,278) και το *GAPDH* (M=0,30). Για τον ιστό του θώρακα στο δάκο προσδιορίστηκε η χρήση τριών γονιδίων αναφοράς ($V3/4=0,17$), τα *Rpl19* (M=0,429), *14-3-3zeta* (M=0,455) και *ubx* (M=0,484). Ενώ στον ιστό της κοιλιάς του εντόμου, ιδανικά πρέπει να χρησιμοποιηθούν τρία γονίδια αναφοράς για την ορθή κανονικοποίηση της qRT-PCR ($V3/4=0,154$), τα *α -TUB* (M=0,646), *14-3-3zeta* (M=0,66) και *GAPDH* (M=0,671) (Εικόνα 61).

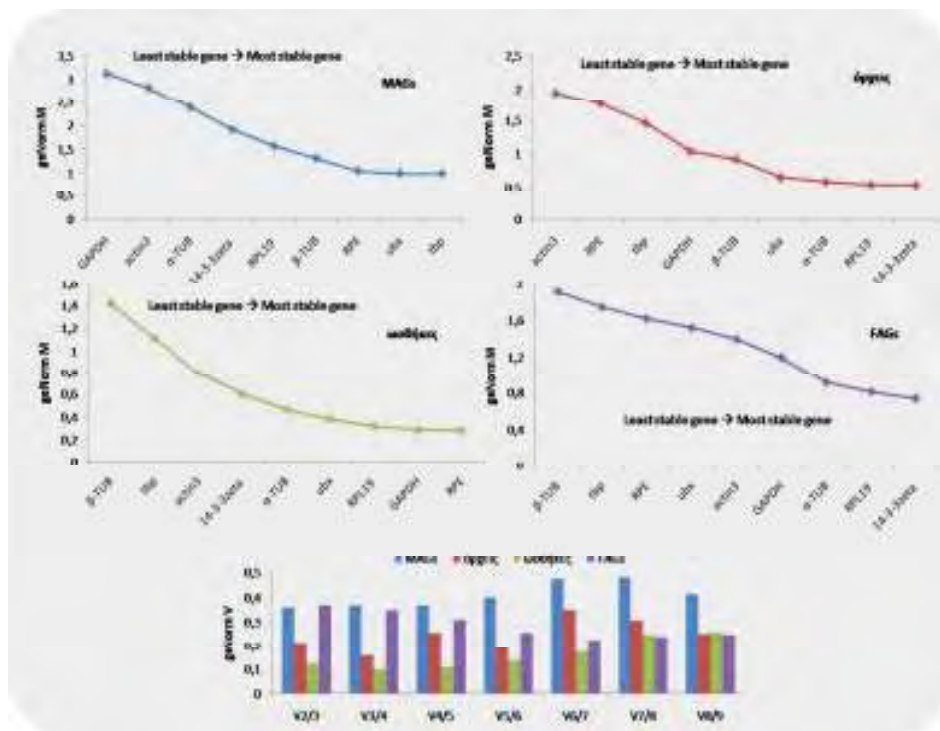
Τέλος, μελετήθηκαν οι ιστοί του οσφρητικού συστήματος κεραία και σιαγόνες, αλλά και ο ωothής

για τον δάκο ώστε να γίνει προσδιορισμός των κατάλληλων γονιδίων αναφοράς που απαιτούνται για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων στη qRT-PCR. Για τον ιστό της κεραίας του δάκου σύμφωνα με την ανάλυση του geNorm πρέπει να χρησιμοποιηθούν τα γονίδια *actin3* (M=0,898) και *RPL19* (M=0,927) καθώς η χαμηλότερη τιμή του V προσδιορίστηκε για το $V2/3=0,309$. Για τους σιαγόνες του εντόμου (maxillary palps), ο ιδανικός αριθμός των χρησιμοποιούμενων γονιδίων αναφοράς είναι τέσσερα ($V4/5=0,155$), τα οποία είναι τα: *β -TUB* (M=0,534), *RPL19* (M=0,547), *ubx* (M=0,589) και *GAPDH* (M=0,765). Τέλος, ο προσδιορισμός του αριθμού των κατάλληλων γονιδίων για τον ωothή του δάκου προέκυψε λαμβάνοντας υπόψη ότι η χαμηλότερη τιμή V βρέθηκε να είναι για το ζεύγος διακύμανσης $V7/8=0,375$, που θα σήμαινε ότι συνιστάται η χρήση επτά γονιδίων αναφοράς. Ωστόσο, σημαντική παράμετρος στο αποτέλεσμα αποτελεί ότι η τιμή M πρέπει να είναι μικρότερη από 1,50. Συνεπώς, λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω για τον ωothή του δάκου, προσδιορίστηκε η χρήση των γονιδίων *GAPDH* (M=1,019), *β -TUB* (M=1,088) και *RPL19* (M=1,201) ως γονίδια αναφοράς για τη qRT-PCR (Εικόνα 62).

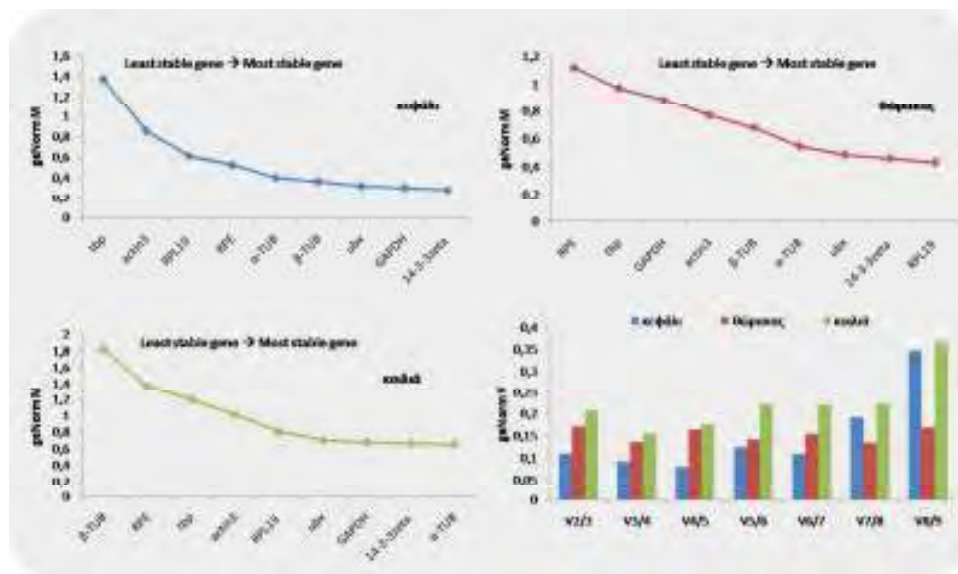


Εικόνα 59: Σχηματική αποτύπωση των αποτελεσμάτων τους αλγόριθμου geNorm για τα αναπτυξιακά στάδια του δάκου (αυγό, προνύμφη και νύμφη).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

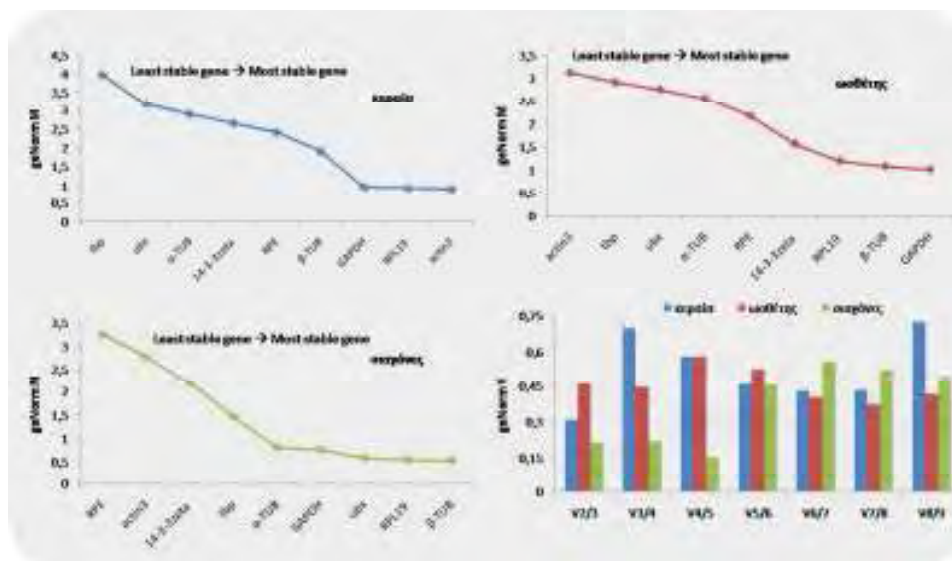


Εικόνα 60: Σχηματική αποτύπωση των αποτελεσμάτων τους αλγόριθμου geNorm για το αναπαραγωγικό σύστημα του δάκου (όρχεις, ωοθήκες, MAGs και FAGs).



Εικόνα 61: Σχηματική αποτύπωση των αποτελεσμάτων τους αλγόριθμου geNorm για τους ιστούς του σώματος του δάκου (κεφάλι, θώρακας και κοιλιά).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



Εικόνα 62: Σχηματική αποτύπωση των αποτελεσμάτων τους αλγόριθμου geNorm για το οσφρητικό σύστημα του δάκου (κεραία, σιαγόνες) αλλά και τον ωοθέτη του αναπαραγωγικού συστήματος.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε επεξεργασία των αποτελεσμάτων για τους δεκατρείς ιστούς με τους αλγόριθμους NormFinder, refFinder και Bestkeeper για τον προσδιορισμό του κατάλληλου γονιδίου αναφοράς. Σύμφωνα με το πρόγραμμα NormFinder δύναται να γίνει ο προσδιορισμός του κατάλληλου γονιδίου αναφοράς όπως επίσης και του καλύτερου συνδυασμού των γονιδίων. Το λογισμικό του κατατάσσει το σύνολο των υποψηφίων γονιδίων αναφοράς σύμφωνα με τη σταθερότητα της έκφρασης τους στα δεδομένα του κάθε πειράματος. Ο προσδιορισμός αυτός είναι εφικτός μέσω της παραμέτρου stability value, όπου όσο μικρότερη η τιμή της, τόσο πιο σταθερό είναι το γονίδιο αναφοράς. Αντίστοιχα, το πρόγραμμα Bestkeeper μπορεί να επεξεργαστεί τα δεδομένα από τα υποψήφια γονίδια αναφοράς που εισάγονται με τη μορφή των Cq, και τα κατατάσσει σύμφωνα με τις τιμές Standard Deviation (SD) και Coefficient of Variation (CV). Το πιο κατάλληλο γονίδιο αναφοράς είναι εκείνο που έχει τις μικρότερες τιμές SD και CV (Pfaffl et al., 2004). Τέλος, το διαδικτυακό πρόγραμμα refFinder κατατάσσει όλα τα πιθανά γονίδια αναφοράς σύμφωνα με τη σταθερότητα της έκφρασης των γονιδίων βασισόμενο στην κατάταξη των προγραμμάτων geNorm, Normfinder, BestKeeper και

τα συγκριτικά προγράμματα της μεθόδου delta-delta Ct. Επίσης, το πρόγραμμα αυτό αποδίδει ένα κατάλληλο weight για κάθε γονίδιο και υπολογίζει το γεωμετρικό μέσο όρο των weights τους για τη συνολική τελική κατάταξη (Yuan et al., 2014). Όσο μικρότερη είναι η τιμή του γεωμετρικού μέσου, τόσο πιο σταθερό θεωρείται το γονίδιο αναφοράς.

Στις περισσότερες περιπτώσεις υπήρξε ομολογία των αποτελεσμάτων στους τέσσερις διαφορετικούς αλγόριθμους, ωστόσο όμως σε κάποιους ιστούς τα προτεινόμενα γονίδια είχαν σημαντική απόκλιση. Ο βασικός λόγος των διαφορών αυτών είναι η χρήση διαφορετικών στρατηγικών που κατά συνέπεια μπορεί να οδηγήσει σε διαφορετικά αποτελέσματα (Mallona, 2010; Mafra, 2012). Το διαδικτυακό πρόγραμμα refFinder σχεδόν σε όλους τους εξεταζόμενους ιστούς είχε τελείως διαφορετικά αποτελέσματα συγκριτικά με τα υπόλοιπα τρία προγράμματα. Σε συνδυασμό με την ομοιότητα των εξερχόμενων αποτελεσμάτων (σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις προτείνονται συγκεκριμένα γονίδια ως τα κατάλληλα γονίδια αναφοράς), το πρόγραμμα refFinder κατατάσσεται στην τελευταία θέση επιλογής μας για την παρούσα μελέτη της δεδομένης πειραματικής ενότητας ως το λιγότερο αξιόπιστο. Ωστόσο, τα αποτελέσματά του

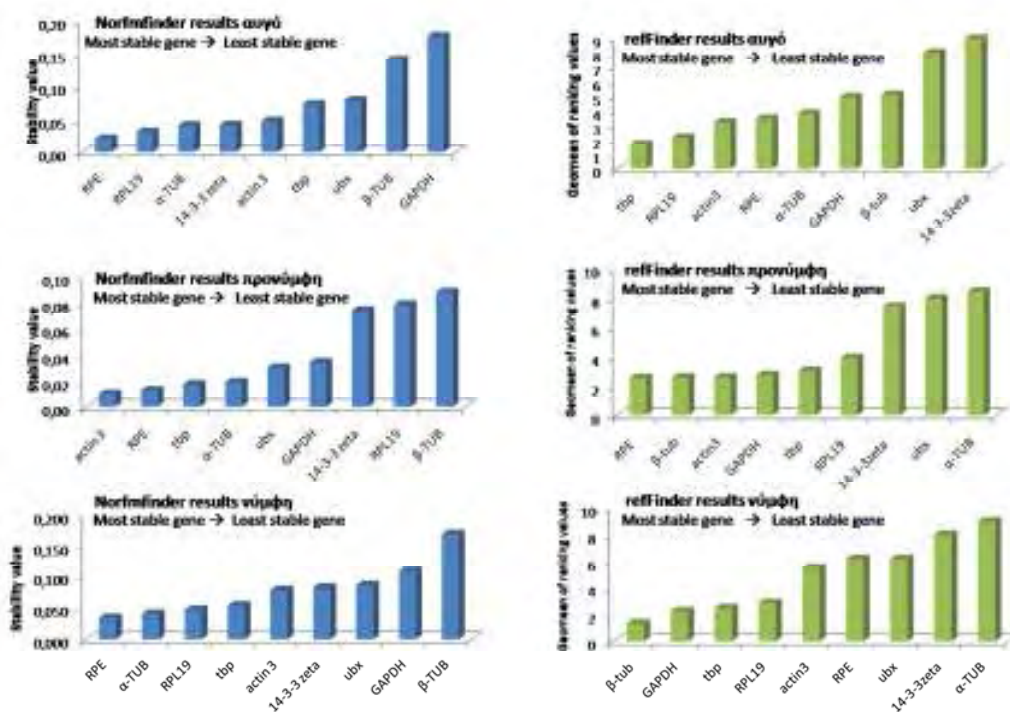
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

παρατίθενται παρακάτω μαζί με εκείνα των υπόλοιπων αλγορίθμων.

Αναλυτικά, για τα αναπτυξιακά στάδια του δάκου και συγκεκριμένα για το αυγό, τα γονίδια που προέκυψαν από την επεξεργασία των τριών αλγορίθμων είναι τα *RPE* και *Rpl19* (Normfinder), *RPE* (Bestkeeper) και το *tbp* (ReffFinder), αντίστοιχα. Για το στάδιο της προνύμφης, τα κατάλληλα γονίδια αναφοράς είναι τα *RPE* και *actin3* (Normfinder) και το *RPE* (Bestkeeper και ReffFinder). Τέλος, για την νύμφη του δάκου τα προτεινόμενα γονίδια αναφοράς είναι τα *RPE* και α -*TUB* (Normfinder) και το α -*TUB* (Bestkeeper) και το β -*TUB* (ReffFinder) (Εικόνα 63, Πίνακας 11).

Αναλύοντας τους ιστούς από τα όργανα αναπαραγωγής του εντόμου, οι τρεις αλγόριθμοι

έδωσαν τα παρακάτω αποτελέσματα. Για τους όρχεις, τα πλέον σταθερά γονίδια αναφοράς σύμφωνα με το Normfinder είναι τα *RPL19* και *14-3-3zeta*, το *tbp* (refFinder) και το *14-3-3zeta* (Bestkeeper). Όσον αφορά τα MAGs, τα κατάλληλα γονίδια αναφοράς είναι τα *RPL19* και *14-3-3zeta* (Normfinder), το *ubx* (refFinder) και το *RPL19* (Bestkeeper). Σχετικά με τον ιστό των ωοθηκών, οι τρεις διαφορετικοί αλγόριθμοι είχαν ως αποτέλεσμα τα κατάλληλα γονίδια αναφοράς να είναι τα *tbp* και *RPL19* (Normfinder), *GAPDH* (ReffFinder) και *tbp* (Bestkeeper). Τέλος, για τα FAGs, προέκυψε ότι τα πιο σταθερά γονίδια αναφοράς είναι τα α -*TUB* και *actin3* (Normfinder), το *tbp* (ReffFinder) και το γονίδιο α -*TUB* (Bestkeeper) (Εικόνα 64, Πίνακας 12).

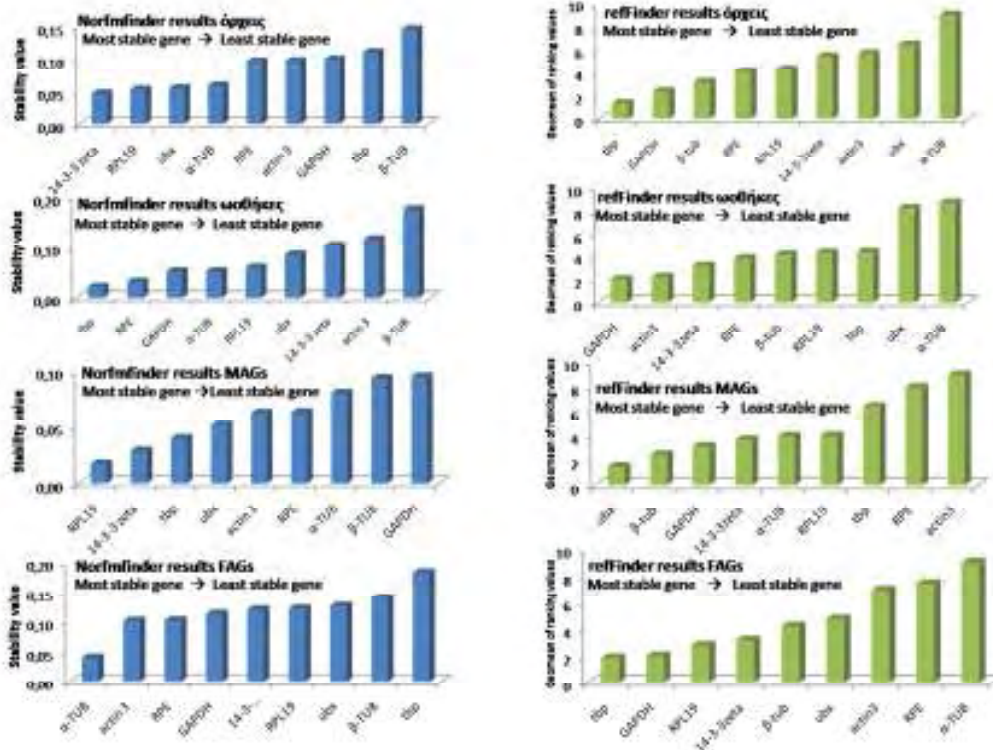


Εικόνα 63: Σχηματική αποτύπωση των αποτελεσμάτων από τους αλγορίθμους NormFinder και reffFinder για τα αναπτυξιακά στάδια του δάκου (αυγό, προνύμφη και νύμφη).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Πίνακας 11: Αποτελέσματα από την ανάλυση μέσω του προγράμματος Bestkeeper για τους ιστούς αυγό, προνύμφη και νύμφη των αναπτυξιακών σταδίων του εντόμου *Bactrocera oleae*.

Αποτελέσματα Bestkeeper αναπτυξιακών σταδίων						
Γονίδιο	αυγό		Προνύμφη		Νύμφη	
	SD	CV	SD	CV	SD	CV
<i>14-3-3 zeta</i>	0,8	3,04	2,15	9,47	0,87	4,07
<i>Ubx</i>	0,63	2,15	1,39	5,23	0,96	3,73
<i>Tbp</i>	0,65	2,34	1,04	4,09	0,94	3,55
<i>β-TUB</i>	1,24	3,62	2,83	9,01	1,19	4,13
<i>GAPDH</i>	3,04	10,88	1,94	9,35	1,93	3,8
<i>actin 3</i>	1,13	3,19	1,24	6,09	1,17	4,94
<i>RPE</i>	0,56	2,4	1,04	4	0,55	2,6
<i>RPL19</i>	0,85	3,86	1,84	8,98	0,6	2,96
<i>α-TUB</i>	0,81	3,02	1,79	8,19	0,12	0,55



Εικόνα 64: Σχηματική αποτύπωση των αποτελεσμάτων από τους αλγόριθμους NormFinder και refFinder για το αναπαραγωγικό σύστημα του δάκου (όρχεις, ωοθήκες, MAGs και FAGs).

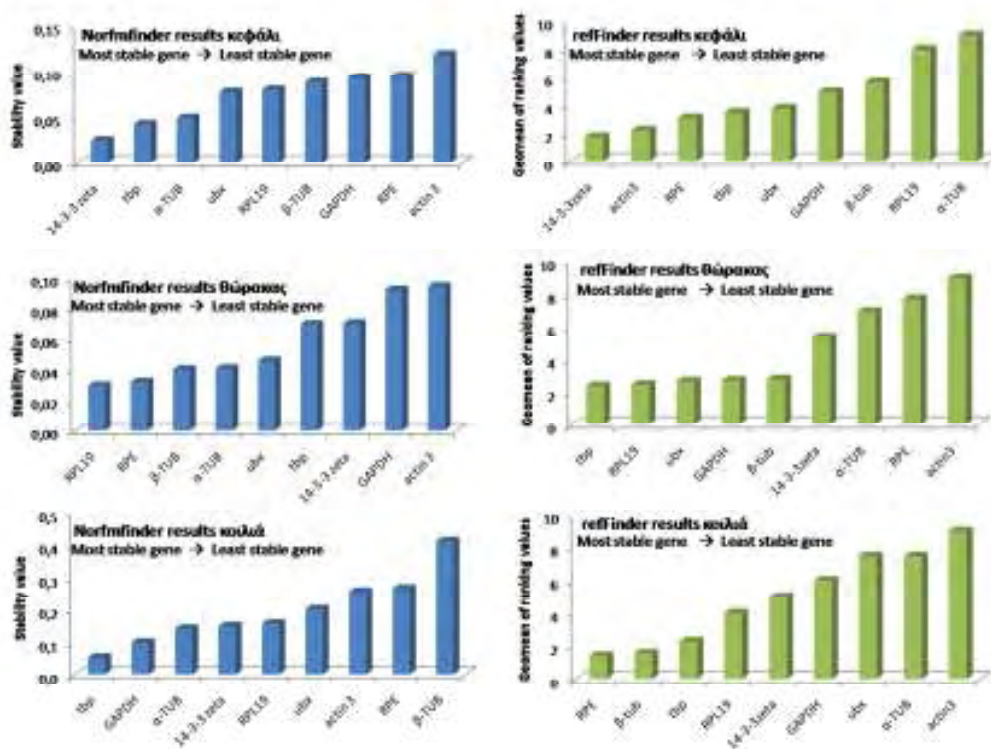
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Πίνακας 12: Αποτελέσματα από την ανάλυση μέσω του προγράμματος Bestkeeper για τους ιστούς του αναπαραγωγικού συστήματος: όρχεις, ωοθήκες, MAGs και FAGs του εντόμου *Bactrocera oleae*

Γονίδιο	Όρχεις		ωοθήκες		MAGs		FAGs	
	SD	CV	SD	CV	SD	CV	SD	CV
<i>14-3-3 zeta</i>	0,34	1,61	1,75	8,33	2,50	8,19	1,88	6,44
<i>ubx</i>	1,52	8,59	0,91	3,98	0,93	2,83	1,07	3,32
<i>Tbp</i>	1,58	4,89	0,67	3,17	2,01	6,79	1,17	5,05
<i>β-TUB</i>	2,3	8,9	1,95	7,61	1,18	3,35	1,90	6,70
<i>GAPDH</i>	2,13	7,34	0,70	3,99	2,62	8,69	1,37	4,73
<i>actin 3</i>	2,52	7,87	1,95	8,53	2,14	7,57	1,52	5,75
<i>RPE</i>	1,37	4,25	1,48	6,61	0,80	2,44	1,54	4,67
<i>RPL19</i>	1,46	5,24	0,68	4,24	0,28	1,35	1,62	5,83
<i>α-TUB</i>	1,63	6,7	0,83	4,29	1,87	6,46	0,96	2,66

Στη συνέχεια της ανάλυσης των ιστών του δάκου, κεφάλι, θώρακας και κοιλιά με σκοπό την εύρεση των κατάλληλων γονιδίων αναφοράς, χρησιμοποιήθηκαν εκ νέου οι τρεις αλγόριθμοι NormFinder, refFinder και Bestkeeper. Συγκεκριμένα για το κεφάλι του δάκου βρέθηκε ότι τα πιο σταθερά γονίδια είναι τα *14-3-3zeta* και *tbp* (Normfinder), το *14-3-3zeta* (refFinder) και το *tbp* (Bestkeeper). Ενώ για τον θώρακα τα κατάλληλα γονίδια αναφοράς

σύμφωνα με το NormFinder είναι τα *RPL19* και *RPE*, το *tbp* (RefFinder) και το *RPE* (Bestkeeper). Τέλος, για τον ιστό της κοιλιάς του δάκου έπειτα από την ανάλυση με τους τρεις αλγόριθμους βρέθηκε ότι τα γονίδια *tbp* και *GAPDH* είναι τα πλέον κατάλληλα σύμφωνα με το Normfinder, το *RPE* σύμφωνα με το RefFinder και το *α-TUB* με βάση το Bestkeeper (Εικόνα 65, Πίνακας 13).



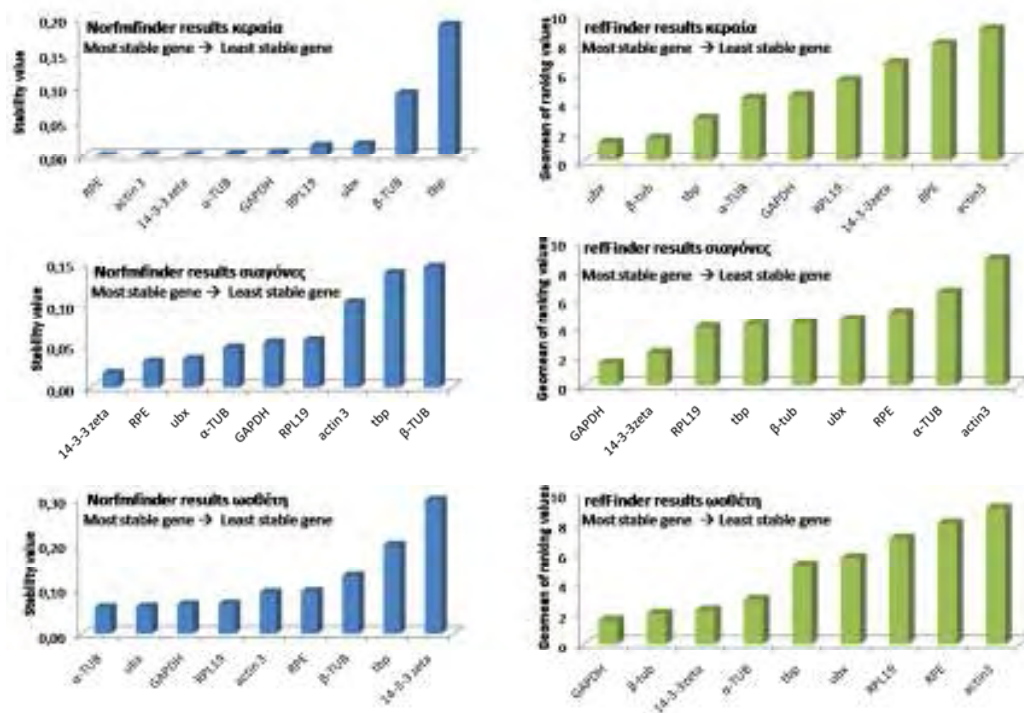
Εικόνα 65: Σχηματική αποτύπωση των αποτελεσμάτων από τους αλγόριθμους NormFinder και refFinder για τους ιστούς του σώματος του δάκου (κεφάλι, θώρακας και κοιλιά).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Γονίδιο	Κεφάλι		Θώρακας		Κοιλιά	
	SD	CV	SD	CV	SD	CV
<i>14-3-3 zeta</i>	0,43	2,13	1,94	6,97	1,21	5,96
<i>Ubx</i>	2,74	12,78	1,52	4,89	0,71	2,90
<i>Tbp</i>	0,28	1,17	1,37	4,25	0,78	3,81
<i>β-TUB</i>	0,48	1,64	2,30	8,90	2,84	12,02
<i>GAPDH</i>	0,44	2,39	2,13	7,34	0,79	4,23
<i>actin 3</i>	1,49	7,42	2,52	7,87	1,06	5,90
<i>RPE</i>	0,37	1,51	0,34	1,61	1,60	6,73
<i>RPL19</i>	0,45	2,27	1,84	6,74	1,00	5,50
<i>α-TUB</i>	0,51	2,47	1,63	6,70	0,51	2,54

Επιπρόσθετα, έγινε ανάλυση με τους τρεις αλγόριθμους για τους ιστούς του σφρητικού συστήματος κεραία, σιαγόνες και του ωοθέτη από το αναπαραγωγικό σύστημα του *Bactrocera oleae*. Συγκεκριμένα, τα κατάλληλα γονίδια αναφοράς για την κεραία του δάκου είναι τα *RPE* και *actin3* (Normfinder), το *ubx* (RefFinder) και το *RPE* (Bestkeeper). Ομοίως, για τον ιστό των σιαγόνων του

εντόμου σύμφωνα με τον αλγόριθμο Normfinder ο καλύτερος συνδυασμός γονιδίων αναφοράς είναι τα *14-3-3 zeta* και *RPE*, ενώ το πρόγραμμα RefFinder προτείνει το *GAPDH* και το Bestkeeper προτείνει το *14-3-3 zeta*. Τέλος, για τον ωοθέτη του δάκου τα κατάλληλα γονίδια αναφοράς είναι τα *α-TUB* και *ubx* (Normfinder), το *GAPDH* (RefFinder) και το *α-TUB* (Bestkeeper) (Εικόνα 66, Πίνακας 14).



Εικόνα 66: Σχηματική αποτύπωση των αποτελεσμάτων από τους αλγόριθμους NormFinder και refFinder για το σφρητικό σύστημα του δάκου (κεραία, σιαγόνες) αλλά και τον ωοθέτη του αναπαραγωγικού συστήματος.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Πίνακας 14: Αποτελέσματα από την ανάλυση μέσω του προγράμματος Bestkeeper για τους ιστούς κεραία, σιαγόνες και ωοθήης του εντόμου *Bactrocera oleae*.

Αποτελέσματα Bestkeeper						
Οσφρητικό σύστημα				Αναπαραγωγικό σύστημα		
	Κεραία		Σιαγόνες		Ωοθήης	
Γονίδιο	SD	CV	SD	CV	SD	CV
<i>14-3-3 zeta</i>	1,80	6,06	1,94	6,23	2,01	5,93
<i>Ubx</i>	2,38	7,02	3,00	9,18	1,38	3,98
<i>Tbp</i>	3,58	15,09	2,68	8,59	2,45	10,39
<i>β-TUB</i>	1,96	5,38	2,89	10,18	2,35	7,72
<i>GAPDH</i>	2,11	7,01	2,91	10,79	2,35	7,33
<i>actin 3</i>	1,63	5,44	2,65	8,96	2,66	7,75
<i>RPE</i>	1,50	4,39	2,35	6,98	1,51	4,27
<i>RPL19</i>	1,88	6,33	2,88	10,99	2,73	8,42
<i>α-TUB</i>	1,88	5,78	3,02	10,70	1,09	3,02

A.3.1 Κατάταξη των γονιδίων αναφοράς (best ranking) στους ιστούς του εντόμου *B. oleae*

Η ανάλυση των δεκατριών εξεταζόμενων ιστών του δάκου της ελιάς για την επιλογή του κατάλληλου γονιδίου αναφοράς σύμφωνα με τους τέσσερις αλγόριθμους επέστρεψε διαφορετικά αποτελέσματα. Ωστόσο, σε κάποια προγράμματα υπήρξε συμφωνία των αποτελεσμάτων (geNorm, NormFinder), ενώ σε άλλα υπήρξαν μεγάλες αποκλίσεις (ReffFinder). Για να μπορέσουμε να βγάλουμε ένα ασφαλές συμπέρασμα που να βασίζεται στα αποτελέσματα των τεσσάρων προγραμμάτων και να κατατάσσει τα γονίδια αναφοράς από το καλύτερο προς το λιγότερο καλό, πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση σύμφωνα με τη διάμεση τιμή (median). Συγκεκριμένα, από την ανάλυση προέκυψε ότι στα αναπτυξιακά στάδια του δάκου, για το αυγό ιδανικά

θα πρέπει να χρησιμοποιηθούν τέσσερα γονίδια αναφοράς τα: *tbp*, *RPE*, *RPL19* και *14-3-3zeta*. Στο στάδιο της προνύμφης τα δύο καλύτερα γονίδια αναφοράς είναι τα *14-3-3zeta* και *α-TUB*. Τέλος, για το στάδιο της νύμφης συνιστάται η χρήση δύο γονιδίων αναφοράς για την σωστή κανονικοποίησης, τα *14-3-3zeta* και *RPE*. Για το κεφάλι του δάκου, τα δύο γονίδια αναφοράς που προέκυψαν είναι τα *14-3-3zeta* και *β-TUB*. Αντίστοιχα για το θώρακα είναι τα *14-3-3zeta*, *GAPDH* και *RPE*, ενώ για την κοιλιά του εντόμου είναι τα *ubx*, *14-3-3zeta* και *GAPDH*. Στο αναπαραγωγικό σύστημα του δάκου, η ανάλυση επέστρεψε τα παρακάτω αποτελέσματα, για τους όρχεις τα τρία καλύτερα γονίδια αναφοράς είναι τα *14-3-3zeta*, *actin3* και *RPE*. Για τα MAGs, τα τρία γονίδια αναφοράς που προτείνονται είναι τα *RPL19*, *actin3* και *RPE*. Αντίστοιχα, για την ωοθήκη του δάκου μπορούν να χρησιμοποιηθούν τα γονίδια *actin3* και *14-3-3zeta*, αλλά και για τα FAGs τα πέντε γονίδια αναφοράς είναι τα *GAPDH*, *actin3*, *RPE*, *14-3-3zeta* και *α-TUB*. Τέλος, για τον ιστό του ωοθέτη τα τρία γονίδια αναφοράς που πρέπει να χρησιμοποιηθούν ιδανικά για την ορθή κανονικοποίηση είναι τα *14-3-3zeta*, *tbp* και *actin3*. Για το οσφρητικό σύστημα του δάκου και συγκεκριμένα για τις κεραίες προτείνεται η χρήση τριών γονιδίων αναφοράς, των *14-3-3zeta*, *actin3* και *GAPDH*. Αντίστοιχα, για τον ιστό των σιαγόνων τα τέσσερα γονίδια αναφοράς που μπορούν να χρησιμοποιηθούν είναι τα *ubx*, *RPE*, *GAPDH* και *β-TUB*. Στον Πίνακα 15 παρατίθενται συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα της ανάλυσης για την επιλογή των κατάλληλων γονιδίων αναφοράς στους εξεταζόμενους ιστούς που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ορθή κανονικοποίηση στην qRT-PCR σύμφωνα με τα αποτελέσματα των τεσσάρων διαφορετικών αλγορίθμων.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Πίνακας 15: Η καλύτερη σειρά κατάταξης (best-ranking) των γονιδίων αναφοράς για το δάκο της ελιάς, *B.oleae*, σύμφωνα με την ανάλυση των τεσσάρων προγραμμάτων geNorm, NormFinder, BestKeeper και RefFinder για τους δεκατρείς εξεταζόμενους ιστούς.

Εξεταζόμενοι ιστοί		Η καλύτερη σειρά κατάταξης των γονιδίων αναφοράς				
Αναπτυξιακά στάδια	Αυγό	<i>tbp</i>	<i>RPE</i>	<i>RPL19</i>	<i>14-3-3zeta</i>	
	προνύμφη	<i>14-3-3zeta</i>	<i>α-TUB</i>			
	Νύμφη	<i>14-3-3zeta</i>	<i>RPE</i>			
Ιστοί σώματος	Κεφάλι	<i>14-3-3zeta</i>	<i>β-TUB</i>			
	θώρακας	<i>14-3-3zeta</i>	<i>GAPDH</i>	<i>RPE</i>		
	Κοιλία	<i>ubx</i>	<i>14-3-3zeta</i>	<i>GAPDH</i>		
Αναπαραγωγικό σύστημα	Όρχεις	<i>14-3-3 zeta</i>	<i>actin3</i>	<i>RPE</i>		
	MAGs	<i>RPL19</i>	<i>actin3</i>	<i>RPE</i>		
	ωοθήκες	<i>actin3</i>	<i>14-3-3 zeta</i>			
	FAGs	<i>GAPDH</i>	<i>actin3</i>	<i>RPE</i>	<i>14-3-3zeta</i>	<i>α-TUB</i>
	ωοθήτης	<i>14-3-3 zeta</i>	<i>Tbp</i>	<i>actin3</i>		
Οσφρητικό σύστημα	κεραίες	<i>14-3-3 zeta</i>	<i>actin3</i>	<i>GAPDH</i>		
	σιαγόνες	<i>ubx</i>	<i>RPE</i>	<i>GAPDH</i>	<i>β-TUB</i>	

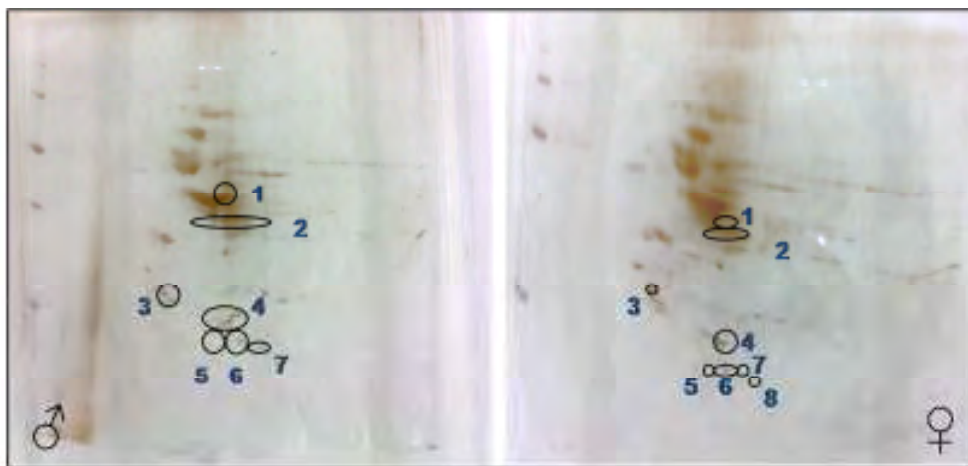
B. Πρωτεομική ανάλυση στο δάκο της ελιάς, το έντομο *Bactrocera oleae*

B.1 Ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων (2D PAGE) σε κεφάλια από αρσενικά και θηλυκά άτομα δάκου

Για τη μελέτη της διαφορικής έκφρασης των πρωτεϊνών σε αρσενικά και θηλυκά έντομα δάκου της ελιάς χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά στο έντομο η πρωτεομική ανάλυση. Αρχικά συλλέχθηκαν κεφάλια από αρσενικά και θηλυκά έντομα του εργαστηριακού πληθυσμού *B. oleae*, απομονώθηκαν οι πρωτεΐνες και ακολούθησε ηλεκτροφόρηση 2D-PAGE ώστε να γίνει ο διαχωρισμός τους. Έπειτα, έγινε ο εντοπισμός των σημαντικότερων πρωτεϊνών με διαφορετικό πρότυπο έκφρασης ανάμεσα στα δύο φύλα (Εικόνα 67). Στη συνέχεια, οι πρωτεΐνες αποκόπηκαν και ακολούθησε πέψη με τρυψίνη και τελικά αναλύθηκαν με φασματομετρία μάζας στο Ινστιτούτο Αλέξανδρος Φλέμινγκ. Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε μέσω βιοπληροφορικής ανάλυσης

όπου χρησιμοποιήθηκαν το πρόγραμμα Blast και η βάση δεδομένων της *Drosophila*, flybase (Πίνακας 16). Όπως και στην τρανσκριπτομική ανάλυση, έτσι και στην πρωτεομική ανάλυση λόγω των ελλείπων γνώσεων του γονιδιώματος του δάκου, βασιστήκαμε στο συγγενικό είδος της *Drosophila melanogaster* για τη σύγκριση των πεπτιδίων. Όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα, υπάρχουν πρωτεΐνες που εκφράζονται με διαφορετικό τρόπο ανάμεσα σε θηλυκά και αρσενικά έντομα *Bactrocera oleae*. Συγκεκριμένα, στα θηλυκά έντομα υπερεκφράζονται οι πρωτεΐνες 14-3-3ε, 14-3-3ζ (spot 3), Peroxiredoxin (spot 7) και Actin (spot 6), ενώ στα αρσενικά έντομα υπερεκφράζονται οι πρωτεΐνες Ισοκιτρική DH και Arg-κινάση (spot 2) (Εικόνα 67, Πίνακας 16). Οι πρωτεΐνες αυτές ανήκουν σε διαφορετικές λειτουργικές ομάδες όπως κυτοσκελετού, μεταβολισμού, συναπτοσωμικές, μεταγωγής σήματος και οξειδωτικού στρες.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



Εικόνα 67: Δισδιάστατο πήκτωμα ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών από κεφάλια αρσενικών (αριστερά) και θηλυκών (δεξιά) εντόμων *B. oleae*. Σύμφωνα με το διαφορετικό προφίλ έκφρασης των πρωτεϊνών διακρίνονται αριθμημένα τα διαφορετικά πεπτιδία που εντοπίζονται στα δύο φύλα του δάκου.

Πίνακας 16: Οι διαφορετικά εκφραζόμενες πρωτεΐνες που προσδιορίστηκαν με φασματομετρία μάζας.

SpotNo	Protein name	Acession no.	Mw(KDa)	pI	Length(aa)
2	ArgK-PB	FBpp0076271	47,9	6,04	432
2	IDH (Isocitrate Dehydrogenase)	Q9VWH4	40,8	7,36	377
3	14-3-3 ε	FBpp0082989	29,2	4,84	256
3	14-3-3 ζ	FBpp0087500	28,3	4,93	248
3	Snap 25	FBpp0110435	23,7	4,61	212
4	Ranbp 21	FBpp0074528	139,1	6,86	1241
6	Act87E	FBpp0082253	41,8	5,48	376
6	Act5C	FBpp0070788	41,8	5,48	376
6	CG30325-PA	FBpp0086000	86,5	9,96	750
6	GstD1-PA	FBpp0082077	23,9	7,23	209
6	GstD9-PA	FBpp0082078	25,4	5,34	218
7	Jafrac 1-PB (Peroxiredoxin)	FBpp0073594	21,7	5,34	194

B.2 Πεπτιδομική ανάλυση στο αναπαραγωγικό σύστημα αρσενικών και θηλυκών ατόμων *B. oleae*

Μια νέα προσέγγιση χρησιμοποιήθηκε στο πλαίσιο της πρωτεομικής ανάλυσης του δάκου, η πεπτιδομική ανάλυση στο αναπαραγωγικό σύστημα αρσενικών και θηλυκών ατόμων δάκου. Συγκεκριμένα, από τα αρσενικά έντομα απομονώθηκαν οι ιστοί των όρχεων και οι αρρενοειδικοί βοηθητικοί αδένες (Male Accessory Glands, MAGs) ενώ από τα θηλυκά έντομα οι σπερματοθήκες και οι θηλεοειδικοί βοηθητικοί αδένες (Female Accessory Glands, FAGs). Ακολούθησε απομόνωση των πεπτιδίων και, έπειτα από στάδιο καθαρισμού, τα πεπτιδία υποβλήθηκαν σε

φασματομετρία μάζας (MALDI TOF-TOF). Οι αλληλουχίες των πεπτιδίων επεξεργάστηκαν μέσω του λογισμικού του προγράμματος MASCOT. Χρησιμοποιήθηκε αντιστοίχιση των πεπτιδίων με τις βάσεις δεδομένων της *D. melanogaster*, με τα δεδομένα του τρανσκριπτώματος των *C. capitata* και *B. oleae* και τέλος σε ένα γενικευμένο έλεγχο στη βάση δεδομένων που περιλαμβάνει όλους τους οργανισμούς. Ωστόσο, στην περίπτωση μιας τεράστιας βάσης δεδομένων, που περιέχει όλα τα είδη, το MASCOT θα είναι λιγότερο συγκεκριμένο και από τις πρωτεΐνες που θα ταιριάζουν θα επιλεγθούν μόνο οι πιο κοινές μεταξύ όλων των

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

διαφορετικών ειδών αποκρύπτοντας τις υπόλοιπες πρωτεΐνες που εκφράζονται αποκλειστικά στο είδος που μας ενδιαφέρει. Για το συγκεκριμένο λόγο τα δεδομένα που προέκυψαν από τη σύγκριση με τη βάση δεδομένων όλων των οργανισμών, ήταν ελάχιστα. Αντίθετα όμως, στην περίπτωση που περιοριστεί η βάση δεδομένων για παράδειγμα σε στενά συγγενικά είδη, όπως η *Drosophila sp.*, τότε προκύπτουν καλύτερα αποτελέσματα πρωτεϊνών υψηλής βαθμολογίας που είναι πιο συγκεκριμένες. Τα πεπτίδια που προέκυψαν από το MASCOT εμφανίζονται με τη σειρά των τιμών βαθμολόγησης του συγκεκριμένου λογισμικού. Το MASCOT είναι ένα λογισμικό στο οποίο η συνολική βαθμολογία (score) είναι η πιθανότητα ότι η παρατηρούμενη αντιστοιχία είναι τυχαίο γεγονός. Ωστόσο, ακόμα κι αν παρατίθενται σύμφωνα με τη σειρά του εκάστοτε σκορ, κάθε πεπτίδιο πρέπει ακόμα να ελεγχθεί ξεχωριστά ώστε να επιβεβαιωθεί η σωστή αλληλουχία του και ότι αυτή η αλληλουχία ταιριάζει με την δεδομένη πρωτεΐνη. Συνεπώς, στο στάδιο αυτό πραγματοποιείται η βιοπληροφορική ανάλυση για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων. Στη λίστα των πρωτεϊνών που παρατίθεται παρακάτω παρουσιάζονται τα δεδομένα του πεπτιδιώματος του αναπαραγωγικού συστήματος του δάκου που εξακολουθεί να χρειάζεται περαιτέρω αναλύσεις

επιβεβαίωσης. Στην παρούσα μελέτη επεξεργάστηκαν τα αποτελέσματα από τη σύγκριση με τη βάση δεδομένων της *Drosophila*, ενώ αξίζει να σημειωθεί ότι η φασματομετρία μάζας αλλά και η επεξεργασία των πεπτιδίων μέσω του MASCOT πραγματοποιήθηκαν από το Πανεπιστήμιο Georg-August-Universität στο Göttingen και το εργαστήριο του καθηγητή Ernst Wimmer. Στη συνέχεια, οι πρωτεΐνες και τα αντίστοιχα γονίδια μελετήθηκαν ώστε να προσδιοριστεί ο ρόλος τους. Συγκεκριμένα, από τις πρωτεΐνες που συνολικά προσδιορίστηκαν, πραγματοποιήθηκε εστιασμένη έρευνα στη βιβλιογραφία ώστε να διευκρινιστεί η συσχέτισή τους με το φυλοδιαχωρισμό. Από την επεξεργασία των δεδομένων για το αναπαραγωγικό σύστημα των αρσενικών ατόμων δάκου συνολικά προέκυψαν έντεκα πρωτεΐνες που παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση εκ των οποίων οι τέσσερις εμφανίζουν αρρενο-ειδικό ρόλο. Αντίστοιχα, για τα θηλυκά έντομα προέκυψαν συνολικά 573 πρωτεΐνες όπου η μελέτη μας εστιάστηκε σε εννέα (9) πρωτεΐνες με συγκεκριμένο θηλεο-ειδικό ρόλο. Στον Παράρτημα II παρατίθενται αναλυτικά τα αποτελέσματα από την πεπτιδομική ανάλυση στο αναπαραγωγικό σύστημα στα δύο φύλα του δάκου της ελιάς.

Πίνακας 17: Οι πρωτεΐνες που απομονώθηκαν από την πεπτιδομική ανάλυση στο αναπαραγωγικό σύστημα των αρσενικών και θηλυκών ατόμων δάκου και μελετήθηκαν περαιτέρω καθώς παρουσίασαν ενδιαφέρον ως προς το φυλοδιαχωρισμό

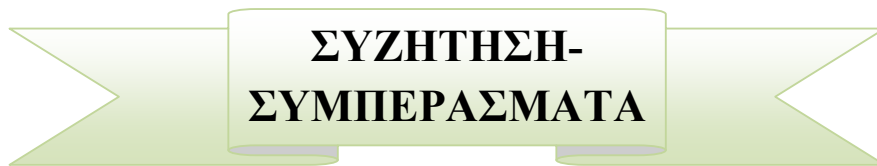
<i>Batrocera oleae</i> male blast to <i>Drosophila</i>	
Protein Name	Gene Name
TRPCG	<i>Trpm</i>
LOLA5	<i>lola</i>
KCC2A	<i>CaMKII</i>
GALT7	<i>GalNAc-T2</i>
<i>Batrocera oleae</i> female blast to <i>Drosophila</i>	
Protein Name	Gene Name
CLH	<i>Chc</i>
PHP	<i>ph-p</i>
BICC	<i>BicC</i>
ECR	<i>EcR</i>
E75BA	<i>Eip75B</i>
EGFR	<i>Egfr</i>
LOZEN	<i>lz</i>
E78C	<i>Eip78C</i>
GLD2B	<i>wisp</i>

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Οι πρωτεΐνες που μελετήθηκαν περαιτέρω βιβλιογραφικά παρουσιάζονται στον Πίνακα 17. Όπως προέκυψε από τη μελέτη του ρόλου της κάθε πρωτεΐνης και του αντίστοιχου γενετικού τόπου, διαπιστώθηκε ότι οι δεκατρείς επιλεγμένες πρωτεΐνες εμπλέκονται σε συστήματα φυλοδιαχωρισμού κυρίως στο συγγενικό είδος του δάκου, τη *D.melanogaster* αλλά και στο ποντίκι και τον άνθρωπο. Πιο συγκεκριμένα, οι γενετικοί τόποι *Trpm*, *lola*, *CaMKII* και *GalNAc-T2* εντοπίστηκαν μόνο στο αναπαραγωγικό σύστημα των αρσενικών ατόμων του δάκου και συγκέντρωσαν υψηλή βαθμολογία και ομολογία με τη βάση δεδομένων της *Drosophila* κατά την ανάλυση τους με το πρόγραμμα MASCOT. Τα συγκεκριμένα γονίδια εμπλέκονται σε μηχανισμούς φυλετικής διαφοροποίησης στο στάδιο των γαμετικών κυττάρων της βλαστικής σειράς στα αρσενικά. Αντίστοιχα, οι γενετικοί τόποι *Chc*, *ph-p*, *BicC*, *EcR*, *Eip75B*, *Egfr*, *lz*, *Eip78C* και *wisp* που εντοπίστηκαν στο αναπαραγωγικό σύστημα των θηλυκών ατόμων δάκου εμπλέκονται σε μηχανισμούς φυλετικής διαφοροποίησης στο στάδιο των γαμετικών κυττάρων της βλαστικής σειράς των θηλυκών. Παράλληλα, βρέθηκε ότι οι γενετικοί τόποι *EcR*, *Eip75B* και *Eip78C* συνδέονται μεταξύ τους σε ένα μονοπάτι που οδηγεί στην έκφραση των λειτουργιών διαφοροποίησης στα θηλυκά καθώς ελέγχει το σχηματισμό κυττάρων της βλαστικής σειράς των ωοθηκών και την επιβίωση των ωοθυλακίων στη *Drosophila*. Ενώ, το μονοπάτι της EGFR μπορεί να ρυθμίσει μεταγραφικά τους παράγοντες της ανάπτυξης όπως του υποδοχέα της εκδυσόνης (EcR). Επιπρόσθετα, εντοπίστηκαν δύο πρωτεΐνες που εκφράζονται στα θηλυκά και είναι ενδιαφέρουσες καθώς η πρωτεΐνη WISP (GLD-2) συνδέεται με τη Bicaudal-C (Bic-C) της *Drosophila*. Τα αντίστοιχα γονίδια *Bic-C* και *wisp* βρίσκονται μόνο στα ωοκύτταρα και τα πρώιμα έμβρυα και έχουν σημαντικό ρόλο στην ωογένεση.

Η παρούσα μελέτη μέσω της πεπτιδομικής στο αναπαραγωγικό σύστημα των δύο φύλων του δάκου εστίασε σε πρωτεΐνες που εμπλέκονται σε συστήματα φυλοδιαχωρισμού. Τελικά έγινε εντοπισμός δεκατριών διαφορετικών πρωτεϊνών που εκφράζονται διαφορετικά μεταξύ των αρσενικών και θηλυκών

ατόμων δάκου, οι οποίες έχουν σημαντικό ρόλο στη σεξουαλική διαφοροποίηση του εντόμου. Ωστόσο, οι λίστες των πρωτεϊνών και των αντίστοιχων γονιδίων που απελευθερώθηκαν από την πεπτιδομική ανάλυση είναι ιδιαίτερα μεγάλες με πολλά δεδομένα που σίγουρα χρήζουν περαιτέρω επεξεργασίας και ανάλυσης σε μελλοντικό και επόμενο στάδιο.



**ΣΥΖΗΤΗΣΗ-
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ**

1. Ανάλυση των γονιδίων του δάκου που εμπλέκονται σε συστήματα φυλοδιαχωρισμού και ανθεκτικότητας

Η παρούσα διατριβή αφορά την ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης μέσω τρανσκριπτομικής και πρωτεομικής, του σημαντικότερου εχθρού της ελιάς, του εντόμου *Bactrocera oleae*, με έμφαση σε συστήματα φυλοδιαχωρισμού και ανθεκτικότητας στο εντομοκτόνο spinosad. Μέχρι πρότινος, τα δεδομένα για το γονιδίωμα του δάκου της ελιάς ήταν ελάχιστα. Με την προσέγγιση μας, καταφέραμε να απομονώσουμε περισσότερα από 13.000 γονίδια ώστε να συμβάλλουμε στην εξερεύνηση του γονιδιώματος του εντόμου. Από την RNA-seq ανάλυση των γενετικών τόπων που εμπλέκονται σε συστήματα φυλοδιαχωρισμού και συγκεκριμένα από τη διαφορική ανάλυση οργάνων αναπαραγωγής μεταξύ αρσενικών και θηλυκών ατόμων δάκου βρέθηκαν συνολικά 1238 γονίδια που υπερεκφράζονται σε αρσενικά έντομα και 330 γονίδια που υπερεκφράζονται στα θηλυκά έντομα. Αντίστοιχα, από την ανάλυση των γενετικών τόπων που εμπλέκονται σε μηχανισμούς ανθεκτικότητας στο εντομοκτόνο spinosad και τη διαφορική ανάλυση μεταξύ του ευαίσθητου και του ανθεκτικού στο spinosad πληθυσμού του δάκου, αποκαλύφθηκαν 9 γονίδια που υπερεκφράζονται στον ανθεκτικό στο spinosad πληθυσμό (SPIN) και 40 γονίδια που υπερεκφράζονται στον ευαίσθητο εργαστηριακό πληθυσμό (LAB). Στην περαιτέρω ανάλυση επιβεβαίωσης (validation) των αποτελεσμάτων του RNA-seq, συνολικά μελετήθηκαν οι 12 γονίδια [*kl2* (*male fertility factor, kl2*), *kl3* (*male fertility factor, kl3*), *kl5* (*male fertility factor, kl5*), *ory* (*occludin-related Y protein*), *fem-1* (*sex-determining protein fem-1*), *gas8* (*growth arrest specific protein 8*), *lobo* (*lost boys*), *ix* (*intersex*), *pbl* (*pebble*), *hcf* (*host cell factor C1*), που υπερεκφράζονται στα αρσενικά και τα *sox* και *pcp* (*pupal cuticle protein 78E*) που υπερεκφράζονται στα θηλυκά έντομα] που εμπλέκονται στο φυλοδιαχωρισμό σε ιστούς του αναπαραγωγικού συστήματος του δάκου. Όσον αφορά τη μελέτη των εμπλεκόμενων γενετικών τόπων

σε μηχανισμούς ανθεκτικότητας στο spinosad, συνολικά μελετήθηκαν τα 16 γονίδια [*Yolk protein 2* (*Yp2*), *ATP synthase FO subunit 6* (*ATP synthase*), *Low affinity cationic amino acid transporter 2* (*CAT-2*), *Serineprotease 6* (*SP6*), *4-nitrophenylphosphatase* (*pNPPase*), *Salivary Cys-rich secreted peptide-vWF* (*SalCys*), *Cytochrome P450 6a23-like* (*Cyp6a23*) και *Antigen 5 precursor* (*Ant5*) που υπερεκφράζονται στα ανθεκτικά στο spinosad έντομα και *Heat-shock protein 70* (*Hsp70*), *Heat-shock protein 23* (*Hsp23*), *Larval serum protein 1* (*LSP1*), *HexamerinL1* (*HexL1*), *Chitinase 5* (*Cht5*), *Oxidase/oxidase* (*oxidase*), *Macrophage mannose receptor 1* (*mmr1*) και *Cell division cycle-associated protein 7* (*Cdc*) που υπερεκφράζονται στα ευαίσθητα έντομα του εργαστηριακού πληθυσμού]. Ωστόσο, οι γενετικοί τόποι για τους οποίους επιβεβαιώθηκαν τα αποτελέσματα, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία αντιστοιχούν σε ομάδες γονιδίων που συνδέονται με το φυλοδιαχωρισμό, αλλά και σε ομάδες μεταβολισμού ενέργειας σε συνθήκες στρες, αντίδρασης του ανοσοποιητικού συστήματος και αποτοξίνωσης. Παρακάτω, αναλύεται ο ρόλος των μελετώμενων γενετικών τόπων της παρούσας έρευνας.

1.1 Γονίδια που εμπλέκονται σε συστήματα φυλοδιαχωρισμού στο δάκο της ελιάς

1.1.1 Γονίδια που συνδέονται με το Y χρωμόσωμα στη *Drosophila* (*kl3*, *kl5* και *ory*)

Η qRT-PCR επιβεβαίωσε την αυξημένη έκφραση των γονιδίων *kl2*, *kl3*, *kl5* και *ory* στους όρχεις από τους αρσενικούς δάκους. Στη *Drosophila melanogaster*, τα γονίδια *kl3* και *kl5* (μαζί με το *kl2*) είναι γνωστοί παράγοντες γονιμότητας που συνδέονται στο χρωμόσωμα Y. Η έλλειψη του *kl3* ή *kl5* προκαλεί την απώλεια του εξωτερικού σκέλους της axoneme ουράς του σπέρματος (Hardy et al., 1981), μια δομή που όπως είναι γνωστό περιέχει το μοριακό κινητήρα πρωτεΐνης δυνεΐνης σε άλλους οργανισμούς (Gibbons, 1995). Όντως, οι Goldstein et al., το 1982 έδειξαν ότι σε αρσενικά που είχαν μεταλλαγμένα τα γονίδια *kl3* και *kl5*, το σπέρμα στερούταν τρεις διακριτές, υψηλού μοριακού βάρους πρωτεΐνες με κινητικότητα

παρόμοια με τις βαριές αλυσίδες της δυνεΐνης στο *Chlamydomonas reinhardtii* και πρότειναν ότι αυτοί οι παράγοντες γονιμότητας είναι τα δομικά γονίδια των τριών διαφορετικών πρωτεϊνών, βαριάς αλυσίδας δυνεΐνης (Goldstein et al., 1982). Το 1993, οι Gerner και Hays αλληλούχησαν τμήμα του *kl5* και έδειξαν ότι κωδικοποιεί ένα axonemal b-dynein heavy chain που εκφράζεται στους όρχεις (Gerner and Hays, 1993). Το γονίδιο *ory* στη *D. melanogaster* είναι επίσης παράγοντας που συνδέεται στο Y χρωμόσωμα αν και οι λεπτομέρειες σχετικά με το γονίδιο αυτό είναι ελάχιστες. Τα γονίδια *kl3*, *kl5* και *ory* είναι συνδεδεμένα στο Y χρωμόσωμα σε 12 διαφορετικά αλληλουχημένα γονιδιώματα της *Drosophila* (Koerich et al., 2008). Στη *Drosophila*, τα πλησιέστερα paralogs των *kl2*, *kl3* και *kl5* είναι αυτοσωμικά και όχι φυλοσύνδετα, υποδηλώνοντας ότι η εξέλιξη του χρωμοσώματος Y της *Drosophila* προήλθε από τη συσσώρευση των γονιδίων που σχετίζονται με τα αρσενικά που προκύπτουν *de novo* από τα αυτοσώματα (Carvalho et al., 2000). Ενώ η πιο πιθανή λειτουργία των τριών γονιδίων στο δάκο της ελιάς μπορεί να είναι παρόμοια με εκείνη της *Drosophila*, δεν έχουμε καμία ένδειξη σχετικά με τον εντοπισμό τους στα χρωμοσώματα. Ωστόσο, οι πληροφορίες αυτές θα μπορούσαν να ρίξουν φως στην εξελικτική προέλευση του χρωμοσώματος Y του δάκου της ελιάς.

1.1.2 Γονίδια που εμπλέκονται στη σπερματογένεση και την κινητικότητα του σπέρματος

Ένα γονίδιο που εμπλέκεται στη σπερματογένεση και δύο γονίδια που σχετίζονται με την κινητικότητα του σπέρματος αποδείχθηκε ότι υπερεκφράζονται στους ιστούς των αρσενικών δάκων, τόσο στην τρανσκριπτομική ανάλυση αλλά και έπειτα από την qRT-PCR. Το γονίδιο *sex-determining protein fem-1* (*fem-1*), κωδικοποιεί ένα ουσιαστικό προϊόν σπερματογένεσης στο *Caenorhabditis elegans*. Ενώ τρία *fem* γονίδια, τα *fem-1*, *fem-2* και *fem-3* έχουν αποδειχθεί πως είναι σημαντικά για την ανάπτυξη των αρσενικών (Kimble et al., 1984). Οι μεταλλάξεις λόγω ελλιπούς λειτουργίας σε οποιοδήποτε από τα *fem* γονίδια εμποδίζουν όλα τα στοιχεία για την

ανάπτυξη των αρσενικών και μετατρέπουν τα ζώα που είναι γενετικά αρσενικά σε θηλυκά (Doniach and Hodgkin, 1984; Spence et al., 1990). Το προβλεπόμενο προϊόν του γονιδίου *fem-1* είναι μια ενδοκυτταρική πρωτεΐνη που περιέχει επαναλήψεις ανκυρίνης (ankyrin), όπου σε πολλές άλλες πρωτεΐνες μεσολαβεί στην ειδική αλληλεπίδραση πρωτεΐνης-πρωτεΐνης (Spence et al., 1990). Στη *D. melanogaster*, έχει βρεθεί ένα ομόλογο του *fem-1* με παρόμοια δομή (Flybase). Το γονίδιο *growth arrest-specific protein 8* (*Gas8*), είναι μία πρωτεΐνη δέσμευσης μικροσωληνίσκων που εντοπίζεται σε περιοχές ρύθμισης της δυνεΐνης σε κύτταρα θηλαστικών. Στο ποντίκι, η *Gas8* είναι κυρίως μια πρωτεΐνη των όρχεων, η έκφραση της οποίας ρυθμίζεται αναπτυξιακά κατά την διάρκεια της εφηβείας και της σπερματογένεσης. Στον άνθρωπο, απουσιάζει στα στείρα αρσενικά που δεν έχουν την ικανότητα να παράγουν γαμέτες (Yeh et al., 2002) ενώ το *Gas8* δεν έχει μελετηθεί σε έντομα. Το γονίδιο *lost boys* (*lobo*), έχει αποδειχθεί ότι επηρεάζει την κίνηση εισόδου του σπέρματος στους υποδοχείς σπέρματος των θηλυκών και δεν επηρεάζει την κίνηση εξόδου του σπέρματος από τις σπερματοθήκες στη *D. melanogaster* (Yang et al., 2011). Θεωρώντας ότι τα γονίδια αυτά θα έχουν παρόμοια λειτουργία στο δάκο, είναι αναμενόμενη η υπερέκφραση τους στους όρχεις των αρσενικών.

1.1.3 Γονίδια καθορισμού του φύλου

Στη *D. melanogaster*, το γονίδιο *intersex* (*ix*) ελέγχει την σωματική σεξουαλική διαφοροποίηση μόνο στα θηλυκά, ενώ ενεργεί κυρίως στο τέλος κατά την ιεραρχία του φυλοκαθορισμού. Το προϊόν του δεν έχει μια γνωστή δομή δέσμευσης του DNA και ως εκ τούτου, θεωρείται πως ενεργεί σαν συν-παράγοντας μεταγραφής για την παραλλαγή της πρωτεΐνης doublesex (*DSX^F*) στο θηλυκό, ένα βασικό γονίδιο του μονοπατιού του σεξουαλικού προσδιορισμού στη *D. melanogaster* (Garrett-Engle et al., 2002). Ελάχιστες διαφορές παρατηρήθηκαν στην έκφραση του *ix* μεταξύ των δύο φύλων στη μύγα της ελιάς. Η τρανσκριπτομική ανάλυση έδειξε επίσης τετραπλάσια έκφραση του *sox* στους ιστούς των θηλυκών εντόμων, το αποτέλεσμα όμως δεν επιβεβαιώθηκε μετά από την qRT-PCR. Η οικογένεια των γονιδίων *sox* αποτελείται

από μια ομάδα με συναφείς μεταγραφικούς παράγοντες που έχουν κρίσιμο ρόλο στην εμβρυϊκή ανάπτυξη. Η οικογένεια αυτή αρχικά ταυτοποιήθηκε στα θηλαστικά σύμφωνα με την ομοιότητα της αλληλουχίας ως προς το *SRY, sex-determining region Y chromosome* (Gubbay et al., 1990). Στη μέλισσα, ενώ οι πρωτεΐνες SOX παίζουν σημαντικό ρόλο στη διαφοροποίηση των γονάδων, η ομάδα των ορθόλογων SoxE είχαν υπερέκφραση στους όρχεις των κηφήνων (Wilson and Dearden, 2008). Στη *Drosophila* το SoxN είναι μια νέα ομάδα *B Sox* γονιδίου που εκφράζεται στο αναπτυσσόμενο ΚΝΣ και είναι ένας από τους αρχικούς μεταγραφικούς παράγοντες και εκφράζεται κατά τρόπο πανευροεξωδερμικό (Crémazy et al., 2000).

1.1.4 Άλλα γονίδια

Το γονίδιο *Pebble (Pbl)* ανήκει σε μια οικογένεια παραγόντων ανταλλαγής GTP που είναι απαραίτητα για την κατασκευή ενός συστατικού δακτυλίου και την έναρξη της κυτοκίνησης κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής διαίρεσης των σωματικών κυττάρων στη *D. melanogaster* (Prokopenko et al., 1999; O'Keefe et al., 2001). Ο ρόλος του κατά την σπερματογένεση δεν έχει διευκρινιστεί ακόμα. Η έκφραση του *Pbl* στους όρχεις στη *D. melanogaster* είναι χαμηλή (flybase). Από την άλλη πλευρά, η έκφραση του γονιδίου στους όρχεις της μύγας της ελιάς βρέθηκε αυξημένη σε σύγκριση με την έκφρασή του στα θηλυκά όργανα αναπαραγωγής (FAGs και σπερματοθήκες). Το γονίδιο *Host cell factor C1 (Hcf)* συμμετέχει σε πλήθος λειτουργιών του κυττάρου, συμπεριλαμβανομένης της ρύθμισης της μεταγραφής, της κυτοκίνησης, της εξέλιξης του κυτταρικού κύκλου και της αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης (Khurana and Kristie, 2004). Η πρωτεΐνη είναι απαραίτητη για τη βιωσιμότητα του κυττάρου και έχει παρόμοια δράση μεταξύ μεγάλου εύρους ειδών. Ένα απλό ομόλογο *Hcf* που υπάρχει στη *Drosophila* (ονομάζεται dHCF) εκφράζεται σε όλους τους ιστούς σε σχετικά χαμηλά επίπεδα (flybase). Η τρανσκριπτομική ανάλυση στους ιστούς της μύγας της ελιάς έδειξε ~0,2 φορές υψηλότερη έκφραση στους αρσενικούς ιστούς. Το συγκεκριμένο αποτέλεσμα επιβεβαιώθηκε μετά από qRT-PCR, με

τους ίδιους ιστούς, όπου παρατηρήθηκαν υψηλότερα επίπεδα έκφρασης στους όρχεις σε σύγκριση με στα θηλυκά όργανα αναπαραγωγής (FAGs και σπερματοθήκες). Η ποσοτικοποίηση με την qRT-PCR επιβεβαίωσε την υπερέκφραση του γονιδίου *pupal cuticle protein (pcp)* στα θηλυκά όργανα αναπαραγωγής (FAGs και σπερματοθήκες) σε σύγκριση με τους όρχεις στα αρσενικά έντομα. Οι πρωτεΐνες της επιδερμίδας μαζί με τη χιτίνη, είναι τα δύο συστατικά της επιδερμίδας των εντόμων. Οι πρωτεΐνες αυτές φαίνεται να είναι ειδικές για τον τύπο της επιδερμίδας που εμφανίζεται στα διάφορα στάδια της ανάπτυξης των εντόμων. Οι εύκαμπτες πρωτεΐνες που βρίσκονται στη μαλακή επιδερμίδα της προνύμφης και της νύμφης μπορούν επίσης να βρεθούν στη μαλακή ενδοεπιδερμίδα των ενήλικων εντόμων (Talbo et al., 1991). Στα θηλυκά έντομα απαιτείται η στεροειδής ορμόνη 20-υδροξυεκδυζόνη (20E) προκειμένου να ενεργοποιηθεί η λεκιθογένεση, μια διαδικασία που απαιτείται για την ανάπτυξη των αυγών. Στο κουνούπι *Anopheles gambiae*, μεγάλες ποσότητες 20E παράγονται και αποθηκεύονται στους βοηθητικούς αδένες των αρσενικών (MAGs) και στη συνέχεια παραδίδονται στα θηλυκά κουνούπια κατά τη διάρκεια του ζευγαρώματος (Pondeville et al., 2008). Από την άλλη πλευρά, για τη συσσώρευση των πρωτεϊνών της επιδερμίδας απαιτείται ένας παλμός 20E (Doctor et al., 1985). Ωστόσο, στον δάκο δεδομένου ότι τα FAGs/spermathecae συλλέχθηκαν όταν τα θηλυκά ήταν παρθένα, δεν μπορεί να δοθεί μια εύλογη εξήγηση για την υπερ-έκφραση των *pcps*.

1.2 Γονίδια που εμπλέκονται στους μηχανισμούς ανθεκτικότητας του δάκου στο spinosad

1.2.1 Γονίδια αυξημένων απαιτήσεων ενέργειας και μεταβολισμού

Η *ATP synthase* είναι ένα σημαντικό ένζυμο που παρέχει ενέργεια στα κύτταρα ώστε να τη χρησιμοποιήσουν για την σύνθεση του ATP. Η *ATP synthase* βρίσκεται στα μιτοχόνδρια και αποτελείται από δύο περιοχές: το τμήμα FO που είναι ενσωματωμένο στη μιτοχονδριακή μεμβράνη και λειτουργεί ως πόρος πρωτονίων και το τμήμα F1 που είναι μέσα στη μήτρα των μιτοχονδρίων και

συνδέεται με τη δραστηριότητα της *ATP synthase*. Μέσω της διαφορικής ανάλυσης του πρωτεώματος και προσδιορισμού της ενζυμικής δραστηριότητας, βρέθηκε αυξημένη έκφραση της *ATP synthase* στο έντερο ενός ανθεκτικού πληθυσμού στα πυρεθροειδή του *Helicoverpa armigera* (Konus et al., 2013). Δεδομένου ότι περισσότερες πρωτεΐνες που σχετίζονται με την ενέργεια (όπως οι vacuolar-type ATPase A/B και arginine kinase) παρουσίασαν αύξηση, οι συγγραφείς πρότειναν ότι η αυξημένη ενέργεια μεταβολισμού μπορεί να είναι μια γενική προϋπόθεση για την αντιστάθμιση των δαπανών της ενέργειας που καταναλώνονται κατά τις διαδικασίες αποτοξίνωσης. Στην πραγματικότητα, οι αναστολείς της *ATP synthase* στα μιτοχόνδρια, όπως το Diaphenhiuron, είναι γνωστά εντομοκτόνα για αφίδες, αλευρώδεις και hoppers (IRAC, 2011). Στο δάκο της ελιάς, παρατηρήθηκαν σημαντικά αυξημένα επίπεδα του γονιδίου *ATP synthase FO subunit 6* στον ανθεκτικό εργαστηριακό πληθυσμό SPIN, σε σύγκριση με τους ευαίσθητους πληθυσμούς LAB και w-GR, ενώ τα επίπεδα του άγριου ανθεκτικού πληθυσμού w-CAL ήταν ενδιάμεσα. Το γεγονός αυτό αποτελεί ένδειξη των αυξημένων ενεργειακών απαιτήσεων των ανθεκτικών εντόμων ώστε να ξεκινήσει η διαδικασία αποτοξίνωσης. Το γονίδιο *Low affinity cationic amino acid transporter-2 (CAT-2)* ανήκει σε μια μεγάλη ομάδα διαλυτών μεταφερόμενων πρωτεϊνών, μία ομάδα με περισσότερες από 300 μεμβρανικές πρωτεΐνες μεταφοράς που ταξινομούνται σε 52 οικογένειες (Hediger et al., 2004). Αυτοί οι μεταφορείς χρησιμοποιούν την ενέργεια από την υδρόλυση του ATP για να μεταφέρουν διάφορα υποστρώματα διαμέσου των κυτταρικών μεμβρανών. Συνεπώς, ελέγχονται αρκετές λειτουργίες όπως η σύνθεση πρωτεϊνών, ο μεταβολισμός των ορμονών, οι καταλυτικές λειτουργίες μεταβίβασης των νευρών, η ρύθμιση της ανάπτυξης των κυττάρων, η παραγωγή της ενέργειας μεταβολισμού, η σύνθεση των πουρινών και των πυριμιδινών, ο μεταβολισμός του αζώτου και η βιοσύνθεση της ουρίας. Επιπλέον, στα κύτταρα των θηλαστικών, η πρόσληψη των αμινοξέων προκαλείται από τους ενεργειακά εξαρτώμενους και παθητικούς μεταφορείς με αλληλεπικαλυπτόμενη επιλεκτικότητα υποστρώματος.

Οι περισσότεροι ενεργειακά εξαρτώμενοι μεταφορείς ομαδοποιούνται είτε με την συν-μεταφορά του Na^+ ή του Cl^- ή στην αντίθετη μεταφορά του K^+ . Όπως αναφέρεται για το σύστημα γ^+ , οι πρωτεΐνες CAT καταλύουν την Na^+ -ανεξάρτητη πρόσληψη αργινίνης, λυσίνης και ορνιθίνης και τη Na^+ -εξαρτώμενη πρόσληψη κάποιων ουδέτερων αμινοξέων (White, 1985). Τόσο τα έντομα των ανθεκτικών πληθυσμών SPIN και w-CAL έδειξαν σημαντικά υψηλότερες επίπεδα του *CAT-2* σε σύγκριση με τον ευαίσθητο εργαστηριακό πληθυσμό LAB και τον φυσικό w-GR. Αν και δεν υπάρχουν δεδομένα στη βιβλιογραφία που να υποδηλώνουν ότι το γονίδιο *CAT-2* μπορεί να εμπλέκεται στην μεταφορά ή απομάκρυνση του spinosad από το κύτταρο, υποθέτουμε ότι η υπερέκφραση του συγκεκριμένου γενετικού τύπου σχετίζεται με την υπερέκφραση της *ATP synthase* και απεικονίζει τις αυξημένες ενεργειακές και μεταβολικές ανάγκες των ανθεκτικών εντόμων.

1.2.2 Πρωτεΐνες εμβρυικής και νυμφικής ανάπτυξης

Οι βιτελλογενίνες (Vgs) είναι πρόδρομες της βασικής πρωτεΐνης αποθήκευσης των αυγών, βιτελλίνης, σε πολλά ωοτόκα ζώα. Στα υψηλότερα Diptera, οι Vgs ονομάζονται Yolk proteins (Yps, πρωτεΐνες της λεκίθου) και παράγονται τόσο από το σώμα αλλά και από την ωοθήκη στην πλειονότητα των ειδών. Τρεις βασικοί παράγοντες ρυθμίζουν την λεκιθογένεση στη *D. melanogaster*: ένας παράγοντας του εγκεφάλου, ένας ωοθηκικός παράγοντας που διεγείρει τη σύνθεση των Yp στο σώμα (πλέον αναφέρεται ως εκδυσόνη) και ένας θωρακικός παράγοντας (Juvenile Hormone, JH) που συμμετέχουν στην απορρόφηση των Yp από τις ωοθήκες. Η JH ρυθμίζει τη σύνθεση και την πρόσληψη των Yp, ενώ η εκδυσόνη εμπλέκεται μόνο στη σύνθεση των Yp (Handler et al., 1977; Postlethwait and Handler, 1979). Στα κουνούπια του γένους *Culex* ένας παράγοντας του κεφαλιού απελευθερώνεται 4-8 λεπτά μετά την έναρξη της σίτισης (Baldrige and Feyereisen, 1986). Η λεκιθική φάση αρχίζει μετά την σίτιση σε μη-αυτογενή είδη ή μετά την εμφάνιση των ενηλίκων των αυτογενών ειδών, ενώ ο *corpora cardiaca stimulating factor (CCSF)* απελευθερώνεται από την ωοθήκη (Borovsky,

1982; Lea and Van Handel, 1982). Οι Vgs των εντόμων συντίθενται στο σώμα σε μια διαδικασία που περιλαμβάνει σημαντικές δομικές τροποποιήσεις (π.χ., γλυκοσυλίωση, λιπιδίωση, φωσφορυλίωση, αποφωσφορυλίωση, πρωτεολυτική διάσπαση, κλπ) των νεοσυντιθέμενων πρωτεϊνών πριν από την έκκριση τους και τη μεταφορά τους στις ωσθήκες (review Hagedorn and Kunkel, 1979; Tufail and Takeda, 2008). Η *4-nitro-phenylphosphatase* (*pNPPase*) καταλύει την υδρόλυση των νιτροφενυλφωσφορικών αλάτων σε νιτροφαινόλες. Σε όξινο pH λειτουργεί πιθανόν όξινη φωσφατάση ενώ σε αλκαλικό pH λειτουργεί ως αλκαλική φωσφατάση. Στο kissing bug *Rhodnius prolixus*, η ενεργοποίηση της όξινη φωσφατάσης προκύπτει με τη γονιμοποίηση του ωαρίου και η *pNPPase* φαίνεται να εμπλέκεται στην αποφωσφορυλίωση της βιτελλίνης (Fialho et al., 2002). Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, η *pNPPase* θα πρέπει να ακολουθεί τα αυξημένα επίπεδα έκφρασης της *Yp* καθώς εμπλέκεται στην τροποποίησή της κατά τη μεταφορά στις ωσθήκες. Όσον αφορά τους ανθεκτικούς στο spinosad δάκους, τα αυξημένα επίπεδα της *Yp2* και σε μικρότερο βαθμό της *pNPPase*, που παρατηρήθηκαν στις ανθεκτικές μύγες είναι πολύ πιθανό να συνδέονται με γεγονότα που λαμβάνουν χώρα στο κυρίως σώμα που περιβάλλει τα κεφάλια των εντόμων και όχι με τον εγκέφαλο τους και ενδεχομένως να σχετίζεται με τη διατροφή τους και όχι με τις διαδικασίες που συνδέονται με την ανάπτυξη των εμβρύων. Επιπλέον, έχει αναφερθεί η ύπαρξη μιας φυσιολογικής σχέσης μεταξύ της δραστηριότητας της βιτελλογενίνης, της οξειδωτικής βλάβης και της θνησιμότητας, που υποδηλώνει έναν αντιοξειδωτικό ρόλο της βιτελλογενίνης. Σε πειράματα RNAi σε μέλισσες αποδείχθηκε ότι η έκφραση της βιτελλογενίνης συνδέεται με τα επίπεδα ανθεκτικότητας των μελισσών σε οξειδωτικό στρες (Seehuus et al., 2006). Στην ίδια μελέτη, η υπερβολική θνησιμότητα των μελισσών vg⁻ αποδείχθηκε ότι συνδέεται με κυτταρική βλάβη που περιελάμβανε μια σοβαρή οξειδωτική προσβολή στο κυρίως σώμα έπειτα από την έκθεση στο paraquat. Η αυξημένη έκφραση του γονιδίου *Yp2* στα ανθεκτικά στο spinosad έντομα *Bactrocera oleae* είναι ανάλογη με την παρατηρούμενη επίμονη παραγωγή της πρωτεΐνης vitellogenin-like στα ανθεκτικά στο

εντομοκτόνο mosquitofish *Gambusia affinis*. Υπό κανονικές συνθήκες, στα mosquitofish η Vg παράγεται κατά τη διάρκεια της αναπαραγωγικής περιόδου. Ωστόσο, τα ανθεκτικά στο εντομοκτόνο mosquitofish παράγουν την vitellogenin-like πρωτεΐνη όλο το χρόνο (Denison et al., 1981). Οι συγγραφείς προτείνουν ότι τα ξενοβιοτικά ενδέχεται να προκαλούν τον σχηματισμό της vitellogenin-like πρωτεΐνης προκειμένου να δεσμεύονται και να μεταφέρονται τα εντομοκτόνα. Τέλος, διερωτηθήκαμε αν η παρατηρούμενη υπερέκφραση του γονιδίου είναι μόνο θηλεοειδική. Στην πραγματικότητα, όπως ήταν αναμενόμενο η λειτουργική ανάλυση σε τρία θηλυκά και τρία αρσενικά έντομα των πληθυσμών SPIN, w-CAL, LAB και w-GR έδειξε αυξημένη έκφραση του *Yp2* μόνο στα κεφάλια από τα θηλυκά έντομα των πληθυσμών SPIN και w-CAL. Είναι ενδιαφέρον ότι η μεταβλητότητα εντός του ίδιου πληθυσμού ήταν πολύ υψηλή. Ενώ οι τιμές σχετικής έκφρασης για το w-GR και LAB ήταν κοντά στο μηδέν (από 0,0016 έως 0,0548 και από 0,00036 έως 0,00079, αντίστοιχα), οι τιμές σχετικής έκφρασης για τον w-CAL κυμαίνονταν από 3,265 έως 17,178 και για τον SPIN από 0,0075 έως 5,656. Λαμβάνοντας υπόψη ότι οι δάκοι του πληθυσμού SPIN τρέφονται με σταθερή διατροφή spinosad, η χαμηλή έκφραση του *Yp2* παρατηρείται σε ένα θηλυκό του SPIN (0,0075) που αποδεικνύει ότι η υψηλή έκφραση *Yp2* μπορεί να είναι προστατευτική, αλλά δεν είναι απαραίτητη για τους ανθεκτικούς στο spinosad θηλυκούς δάκους. Αντίθετα, δύο πρωτεΐνες αποθήκευσης, hexamerin larval protein 1 (HexL1) και η larval serum protein 1 (Lsp1), εμφάνισαν υποέκφραση. Στα ολομετάβολα έντομα, τα οποία περνούν από διαφορετικά στάδια, τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά που λαμβάνονται σε ένα στάδιο αλλά απαιτούνται και σε ένα άλλο απορροφούνται από τις πρωτεΐνες αποθήκευσης και μεταφέρονται σε όλα τα στάδια μέχρι να χρησιμοποιηθούν. Υπό αυτή την έννοια, αν ένα έντομο δεν τροφοδοτείται ή περιορίζει τη διατροφή του κατά τη διάρκεια ενός εξειδικευμένου σταδίου, οι δραστηριότητες του θα πρέπει να υποστηρίζονται από την πρόσληψη θρεπτικών συστατικών κατά τη διάρκεια ενός προηγούμενου σταδίου διατροφής. Για παράδειγμα, η ανάπτυξη του εμβρύου στα κουνούπια εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από ένα πλούσιο σε

πρωτεΐνες γεύμα αίματος. Από την άλλη πλευρά, τα έντομα που τρέφονται με νέκταρ πρέπει να λάβουν τη μέγιστη πρωτεΐνη που προορίζεται για τα έμβρυα κατά τη διάρκεια του προνυμφικού σταδίου και να την αποθηκεύσουν μέχρι τη σύνθεση των πρωτεϊνών της λεκίθου. Η αποθήκευση αυτή, γίνεται μέσω ποικίλων δομικά όμοιων εξαμερινών (hexamerins, άρθρα ανασκόπησης: Telfer and Kunkel, 1991; Kanost et al., 1990; Haunerland, 1996). Οι πρωτεΐνες αποθήκευσης δεν παράγονται μόνο κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης της προνύμφης. Τα ενήλικα θηλυκά του diamondback σκόρου, *Plutella xylostella*, συνθέτουν τις hexamerins λίγες ώρες μετά την εκκόλαψη έτσι ώστε να γίνει επανεγκλωβισμός των αμινοξέων που έχουν χρησιμοποιηθεί έως τότε (Wheeler et al., 2000). Οι hexamerins εμπλέκονται επίσης στη ρύθμιση της JH. Στους τερμίτες, οι hexamerins εμπλέκονται στην αποθήκευση των θρεπτικών και τη διατροφική σηματοδότηση και είναι επίσης γνωστό ότι δεσμεύουν τη JH (Tawfik et al., 2006). Θεωρείται ότι με την σύνδεσή τους οι hexamerins απομονώνουν τη JH, εμποδίζοντας έτσι την πρόκληση μετέπειτα συνεπειών στην έκφραση των γονιδίων που εμπλέκονται στην ανάπτυξη (Zhou et al., 2006). Πράγματι, σύμφωνα με την RNAi αποσιώπηση της hexamerin επηρεάστηκαν 15 από τα 17 μορφογενετικά σχετιζόμενα γονίδια που είναι μέλη ενός JH-responsive γονιδιωματικού δικτύου (Zhou et al., 2007). Επομένως, είναι άξιο απορίας γιατί οι πρωτεΐνες αποθήκευσης υποεκφράζονται στους ανθεκτικούς στο spinosad δάκους. Είναι εύλογο ότι οι ανθεκτικές μύγες του πληθυσμού w-CAL μύγες (και σε μικρότερο βαθμό ο λιγότερο ανθεκτικός πληθυσμός w-GR) έχουν αναπτύξει την ικανότητα να αποθηκεύουν επαρκείς ποσότητες των απαραίτητων αμινοξέων για την ενήλικη ζωή τους κατά τη διάρκεια των προνυμφικών σταδίων και να μην απαιτούν πρόσθετες αναπληρώσεις κατά την ενήλικη ζωή τους. Η διαθεσιμότητα αυτή των θρεπτικών συστατικών μπορεί να είναι απαραίτητη για την αντιμετώπιση των αυξημένων απαιτήσεων σε ενέργεια και το μεταβολισμό στο τοξικό περιβάλλον των ανθεκτικών εντόμων. Αντιθέτως, υπό κανονικές συνθήκες, όταν οι μύγες έχουν την πολυτέλεια να λαμβάνουν και να αποθηκεύουν τα αμινοξέα αργότερα στην ενήλικη ζωή τους, μπορούν να ενεργοποιήσουν τις πρωτεΐνες

αποθήκευσης τους μετά από ένα γεύμα. Ωστόσο για να αποδειχθεί ο ισχυρισμός αυτός, περαιτέρω λεπτομερή πειράματα θα πρέπει να πραγματοποιηθούν ώστε να εκτιμηθεί η έκφραση των γονιδίων αποθήκευσης και των σχετικών γονιδίων κατά τη διάρκεια των σταδίων της προνύμφης, νύμφης και ενήλικου, υπό διαφορετικές διατροφικές συνθήκες.

1.2.3 Γονίδια που σχετίζονται με το ανοσοποιητικό σύστημα, την αποτοξίνωση και το στρες

Έξι γονίδια που εμπίπτουν σε αυτή την κατηγορία κέντρισαν το ενδιαφέρον μας. Ο πρώτος γενετικός τύπος που μελετήθηκε ήταν το γονίδιο *Serine protease 6 (SP6)*. Ενώ ο ρόλος των άλλων ενζύμων αποτοξίνωσης στην ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα είναι πλήρως κατανοητός, η συμμετοχή των πρωτεασών και πρωτεασών της σερίνης δεν είναι. Οι πρωτεάσες εμπλέκονται στην πέψη των πρωτεϊνών έξω από τα κύτταρα και στην έκφραση και τη ρύθμιση των κυτταρικών πρωτεϊνών (Wilkins et al., 1998). Οι κυτταρικές πρωτεάσες λειτουργούν για να δημιουργήσουν βιολογικά ενεργά μόρια ή να καταστρέψουν βιολογικώς δραστικές πρωτεΐνες και πεπτιδία (Bond and Butler, 1987; Rivett, 1990). Επιπλέον, τα συστήματα/μονοπάτια μεταγωγής σηματοδότησης που ελέγχονται από τους υποδοχείς των G πρωτεϊνών (GPCRs), πρωτεϊνική κινάση/φωσφατάσες και πρωτεάσες εμπλέκονται στη ρύθμιση του γονιδίων P450s (Li et al., 2013). Έχει μεγάλο ενδιαφέρον ότι αυξημένα επίπεδα όλων των κυτταροπλασματικών και λυσοσωμικών πρωτεασών ανιχνεύθηκαν στις ανθεκτικές στο spinosad μύγες της *M. domestica* 48 ώρες μετά την έκθεση τους στο spinosad σε επίπεδο δόσης LD50 (Saleem et al., 2009), που υποδεικνύουν ότι οι πρωτεάσες εμπλέκονται στην ανάπτυξη της ανθεκτικότητας στο spinosad στην οικιακή μύγα. Δύο γονίδια *Serine protease (trypsin και chymotrypsin)* έχουν επίσης δείξει ότι έχουν τρεις φορές υψηλότερη έκφραση σε ανθεκτικά στο deltamethrin κουνούπια *Culex pipiens pallens* (Gong et al., 2005). Τα δύο αυτά ένζυμα σε περαιτέρω ανάλυση αποδείχθηκε πως υδρολύουν το deltamethrin (Yang et al., 2008). Επιπλέον, η υπερέκφραση των *Serine proteases* έχει τεκμηριωθεί

σε ανθεκτικά στο permethrin κουνούπια *Culex quinquefasciatus* (Liu et al., 2012). Τέλος, στο κουνούπι *Aedes aegypti*, οι *Serine proteases* εκφράζονται επίσης στους σιελογόνους αδένες και θεωρείται ότι έχουν έναν αμυντικό ρόλο εναντίον της ανάπτυξης των βακτηρίων που προσλαμβάνονται με το σάλιο κατά τη διάρκεια των γευμάτων με ζάχαρη (Marinotti et al., 1990; Valenzuela et al., 2002). Στο δάκο της ελιάς, το επίπεδο της *Serine protease* δ στους ανθεκτικούς πληθυσμούς SPIN και w-CAL είναι σημαντικά αυξημένο σε σύγκριση με τον ευαίσθητο εργαστηριακό πληθυσμό LAB, ενώ ο φυσικός ευαίσθητος πληθυσμός w-GR έχει επίσης σημαντική έκφραση. Προφανώς, οι *Serine proteases* απαιτούνται όχι μόνο για την πέψη των περίπλοκων θρεπτικών συστατικών στους άγριους πληθυσμούς του δάκου, σε σύγκριση με την τυποποιημένη διατροφή του εργαστηρίου, αλλά μπορούν επίσης να συμμετέχουν στην άμυνα εναντίον των βακτηριακών παθογόνων που προκύπτουν κατά την σίτιση τους. Μια οικογένεια πρωτεϊνών *oxidase/peroxidase* βρέθηκε να υποεκφράζεται στο τρανσκριπτόμα του στελέχους SPIN. Ωστόσο, σε περαιτέρω συγκρίσεις μεταξύ των LAB, w-GR και w-CAL πληθυσμών, η τάση αυτή αντιστράφηκε και αποδείχθηκαν υψηλότερα επίπεδα έκφρασης στις μύγες από τον πληθυσμό w-CAL. Αν και τέτοιες πρωτεΐνες παρουσιάζουν τις ιδιότητες της δέσμευσης μεταξύ πρωτεΐνης-πρωτεΐνης και είναι γνωστό ότι εμπλέκονται σε μηχανισμούς άμυνας (όπως η ενδοκυτταρική φαγοκυττάρωση των κυττάρων απόπτωσης ή ξένων υλικών) (Soudi et al., 2012), το συγκεκριμένο γονίδιο δεν αξιολογήθηκε περαιτέρω. Ένα ακόμη γονίδιο, το *macrophage mannose receptor* (*MMR*) βρέθηκε επίσης να έχει υποέκφραση στον ανθεκτικό πληθυσμό SPIN. Το γονίδιο *MMR* είναι ένας C-τύπου υποδοχέας λεκτίνης και ανήκει σε μια οικογένεια υποδοχέων που δεσμεύουν τους επιφανειακούς υδατάνθρακες και για τη σύνδεση αυτή απαιτείται το ασβέστιο. Στους ανθρώπους είναι γνωστό ότι αναγνωρίζουν τα τμήματα υδατανθράκων των μικροβίων, όπως επίσης και προϊόντα που σχετίζονται με την αίσθηση και που προέρχονται από κύτταρα που πεθαίνουν και μεταδίδουν σήματα φλεγμονής που ρυθμίζουν το ανοσοποιητικό σύστημα (Cambi and Figdor, 2009). Από την άλλη πλευρά, στα

καρκινοειδή πιστεύεται ότι εμπλέκονται στην ρύθμιση της ασβεστοποίησης του εξωσκελετού (Kuballa and Elizur, 2008). Στην ίδια μελέτη, τα μέλη της υπερικογένειας *serine protease* μεταβάλλουν επίσης την έκφρασή τους κατά τη διάρκεια των διαφόρων σταδίων molting. Στα έντομα, οι secretory C-type lectins πιστεύεται ότι έχουν σημαντικό ρόλο στις αλληλεπιδράσεις των κυττάρων κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης (Kawaguch et al., 1991). Επιπρόσθετα, θεωρούνται σημαντικές στο ανοσοποιητικό σύστημα, συμπεριλαμβανομένης της ανίχνευσης και εξουδετέρωσης των παθογόνων και των ξένων υλικών σε διάφορα είδη εντόμων (Natori, 2001). Στο κουνούπι *Aedes aegypti* και τη σαρκοφάγο μύγα *Sarcophaga peregrina*, οι λεκτίνες τύπου-C εκφράζονται στους σιελογόνους αδένες και θεωρείται ότι ελέγχουν τα βακτηριακά παθογόνα από τα λαμβανόμενα γεύματα (Marinotti et al., 1990; Valenzuela et al., 2002; Grossman and James, 1993; Yamamoto-Kihara and Kotani, 2004). Στο τρανσκριπτόμα του δάκου της ελιάς βρέθηκε το γονίδιο *macrophage mannose receptor* να έχει υποέκφραση στον πληθυσμό SPIN, αλλά η τάση αυτή αντιστράφηκε κατά τη λειτουργική ανάλυση των πληθυσμών LAB, w-GR και w-CAL και, ως εκ τούτου, δεν μπορούν να αξιολογηθούν πριν από περαιτέρω αναλύσεις. Το γονίδιο *Salivary cys rich peptide* που η πρωτεϊνική του δομή αντιστοιχεί στον παράγοντα von Willebrand (vWF) βρέθηκε να έχει υπερέκφραση στα ανθεκτικά στο spinosad έντομα. Η πλειονότητα των πρωτεϊνών που περιέχουν τη δομή vWF είναι εξωκυτταρικές. Ωστόσο, στα ευκαρυωτικά κύτταρα οι πιο παλιές είναι τμήματα των ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην μεταγραφή, την επιδιόρθωση του DNA, τη ριβοσωμική και μεμβρανική μεταφορά και το πρωτεάσωμα. Ο vWF τείνει να συνδέεται με άλλες πρωτεΐνες συνεπώς εμφανίζεται να εμπλέκεται σε πολυπρωτεϊνικά σύμπλοκα. Στα έντομα, τεράστιες πρωτεΐνες που περιέχουν vWF, όπως οι αιμολεκτίνες στη *D. melanogaster* και οι αιμοκυτίνες στο *B. mori*, θεωρείται ότι δρουν σε διεργασίες όπως θρομβώσεις της αιμολέμφου ή σε συσσωματώματα των αιμοκυττάρων, όπως ο σχηματισμός των οζιδίων (Lesch et al. 2007; Arai et al., 2013). Τέτοιες διεργασίες αποτελούν θεμελιώδεις αντιδράσεις της

έμφυτης ανοσίας των εντόμων, προκειμένου να καταπολεμήσουν τους μικροοργανισμούς από την αιμοκήλη (hemocoel). Ενδεχομένως, για τα ανθεκτικά στο spinosad έντομα (SPIN) να μπορούσε να προβλεφθεί παρόμοια δράση. Η υπερέκφραση του γονιδίου *Salivary cys rich peptide* είναι σύμφωνη με την υπερέκφραση των παραπάνω γονιδίων που εμπλέκονται σε μηχανισμούς άμυνας. Η λειτουργική ανάλυση των πληθυσμών δάκου LAB, w-GR και w-CAL επιβεβαίωσε σημαντική υποέκφραση στον ευαίσθητο εργαστηριακό πληθυσμό LAB.

Επιπρόσθετα, ο γενετικός τόπος που μελετήθηκε επίσης ήταν ο *CytochromeP450 6a23-like* (*Cyrb6a23*). Το γονίδιο αυτό ανήκει στην υπεροικογένεια των μονοοξυγενασών οι οποίες καταλύουν την οξειδωση των οργανικών ουσιών. Επίσης, εμπλέκονται στο μεταβολισμό των φαρμάκων και τη βιοενεργοποίηση περίπου του 75% όλων των διαφορετικών μεταβολικών αντιδράσεων (Guengerich, 2008). Τα P450s έχουν εμπλακεί στην ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα έναντι διαφόρων ουσιών (reviews: Feyereisen, 1999; Scott, 1999; Li et al., 2007). Ο ρόλος τους στην αποτοξίνωση του spinosad έχει υποθεθεί τουλάχιστον για τα έντομα *Helicoverpa armigera* (Wang et al., 2009), *Musca domestica* (Markussen and Kristensen, 2012) και *Bombus huntii* (Xu et al., 2013), ενώ έχει αμφισβητηθεί στη *Drosophila melanogaster* (Willoughby et al., 2006). Ο γενετικός τόπος *Cyrb6a23* είχε ιδιαίτερα υψηλή υπερέκφραση στη ανάλυση RNA-seq στον ανθεκτικό στο spinosad πληθυσμό του δάκου SPIN (232,692-φορές), αν και όχι στατιστικά σημαντική, καθώς δεν πληροί τα κριτήρια (p value = 0.0003877, q value = 0.109514). Κατά τη qRT-PCR σε τρία θηλυκά και τρία αρσενικά έντομα των πληθυσμών SPIN, LAB, w-CAL και w-GR αποδείχθηκε κατά μέσο όρο, αυξημένο επίπεδο έκφρασης στους πληθυσμούς SPIN και τον w-CAL σε σύγκριση με τον πληθυσμό LAB. Ωστόσο, ο πληθυσμός w-GR είχε ενδιάμεσα επίπεδα έκφρασης. Δύο στοιχεία πρέπει να σημειωθούν σε αυτό το σημείο. Αρχικά, η μεγάλη διακύμανση των επιπέδων του *Cyrb6a23*. Σε ορισμένα άτομα του πληθυσμού SPIN το επίπεδο έκφρασης του *Cyrb6a23* ήταν χαμηλότερο σε σύγκριση με εκείνο ορισμένων ατόμων του πληθυσμού LAB. Ωστόσο, δεδομένου ότι το RNA για την RNA-seq λήφθηκε από ένα σύνολο

ανάμειξης 40 θηλυκών και 40 αρσενικών ατόμων δάκου, το αποτέλεσμα του RNA-seq πιθανόν και αντικατοπτρίζει το μέσο όρο της έκφρασης του πληθυσμού. Επιπλέον, τα επίπεδα έκφρασης των P450s ποικίλλουν κατά τη διάρκεια του κύκλου ζωής του εντόμου (Xu et al., 2013) και η παρατηρούμενη διακύμανση της έκφρασης του *Cyrb6a23* στη μύγα της ελιάς μύγα μπορεί να αντικατοπτρίζει τον μη συγχρονισμό των στάδιο της ζωής τους. Δεύτερον, τα έντομα του πληθυσμού w-GR είχαν κατά μέσο όρο ενδιάμεσα επίπεδα έκφρασης του γενετικού τόπου *Cyrb6a23*. Όπως αναφέρεται στην ενότητα των Υλικών και Μεθόδων, ακόμη και αν οι μύγες ελήφθησαν από ένα μόνο αγρό χωρίς τη χρήση χημικών στην Ελλάδα, η αναλογία της ανθεκτικότητάς τους ήταν τρεις φορές υψηλότερη από εκείνη των δάκων του εργαστηριακού ευαίσθητου πληθυσμού LAB και ως εκ τούτου, ο w-GR δεν μπορεί να θεωρηθεί ως μια πηγή πραγματικά ευαίσθητων στο spinosad εντόμων.

Παράλληλα, δύο πρωτεΐνες Heat shock, οι *Hsp70* και *Hsp23*, βρέθηκαν να έχουν υποέκφραση στο τρανσκριπτόμα του πληθυσμού SPIN, κάτι που δεν επιβεβαιώθηκε έπειτα από τη λειτουργική ανάλυση. Οι πρωτεΐνες *Hsp70* είναι πολύ συντηρημένες και εκφράζονται γενικά σχεδόν σε όλους τους ζωντανούς οργανισμούς, καθώς είναι πολύ σημαντικές στην αναδίπλωση και το ξεδίπλωμα των πρωτεϊνών, την αποτοξίνωση των φυτοφαρμάκων και των βαρέων μετάλλων. Το γονίδιο *Hsp23* ανήκει σε μια υπεροικογένεια lens alpha crystalline-related, και επίσης βρίσκεται στα κύτταρα των σιελογόνων αδένων της *D. melanogaster* (Arrigo and Ahmad-Zadeh, 1981). Σε όλες τις αναφερόμενες περιπτώσεις στρες και αποτοξίνωσης όπου συμμετείχαν οι *Hsp*, τα μετάγραφα τους ήταν ισχυρά υπερεκφραζόμενα. Ωστόσο, προκειμένου να αποσαφηνιστεί ο ρόλος τους στην ανθεκτικότητα στο spinosad στο δάκο της ελιάς θα πρέπει να γίνουν περαιτέρω πειράματα.

Ένας ακόμη γενετικός τόπος που μελετήθηκε ήταν ο *Antigen 5 precursor* (*Ant5*). Το συγκεκριμένο γονίδιο εμφανίζει ομοιότητα με το *Antigen 5-related 2 gene* (*Agr2*) της *Drosophila*. Οι πρωτεΐνες *Agr2* ανήκουν στην οικογένεια των CAP πρωτεϊνών, οι οποίες περιλαμβάνουν τις πρωτεΐνες των θηλαστικών Cysteine-rich secretory, τις πρωτεΐνες του δηλητηρίου

της σφήκας Antigen 5 και τις πρωτεΐνες της ομάδας 1 των φυτών Pathogenesis-related. Το προϊόν του γονιδίου της *Drosophila melanogaster* το ορθόλογο *Agr2* υποδεικνύεται πως λειτουργεί είτε ως ένα νέο είδος του αναστολέα της πρωτεάσης ή ως αντιμικροβιακή πρωτεΐνη (Megraw et al., 1998). Στην παρούσα μελέτη, το *Ant5* είχε υπερέκφραση στο τρανσκριπτώμα του πληθυσμού SPIN. Ωστόσο, η περαιτέρω λειτουργική ανάλυση έδειξε υπερέκφραση του γενετικού τόπου τόσο στον πληθυσμό w-GR αλλά και στον πληθυσμό w-CAL.

Επίσης, μελετήθηκε ο γενετικός τόπος *Chitinase 5* (*Chit5*). Στα έντομα, η χιτίνη είναι πρωτεΐνη του κριώματος, παρέχοντας τόσο εξω- και ενδο-υποστήριξη στα επιδερμικά κύτταρα της τραχείας και της περιτροφικής μεμβράνης που επιστρώνει το επιθήλιο του στομάχου (Merzendorfer and Zimoch, 2003). Οι χιτινάσες του μεσοστόμαχου φαίνεται να εμπλέκονται στο σχηματισμό, τη διάτρηση και την αποικοδόμηση της περιτροφικής μεμβράνης του μεσοστόμαχου, η οποία προστατεύει το επιθήλιο του στομάχου από επιβλαβείς παράγοντες, τοξίνες και παθογόνα (Peters, 1992; Shen and Jacobs-Lorena, 1997; Filho et al., 2002). Οι χιτινάσες έχουν επίσης προταθεί ως βιο-εντομοκτόνα, καθώς διαγονιδιακά φυτά που εκφράζουν χιτινολυτικά ένζυμα ενισχύουν την αποτελεσματικότητα άλλων βιολογικών τοξινών (π.χ. Bt ή μυκοξίνες) (Kramer and Muthukrishnan, 1997; Herrera-Estrella and Chet, 1999). Στο δάκο της ελιάς, ο γενετικός τόπος *Chit5* είχε υποέκφραση στο τρανσκριπτώμα του πληθυσμού SPIN και βρέθηκε να υποεκφράζεται στον πληθυσμό w-CAL. Λαμβάνοντας υπόψη τον προαναφερθέντα ρόλο των χιτινασών, μπορούμε να υποθέσουμε ότι με την υποέκφραση των γονιδίων της χιτινάσης οι ανθεκτικοί στο spinosad δάκοι μειώνουν τη διείσδυση του spinosad, αυξάνοντας έτσι την ανθεκτικότητα.

Τέλος, μελετήθηκε ο γενετικός τόπος *Cell division cycle-associated protein 7* (*Cdc*). Το γονίδιο αυτό ανήκει στην HAD-υπερομάδα υδρολάσης, σύμφωνα με το Interpro (InterPro). Η RNA-seq ανάλυση έδειξε ότι ο γενετικός τόπος *Cdc* είχε υποέκφραση στο τρανσκριπτώμα του πληθυσμού SPIN. Ωστόσο, μετά από τη λειτουργική ανάλυση το αποτέλεσμα του RNA-seq δεν επιβεβαιώθηκε, δεδομένου ότι τόσο ο ανθεκτικός πληθυσμός w-CAL αλλά και ο ευαίσθητος

w-GR είχαν υπερέκφραση του γονιδίου σε σύγκριση με τα έντομα του ευαίσθητου πληθυσμού LAB. Ως εκ τούτου, απαιτείται περαιτέρω ανάλυση προκειμένου να διευκρινιστεί ο ρόλος του γονιδίου *Cdc* στην ανθεκτικότητα στο spinosad.

1.3 Σύνοψη εμπλεκόμενων γονιδίων του δάκου που απομονώθηκαν κατά την παρούσα έρευνα

Ο φυλοδιαχωρισμός στα ενήλικα άτομα του δάκου σε επίπεδο μορφολογικών χαρακτηριστικών είναι εφικτός, ωστόσο όμως σε πρώιμο στάδιο (αυγά, προνύμφη και νύμφη) ο προσδιορισμός του φύλου δεν είναι εφικτός. Με την παρούσα έρευνα όμως προσπαθήσαμε να ανακαλύψουμε σε μοριακό επίπεδο μηχανισμούς και μονοπάτια που εμπλέκονται στο φυλοδιαχωρισμό του δάκου της ελιάς. Συνοψίζοντας τα παραπάνω δεδομένα, η προσέγγιση που ακολουθήθηκε αποκάλυψε πλειάδα γενετικών τόπων που εμφάνισαν υπερέκφραση σε αρσενικά και θηλυκά άτομα δάκου. Η εστιασμένη μελέτη σε συγκεκριμένα γονίδια με γνωστό τρόπο δράσης οδήγησε στην ανακάλυψη γενετικών τόπων εμπλεκόμενων σε συστήματα φυλοδιαχωρισμού στο δάκο της ελιάς. Τα σημαντικότερα γονίδια που επιλέχθηκαν για περαιτέρω μελέτη σύμφωνα με τη βιβλιογραφία εδράζονται στο Y χρωμόσωμα σε συγγενικά είδη εντόμων και εμπλέκονται στη σπερματογένεση και την κινητικότητα του σπέρματος. Ήδη η διαπίστωση αυτή μπορεί να αποφέρει νέα δεδομένα για το ελάχιστα εξερευνημένο σε επίπεδο γονιδιώματος έντομο, *Bactrocera oleae*. Καταφέραμε και εντοπίσαμε γονίδια που υπερεκφράζονται μόνο στο ένα από τα δύο φύλα ενώ η υπόθεση μας επιβεβαιώθηκε τόσο πειραματικά αλλά κυρίως και βιβλιογραφικά. Έτσι μέσα από ένα φάσμα γενετικών τόπων που αναλύθηκαν συμπεραίνουμε ότι τα γονίδια *kl2* (*male fertility factor, kl2*), *kl3* (*male fertility factor, kl3*), *kl5* (*male fertility factor, kl5*), *ory* (*occludin-related Y protein*), *fem-1* (*sex-determining protein fem-1*), *gas8* (*growth arrest specific protein 8*) και *lobo* (*lost boys*) και υπερεκφράζονται στα αρσενικά άτομα, μπορούν να μας οδηγήσουν με σιγουριά στην επιβεβαίωση ενός φυλοδιαχωριστικού μοντέλου. Αντίστοιχα, στο πλαίσιο μελέτης των μηχανισμών ανθεκτικότητας στο spinosad για το δάκο

της ελιάς προέκυψαν σημαντικά δεδομένα. Η προσαρμογή και η επιβίωση των δάκων στο τροποποιημένο περιβάλλον που προκαλείται από το στρες λόγω της χρήσης εντομοκτόνων φαίνεται να είναι συνέπεια των αλλαγών στην έκφραση πολλαπλών γονιδίων, που επηρεάζει από κοινού τα βιολογικά και φυσιολογικά μονοπάτια. Η αντίληψή μας για την ανάπτυξη της ανθεκτικότητας των εντόμων στα εντομοκτόνα, που κατά παράδοση αποδίδεται είτε στη μεταβολή της θέσης-στόχου ή στην υπερέκφραση διαφόρων γονιδίων αποτοξίνωσης (όπως P450s, εστεράσες και GSTs), έχει αλλάξει πρόσφατα σύμφωνα με την ικανότητά μας να εξετάσουμε τέτοια ερωτήματα με ένα πιο ολιστικό τρόπο μέσω της τρανσκριπτομικής ανάλυσης. Αυτό μας δίνει την ευκαιρία να εξεταστούν τα διαφορετικά ρυθμιστικά δίκτυα των γονιδίων που έχουν αλληλεπίδραση μέσω σύνθετων μηχανισμών. Στην παρούσα διατριβή, διεξήχθη συγκριτική ανάλυση του τρανσκριτώματος μεταξύ των ευαίσθητων και ανθεκτικών στο spinosad δάκων, προκειμένου να διερευνηθούν και να εντοπιστούν γενετικοί τύποι και μοριακοί μηχανισμοί που ενδέχεται να συμμετέχουν στην ανθεκτικότητα στο spinosad. Οι παρατηρούμενες τροποποιήσεις στο επίπεδο του RNA καθώς και οι λειτουργικές αναλύσεις και οι βιοδοκιμές, δείχνουν τις πολυεπίπεδες επιπτώσεις που έχει το εντομοκτόνο στη φυσιολογία του εντόμου. Τα αποτελέσματά μας αποδεικνύουν ότι η αντίδραση του οργανισμού στον νέο στρεσογόνο περιβαλλοντικό παράγοντα επηρεάζει κυρίως τα μονοπάτια μεταβολισμού ενέργειας, αντίδρασης του ανοσοποιητικού συστήματος και αποτοξίνωσης. Τα μονοπάτια οξειδωτικού, ξενοβιοτικού και αντίδρασης του ανοσοποιητικού συστήματος λόγω στρες φαίνεται ότι συντονίζονται, οδηγώντας στη ρύθμιση πολυάριθμων κυτταρικών και βιολογικών ή φυσιολογικών διεργασιών. Ωστόσο, περαιτέρω μελέτες απαιτούνται για να καθοριστούν οι μοριακοί μηχανισμοί αλλά και η σπουδαιότητα αυτής της πολλαπλής ρύθμισης.

2. Πρωτεομική ανάλυση

2.1 Ανάλυση των αποτελεσμάτων της πρωτεομικής στο δάκο της ελιάς

Η πρωτεομική ανάλυση στο δάκο της ελιάς εφαρμόστηκε για πρώτη φορά στην παρούσα μελέτη. Η προσέγγιση αυτή συνέβαλε ουσιαστικά στην αποκάλυψη πρωτεϊνών και πεπτιδίων που εμπλέκονται στους μηχανισμούς φυλοδιαχωρισμού του εντόμου αυτού. Αρχικά, χρησιμοποιήθηκε η προσέγγιση της ηλεκτροφόρησης δύο διαστάσεων (2D-PAGE) ανάμεσα σε κεφάλια από αρσενικά και θηλυκά άτομα δάκου. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν δεν πιστοποιήσαν πρωτεΐνες και προϊόντα μετάφρασης που εμπλέκονται στο φυλοδιαχωρισμό. Αντίθετα, από τα αποτελέσματα προέκυψαν πρωτεΐνες που ανήκουν σε ομάδες αποτοξίνωσης λόγω οξειδωτικού στρες, σε λειτουργικές ομάδες όπως μεταβολισμού, κυττοσκελετού, συναπτοσώματος και μεταγωγής σήματος. Πιο συγκεκριμένα, οι πρωτεΐνες που εντοπίστηκαν να υπερεκφράζονται στα θηλυκά έντομα είναι οι 14-3-3ε, 14-3-3ζ, Ranbp 21, Peroxiredoxin, Actin87E, Actin5C, GstD1-PA και GstD9-PA, ενώ στα αρσενικά έντομα εντοπίστηκαν να υπερεκφράζονται οι πρωτεΐνες Ισοκιτρική DH και Arg-κινάση. Ο ρόλος των συγκεκριμένων πρωτεϊνών δεν οδήγησε σε κάποιο αξιόλογο συμπέρασμα ώστε να γίνει εντοπισμός κάποιου μονοπατιού φυλοδιαχωρισμού. Οι πρωτεΐνες 14-3-3 είναι μικρές διμερείς όξινης πρωτεΐνες που είναι υψηλά συντηρημένες σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα (Wang and Shakes, 1996; Ferl et al., 2002; Gardino et al., 2006). Πολλά μέλη της οικογένειας υπάρχουν στα μετάζωα όπου χαρακτηρίζονται από εξαιρετικά υψηλή ομοιότητα των αλληλουχιών μεταξύ των ομόλογων ισοτύπων από διαφορετικά είδη. Παρά το γεγονός ότι οι πρωτεΐνες είναι ιδιαίτερα άφθονες στο νευρικό σύστημα, υπάρχουν επίσης με ένα φαινομενικά ισοτυπο-ειδικό τρόπο σε πολλούς άλλους ιστούς συμπεριλαμβανομένων πολλών οργάνων και αδένων, στον αμφιβληστροειδή, τις ωοθήκες και τους όρχεις σε σπονδυλωτά και ασπόνδυλα (Wang and Shakes, 1996; Ferl et al., 2002; Aitken et al., 1992). Η *Drosophila* περιέχει μόνο δύο γονίδια 14-3-3, το *leonardo*, ένα ορθόλογο της 14-3-3ζ των θηλαστικών και το *D14-3-3ε* (Skoulakis and Davis, 1998). Οι πρωτεΐνες 14-3-3 αλληλεπιδρούν με ποικίλες

κυτταρικές πρωτεΐνες κυρίως με τη σύνδεση με φωσφορυλιωμένες σερίνες ή θρεονίνες σε συγκεκριμένα μοτίβα και σχετίζονται με πολλές κυτταρικές διεργασίες και λειτουργίες (Morrison 2009; Van Hemert et al., 2001). Η πρωτεΐνη SNAP-25 είναι εξελικτικά συντηρημένη και ανήκει στην ομάδα των πρωτεϊνών που εμπλέκονται στον υποδοχέα των συναπτικών κυστιδίων στις νευρικές απολήξεις. Στη *D. melanogaster* η SNAP-25 έχει μια σύνθετη οργάνωση με οκτώ εξόνια που συνολικά εκτείνονται σε περισσότερες από 120 kb (Risinger et al., 1997). Η πρωτεΐνη Ranbp 21 που βρέθηκε να υπερεκφράζεται στα θηλυκά άτομα δάκου συμμετέχει στην ενδοκυτταρική μεταφορά των πρωτεϊνών. Σύμφωνα με το Interpro η πρωτεΐνη Ranbp 21 υπάγεται στον τομέα/μοτίβο με την Importin-beta N-terminal domain. Τα μέλη της οικογένειας Importin-beta (karyopherin-beta) μπορούν να δεσμεύουν και να μεταφέρουν φορτία, ή μπορούν να σχηματίσουν ετεροδιμερή με την importin-alpha (Interpro). Επίσης, υπερέκφραση στα θηλυκά έντομα βρέθηκε να έχει και η Peroxiredoxin (thioredoxin peroxidase 1) που εμπλέκεται στη ρύθμιση της οξειδοαναγωγής του κυττάρου. Ανήκει σε μια ευρεία οικογένεια αντιοξειδωτικών ενζύμων που ελέγχει τα επηρεαζόμενα επίπεδα του υπεροξειδίου από την κυτοκίνη. Παράλληλα, μπορεί να έχει σημαντικό ρόλο στην εξάλειψη των υπεροξειδίων που παράγονται κατά το μεταβολισμό. Κυρίως προτιμάται ως αναγωγικό υπόστρωμα, η thioredoxin 2 αντί της thioredoxin 1 (UniProt). Στο γονιδίωμα της *D. melanogaster* έχουν ταυτοποιηθεί πέντε γονίδια (Radyuk et al., 2001). Η ακτίνη (actin) είναι μία κύρια πρωτεΐνη συστολής που βρίσκεται σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα, αντιπροσωπεύοντας το 1-2% του συνόλου των κυτταρικών πρωτεϊνών. Ως το βασικό συστατικό των λεπτών νηματίων, η ακτίνη είναι μία από τις κύριες πρωτεΐνες που είναι υπεύθυνες για τη σύσπαση των μυών. Επιπλέον, η ακτίνη είναι σημαντική σε πολλές κυτταρικές διεργασίες, συμπεριλαμβανομένης της κινητικότητας των κυττάρων, της κυτοκίνησης και της μορφογένεσης (για reviews: Pollard and Weihing 1974; Korn 1978). Στη *D. melanogaster* η οικογένεια των γονιδίων της ακτίνης αποτελείται από έξι υψηλά

συντηρημένα γονίδια, που βρίσκονται παντού κατανεμημένα σε ολόκληρο το γονιδίωμα (Tobin et al 1980; Fyrborg et al. 1980), που συμμετέχουν τόσο σε αναπτυξιακά στάδια όσο και σε ιστοειδική έκφραση. Τα μοτίβα έκφρασης των επιμέρους γονιδίων υποδεικνύουν διαφορετικούς λειτουργικούς ρόλους για τις διάφορες ακτίνες. Το γονίδιο *actin5C* κωδικοποιεί τις ακτίνες του κυτταροπλάσματος, ενώ το γονίδιο *actin 87E* κωδικοποιεί ενδοκυτταρικά των μυών τις ακτίνες στις προνύμφες και τα ενήλικα (Zulauf et al., 1981; Sanchez et al., 1983; Fyrborg et al., 1983). Τέλος, υπερέκφραση στα θηλυκά άτομα δάκου είχαν οι πρωτεΐνες GstD1-PA, GstD9-PA. Γενικά, υπάρχουν αρκετά μέλη της οικογένειας γονιδίων *Gst* που είναι γνωστό ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στην αποτοξίνωση σε πολλά είδη, συμπεριλαμβανομένων των εντόμων (Enayati et al., 2005). Οι GSTs γενικά λειτουργούν σε υδρόφοβες οργανικές ενώσεις, που μεταβάλλουν την υδροφοβικότητά τους (Atkins et al., 1993). Στη *D. melanogaster* (Tang and Tu, 1994), καθώς και στο κουνούπι *Anopheles gambiae* (Ranson et al., 2001), το γονίδιο *GstD1* έχει μεγάλη δραστηριότητα και θεωρείται ότι εμπλέκεται στην ανθεκτικότητα στο DDT. Αντίστοιχα, στα αρσενικά άτομα δάκου βρέθηκαν να υπερεκφράζονται οι πρωτεΐνες IDH (Isocitrate Dehydrogenase) και ArgK-PB. Η Isocitrate dehydrogenase ή αλλιώς NADP⁺-εξαρτόμενη isocitrate dehydrogenase (NADP⁺-IDH, EC 1.1.1.42) καταλύει την οξειδωτική αποκαρβοξυλίωση του isocitrate σε αoxoglutarate με την ταυτόχρονη παραγωγή του NADPH. Η NADP⁺-IDH στους ευκαρυώτες έχει σημαντικό ρόλο στη φυσιολογία που έχουν μελετηθεί πιο εντατικά στα θηλαστικά, τα φυτά και τους μύκητες (π.χ. *Saccharomyces cerevisiae*) (Plaut et al., 1983; Gonzalez-Villasoñor and Powers 1985; Loftus et al., 1994; Corpas et al., 1999; Koh et al., 2004; Contreras-Shannon and McAlister-Henn, 2004; Liu et al. 2006). Η NADP⁺-IDH έχει μελετηθεί ελάχιστα στα έντομα. Οι μέχρι τώρα γνώσεις αποδεικνύουν ότι η κυτταροπλασματική NADP⁺-IDH ως τώρα έχει απομονωθεί για την ομοιογένεια και έχει χαρακτηριστεί πριν από αρκετές δεκαετίες σε μόνο δύο είδη εντόμων: τη μύγα *D. melanogaster* (Williamson et al., 1980) και το μεταξοσκώληκα,

Bombyx mori (Miake et al., 1977a). Τέλος, η Arginine kinase (ATP:arginine phospho transferase; EC 2.7.3.3) καταλύει την αντίστροφη τρανσφοσφορυλίωση μεταξύ της N-phospho-L-arginine και του ADP (Ellington, 2001). Το γονίδιο *ArgK-PB* στη *D. melanogaster* φαίνεται πως συμμετέχει στη βιολογική διαδικασία της φωσφορυλίωσης (flybase). Επίσης, στη *Drosophila* η ArgK είναι πιθανόν να σχετίζεται με τμήματα των οργανιδίων που αντιστοιχούν είτε στην κυτοσολική ArgK που δεσμεύεται στην εξωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων ή πιο πιθανό με την κυτοσολική ArgK που συνδέεται με το σαρκοπλασματικό δίκτυο ή σε άλλες μεμβράνες (Wallimann et al., 1992).

3. Πεπτιδομική ανάλυση

Μια νέα προσέγγιση χρησιμοποιήθηκε επίσης με σκοπό την ανακάλυψη πεπτιδίων που υπερεκφράζονται σε αρσενικά και θηλυκά άτομα δάκου αντίστοιχα και την μετέπειτα συμμετοχή τους σε μηχανισμούς φυλοδιαχωρισμού. Αρχικά πραγματοποιήθηκε απομόνωση πεπτιδίων από όργανα αναπαραγωγής αρσενικών (όρχεις) και θηλυκών (σπερματοθήκες και FAGs) εντόμων και ακολούθησε φασματομετρία μάζας με τη χρήση MALDITOF-TOF. Στη συνέχεια, η επεξεργασία μέσω του MASCOT μας τροφοδότησε με εκατοντάδες πεπτίδια διαφορετικά εκφραζόμενα στα δύο φύλα του δάκου. Από την βιοπληροφορική ανάλυση για το αναπαραγωγικό σύστημα αρσενικών και θηλυκών εντόμων δάκου αποκαλύφθηκε πλήθος πρωτεϊνών και των αντίστοιχων γονιδίων που εκφράζονται μόνο στα θηλυκά και μόνο στα αρσενικά έντομα, αντίστοιχα. Στα θηλυκά έντομα, εντοπίστηκαν εννέα πρωτεΐνες και οι αντίστοιχοι γενετικοί τόποι ενώ στα αρσενικά τέσσερις πρωτεΐνες όπου ο ρόλος τους είναι ήδη γνωστός βιβλιογραφικά και σχετίζεται με τη σεξουαλική διαφοροποίηση στο στάδιο των γαμετικών κυττάρων. Συγκεκριμένα, στα θηλυκά έντομα οι γενετικοί τόποι με ενδιαφέρον για περαιτέρω μελέτη που εντοπίστηκαν είναι οι: *Chc*, *ph-p*, *wisp*, *BicC*, *lz*, *Egfr*, *EcR*, *Eip75B* και *Eip78C*. Αντίστοιχα, στα αρσενικά έντομα οι γενετικοί τόποι

που μελετήθηκαν είναι οι: *Trpm*, *lola*, *CaMKII* και *GalNAc-T2*. Αναλυτικά, ο τρόπος δράσης των δεκατριών πρωτεϊνών και των αντίστοιχων γονιδίων που εντοπίστηκαν στην παρούσα μελέτη παρατίθεται παρακάτω.

3.1 Πρωτεΐνες και γονίδια που εκφράζονται μόνο στα θηλυκά άτομα δάκου.

3.1.1 Πρωτεΐνη CLH, γονίδιο *Chc* (*Clathrin heavy chain*)

Στην *Drosophila* το γονίδιο *Chc* (*CG9012*) βρίσκεται στο χρωμόσωμα X (13F5) και περιέχει έξι δυνητικά μεταγραφικά παράγωγα, τα οποία διαφέρουν μόνο ως προς το μέγεθος του μη κωδικοποιημένου εξονίου ένα. Όλα τα μετάγραφα κωδικοποιούν μία μοναδική πρωτεΐνη της *Drosophila*, τη *Chc*. Η *Clathrin* παίζει σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό των επικαλυμμένων κυστιδίων κατά την ενδοκυττάρωση. Το γονίδιο *Bic-D* αλληλεπιδρά με το *Chc* και είναι απαραίτητο για τον ορθό εντοπισμό του *Chc* στα ωοκύτταρα. Στις μελέτες εντοπισμού και των δύο γονιδίων δύναται να αποκαλυφθεί μόνο εάν τα *Bic-D* και *Chc* βρίσκονται μαζί στον ίδιο κυτταρικό χώρο. Πράγματι, ένα τμήμα από το *Chc* εντοπίζεται μαζί με το *Bic-D* σε συγκεκριμένες περιοχές του ωαρίου. Σε αντίθεση με το νευρικό σύστημα, στο οποίο ο Li et al. περιγράφει τη *Chc* ως τη βασική *Bic-D*-συνδεδεμένη πρωτεΐνη στο κεφάλι της *Drosophila* (Li et al., 2010), ο Vazquez-Pianzola και οι συνεργάτες του (2014) διαπίστωσαν ότι η *Chc* είναι μία πρωτεΐνη που συμμετέχει μαζί με την *Bic-D* στις ωοθήκες και τα έμβρυα όπου οι λειτουργίες τους παρουσιάζουν σημαντική επικάλυψη. Η συσχέτιση της πρωτεΐνης *Bic-D* με την *Chc* οδήγησε τους Vazquez-Pianzola et al. (2014) να ανακαλύψουν ότι το γονίδιο *Bic-D* είναι απαραίτητο για την ενδοκυττάρωση στο ωοκύτταρο μέσω δύο διαφορετικών μηχανισμών. Ο πρώτος μηχανισμός αφορά ότι η *Bic-D* φαίνεται να εντοπίζει το mRNA του *Chc* στο ωοκύτταρο. Επιπλέον όμως, η *Bic-D* φαίνεται να μεταφέρει την πρωτεΐνη *Chc* στην οπίσθια εξωτερική στοιβάδα του ωοκυττάρου. Ένας μηχανισμός ανακύκλωσης της *Chc* μπορεί να είναι ενεργός στην εξωτερική στοιβάδα του ωαρίου, αλλά τα δεδομένα των Vazquez-Pianzola et al., 2014 συμφωνούν με τη λειτουργία της *Bic-D* στη μεταφορά

της Chc στο ωοκύτταρο και στη συνέχεια στην εξωτερική στοιβάδα του. Ωστόσο, ενώ φαίνεται πιθανό και οι δύο μηχανισμοί να είναι ενεργοί στα θηλυκά γαμετικά κύτταρα απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για να διευκρινιστεί η ξεχωριστή συμβολή τους και για να διαπιστωθεί εάν συμβαίνουν ταυτόχρονα ή διαδοχικά. Η αυξημένη, λοιπόν, έκφραση της πρωτεΐνης Chc στα θηλυκά άτομα δάκου υποδεικνύει ένα παρόμοιο ρόλο της πρωτεΐνης αυτής στις διεργασίες των γαμετικών κυττάρων των θηλυκών ατόμων δάκου.

3.1.2 Πρωτεΐνη PHP, γονίδιο *ph-p* (*polyhomeotic proximal*)

Ο γενετικός τόπος *ph* βρίσκεται στο X χρωμόσωμα στη θέση 2D 2-3 και αποτελείται από δύο διαφορετικές μονάδες (units) μεταγραφής, που ονομάζονται *polyhomeotic-distal* (*ph-d*) και *polyhomeotic-proximal* (*ph-p*) και αντιστοιχούν στο διαδοχικό διπλασιασμό του DNA (Dura et al., 1987; Deatrick et al., 1991). Το γονίδιο *polyhomeotic* (*ph*) της *Drosophila* είναι μέλος της ομάδας των γονιδίων Polycomb (Pc-G), τα οποία κωδικοποιούν τους μεταγραφικούς καταστολείς που απαιτούνται για τη διατήρηση του πρότυπου έκφρασης των ομοιοτικών γονιδίων κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη αλλά και των προνυμφών (Christen and Bienz, 1994; McKeon et al., 1994; Soto et al., 1995). Το γονίδιο *polyhomeotic* απαιτείται για τον πολλαπλασιασμό των σωματικών κυττάρων και τη διαφοροποίηση κατά τη διάρκεια σχηματισμού των ωοθυλακίων στη *Drosophila* (Narbonne et al., 2003). Επίσης, ο Narbonne et al., 2003 έδειξαν ότι η υπερέκφραση του γονιδίου *polyhomeotic* οδηγεί σε συγκεκριμένες ανωμαλίες στο σχηματισμό του ωοθυλακίου. Ενώ, παρόμοιος φαινότυπος με εκείνο που παρατηρήθηκε κατά τη μελέτη της υπερέκφρασης του *ph*, στα πολυκιστικά ωοθυλάκια (πολλές κύστες μέσα σε ένα ωοθυλάκιο), παρατηρήθηκε και για τα αλληλόμορφα που έχουν απώλεια της λειτουργίας του *ph*. Η έκφραση του γονιδίου *ph-p* μόνο στα θηλυκά άτομα δάκου της ελιάς οδηγεί στην υπόθεση για μια παρεμφερή λειτουργία και στο έντομο αυτό.

3.1.3 Πρωτεΐνη GLD2B, γονίδιο *wisp* (*wispy*) – Πρωτεΐνη BICC, γονίδιο *BicC* (*Bicaudal C*)

Το γονίδιο *wispy* (*wisp*) της *Drosophila* κωδικοποιεί την προβλεπόμενη κυτταροπλασματική πολυ (A) πολυμεράση που είναι μέλος της GLD-2 τάξης πρωτεϊνών. Επιπρόσθετα, βρέθηκε ότι το γονίδιο *wisp* είναι απαραίτητο κατά τη διάρκεια της ωογένεσης αλλά και της ενεργοποίησης του ωαρίου. Το *wisp* είναι απαραίτητο σε κάποιο τομέα της τουμπουλίνης του κυτταροσκελετού στα ωοκύτταρα και τα έμβρυα. Η επίδραση των μητρικών μεταλλάξεων του *wisp* έχει αναφερθεί ότι προκαλεί βλάβη στον εντοπισμό του bicoid mRNA και στις microtubule βασισόμενες δράσεις κατά τη μείωση στα θηλυκά, που οδηγεί σε πολύ πρόωμη αναπτυξιακά σύλληψη (Brent et al., 2000). Τα πρώιμα έμβρυα των θηλυκών με μετάλλαξη στο *wisp* είναι επίσης γνωστό ότι αδυνατούν να αποσταθεροποιήσουν τα μητρικά μετάγραφα, ένα φαινόμενο που δείχνει ελάττωμα στην ενεργοποίηση του ωαρίου (Tadros et al., 2003). Αυτό κυρίως οφείλεται στην αδυναμία στην έναρξη της μίτωσης μετά τη γονιμοποίηση και εμφανίζεται ως αποτέλεσμα σε ένα κομμάτι από ανωμαλίες που συμβαίνουν κατά τη διάρκεια της ολοκλήρωσης της μείωσης των θηλυκών κατά την απουσία της λειτουργίας του *wisp*. Το γονίδιο *Bic-C*, που είναι παρόν όπως και το *wisp* στα ωοκύτταρα και τα πρώιμα έμβρυα, απαιτείται για την πρόσθια και οπίσθια σχηματοποίηση κατά την ωογένεση (Mahone et al., 1995; Saffman et al., 1998). Ενώ, στη βλαστική σειρά, το *Bic-C* πρόσφατα έχει αναφερθεί ότι ρυθμίζει την έκφραση συγκεκριμένων mRNAs που συμμετέχουν στον έλεγχο του μήκους της πολυ (A) ουράς τους (Chicoine et al., 2007). Σύμφωνα με τη μοριακή ταυτότητάς της, είναι πιθανό ότι η πρωτεΐνη WISP επηρεάζει τους τομείς ενεργοποίησης των ωαρίων και της ωογένεσης με έναν απλό μηχανισμό: τον προσδιορισμό του μήκους της πολυ (A) ουράς των βασικών μητρικών mRNAs. Η πρωτεΐνη WISP απαιτείται για την πολυαδενυλίωση των *bicoid*, *Toll* και *torso* mRNAs κατά την ενεργοποίηση του ωαρίου. Επίσης, η λειτουργία της πρωτεΐνης WISP είναι απαραίτητη σε ωοκύτταρα για την κανονική ρύθμιση της πολυαδενυλίωσης του mRNA του *dmos* και ενδεχομένως μέσω αυτής της δράσης, για την

φωσφορυλίωση (ενεργοποίηση) των MAPKs στα ώριμα ωοκύτταρα πριν από την ενεργοποίηση του ωαρίου. Παράλληλα, η πρωτεΐνη WISP μπορεί να αλληλεπιδράσει με τη Bicaudal-C καθώς η σύγκριση της αλληλουχίας υποδηλώνει ότι η πρωταρχική αλληλουχία των αμινοξέων της WISP, όπως και εκείνες των άλλων GLD-2 πρωτεϊνών (Kwak et al., 2004; Kwak και Wickens, 2007), δεν περιέχουν κανένα προβλεπόμενο μοτίβο αναγνώρισης του RNA. Οι Cui et al., 2008 χρησιμοποιώντας ένα σύστημα δύο-υβριδίων του ζυμομύκητα βρήκαν ότι η WISP μπορεί να αλληλεπιδράσει με τη Bic-C. Οι πρωτεΐνες WISP και Bic-C βρέθηκαν να έχουν έκφραση μόνο στα θηλυκά άτομα δάκου, αποδεικνύοντας τη σημαντικότητα του ρόλου τους κατά την ωογένεση και την ενεργοποίηση του ωαρίου.

3.1.4 Πρωτεΐνη LOZEN, γονίδιο *Iz* (*lozenge*)

Το γονίδιο *lozenge* βρίσκεται στο X χρωμόσωμα στη θέση 27.7 στη *D. melanogaster*. Έχουν αναφερθεί περίπου είκοσι μεταλλαγμένα αλληλόμορφα σε αυτό το γενετικό τόπο (Bridges and Brehme, 1944), αλλά περίπου τα μισά από αυτά είτε έχουν χαθεί ή έχουν απορριφθεί. Δύο μεταλλαγμένοι χαρακτήρες που επηρεάζουν τη σπερματοθήκη έχουν περιγραφεί από τον Wexelsen (1928). Ένα από τα χαρακτηριστικά του μεταλλαγμένου γονιδίου “*lozenge*” είναι η μη γονιμότητα, ή σχεδόν στειρότητα, στα ομόζυγα θηλυκά. Πολλαπλά αλληλόμορφα του *lozenge* έχουν ανακαλυφθεί από τον Bridges το 1916 που παρατήρησε το πρωτότυπο μεταλλαγμένο *lozenge* (Bridges and Brehme, 1944, σελίδα 118). Δεκατέσσερα από αυτά τα αλληλόμορφα μελετήθηκαν από τον Gottschewski (1936), ο οποίος τα χρησιμοποίησε σε μια έρευνα για τις ποιοτικές διαφορές μεταξύ των αλληλόμορφων γονιδίων. Αν και η μελέτη του ασχολήθηκε κυρίως με το χρώμα, το σχήμα και τη δομή των ματιών, έγινε και αναφορά σε σχέση με τη γονιμότητα. Οι Oliver και Green (1944) ανέφεραν ότι τρία από τα *lozenge* αλληλόμορφα παρουσίασαν χαμηλή γονιμότητα και αναπαραγωγική ικανότητα στα ομόζυγα θηλυκά και ότι σε αυτά τα θηλυκά, απουσίαζαν τα female accessory glands (FAGs) και οι σπερματοθήκες. Παρά το γεγονός ότι συνδυασμοί αυτών των αλληλομόρφων είχαν επίσης

έλλειψη FAGs και σπερματοθηκών, τα θηλυκά ήταν περισσότερο δραστήρια σεξουαλικά σε σχέση με τα ομόζυγα θηλυκά. Κατά συνέπεια, η χαμηλή γονιμότητα των θηλυκών *lozenge* θα μπορούσε να σχετίζεται με τη βιωσιμότητα του σπέρματος μετά τη γονιμοποίησή τους. Οι Oliver και Green (1944) διαπίστωσαν ότι τα ομόζυγα *Izg* θηλυκά παράγουν πολλά ωάρια για μια παρατεταμένη χρονική περίοδο, αλλά ότι τα γόνιμα ωάρια είναι λίγα σε αριθμό και εμφανίζονται μόνο κατά τις πρώτες ημέρες μετά το ζευγάρισμα. Επίσης, πρότειναν ότι το φαινόμενο μπορεί να οφείλεται σε πιθανή απώλεια της βιωσιμότητας του σπέρματος στους κοιλιακούς υποδοχείς των θηλυκών. Επιπρόσθετα, αποδείχθηκε ότι η αρχική ποσότητα του σπέρματος που είναι αποθηκευμένη στους σωληνοειδείς υποδοχείς των *lozenge* θηλυκών ήταν λιγότερη από εκείνη των θηλυκών μαρτύρων. Ωστόσο, το πιο εντυπωσιακό χαρακτηριστικό ήταν η απώλεια της κινητικότητας του σπέρματος σε ένα σχετικά σύντομο χρονικό διάστημα στα *lozenge* θηλυκά. Συνεπώς και για το δάκο της ελιάς η αυξημένη έκφραση του συγκεκριμένου γενετικού τόπου μόνο στα θηλυκά συνηγορεί για ένα παρόμοιο ρόλο.

3.1.5 Πρωτεΐνη EGFR, γονίδιο *Egfr* (Epidermal growth factor receptor)

Η πρωτεΐνη Epidermal growth factor receptor (EGFR) εκφράζεται σε μεγάλο εύρος κυτταρικών τύπων. Η ανώμαλη ενεργοποίηση ή έκφραση της EGFR προκαλεί καρκίνο στον άνθρωπο και θεωρείται ότι εμπλέκεται στον μετασχηματισμό, τον σχηματισμό των όγκων αλλά και τη μετάσταση (Schlessinger, 2000; 2002). Οι Jordan et al., 2005 έχουν χρησιμοποίησει μικροσυστοιχίες cDNA για να διαφωτίσουν κάποιους από τους μεταγενέστερους στόχους της ενεργοποίησης της EGFR στην ωοθήκη της *Drosophila*. Η ωοθήκη της *Drosophila* αποτελεί ένα απλό σύστημα για την ανάλυση της αλληλεπίδρασης των μονοπατιών σηματοδότησης. Το μονοπάτι της EGFR αποτελεί ενδιαφέρον, καθώς είναι επίσης ενεργό στα σωματικά κύτταρα που περιβάλλουν το ωοκύτταρο των θηλαστικών. Αυτό, όπως και άλλα μονοπάτια, είναι βασικά για τα ωοκύτταρα των θηλαστικών και τη διαφοροποίηση

των κυττάρων του ωοθυλακίου (Eppig, 2001). Αυτά τα μονοπάτια περιλαμβάνουν τα EGFR, TGF-β/dpp, Jnk, Notch, και EcR μονοπάτια σηματοδότησης. Τα δεδομένα των μικροσυστοιχιών των Jordan et al., 2005 προσδιορίζουν βασικά συστατικά από κάθε ένα από τα πέντε μονοπάτια που αναφέρονται παραπάνω, αλλά και επιπλέον μονοπατιών, καθώς εκφράζονται διαφορετικά λόγω μεταβολών στο μονοπάτι EGFR. Τα δεδομένα των μικροσυστοιχιών των Jordan et al., 2005 δείχνουν ότι το μονοπάτι της EGFR μπορεί να ρυθμίσει μεταγραφικά τα συστατικά των μονοπατιών του transforming growth factor-beta (TGF-β), του υποδοχέα της εκδυσόνης (EcR) και του Wg, τα οποία με τη σειρά τους ρυθμίζουν την μεταγραφή της Broad. Για όλα αυτά τα μονοπάτια υπάρχει η πιθανότητα να δρουν μεταγενέστερα του EGFR μονοπατιού και οι συνιστώσες τους είναι είτε αυξημένες ή κατεσταλμένες ως η βασική δραστηριότητα του μονοπατιού αυτού. Είναι επίσης πιθανό ότι το μονοπάτι της EGFR ελέγχει τους μετατροπείς των συγκεκριμένων μονοπατιών σε μεταγραφικό επίπεδο και, ως εκ τούτου, ρυθμίζει τη δραστηριότητα της οδού του.

3.1.6 Οι πρωτεΐνες που σχετίζονται με τη δράση της εκδυσόνης: ECR, E75BA και E78C

Ο υποδοχέας της εκδυσόνης (EcR) εκφράζεται ευρέως στην ωοθήκη (Riddiford et al., 2000). Η σηματοδότηση της εκδυσόνης απαιτείται για την ανάπτυξη των ωοθηκών πριν την ενηλικίωση (Gancz et al., 2011), επίσης ελέγχει την ανάπτυξη των ωοθυλακίων (Buszczak et al., 1999; Carney and Bender, 2000), καθώς και τη μετανάστευση των συνοριακών κυττάρων (border cells), έναν υποπληθυσμό κυττάρων του ωοθυλακίου (Bai et al., 2000; Jang et al., 2009). Επιπρόσθετα, ο σχηματισμός των κύστεων της βλαστικής σειράς και η ενθυλάκωση εξαρτώνται έμμεσα από την σηματοδότηση της εκδυσόνης (Konig et al, 2011; Morris and Spradling, 2012). Πολλοί πυρηνικοί ορμονικοί υποδοχείς έχουν επίσης γνωστούς ρόλους στην ωογένεση. Ο πυρηνικός ορμονικός υποδοχέας Ecdysone-induced protein 75B (E75) ελέγχει μια ποικιλία κυτταρικών διεργασιών στην ωοθήκη, συμπεριλαμβανομένης της επιβίωσης των ωοθυλακίων κατά την πρώιμη λεκιθογένεση

(Buszczak et al., 1999; Morris and Spradling, 2012). Αντίστοιχα, η Ecdysone-induced protein 78C (E78) που σχετίζεται στενά με την E75 και την Rev-Erb των θηλαστικών και τους Peroxisome Proliferator Activated Receptors (Υποδοχείς ενεργοποίησης πολλαπλασιασμού υπεροξεισωμάτος) (Bridgham et al., 2010; King-Jones and Thummel, 2005), ταυτοποιήθηκε επίσης ως ένας πρώιμος στόχος της εκδυσόνης (Stone and Thummel, 1993). Το γονίδιο *Ecdysone response E78* ελέγχει το σχηματισμό της φωλεάς ωοθηκικών βλαστικών κυττάρων και την επιβίωση των ωοθυλακίων στη *Drosophila* (Ables et al., 2015). Ενώ, η απώλεια του *E78* προκαλεί πολλαπλά ελαττώματα των ωοθηκών, με αποτέλεσμα τη σημαντικά μειωμένη γονιμότητα των θηλυκών. Σύμφωνα με την αρχική αναγνώριση ως στόχος της σηματοδότησης της εκδυσόνης, διαπιστώνεται ότι η *E78* γενετικά αλληλεπιδρά με τις EcR και *ecdysoneless* (ECD) για τον έλεγχο της επιβίωσης του ωοθυλακίου. Συνεπώς, προσδιορίζεται νέος ρόλος για την *E78* στη *Drosophila*, που δείχνει ότι μπορεί να είναι στην ωογένεση ένας σημαντικός μεσολαβητής του μεταγραφικού καταρράκτη που προκαλείται από την εκδυσόνη. Οι μεταλλάξεις διαφόρων γονιδίων πρώιμης απόκρισης της εκδυσόνης, συμπεριλαμβανομένων των *EcR*, *E74*, και *E75* εμφανίζουν παρόμοιο θάνατο της κύστης κοντά στην έναρξη της λεκιθογένεσης του ωαρίου (Buszczak et al, 1999; Carney and Bender, 2000), υποδηλώνοντας ότι η σηματοδότηση της εκδυσόνης προάγει την ωρίμανση ή το ερέθισμα της επιβίωσης κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των ωοθυλακίων.

Η σηματοδότηση των στεροειδών διαδραματίζει έναν ρόλο σε πολλαπλά στάδια της ωογένεσης των θηλαστικών, συμπεριλαμβανομένου του γαμετικού καθορισμού του φύλου (που επισκοπείται από Kashimada and Koorman, 2010). Αν και μέχρι πρότινος δεν είχε κανένα γνωστό ρόλο στον καθορισμό του φύλου της *Drosophila* (αναθεωρείται από τον Salz, 2011), η εκδυσόνη παίζει ρόλο στο φυλοδιαχωρισμό κατά τη διάρκεια της ενήλικης ζωής. Τα γονίδια του μονοπατιού σηματοδότησης της εκδυσόνης εκφράζονται διαφορετικά μεταξύ των ωοθηκών και των όρχεων και είναι λειτουργικά απαραίτητα για τη γονιμότητα των θηλυκών αλλά όχι των αρσενικών (Gazivova et al., 2004; Garen et al.,

1977; Bownes et al., 1983). Καθώς η σηματοδότηση της στεροειδούς ορμόνης αποτελεί το βασικό ρυθμιστή των αναπτυξιακών μεταβάσεων, ερευνήθηκε από τους Morris and Spradling (2012) αν η εκδυσόνη ελέγχει τα γεγονότα στις αρχές της ωογένεσης της *Drosophila*. Αποδείχθηκε, ότι ο φυλετικός διμορφισμός της σηματοδότησης από τη στεροειδή ορμόνη δρα στο σημείο της ανάπτυξης όπου γίνεται η διαφοροποίηση μεταξύ των αρσενικών και θηλυκών γαμετικών κυττάρων. Παράλληλα, αποδεικνύεται ότι η σηματοδότηση της εκδυσόνης προάγει πολλαπλά, βασικά βήματα για την πρόωρη ωογένεση. Αντίθετα, η ανάπτυξη των γαμετικών κυττάρων στα αρσενικά στερείται την απαίτηση της σηματοδότησης των στεροειδών. Οι μεταβολικές απαιτήσεις της παραγωγής των ωαρίων είναι τεράστιες, σε αντίθεση με εκείνες της παραγωγής σπέρματος. Εάν η σηματοδότηση των στεροειδών στο σώμα των ωοθηκών δρα για να μεσολαβεί στις έκτακτες μεταβολικές απαιτήσεις της παραγωγής των θηλυκών γαμετών, τότε δεν αποτελεί έκπληξη η απουσία μιας τέτοιας απαίτησης των αρσενικών. Αυτή η θεμελιώδης διαφορά μεταξύ της γαμετογένεσης των αρσενικών και θηλυκών μπορεί να ισχύει για ένα ευρύ φάσμα οργανισμών και μπορεί να εξηγήσει γιατί η φυλο-ειδική σηματοδότηση των στεροειδών είναι μια κοινή όψη γαμετογένεσης. Στο δάκο της ελιάς ο φυλοδιαχωρισμός σε πρώιμο αναπτυξιακό στάδιο δεν είναι εφικτός, ωστόσο όμως μέσω του ρόλου της εκδυσόνης δύναται να γίνει ο προσδιορισμός αυτός στο στάδιο του ενηλίκου εντόμου. Σύμφωνα με τα δεδομένα που παρατίθενται παραπάνω, το μονοπάτι της EGFR μπορεί να ρυθμίσει μεταγραφικά τα συστατικά του μονοπατιού του υποδοχέα της εκδυσόνης (*EcR*), όπου παράλληλα ελέγχεται η αλληλεπίδραση των γενετικών τόπων *Ecdysone response E78* και *Ecdysone-induced protein 75B (E75)*. Στα θηλυκά άτομα του δάκου, παρατηρήθηκε έκφραση των παραπάνω γονιδίων παρέχοντας την εικόνα του μονοπατιού σηματοδότησης της εκδυσόνης, δίνοντας μας νέα δεδομένα για έναν νέο παράγοντα φυλοδιαχωρισμού στο στάδιο των ενηλίκων.

3.2 Πρωτεΐνες και γονίδια που εκφράζονται μόνο στα αρσενικά άτομα δάκου.

3.2.1 Πρωτεΐνη TRPCG, γονίδιο *Trpm* (Transient receptor potential cation channel, subfamily M ortholog)

Σύμφωνα με την βάση δεδομένων Uniprot, το γονίδιο ανήκει στην οικογένεια των μεταβατικών υποδοχέων (transient receptor) (TC 1.A.4) και στην υποοικογένεια LTrpC {ECO:0000305} (A8DYE2). Οι cysteine-rich secretory πρωτεΐνες (CRISPs) είναι μια ομάδα τεσσάρων πρωτεϊνών στο ποντίκι που εκφράζονται σε μεγάλο βαθμό στο αναπαραγωγικό σύστημα των αρσενικών και σε μικρότερο βαθμό σε άλλους ιστούς. Οι CRISPs ειδικά στα σπονδυλωτά, περιέχουν μια C-terminal CRISP δομή (Gibbs et al., 2006; Guo et al., 2005), και βρίσκονται κυρίως στο αναπαραγωγικό σύστημα των αρσενικών θηλαστικών αλλά και στο δηλητήριο των ερπετών (Gibbs et al., 2008, Yamazaki and Morita, 2004). Στο ποντίκι υπάρχουν τέσσερις CRISPs, και όλες ενσωματώνονται εντός ή επί του σπέρματος (Gibbs et al., 2008, Koppers et al., 2011). Η CRISP2 έχει ενσωματωθεί στο ακροσωμάτιο του σπέρματος και την ουρά (Foster and Gerton, 1996; Maeda et al., 1999; O'Bryan et al., 2001). Οι CRISP1 και CRISP4 εκκρίνονται από τα κύρια κύτταρα της επιδιδυμίδας και περιβάλλουν το σπέρμα σε υψηλές συγκεντρώσεις (Jalkanen et al., 2005; Nolan et al., 2006; Eberspaecher et al., 1995). Η CRISP3 παράγεται από τα κυστίδια του σπέρματος και του προστάτη και βρίσκεται στο σπερματικό υγρό (Krätzschar et al., 1996). Από τα δεδομένα των Gibbs et al., 2011, φαίνεται ότι η CRISP4, ενεργώντας τουλάχιστον εν μέρει μέσω της TRPM8, συμμετέχει στη δημιουργία ενός ευνοϊκού περιβάλλοντος της επιδιδυμίδας με φυσιολογική λειτουργία του σπέρματος. Ο TRPM8 είναι ένας σημαντικός υποδοχέας κρούς στο σώμα που βρίσκεται σε πολλούς ιστούς, συμπεριλαμβανομένης της κεφαλής και της ουράς του σπέρματος. Οι Gibbs et al., 2011 απέδειξαν ότι η CRISP4, μέσω της ρύθμισης των ιόντων Ca^{2+} που ρέουν μέσα από τα κανάλια της TRPM8, εμπλέκεται στον καθορισμό της λειτουργικής ικανότητας του ακροσωματίου του σπέρματος. Οι αλλαγές στη ροή των ιόντων έχουν συσχετιστεί με την απόκτηση των συγκεκριμένων λειτουργιών του σπέρματος που

κανονικά εκδηλώνονται κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης του σπερματοζωαρίου (Aitken, et al., 2007).

3.2.2 Πρωτεΐνη LOLA5, γονίδιο *lola* (*longitudinal lacking*)

Ο μεταγραφικός ρυθμιστής *lola* απαιτείται για τη διατήρηση των βλαστικών κυττάρων και την διαφοροποίηση των γαμετικών κυττάρων στους όρχεις της *Drosophila*. Η συμπεριφορά των βλαστικών κυττάρων ρυθμίζεται από εξωγενή σήματα από εξειδικευμένα μικροπεριβάλλοντα, ή θώκους, και ενδογενείς παράγοντες που απαιτούνται για την εκτέλεση των κατάλληλα εκφραζόμενων αποκρίσεων στα σήματα θέσης. Ο γενετικός τύπος *lola* κωδικοποιεί μία οικογένεια από τουλάχιστον 20 διαφορετικές πυρηνικές πρωτεΐνες, που χαρακτηρίζονται από Lola-A έως T (Goeke et al., 2003). Επιπλέον, το γονίδιο *lola* απαιτείται για την ορθή εκτέλεση των βασικών αναπτυξιακών μεταβάσεων κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης των γαμετικών κυττάρων των αρσενικών, συμπεριλαμβανομένου του διακόπτη από τη διέλευση για την ενίσχυση και την προγονική διαφοροποίηση στην ανάπτυξη του σπερματοκυττάρου, όπως επίσης και τη διαδικασία της μίτωσης του κυτταρικού κύκλου και την σπερματογένεση. Τα διαφορετικά ισόμορφα του *lola*, που το καθένα έχει ένα μοναδικό C-άκρο και δομές δακτύλων ψευδαργύρου (zinc finger), μπορούν να ελέγχουν τα διάφορα στοιχεία του πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης στα κύτταρα της βλαστικής σειράς των αρσενικών και στις σειρές των σωματικών βλαστικών κυττάρων της κύστης. Οι Davies et al., 2012 αναφέρουν πως το *lola* απαιτείται αυτόνομα στα κύτταρα για τη διατήρηση των βλαστικών κυττάρων, την έγκαιρη μετάβαση από τη σπερμογονιακή διαίρεση στην ανάπτυξη των σπερματοκυττάρων και τη γονιδιακή έκφραση, και την εξέλιξη μέσω των μειωτικών διαιρέσεων στους όρχεις της *Drosophila*.

3.2.3 Πρωτεΐνη KCC2A, γονίδιο *CaMKII* (*Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II*)

Σύμφωνα με τους Moriya et al., 1995 στους όρχεις στο ποντίκι η εξαρτώμενη από την καλμοδουλίνη

πρωτεΐνη φωσφατάση (calcineurin) βρίσκεται στους πυρήνες γύρω και κατά μήκος των σπερματίδων (Cell Tissue Res. 1995; 281: 273-81). Στη συγκεκριμένη μελέτη πραγματοποιήθηκε εντοπισμός της καλσινευρίνης με ανοσοϊστοχημεία, σε όρχεις του ποντικού. Τη βάση αποτέλεσαν προηγούμενες παρατηρήσεις των ερευνητών όπου έδειχναν ότι η καλμοδουλίνη βρίσκεται ασυνήθιστα, σε επάρκεια στα στάδια της σπερματογένεσης από τα μέσα του παχυτενίου των σπερματοκυττάρων μέχρι την επιμήκυνση των σπερματίδων. Μέσω του έμμεσου ανοσοφθορισμού με τη χρήση αντισωμάτων από τους όρχεις των ποντικών αποκαλύφθηκαν μόνο θετικές αντιδράσεις στους πυρήνες γύρω ή κατά μήκος των σπερματίδων. Η καλσινευρίνη ξεκινά να συσσωρεύεται στους πυρήνες από το στάδιο των καλυμμάτων των ακροσωμάτων, κορυφώνεται κατά το αρχικό στάδιο της επιμήκυνσης των πυρήνων και στη συνέχεια μειώνεται. Σε μετέπειτα έρευνα των Moriya et al., 2000, μελετήθηκε ανοσοϊστοχημικά ο εντοπισμός της calcium/calmodulin-dependent protein kinase (CaM kinase II) χρησιμοποιώντας αντισώματα έναντι της CaM κινάση II gamma και ακολούθησε σύγκριση τους με την κατανομή της καλμοδουλίνης. Αποδείχθηκε μεγαλύτερη συγκέντρωση στα πρώιμα σπερματοκύτταρα και εντοπίστηκε στο εξωτερικό στρώμα του σπερματικών σωληναρίων, όπου το επίπεδο καλμοδουλίνης ήταν σχετικά χαμηλό. Μετρήσεις της πυκνότητας των σωματιδίων αποκάλυψαν ότι η CaM κινάση II είναι παροδικά αυξημένη στον πυρήνα των ζυγωτών στα σπερματοκύτταρα.

3.2.4 Πρωτεΐνη GALT7, γονίδιο *GalNAc-T2* (*UDP-N-acetyl-α-D-galactosamine: polypeptideN-acetylgalactosaminyltransferase 2*)

Ένας μεγάλος αριθμός από μελέτες έχουν ερευνησει τα αντιγόνα και τα γλυκολιπίδια του «histo-bloodgroup» σε όγκους των όρχεων (Andrews et al., 1984; Andrews et al., 1996; Dabelsteen and Jacobsen, 1991; Kang et al., 1995; Olie et al., 1996; Wenk et al., 1994). Αντιθέτως, πολύ λίγα είναι γνωστά σχετικά με την έκφραση των απλού τύπου βλεννίνης mucin-type O-glycans Tn, T και σιαλλο-Tn και σιαλλο-T, καθώς και των GalNAc-τρανσφερασών που ξεκινούν

την *O*-συνδεδεμένη γλυκοζυλίωση και σχηματίζουν το αντιγόνο Tn στους όρχεις, και ακόμη λιγότερα είναι γνωστά σχετικά με τη λειτουργία τους. Οι *O*-γλυκάνες έχουν ενοχοποιηθεί ότι εμπλέκονται στην ωρίμανση του σπέρματος (Chen et al., 1998). Ο μηχανισμός με τον οποίο συνδέεται το σπερματοζωαρίου στο ωάριο δεν έχει ακόμη πλήρως διευκρινιστεί, αλλά υπάρχει συναίνεση ότι αυτή η αλληλεπίδραση γίνεται μέσω των υδατανθράκων και ξεκινάει από την πρόσδεση μορίων γλυκάνης (review Töpfer-Petersen, 1999). Επιπλέον, μια πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι τα πολυακόρεστα και τα φουκοζυλιωμένα γλυκοσφιγγολιπίδια είναι απαραίτητα για τη σπερματογένεση (Sandhoff et al., 2005). Οι Rajpert-DeMeyts et al., 2007, βρήκαν ένα πολύ περιορισμένο πρότυπο των *O*-γλυκανών στους όρχεις, σε συνδυασμό με την έκφραση μίας μόνο τρανσφεράσης (GalNAc-T3) στα ώριμα μεταμειωτικά γαμετικά κύτταρα. Το εύρημα αυτό συμφωνεί με τις προηγούμενες μελέτες που ανέφεραν την παρουσία των GalNAc-T3 στο φυσιολογικό σπέρμα (Bennett et al., 1999; Mandel et al., 1991). Οι GalNAc-T3 θεωρήθηκε ότι ξεκινούν την *O*-γλυκοζυλίωση του zonadhesin (Hardy and Garbers, 1995) μιας ορχεο-ειδικής πρωτεΐνης. Τέλος, οι Rajpert-DeMeyts et al., 2007 υποθέτουν ότι η GalNAc-T3 μπορεί να παίζει ρόλο ενός πρόσθετου μεσολαβητή της σύνδεσης σπέρματος-ωαρίου, όπως, προσδιορίζεται πρόσφατα και στο ποντίκι SED1 (Ensslin and Shur, 2003). Ενώ, από την ανάλυση των γαμετικών κυττάρων διαπιστώθηκε ότι η GalNAc-T2 είναι παρούσα στα κύτταρα Leydig που υποδηλώνει έναν πιθανό ρόλο στη σύνθεση ή έκκριση των ορμονών των όρχεων που παράγονται στα κύτταρα Leydig.

Με γνώμονα το ρόλο των γονιδίων σε αρσενικά όργανα αναπαραγωγής αλλά και σε πρώιμα στάδια της γαμετογένεσης και σύμφωνα με τα δεδομένα της έκφρασης των τεσσάρων γενετικών τόπων, θεωρούμε ότι οι γενετικοί αυτοί τόποι θα έχουν μια παρεμφερή λειτουργία στα αρσενικά άτομα δάκου.

4. Συμπεράσματα

Η παρούσα διδακτορική διατριβή αποτέλεσε την έναρξη νέων προσπαθειών για τη διερεύνηση του σχεδόν "παρθένου" γονιδιώματος του εντόμου *Bactrocera oleae*. Συνολικά εντοπίστηκαν γονίδια και πρωτεΐνες που είχαν διαφορετική έκφραση μεταξύ των δύο φύλων του εντόμου αλλά και μεταξύ των ευαίσθητων και ανθεκτικών στο εντομοκτόνο spinosad εντόμων. Απώτεροι στόχοι του εγχειρήματος αυτού είναι αφενός μια ολιστική προσέγγιση στην κατανόηση πολύπλοκων μηχανισμών του εντόμου αυτού (όπως ο φυλοκαθορισμός και η ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα) και αφετέρου η δημιουργία καινοτόμων εργαλείων για νέες, φιλικές προς το περιβάλλον μεθόδους αντιμετώπισης του δάκου της ελιάς.

4.1 SIT: Sterile Insect Technique

Όπως αναλύθηκε στην Εισαγωγή, η τεχνική του στείρου εντόμου (SIT), είναι μια πολλά υποσχόμενη, φιλική προς το περιβάλλον προσέγγιση ελέγχου επιβλαβών εντόμων. Στο δάκο της ελιάς οι πρώτες προσπάθειες εφαρμογής της SIT πραγματοποιήθηκαν τη δεκαετία του '70 (Economopoulos, 1977) με περιορισμένη όμως επιτυχία, κυρίως λόγω της διαφορετικής συχνότητας και του χρόνου των συζεύξεων των εργαστηριακών εντόμων (Economopoulos, 1972) αλλά και της τάσης προτίμησης να ζευγαρώνουν με όμοια έντομα (Zervas and Economopoulos, 1982). Η πολύχρονη εμπειρία εφαρμογής της SIT, οδήγησε στην κατανόηση της αναγκαιότητας εξαπόλυσης μόνο αρσενικών ατόμων, συμβάλλοντας καθοριστικά στη δημιουργία στελεχών γενετικού φυλοδιαχωρισμού (Genetic Sexing Strains, GSS) αλλά και πιο πρόσφατα στην ανάπτυξη της SIT νέας γενιάς [RIDL (Release of Insects carrying Dominant Lethals)] (Alphey and Andreasen 2002; Alphey et al., 2002). Η συνεισφορά της παρούσας διατριβής που περιγράφεται αναλυτικά παρακάτω, αφορά τη βελτίωση των προβλημάτων της SIT. Αρχικά, βασίζεται στην επίτευξη του φυλοδιαχωρισμού στο δάκο της ελιάς σε πρώιμο αναπτυξιακό στάδιο. Παράλληλα, με τα νέα δεδομένα της μελέτης, δύναται να υπάρξει βελτίωση των GSS. Ωστόσο, μελλοντικός στόχος είναι η δημιουργία ενός διαγονιδιακού στελέχους με θνησιγόνο γονίδιο που να

προκαλεί το θάνατο των θηλυκών στο εμβρυικό στάδιο.

4.2 Προβλήματα και επίλυση για την επιτυχή εφαρμογή της SIT- Προοπτική για το δάκο της ελιάς

Για να εφαρμοστεί με επιτυχία η SIT, είναι απαραίτητη η γνώση των μοριακών εργαλείων για τον εκάστοτε οργανισμό. Κυρίαρχο επίσης ζήτημα για την επίτευξη μιας επιτυχούς SIT στο δάκο της ελιάς παραμένει η επικράτηση των εργαστηριακών στελεχών έναντι των φυσικών (άγριων) πληθυσμών. Η παρούσα έρευνα εστιάζει κυρίως στην εύρεση λύσεων στα προβλήματα για την εφαρμογή μιας επιτυχούς SIT. Αυτό δύναται να καταστεί εφικτό μέσω της μελέτης και της ταυτοποίησης γενετικών τόπων που υπερεκφράζονται στα αρσενικά ή στα θηλυκά έντομα και εμπλέκονται στο φυλοδιαχωρισμό και πιθανά συμμετέχουν σε μονοπάτια φυλοκαθορισμού. Ενώ θεωρείται ουσιαστική η συμβολή μας στην επίλυση των σημαντικών ζητημάτων που εμποδίζουν την εφαρμογή της SIT με επιτυχία. Ένα σημαντικότερο πρόβλημα για την εφαρμογή της SIT αφορά το διαχωρισμό των δύο φύλων σε κανονικές (και όχι εργαστηριακές) συνθήκες και σε πρώιμο αναπτυξιακό στάδιο. Συνεπώς, ο διαχωρισμός των δύο φύλων του εντόμου μπορεί να αποτελέσει σημαντική βοήθεια στις προσπάθειες για αποτελεσματική SIT. Για παράδειγμα, η ταυτοποίηση ενός γενετικού τόπου φυλοκαθορισμού μπορεί να οδηγήσει στη δυνατότητα προσδιορισμού του φύλου του εντόμου σε αναπτυξιακά στάδια όπου δεν είναι δυνατόν να γίνει ο προσδιορισμός σύμφωνα με τη μορφολογία του. Πρόκειται μάλιστα για ένα πρόβλημα που αφορά πολλά έντομα συμπεριλαμβανομένου και του δάκου της ελιάς. Οι Gabrieli et al., 2010 στη Μεσογειακή μύγα, χρησιμοποίησαν ειδικούς μοριακούς δείκτες ώστε να δημιουργήσουν ένα μοντέλο φυλοδιαχωρισμού σε πρώιμο εμβρυικό στάδιο.

Η χρήση ειδικών μοριακών δεικτών μπορεί να αποτελέσει μια λύση στο πρόβλημα διαχωρισμού των φύλων ως διαγνωστικό μέσο σε αναπτυξιακά στάδια (έμβρυο, προνύμφη και νύμφη) όπου το φύλο δεν μπορεί να προσδιοριστεί και στο δάκο της ελιάς. Από

την παρούσα μελέτη, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν γενετικοί τόποι που εμπλέκονται σε συστήματα φυλοδιαχωρισμού αλλά και φυλοκαθορισμού, με σκοπό να δημιουργήσουμε ένα διαγνωστικό μοντέλο που θα διαχωρίζει το φύλο του εντόμου σε πρώιμο αναπτυξιακό στάδιο. Παράλληλα, το συγκεκριμένο διαγνωστικό πρότυπο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη διάγνωση τόσο του φύλου του εντόμου αλλά και του είδους σε περίπτωση εκτίμησης στη φύση. Δύναται λοιπόν, να αποτελέσει ακόμη και μια απάντηση σε ένα οικολογικό ερώτημα. Μια ακόμη χρήση των ειδικών μοριακών δεικτών είναι η διάγνωση του φύλου και στο εργοστάσιο παραγωγής GSS στελεχών αλλά και την επιβεβαίωση των «προϊόντων» GSS, και τελικά στην καλύτευση των GSS (σε εργαστηριακές συνθήκες δημιουργούμε αρσενικά και θηλυκά που ωστόσο αποδείχτηκε ότι δεν είναι σταθερά).

Στο δάκο της ελιάς, οι τελευταίες προσπάθειες επιτυχούς εφαρμογής της SIT προσανατολίστηκαν στη δημιουργία ενός υπό συνθήκη θηλεο-θησιγόνου στελέχους από την ερευνητική ομάδα της Oxitec (Oxford Insect Technologies). Η προσπάθεια της Oxitec για τη δημιουργία ενός διαγονιδιακού στελέχους δάκου στηρίζεται στις επιτυχημένες προσπάθειες σε άλλα έντομα όπως για παράδειγμα στο κουνούπι, *Aedes aegypti*. Η Oxitec, είναι μια εταιρεία που ιδρύθηκε από ερευνητές του Πανεπιστημίου της Οξφόρδης, εισήγαγε στο έντομο του δάκου ένα γονίδιο που προκαλεί το θάνατο των θηλυκών απογόνων όταν βρίσκονται ακόμα στο στάδιο της προνύμφης (Ant et al., 2012). Στη συνέχεια, θα απελευθερωθούν σε ελαιώνες γενετικά τροποποιημένα αρσενικά που θα ζευγαρώσουν με τα άγρια θηλυκά και θα οδηγήσουν στο θάνατο όλους τους θηλυκούς απογόνους, περιορίζοντας έτσι τους πληθυσμούς του εντόμου. Εφόσον η Oxitec λάβει την απαιτούμενη άδεια από τις ισπανικές αρχές, η τεχνολογία θα δοκιμαστεί στην Ισπανία σε περιορισμένο αριθμό ελαιόδεντρων τα οποία όμως θα μένουν καλυμμένα με δίχτυα για να αποτραπεί η απόδραση των «μεταλλαγμένων» εντόμων. Βασικό πρόβλημα αποτελεί ότι εδώ και ένα μεγάλο χρονικό διάστημα περίπου 2-3 ετών το όλο εγχείρημα δεν δύναται να εγκριθεί από τις αρμόδιες αρχές στην

Ισπανία (www.oxitec.com). Αυτό είναι αποτέλεσμα κυρίως λόγω της νομοθεσίας που επικρατεί καθώς επίσης και των περιβαλλοντικών οργανώσεων που όντας ιδιαίτερα ευαίσθητοποιημένες στο κομμάτι αυτό αντιδρούν για την εφαρμογή της συγκεκριμένης τεχνολογίας. Τελικά η μελέτη των Ant et al., 2012 είχε ως αποτέλεσμα τα διαγονιδιακά έντομα να εμφανίζουν αυξημένη ανταγωνιστικότητα ώστε να μπορούν να συζευχθούν σε σχέση με τα άγρια έντομα αλλά και συγχρονισμένη δραστηριότητα συζεύξεως με τα άγρια θηλυκά έντομα. Επίσης, παρουσίασαν την κατάλληλη αδράνεια σε επανασυζεύξεις με τα άγρια θηλυκά έντομα.

Ωστόσο, η συγκεκριμένη τεχνολογία εμφανίζει συγκεκριμένα προβλήματα. Όπως ήδη αναφέρθηκε, στο διαγονιδιακό στέλεχος του δάκου το γονίδιο προκαλεί το θάνατο των θηλυκών απογόνων όταν βρίσκονται στο στάδιο της προνύμφης. Θα πρέπει να εφαρμοστεί η μέθοδος και με την χρήση γονιδίων που να είναι θνησιγόνα σε εμβρυικό στάδιο μειώνοντας αρκετά το κόστος διατροφής καθώς σε επίπεδο προνυμφών είναι ιδιαίτερα ακριβό και μη συμφέρον. Επίσης, ένα σημαντικό ζήτημα που προκύπτει είναι ότι η πλήρης καταστολή του πληθυσμού δεν αναμένεται πριν την τρίτη γενιά, καθιστώντας την μέθοδο ως μη χρήσιμη για την άμεση καταπολέμηση των εντόμων (Handler, 2002). Σύμφωνα με την παρούσα μελέτη σκοπός είναι να δημιουργηθεί ένα στέλεχος δάκου που θα προκαλεί το θάνατο των θηλυκών στο στάδιο του εμβρύου. Έτσι, δύναται να γίνει εξοικονόμηση στα έξοδα της διατροφής κατά την εκτροφή των εντόμων. Σε μια μελέτη μικρής κλίμακας ενδεχομένως να μην αποτελεί σημαντικό παράγοντα η εξοικονόμηση των εξόδων διατροφής από τη μετάβαση των εντόμων από το στάδιο του εμβρύου, στο στάδιο της προνύμφης. Σε μελλοντική όμως εδραίωση της συγκεκριμένης τεχνολογίας, το εύρος εφαρμογής θα είναι μεγάλο και συνεπώς το κέρδος θα είναι ιδιαίτερα σημαντικό.

4.3 Ανθεκτικότητα στο spinosad- Προοπτική για το δάκο της ελιάς

Για την επιτυχή εφαρμογή της SIT συνήθως χρειάζεται εξαπόλυση 100-1000 φορές περισσότερων

εργαστηριακών εντόμων ως προς το φυσικό πληθυσμό (Rhode et al., 1971; Fisher et al., 1985; Wong et al., 1986; McInnis et al., 1994; Rendón et al., 2004 ; Shelly et al., 2007). Είναι, λοιπόν, προφανές ότι όσο μικρότερος είναι ο πληθυσμός στόχος τόσο μικρότερες οι ανάγκες σε εξαπολούμενα έντομα και τόσο μεγαλύτερη η πιθανότητα επιτυχίας της μεθόδου (Knipling, 1955; 1979; Rendón et al., 2000). Για το λόγο αυτό, συχνά προηγείται της εφαρμογής της SIT μια πρώτη η επέμβαση στους φυσικούς πληθυσμούς, ώστε να μειωθεί το μέγεθος τους με τη χρήση κάποιου εντομοκτόνου (Knipling, 1964; 1979; Dame et al. 1980; Williamson et al. 1983; Politzar and Cuisance 1984). Φυσικά, η προϊστορία χρήσης εντομοκτόνων στο συγκεκριμένο πληθυσμό αλλά και η ύπαρξη ανθεκτικότητας των εντόμων στο εντομοκτόνο είναι ζητήματα που θα πρέπει εκ των προτέρων να αναλυθούν.

Τα τελευταία χρόνια, υπάρχει η τάση για την κατασκευή διαγνωστικών τεστ ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα τα οποία να μπορούν να χρησιμοποιηθούν τόσο στο εργαστήριο αλλά και από τους καλλιεργητές με ευκολία. Για παράδειγμα, αξιολογή κρίνεται η δημιουργία ενός διαγνωστικού τεστ που μπορεί να προσδιορίζει την ανθεκτικότητα του δάκου της ελιάς στα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα (OPs), με απώτερο σκοπό τη διευκόλυνση της εισαγωγής των πυρεθροειδών εντομοκτόνων, παράλληλα με τη χρήση των OPs (Margaritopoulos et al., 2008). Οι ερευνητές, χρησιμοποίησαν μια απλή PCR-RFLP αντίδραση για την ανίχνευση μιας γνωστής μετάλλαξης στο εξόνιο VI της ακετυλοχολινεστεράσης (G488S) που συνδέεται με την ανθεκτικότητα στο εντομοκτόνο. Επίσης, το τελευταίο διάστημα κυκλοφόρησε ένα διαγνωστικό τεστ που μπορεί να χρησιμοποιηθεί με ευκολία ακόμη και στον αγρό. Αφορά τη διάγνωση συγκεκριμένου στελέχους μύκητα (*S. tritici*) σε φύλλα από καλλιέργειες σιτηρών (adgèn phytodiagnosics, plant.neogeneurope.com). Μια μελλοντική προοπτική είναι η δημιουργία ενός διαγνωστικού τεστ για την ανθεκτικότητα στο εντομοκτόνο spinosad. Ένα τέτοιο εγχείρημα, πάντως, δεν προβλέπεται αντίστοιχα εύκολο αφού, όπως φαίνεται από την παρούσα διατριβή, η ανθεκτικότητα του δάκου στο spinosad δεν είναι αποτέλεσμα κάποιας συγκεκριμένης

μετάλλαξης σε ένα μοναδικό γονίδιο-στόχο αλλά είναι αποτέλεσμα διαφορικής έκφρασης πολλών γονιδίων. Σίγουρα η χρήση ενός διαγνωστικού τεστ είναι εύκολη και φαντάζει μια απλή διαδικασία, ειδικά όταν χρησιμοποιείται σε συνθήκες εκτός εργαστηρίου, ωστόσο για να κατασκευαστεί κρύβει μια περίπλοκη διεργασία που προϋποθέτει μεγάλο μοριακό υπόβαθρο.

Επίσης, έχοντας μια πιο ξεκάθαρη γνώση των μηχανισμών που εμπλέκονται στην ανθεκτικότητα, δύναται να γίνει εφικτή η εφαρμογή εντομοκτόνων νέας γενιάς. Τα συγκεκριμένα εντομοκτόνα έχουν συγκεκριμένο τρόπο δράσης που συνδυάζει την αποτελεσματικότητα ακόμη και σε ανθεκτικούς πληθυσμούς σε παλαιότερα μη εκλεκτικά εντομοκτόνα καθώς επίσης και σε πολλές περιπτώσεις τη χαμηλή επίδραση στα ωφέλιμα έντομα της καλλιέργειας (ολοκληρωμένη διαχείριση της καλλιέργειας). Ένα εντομοκτόνο νέας γενιάς, φαίνεται να δίνει λύση τα τελευταία 4-5 χρόνια στην ανθεκτικότητα του πράσινου σκουληκιού (*Helicoverpa armigera*) σε οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα και πυρεθροειδή στην καλλιέργεια του βαμβακιού. Η δραστική ουσία chlorantraniliprole (σκεύασμα Coragen, DuPont) ανήκει στην χημική οικογένεια των ανθρανιλικών διαμιδίων και έχει ένα νέο τρόπο δράσης μέσω της ενεργοποίησης των υποδοχέων ρυανοδίνης των εντόμων. Αυτή η ενεργοποίηση προκαλεί την απελευθέρωση ασβεστίου από τις εσωτερικές αποθήκες των μυών των εντόμων, με άμεσο αποτέλεσμα την μειωμένη μυϊκή λειτουργία, παράλυση και ακολούθως θανάτωση των εντόμων-στόχων (www.dupont.com).

Σύμφωνα με την παρούσα έρευνα, καταφέραμε να εντοπίσουμε γενετικούς τύπους που εμπλέκονται σε μηχανισμούς ανθεκτικότητας στο εντομοκτόνο spinosad και η γνώση των εμπλεκόμενων μονοπατιών μεταβολισμού ενέργειας καθώς και της αντίδρασης του ανοσοποιητικού συστήματος και αποτοξίνωσης μπορεί να αποτελέσει το κίνητρο για την δημιουργία ενός ολοκληρωμένου μοντέλου αντιμετώπισης του εντόμου. Γνωρίζοντας τους γενετικούς τύπους που υπερεκφράζονται στα ανθεκτικά στελέχη και τον ρόλο τους, για παράδειγμα, μπορούν να προκύψουν δεδομένα για την κατασκευή ενός εντομοκτόνου νέας γενιάς για την αντιμετώπιση του δάκου της ελιάς. Με

τη χρήση μιας δραστικής ουσίας που επιδρά σε κάποιο από τα προαναφερόμενα μονοπάτια και μπορεί να οδηγήσει στο σταδιακό θάνατο του εντόμου, δύναται να θεωρηθεί εφικτό ένα τέτοιο μοντέλο. Υποθετικό παράδειγμα θα μπορούσε να είναι η εφαρμογή μιας δραστικής ουσίας που να ενεργοποιεί κάποιο γενετικό τόπο που η πρωτεϊνική του δομή αντιστοιχεί στον παράγοντα von Willebrand (vWF), ώστε να προκληθούν συσσωματώματα και οξίδια στα εσωτερικά οργάνια του εντόμου σε αυξημένο βαθμό, όπου σταδιακά θα έχουν ως αποτέλεσμα τη θανάτωση του εντόμου.

5. Επίλογος

Τέλος, η εφαρμογή των δεδομένων της παρούσας έρευνας μπορεί να αλληλοσυμπληρώσει τις προσπάθειες καταπολέμησης του εντόμου. Αφενός, μέσω των μηχανισμών φυλοδιαχωρισμού και αφετέρου μέσω των μηχανισμών της ανθεκτικότητας που σε συνδυασμό μπορούν να βοηθήσουν στην αποτελεσματική εφαρμογή της SIT. Ενδεχομένως, η συγκεκριμένη έρευνα να αποτελεί ένα κομμάτι στο πάζλ της αναζήτησης καλύτερων και πιο σίγουρων συνθηκών για την επιτυχή εφαρμογή της τεχνικής του στείρου εντόμου και ίσως τα επόμενα κομμάτια του ίδιου πάζλ να είναι τμήμα συνέχειας της παρούσας μελέτης, ενδέχεται όμως να αποτελεί και έναρξη μιας μελλοντικής έρευνας. Ελπίζω, μέσω της προσέγγισης της παρούσας μελέτης να συνέβαλλα έστω και λίγο στην προσπάθεια αντιμετώπισης του δάκου της ελιάς και παράλληλα, τα νέα δεδομένα που αποκαλύφθηκαν σε επίπεδο τρανσκριπτώματος και πρωτεόματος του δάκου και συνδέονται με μηχανισμούς φυλοδιαχωρισμού αλλά και ανθεκτικότητας του εντόμου, να αποτελέσουν στοιχεία για την υλοποίηση της έρευνας και από άλλους επιστήμονες.



ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

BIBΛIOΓΡΑΦΙΑ

- Ables E.T., Bois K.E., Garcia C.A., Drummond-Barbosa D., 2015: *Ecdysone response* gene *E78* controls ovarian germ line stem cell niche formation and follicle survival in *Drosophila*. *Developmental Biology* 400, 33–42
- Aebersold R. and Mann M., 2003: Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* 422:198–207
- Ahuja A. and Singh R. S., 2008: Variation and evolution of male sex combs in *Drosophila*: Nature of selection response and theories of genetic variation for sexual traits. *The Genetics Society of America*. 179, 503-509
- Aitken A., Collinge D.B., van Heusden B.P., Isobe T., Roseboom P.H., et al., 1992: 14-3-3 proteins: a highly conserved, widespread family of eukaryotic proteins. *Trends Biochem Sci* 17: 498–501
- Aitken, et al., 2007 Aitken R.J., et al., 2007: Proteomic changes in mammalian spermatozoa during epididymal maturation. *Asian J Androl* 9:554–564
- Almeras, L., Fontaine, A., Belghazi, M., Bourdon, S., Boucomont-Chapeaublanc, E., et al., 2009: Salivary gland protein repertoire from *Aedes aegypti* mosquitoes. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, 10, 391–402
- Alphey L., Andreasen M., 2002: Dominant lethality and insect population control. *Mol Biochem Parasitol*.121(2):173–178. doi: 10.1016/S0166-6851(02)00040-3
- Alphey L.S., Beard C.B., Billingsley P., Coetzee M., Crisanti A., and Curtis C., 2002: Malaria control with genetically manipulated insect vectors. *Science* 298:119–121
- An Nguyen, T. T., Michaud, D., & Cloutier, C., 2007: Proteomic profiling of aphid *Macrosiphum euphorbiae* responses to host-plant-mediated stress induced by defoliation and water deficit. *J. Insect Physiol.*, 53, 601–611
- Andersen C.L., Jensen J.L., Ørntoft T.F., 2004: Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res* 64:5245–5250
- Andrews M.C., Callaghan A., Field L.M., Williamson M.S., Moores G.D., 2004: Identification of mutations conferring insecticide-insensitive AChE in the cotton-melon aphid, *Aphis gossypii* Glover. *Insect Mol. Biol.* 13, 555–561
- Andrews P.W., Banting G.S., Damjanov I., Arnaud D., Avner P., 1984: Three monoclonal antibodies defining distinct differentiation antigens associated with different high molecular weight polypeptides on the surface of human embryonal carcinoma cells. *Hybridoma* 3:347–361
- Andrews P.W., Casper J., Damjanov I., Duggan-Keen M., Giwercman A., Hata J., von Keitz A., Looijenga L.H., Millan J.L., Oosterhuis J.W., Pera M., Sawada M., Schmoll H.J., Skakkebaek N.E., van Putten W., Stern P., 1996: Comparative analysis of cell surface antigens expressed by cell lines derived from human germ cell tumours. *Int J Cancer* 66:806–816
- Ant T., Koukidou M., Rempoulakis P., Gong H.F., Economopoulos A., Vontas J., Alphey L., 2012: Control of the olive fruit fly using genetics-enhanced sterile insect technique. *BMC Biol*.10:51. doi: 10.1186/1741-7007-10-51
- Arai I., Ohta M., Suzuki A., Tanaka S., Yoshizawa Y., Sato R., 2013: Immunohistochemical analysis of the role of hemocytin in nodule formation in the larvae of the silkworm, *Bombyx mori*. *J Insect Sci* 13:1–13.
- Arnqvist G. and Rowe L., 2005: *Sexual Conflict*, Princeton University Press, Princeton, NJ, USA
- Arrigo A.P., Ahmad-Zadeh C., 1981: Immunofluorescence localization of a small heat shock protein (hsp 23) in salivary gland cells of *Drosophila melanogaster*. *Mol Gen Genet* 184:73–79
- Aslanidis C., de Jong P.J., 1990: Ligation-independent cloning of PCR products (LIC-PCR). *Nucleic Acids Res.* 18(20):6069-74
- Atallah J., 2008: *The Development and Evolution of Complex Patterns: The Drosophila Comb As a Model System*. Cell and System Biology. Toronto, University of Toronto. Ph.D
- Atallah J., Liu N., Dennis P., Hon A., Godt D., Larsen E., 2009: Cell dynamics and developmental bias in the ontogeny of a complex sexually dimorphic trait in *Drosophila melanogaster*. *Evolution and Development*. 11, 191-204
- Atkins W.M., Wang R.W., Bird A.W., Newton D.J., Lu A.Y., 1993: The catalytic mechanism of glutathione S-transferase (GST). Spectroscopic determination of the pKa of Tyr-9 in rat alpha 1-1 GST. *J Biol Chem*. 268(26):19188-91

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Auburn R.P., Kreil D.P., Meadows L.A., Fischer B., Matilla S.S., Russell S., 2005: Robotic spotting of cDNA and oligonucleotide microarrays. *TRENDS in Biotechnology* Vol.23 No.7
- Augustinos A.A., Mamuris Z., Stratikopoulos E.E., D'Amelio S., Zacharopoulou A., Mathiopoulos K.D., 2005: Microsatellite analysis of olive fruit fly populations in the Mediterranean indicates a westward expansion of the species. *Genetica* 125:231–241
- Augustinos A.A., Stratikopoulos E.E., Drosopoulou E., Kakani E.G., Mavragani-Tsipidou P., Zacharopoulou A., Mathiopoulos K.D., 2008: Isolation and characterization of microsatellite markers from the olive fly, *Bactrocera oleae*, and their cross-species amplification in the Tephritidae family. *BMC Genomics* 9:618
- Bai J., Uehara Y., Montell D.J., 2000: Regulation of invasive cell behavior by taiman, a *Drosophila* protein related to AIB1, a steroid receptor coactivator amplified in breast cancer. *Cell* 103,1047–1058
- Baimai V., Phinchongsakuldit J., Sumrandee C., 2000: Cytological evidence for a complex of species within the taxon *Bactrocera tau* (Diptera: Tephritidae) in Thailand. *Biol J Linn Soc* 69:399–409
- Baimai V., Trinachartvanit W., Tigvattananont S., Grote P.J., Poramarcom R., Kijchalao U., 1995: Metaphase karyotypes of fruit flies of Thailand. I. Five sibling species of the *Bactrocera dorsalis* complex (Diptera: Tephritidae). *Genome* 38:1015–1022
- Baldrige G.D., Feyereisen R., 1986: Ecdysteroid titer and oocyte growth in the northern house mosquito, *Culex pipiens* L. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol* 83:325–329
- Barmina O. and Kopp A., 2007: Sex-specific expression of a HOX gene associated with rapid morphological evolution. *Developmental Biology*. 311, 277-286
- Baumhover, A. H., Graham A. J., Bitter B. A., Hopkins D. E., New W. D., Dudley F. H. and Bushland R. C., 1955: Screwworm control through release of sterilized flies. *Journal of Economic Entomology* 48: 462–466
- Baxter S.W., Chen M., Dawson A., Zhao J.-Z., Vogel H., Shelton A.M., Heckel D.G., Jiggins C.D., 2010: Misspliced transcripts of nicotinic acetylcholine receptor alpha6 are associated with field evolved spinosad resistance in *Plutella xylostella* (L.). *PLoS Genet* 6:e1000802
- Bayyareddy, K., Andacht, T. M., Abdullah, M. A., & Adang, M. J., 2009: Proteomic identification of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* toxin Cry4Ba binding proteins in midgut membranes from *Aedes (Stegomyia) aegypti* Linnaeus (Diptera, Culicidae) larvae. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 39, 279–286
- Bedo D.G., 1986: Polytene and mitotic chromosome analysis in *Ceratitidis capitata* (Diptera; Tephritidae). *Can J Genet Cytol* 28:180–188
- Bennett E.P., Hassan H., Mandel U., Hollingsworth M.A., Akisawa N., Ikematsu Y., Merckx G., van Kessel A.G., Olofsson S., Clausen H., 1999: Cloning and characterization of a close homologue of human UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine: polypeptide N-acetylgalactosaminyl-transferase-T3, designated GalNAc-T6. Evidence for genetic but not functional redundancy. *J Biol Chem* 274:25362–25370
- Bergmann A., Agapite J., McCall K., Steller H., 1998: The *Drosophila* gene *hid* is a direct molecular target of Ras-dependent survival signaling. *Cell* 95(3): 331-341
- Bernard P., 1995: New ccdB positive-selection cloning vectors with kanamycin or chloramphenicol selectable markers. *Gene* 162(1):159-60
- Betran E., Thornton K., and Long M., 2002: Retroposed new genes out of the X in *Drosophila*. *Genome Research*, vol. 12, no. 12, pp. 1854–1859
- Beye M., 2004: The dice of fate: the *csd* gene and how its allelic composition regulates sexual development in the honey bee, *Apis mellifera*. *BioEssays* 26: 1131–9
- Beye M., Hasselmann M., Fondrk M.K., Page R.E., et al., 2003: The gene *csd* is the primary signal for sexual development in the honeybee and encodes an SR-type protein. *Cell* 114: 419–29
- Bigler F., Neuenschwander P., Delucchi V., Michelakis S.E., 1986: Natural enemies of preimaginal stages of *Dacus oleae* Gmel. (Dipt., Tephritidae) in Western Crete II: impact on olive fruit fly populations. *Boll. Lab. Entomol. Agrar. Filippo Silvestri* 43:79–96
- Bil M., Broeckx V., Landuyt B., Huybrechts R., 2014: Differential peptidomics highlights adipokinetic hormone as key player in regulating digestion in anautogenous flesh fly, *Sarcophaga crassipalpis*. *Gen Comp Endocrinol*. 1;208:49-56. doi: 10.1016/j.ygcen.2014.08.016. Epub 2014 Sep 16

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Birnboim H.C., Doly J., 1979: A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7(6):1513-23
- Biron, D. G., Marche, L., Ponton, F., Loxdale, H. D., Galeotti, N., et al., 2005: Behavioural manipulation in a grasshopper harbouring hairworm: A proteomics approach. *Proc. Biol. Sci.*, 272, 2117–2126
- Biron, D. G., Ponton, F., Marche, L., Galeotti, N., Renault, L., et al., 2006: “Suicide” of crickets harbouring hairworms: A proteomics investigation. *Insect Mol. Biol.*, 15, 731–742
- Bloomquist J.R., 1996: Ion channels as targets for insecticides. *Ann Rev Entomol* 41: 163-190
- Bolivar F., Rodriguez R.L., Betlach M.C., Boyer H.W., 1977: Construction and characterization of new cloning vehicles. I. Ampicillin-resistant derivatives of the plasmid pMB9. *Gene* 2(2):75-93
- Bond J.S., Butler P.E., 1987: Intracellular proteases. *Annu Rev Biochem* 56:333–364
- Borovsky D., 1982: Release of egg development neurosecretory hormone in *Aedes aegypti* and *Aedes taeniorhynchus* induced by an ovarian factor. *J Insect Physiol* 28:311–316
- Bownes M., 1994: The regulation of the *yolk protein* genes, a family of sex differentiation genes in *Drosophila melanogaster*, *BioEssays* Vol.16, No.10
- Bownes M., Blair M., Kozma R., Dempster M., 1983: 20-hydroxyecdysone stimulates tissue-specific yolk-protein gene transcription in both male and female *Drosophila*. *Journal of embryology and experimental morphology* 78: 249–268
- Brenner S., Johnson M., Bridgham J., Golda G., Lloyd D. H., Johnson D., Luo S., McCurdy S., Foy M., Ewan M., Roth R., George D., Eletr S., Glenn A., Eric V., Steven R. W., Keith M., Burcham T., Pallas M., DuBridge R. B., Kirchner J., Fearon K., Mao J., and Corcoran K., 2000: Gene expression analysis by massively parallel signature sequencing (MPSS) on microbead arrays. *Nature Biotechnology*, 18(6): 630-4
- Brent A.E., MacQueen A. and Hazelrigg T., 2000: The *Drosophila wispy* gene is required for RNA localization and other microtubulebased events of meiosis and early embryogenesis. *Genetics* 154: 1649–1662
- Bret B.L., Larson L.L., Schoonover J.R., Sparks T.C., Thompson G.D., 1997: Biological properties of spinosad. *Down Earth* 52, 6–13.
- Bridges C.B. and Brehme K., 1944: The mutants of *Drosophila melanogaster*. Carnegie Instn. Washington, Publ. 552. 257 pp
- Bridgham J.T., Eick G.N., Larroux C., Deshpande K., Harms M.J., Gauthier M.E., Ortlund E.A., Degnan B.M., Thornton J.W., 2010. Protein evolution by molecular tinkering: diversification of the nuclear receptor superfamily from a ligand-dependent ancestor. *PLoS Biol.* 8
- Brown S.E., Howard A., Kasprzak A.B., Gordon K.H., East P.D., 2009: A peptidomics study reveals the impressive antimicrobial peptide arsenal of the wax moth *Galleria mellonella*. *Insect Biochem Mol Biol.* 39(11):792-800. doi: 10.1016/j.ibmb.2009.09.004
- Bull J.J., 1983: Evolution of Sex Determining Mechanisms. Menlo Park, California: Benjamin/Cummings Publishing Company
- Bustin S. A., Benes V., Nolan T., and Pfaffl M. W., 2005: Quantitative real-time RT-PCR- a perspective. *J Mol Endocrinol* 34, 597-601
- Buszczak M., Freeman M.R., Carlson J.R., Bender M., Cooley L. et al., 1999: Ecdysone response genes govern egg chamber development during midoogenesis in *Drosophila*. *Development* 126: 4581–4589
- Cáceres C., 2002: Mass rearing of temperature sensitive genetic sexing strains in the Mediterranean fruit fly (*Ceratitidis capitata*). *Genetica* 116(1):107-16
- Cambi A., Figdor C., 2009: Necrosis: C-type lectins sense cell death. *Curr Biol* 19:R375–R378
- Candas, M., Loseva, O., Oppert, B., Kosaraju, P., & Bulla, L. A., Jr., 2003: Insect resistance to *Bacillus thuringiensis*: Alterations in the indianmeal moth larval gut proteome. *Mol. Cell Proteomics*, 2, 19–28
- Carney G.E., Bender M., 2000: The *Drosophila ecdysone receptor (EcR)* gene is required maternally for normal oogenesis. *Genetics* 154,1203–1211
- Carolan, J. C., Fitzroy, C. I., Ashton, P. D., Douglas, A. E., & Wilkinson, T. L., 2009: The secreted salivary proteome of the pea aphid *Acyrtosiphon pisum* characterised by mass spectrometry. *Proteomics*, 9, 2457–2467

BIBΛIOΓΡΑΦΙΑ

- Carvalho A.B., Lazzaro B.P., Clark A.G., 2000: Y chromosomal fertility factors kl-2 and kl-3 of *Drosophila melanogaster* encode dynein heavy chain polypeptides. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:13239-44
- Cevallos V.E., Nation J.L., 2004: Chromosomes of the Caribbean fruit fly (Diptera: Tephritidae). *Fla Entomol* 87:361–364
- Chan, Q. W., & Foster, L. J., 2008: Changes in protein expression during honey bee larval development. *Genome Biol.*, 9, R156
- Chen J., Litscher E.S., Wassarman P.M., 1998: Inactivation of the mouse sperm receptor, mZP3, by site-directed mutagenesis of individual serine residues located at the combining site for sperm. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:6193–6197
- Chen, H., Wilkerson, C. G., Kuchar, J. A., Phinney, B. S., & Howe, G. A., 2005: Jasmonate-inducible plant enzymes degrade essential amino acids in the herbivore midgut. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102, 19237–19242
- Chen, L. Z., Liang, G. M., Zhang, J., Wu, K. M., Guo, Y. Y., & Rector, B. G., 2009: Proteomic analysis of novel Cry1Ac binding proteins in *Helicoverpa armigera* (Hubner). *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 73, 61–73
- Chicoine J., Benoit P., Gamberi C., Paliouras M., Simonelig M. et al., 2007: Bicaudal-C recruits CCR4-NOT deadenylase to target mRNAs and regulates oogenesis, cytoskeletal organization, and its own expression. *Dev. Cell* 13: 691–704
- Chomczynski P., 1992: Solubilization in formamide protects RNA from degradation. *Nucleic Acids Res.* 20(14):3791-2
- Christen B. and Bienz M., 1994: Imaginal disc silencers from *Ultrabithorax*: evidence for *Polycomb* response elements. *Mech. Dev.* 48, 255-266
- Clark J.M., 1988: Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by procaryotic and eucaryotic DNA polymerases. *Nucleic Acids Res.* 16(20):9677-86
- Concha C., Scott M.J., 2009: Sexual development in *Lucilia cuprina* (Diptera, Calliphoridae) is controlled by the transformer gene. *Genetics* 182: 785–98
- Contreras-Shannon V., McAlister-Henn L., 2004: Influence of compartmental localization on the function of yeast NADP⁺-specific isocitrate dehydrogenases. *Arch Biochem Biophys.* 423(2):235-46
- Corpas F.J., Barroso J.B., Sandalio L.M., Palma J.M., Lupiáñez J.A., del Río L.A., 1999: Peroxisomal NADP-Dependent Isocitrate Dehydrogenase. Characterization and Activity Regulation during Natural Senescence. *Plant Physiol.* 121(3):921-928
- Costa V., Angelini C., De Feis I. and Ciccodicola A., 2010: Uncovering the Complexity of Transcriptomes with RNA-Seq. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, Article ID 853916, 19 pages. doi:10.1155/2010/853916
- Cox J., Neuhauser N., Michalski A., Scheltema R.A., Olsen J.V., Mann M., 2011: Andromeda: a peptide search engine integrated into the Max Quant environment. *J. Proteome Res* 10:1794–1805
- Craig R., Beavis R.C., 2004: TANDEM: matching proteins with tandem mass spectra. *Bioinformatics* 20:1466–1467
- Crémazy F., Berta P., Girard F., 2000: *Sox neuro*, a new *Drosophila Sox* gene expressed in the developing central nervous system. *Mech Dev* 93:215-9
- Cui J., Sackton K.L., Horner V.L., Kumar K.E. and Wolfner M.F., 2008: Wispy, the *Drosophila* Homolog of GLD-2, Is Required During Oogenesis and Egg Activation. Copyright by the Genetics Society of America. DOI: 10.1534/genetics.107.084558
- Dabelsteen E., Jacobsen G.K., 1991: Histo-blood group antigens as differentiation markers in testicular germ cell tumours. *APMIS* 99:391–397
- Dame et al. 1980; Dame D.A., Williamson D.L., Cobb P.E., Gates D.B., Warner P.V, Mtuya A.G., and Baumgartner H., 1980: Integration of sterile insects and pesticides for the control of the tsetse fly *Glossina morsitans morsitans*, pp. 267–280. In *Proceedings, Symposium: Isotope and Radiation Research on Animal Diseases and their Vectors*. Food and Agriculture Organization of the United Nations/International Atomic Energy Agency, 7–11 May 1979, Vienna, Austria. STI/PUB/525. IAEA, Vienna, Austria
- Davies E.L., Lim J.G.Y, Joo W.J., Tama C., Fuller M.T., 2012: The transcriptional regulator *lola* is required for stem cell maintenance and germ cell differentiation in the *Drosophila* testis. *Dev Biol.* 373(2):310-21. doi: 10.1016/j.ydbio.2012.11.004. Epub 2012 Nov 15
- de Graaf, D. C., Aerts, M., Brunain, M., Desjardins, C. A., Jacobs, F. J., et al., 2010: Insights into the venom compo-

- sition of the ectoparasitoid wasp *Nasonia vitripennis* from bioinformatic and proteomic studies. *Insect Mol. Biol.*, 19(Suppl. 1), 11–26
- Deatrick J., Daly M., Randsholt N. B. and Brock H. W., 1991: The complex genetic locus *polyhomeotic* in *Drosophila melanogaster* potentially encodes two homologous zinc-finger proteins. *Gene* 105, 185- 195
- Denison M.S., Chambers J.E., Yarbrough J.D., 1981: Persistent vitellogenin-like protein and binding of DDT in the serum of insecticide-resistant mosquitofish (*Gambusia affinis*). *Comp Biochem Physiol C*. 69C:109–112
- Doctor J., Fristrom D., Fristrom J.W., 1985: The pupal cuticle of *Drosophila*: biphasic synthesis of pupal cuticle proteins in vivo and in vitro in response to 20-hydroxyecdysone. *J Cell Biol* 101:189-200
- Domon B., Aebersold R., 2006: Review - Mass spectrometry and protein analysis. *Science* 312:212–217
- Doniach T., Hodgkin J., 1984: A sex-determining gene, *fem-1*, required for both male and hermaphrodite development in *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* 106:223-35
- Dower W.J., Miller J.F., Ragsdale C.W., 1988: High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* 16(13):6127-45
- Drosopoulou E., Chrysopoulou A., Nikita V., Mavragani-Tsipidou P., 2009: The *heat shock 70* genes of the olive pest *Bactrocera oleae*: genomic organization and molecular characterization of a transcription unit and its proximal promoter region. *Genome* 52:210–214
- Drosopoulou E., Koepler K., Kounatidis I., Nakou I., Papadopoulos N.T., Bourtzis K., Mavragani-Tsipidou P., 2010: Genetic and cytogenetic analysis of the walnut-husk fly (Diptera: Tephritidae). *Ann Entomol Soc Am* 103:1003–1011
- Drosopoulou E., Nakou I., Síchová J., Kubíčková S., Marec F., Mavragani-Tsipidou P., 2012: Sex chromosomes and associated rDNA form a heterochromatic network in the polytene nuclei of *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae). *Genetica*, 140:169-80. DOI 10.1007/s10709-012-9668-3
- Drosopoulou E., Nestel D., Nakou I., Kounatidis I., Papadopoulos N.T., Bourtzis K., Mavragani-Tsipidou P., 2011: Cytogenetic analysis of the Ethiopian fruit fly *Dacus ciliatus* (Diptera: Tephritidae). *Genetica*, 139:723–732
- Drosopoulou E., Augustinos A.A., Nakou I., Koepler K., Kounatidis I., Vogt H., Papadopoulos N.T., Bourtzis K., Mavragani-Tsipidou P., 2011: Genetic and cytogenetic analysis of the American cherry fruit fly, *Rhagoletis cingulata* (Diptera: Tephritidae). *Genetica*, 139(11-12):1449-64. doi: 10.1007/s10709-012-9644-y
- Dubendorfer A., Hediger M., Burghardt G., Bopp D., 2002: *Musca domestica*, a window on the evolution of sex-determining mechanisms in insects. *Int J Dev Biol* 46: 75–9
- Dura J. M., Randsholt N. B., Deatrick J., Erk I., Santamaria P., Freeman J. D., Freeman S. J., Weddell D. and Brock H. W., 1987: A complex genetic locus, *polyhomeotic*, is required for segmental specification and epidermal development in *D. melanogaster*. *Cell* 51, 829-839
- Eberspaecher U., et al., 1995: Mouse androgen-dependent epididymal glycoprotein CRISP-1 (DE/AEG): Isolation, biochemical characterization, and expression in recombinant form. *Mol Reprod Dev* 42(2):157–172
- Economopoulos A.P. 1977: Gamma-ray sterilization of *Dacus oleae* (Gmelin). Effect of nitrogen on the competitiveness of irradiated males. *Z. Angew. Ent.* 83: 86-95
- Economopoulos A.P. and Tzanakakis M.E., 1967: Egg yolk and olive juice as supplements to the yeast hydrolyzate-sucrose diet for adults of *Dacus oleae*. *Life Sci.* 6: 2409-2416.
- Economopoulos A.P., 1972: Sexual competitiveness of γ-ray sterilized males of *Dacus oleae*. Mating frequency of artificially reared and wild females. *Environmental Entomology* 1, 490-497
- Economopoulos A.P., Avtzis N., Zervas G., Tsitsipis J., Haniotakis G., Tsiropoulos G., Manoukas A., 1977: Control of the olive fly, *Dacus oleae* (Gmelin), by the combined effects of insecticides and release of gamma sterilised insects. *J Appl Entomol.* 83:201–215
- Economopoulos A.P., Giannakakis A., Tzanakakis M.E., Voyadjoglou A.V., 1971: Reproductive behavior and physiology of the olive fruit fly. 1. Anatomy of the adult rectum and odors emitted by adults. *Annals of the Entomological Society of America* 64: 1112-1116
- Ellegren H. and Parsch J., 2007: The evolution of sex-biased genes and sex-biased gene expression. *Nature Reviews Genetics*, vol. 8, no. 9, pp. 689–698
- Ellington, W.R., 2001. Evolution and physiological roles of phosphagen systems. *Ann. Rev. Physiol.* 63, 289 – 325

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Enayati A.A., Ranson H., Hemingway J., 2005: Insect glutathione transferases and insecticide resistance. *Insect Mol Biol.* 14(1):3-8
- Encyclopedia of Insects, Resh and Cardé, 2003
- Eng J., McCormack A., Yates J., 1994: An approach to correlate tandem mass spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein database. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 5:976-989
- Eng J.K., Searle B.C., Clauser K.R., Tabb D.L., 2011: A face in the crowd: recognizing peptides through database search. *Mol. Cell Proteomics* 10(R111): 009522
- Ensslin M.A., Shur B.D., 2003: Identification of mouse sperm SED1, a bimotif EGF repeat and discoidin-domain protein involved in sperm-egg binding. *Cell* 114:405-417
- Eppig J.J., 2001: Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction* 122:829-838
- Erickson JW, Quintero JJ. 2007. Indirect effects of ploidy suggest X chromosome dose, not the X:A ratio, signals sex in *Drosophila*. *PLoS Biol* 5: e332
- Ferl R.J., Manak M.S., Reyes M.F., 2002: The 14-3-3s. *Genome Biol* 3: REVIEWS3010
- Feyereisen R., 1995: Molecular biology of insecticide resistance. *Toxicol. Lett.* 82/83, 83-90
- Feyereisen R., 1999: Insect P450 enzymes. *Annu Rev Entomol* 44:507-533
- Fialho E., Silveira A.B., Masuda H., Silva-Neto M.A., 2002: Oocyte fertilization triggers acid phosphatase activity during *Rhodnius prolixus* embryogenesis. *Insect Biochem Mol Biol* 32:871-880
- Filho B.P.D., Lemos F.J.A., Secundino N.F.C., Páscoa V., Pereira S.T., Pimenta P.F.P., 2002: Presence of chitinase and beta-N-acetylglucosaminidase in the *Aedes aegypti*, a chitinolytic system involving peritrophic matrix formation and degradation. *Insect Biochem Mol Biol* 32:1723-1729
- Findlay, G. D., MacCoss, M. J., & Swanson, W. J., 2009: Proteomic discovery of previously unannotated, rapidly evolving seminal fluid genes in *Drosophila*. *Genome Res.*, 19, 886-896
- Fisher et al. 1985; Fisher K.T., Hill A.R., and Sproul A.N., 1985: Eradication of *Ceratitidis capitata* (Wiedemann) (Diptera:Tephritidae) in Carnarvon, Western Australia. *J. Aust. Entomol. Soc.* 24: 207-208
- Fisher K., 1998: *Genetic Sexing Strains of Mediterranean Fruit Fly (Diptera: Tephritidae): Optimizing High Temperature Treatment of Mass-Reared Temperature-Sensitive Lethal Strains.* *Journal of Economic Entomology* 91: 1406-1414. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/jee/91.6.1406>
- Fisher K.T. and Cáceres C., 2000: A filter rearing system for mass reared genetic sexing strains of Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae), pp. 543-550. In *Proceedings of the Fifth International Symposium on Fruit Flies of Economic Importance*. Penang, Malaysia
- Fletcher B.S., 1989: Ecology; movements of tephritid fruit flies. In: *World crop pests 3(B). Fruit flies; their biology, natural enemies and control* (Ed. by Robinson, A.S.; Hooper, G.), pp. 209- 219. Elsevier, Amsterdam, Netherlands
- Forconi M. and Herschlag D., 2009: Metal Ion-Based RNA Cleavage as a Structural Probe. *Methods in Enzymology*, Volume 468, DOI: 10.1016/S0076-6879(09)68005-8
- Foster J.A., Gerton G.L., 1996: Autoantigen 1 of the guinea pig sperm acrosome is the homologue of mouse Tpx-1 and human TPX1 and is a member of the cysteine-rich secretory protein (CRISP) family. *Mol Reprod Dev* 44:221-229
- Fournier D., Bride J.M., Hoffmann F., Karch F., 1992: Acetylcholinesterase. Two types of modifications confer resistance to insecticide, *J. Biol. Chem.* 267, 14270-14274
- Francis, F., Gerkens, P., Harmel, N., Mazzucchelli, G., De Pauw, E., & Haubruge, E., 2006: Proteomics in *Myzus persicae*: Effect of aphid host plant switch. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 36, 219-227
- Franco M.G., Rubini P.G., Vecchi M., 1982: Sex-determinants and their distribution in various populations of *Musca domestica L.* of Western Europe. *Genet Res* 40: 279-93
- Franz G., 2005: Genetic sexing strains in Mediterranean fruit fly, an example for other species amenable to largescale rearing for the sterile insect technique. In: *Sterile insect technique: principles and practice in area-wide integrated management*. Ed. by Dyck V.A., Hendrichs J., Robinson A.S., Springer, Netherlands, 427-452
- Franz, G., Kerremans P., Rendon P. and Hendrichs J., 1996: Development and application of genetic sexing systems for the Mediterranean fruit fly based on a temperature sensitive lethal, pp. 185-191. In B. A. McPherson and G. J. Steck [eds.], *Fruit fly pests: a world assessment of their biology and management*. St. Lucie Press, Delray Beach, FL

BIBΛIOΓΡΑΦΙΑ

- Frias D., 2002: Importance of larval morphology and heterochromatic variation in the identification and evolution of sibling species in the genus *Rhagoletis* (Diptera: Tephritidae) in Chile. In: Barnes BN (ed) Proceedings, 6th international symposium on fruit flies of economic importance, Stellenbosch. Isteq Scientific Publications, Irene, pp 267–276
- Fu, Q., Liu, P. C., Wang, J. X., Song, Q. S., & Zhao, X. F., 2009: Proteomic identification of differentially expressed and phosphorylated proteins in epidermis involved in larval–pupal metamorphosis of *Helicoverpa armigera*. BMC Genomics, 10, 600
- Furukawa Y., Tsukamoto K., Ikezawa H., 1997: Mutational analysis of the C- terminal signal peptide of bovine liver 5'-nucleotidase for GPI anchoring: a study on the significance of the hydrophilic spacer region. Biochim Biophys Acta 1328:185-196.
- Furusawa, T., Rakwal, R., Nam, H. W., Hirano, M., Shibato, J., et al., 2008a: Systematic investigation of the hemolymph proteome of *Manduca sexta* at the fifth instar larvae stage using one- and two-dimensional proteomics platforms. J. Proteome Res., 7, 938–959
- Furusawa, T., Rakwal, R., Nam, H. W., Shibato, J., Agrawal, G. K., et al., 2008b: Comprehensive royal jelly (RJ) proteomics using one- and two-dimensional proteomics platforms reveals novel RJ proteins and potential phospho/ glycoproteins. J. Proteome Res., 7, 3194–3229
- Fyrberg E.A., Kindle K.L., Davidson N., Kindle K.L., 1980: The *actin* genes of *Drosophila*: a dispersed multigene family. Cell 19(2):365-78
- Fyrberg E.A., Mahaffey J.W., Bond B.J., Davidson N., 1983: Transcripts of the six *Drosophila actin* genes accumulate in a stage- and tissue-specific manner. Cell 33(1):115-23
- Gabrieli P., Falaguerra A., Siciliano P., Gomulski L.M., Scolari F. et al., 2010: Sex and the single embryo: early development in the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*. BMC Dev Biol 10: 12
- Gabrieli P., Gomulski L.M., Bonomi A., Siciliano P., Scolari F., Franz G., Jessup A., Malacrida A.R., Gasperi G., 2011: Interchromosomal duplications on the *Bactrocera oleae* Y chromosome imply a distinct evolutionary origin of the sex chromosomes compared to *Drosophila*. PLoS One 6:e17747
- Gancz D., Lengil T., Gilboa L., 2011: Coordinated regulation of niche and stem cell precursors by hormonal signaling. PLoS Biol. 9(11):e1001202. doi: 10.1371/journal.pbio.1001202. Epub 2011 Nov 22
- Garcia-Martinez V., Hernandez-Ortiz E., Zepeta-Cisneros C.S., Robinson A.S., Zacharopoulou A., Franz G., 2009: Mitotic and polytene chromosome analysis in the Mexican fruit fly, *Anastrepha ludens* (Loew) (Diptera: Tephritidae). Genome 52:20–30
- Gardino A.K., Smerdon S.J., Yaffe M.B., 2006: Structural determinants of 14-3-3 binding specificities and regulation of subcellular localization of 14-3-3-ligand complexes: a comparison of the X-ray crystal structures of all human 14-3-3 isoforms. Semin Cancer Biol 16: 173–182
- Garen A., Kauvar L., Lepesant J.A., 1977: Roles of ecdysone in *Drosophila* development. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 74: 5099–5103
- Garrett-Engle C.M., Siegal M.L., Manoli D.S., Williams B.C., Li H., Baker B.S., 2002: *intersex*, a gene required for female sexual development in *Drosophila*, is expressed in both sexes and functions together with *doublesex* to regulate terminal differentiation. Development 129:4661-75
- Gazivova I., Bonnette P.C., Henrich V.C., Jindra M., 2004: Cell-autonomous roles of the ecdysoneless gene in *Drosophila* development and oogenesis. Development 131: 2715–2725
- Geer L.Y., Markey S.P., Kowalak J.A., Wagner L., Xu M., Maynard D.M., Yang X., Shi W., Bryant S.H., 2004: Open mass spectrometry search algorithm. J. Proteome Res. 3:958–964
- Gempe T., Hasselmann M., Schiott M., Hause G., et al., 2009: Sex determination in honeybees: two separate mechanisms induce and maintain the female pathway. PLoS Biol 7: e1000222
- Gepner J., Hays T.S., 1993: A fertility region on the Y chromosome of *Drosophila melanogaster* encodes a dynein microtubule motor. Proc Natl Acad Sci USA 90:11132-6
- Gibbons I.R., 1995: Dynein family of motor proteins: present status and future questions. Cell Motil Cytoskeleton 32:136-44
- Gibbs et al., 2006; Gibbs G.M., et al., (2006) The cysteine-rich secretory protein domain of Tpx-1 is related to ion channel toxins and regulates ryanodine receptor Ca²⁺ signaling. J Biol Chem 281:4156–4163.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Gibbs G.M., Ortab G., Reddy T., Koppersa A.J., Martínez-López P., Vega-Beltrán J.L., Loa J.C.Y., Veldhuis N., Jamsaia D., McIntyre P., Darszonb A. and O'Bryan M.K., 2011: Cysteine-rich secretory protein 4 is an inhibitor of transient receptor potential M8 with a role in establishing sperm function. *PNAS* vol. 108, no. 17, 7034–7039
- Gibbs G.M., Roelants K., O'Bryan M.K., 2008: The CAP superfamily: Cysteine-rich secretory proteins, antigen 5, and pathogenesis-related 1 proteins—roles in reproduction, cancer, and immune defense. *Endocr Rev* 29:865–897
- Gibson G., 2003: Microarray analysis: genome-scale hypothesis scanning. *PLoS Biol.*1(1):E15
- Goeke S., Greene E.A., Grant P.K., Gates M.A., Crowner D., Aigaki T., Giniger E., 2003: Alternative splicing of *lola* generates 19 transcription factors controlling axon guidance in *Drosophila*. *Nat. Neurosci.*6, 917–924
- Goldstein L.S., Hardy R.W., Lindsley D.L., 1982: Structural genes on the Y chromosome of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci USA* 79:7405-9
- Gong M., Shen B., Gu Y., Tian H., Ma L., Li X., Yang M., Hu Y., Sun Y., Hu X., Li J., Zhu C., 2005: Serine proteinase over-expression in relation to deltamethrin resistance in *Culex pipiens pallens*. *Arch Biochem Biophys* 438:53–62
- Gonzalez-Villaseñor L.I., Powers D.A., 1985: A multilocus system for studying tissue and subcellular specialization. The three NADP-dependent isocitrate dehydrogenase isozymes of the fish *Fundulus heteroclitus*. *J Biol Chem.* 260(16):9106-13
- Gottschewski G., 1936: Quantitative und qualitative Unterschiede innerhalb einer Allelenreihe bei *Drosophila melanogaster*. 2001. *Anz. Suppl.* 9: 104-112
- Goulielmos G.N., Cosmidis N., Eliopoulos E., Loukas M., Zouros E., 2006: Cloning and structural characterization of the 6-phosphogluconate dehydrogenase locus of the medfly *Ceratitis capitata* and the olive fruit fly *Bactrocera oleae*. *Biochem Biophys Res Commun* 341:721–727
- Goulielmos G.N., Cosmidis N., Loukas M., Tsakas S., Zouros E., 2001: Characterization of two alcohol dehydrogenase (Adh) loci from the olive fruit fly, *Bactrocera (Dacus) oleae* and implications for Adh duplication in dipteran insects. *J Mol Evol* 52:29–39
- Goulielmos G.N., Cosmidis N., Theodorakopoulou M.E., Loukas M., Zouros E., 2003: Tracing the history of an enzyme polymorphism: the case of alcohol dehydrogenase-2 (Adh-2) of the olive fruit fly *Bactrocera oleae*. *Mol Biol Evol* 20:293–306
- Graveley B. R., Brooks A. N., Carlson J. W. et al., 2011: The developmental transcriptome of *Drosophila melanogaster*. *Nature*, vol. 471, no. 7339, pp. 473–479
- Graves J.A., 2006: Sex chromosome specialization and degeneration in mammals. *Cell* 124: 901–14
- Grossman G.L., James A.A., 1993: The salivary glands of the vector mosquito, *Aedes aegypti*, express a novel member of the amylase gene family. *Insect Mol Biol* 1:223–232
- Grskovic M. and Ramalho-Santos M., 2008: The pluripotent transcriptome. *StemBook*, ed. The Stem Cell Research Community, StemBook, doi/10.3824/stembook.1.24.1
- Gubbay J., Collignon J., Koopman P., Capel B., Economou A., Münsterberg A., Vivian N., Goodfellow P., Lovell-Badge R., 1990: A gene mapping to the sex determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. *Nature* 346:245-50
- Guengerich F.P., 2008: Cytochrome p450 and chemical toxicology. *Chem Res Toxicol* 21:70–83
- Guo M. et al., 2005: Crystal structure of the cysteine-rich secretory protein stecrisp reveals that the cysteine-rich domain has a K⁺ channel inhibitor-like fold. *J Biol Chem* 280:12405–12412
- Hagedorn H., Kunkel J., 1979: Vitellogenin and Vitellin in Insects. *Annu Rev Entomol* 24:475–505
- Hagen K.S., Santas L., Tsekouras A., 1963: A technique of culturing the olive fly *Dacus oleae* Gmel. on synthetic media under xenic conditions. p. 333-356. In *Radiation and Radioisotopes Applied to Insects of Agricultural Importance*. Proc. Symp. Athens Int. Atom. Energy Agency, Vienna
- Haldane J. B. S., 1922: Sex ratio and unisexual sterility in hybrid animals. *Journal of Genetics*, vol. 12, no. 2, pp. 101–109
- Handler A.M., 2002: Prospects for using genetic transformation for improved SIT and new biocontrol methods *Genetica* 116: 137–149

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Handler A.M., Postlethwait J.H., 1977: Endocrine control of vitellogenesis in *Drosophila melanogaster*: effects of the brain and corpus allatum. *J Exp Zool* 202:389–402
- Hardy D.M., Garbers D.L., 1995: A sperm membrane protein that binds in a species-specific manner to the egg extracellular matrix is homologous to von Willebrand factor. *J Biol Chem* 270:26025–26028
- Hardy R.W., Tokuyasu K.T., Lindsley D.L., 1981: Analysis of spermatogenesis in *Drosophila melanogaster* bearing deletions for Y-chromosome fertility genes. *Chromosoma* 83:593-617
- Harris S., Jones D.B., 1977: Optimisation of the polymerase chain reaction. *Br J Biomed Sci.* 54(3):166-73
- Hasselmann M., Gempe T., Schiott M., Nunes-Silva C.G., et al., 2008: Evidence for the evolutionary nascence of a novel sex determination pathway in honeybees. *Nature* 454: 519–22
- Hauerland N.H., 1996: Insect storage proteins: gene families and receptors. *Insect Biochem Mol Biol* 26:755–765
- Hediger M., Henggeler C., Meier N., Perez R., et al., 2010: Molecular characterization of the key switch F provides a basis for understanding the rapid divergence of the sex-determining pathway in the housefly. *Genetics* 184: 155–70
- Hediger M.A., Romero M.F., Peng J.B., Rolfs A., Takanaga H., Bruford E.A., 2004: The ABCs of solute carriers: physiological, pathological and therapeutic implications of human membrane transport proteins. *Pflugers Arch* 447:465–468
- Heinrich J.C., Scott M.J., 2000: A repressible female-specific lethal genetic system for making transgenic insect strains suitable for a sterile-release program. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 8229–8232
- Hemingway J., 2000: The molecular basis of two contrasting metabolic mechanisms of insecticide resistance. *Insect Biochem Mol Biol* 30: 1009-1015
- Hendrichs, J., Ortiz G., Liedo P. and Schwarz A., 1983: Six years of successful medfly program in Mexico and Guatemala, pp. 353–365. In R. Cavalloro (ed.), *Proceedings, Symposium: Fruit Flies of Economic Importance*. CEC/IOBC International Symposium, 16–19 November 1982, Athens, Greece. A. A. Balkema, Rotterdam, The Netherlands
- Herrera-Estrella A., Chet I., 1999: Chitinases in biological control. *EXS* 87:171–184
- Holm, L., & Sander, C., 1997: Dali/FSSP classification of three-dimensional protein folds. *Nucleic Acids Res.*, 25, 231–234
- Horn C., Wimmer E.A., 2003: A transgene-based, embryo-specific lethality system for insect pest management. *Nat Biotechnol.* 21(1):64-70
- Horwitz J.P., Chua J., Curby R.J., Tomson A.J., Darooge M.A., Fisher B.E., Mauricio J., Klundt I., 1964: substrates for cytochemical demonstration of enzyme activity. I. Some substituted 3-indolyl-beta-d-glycopyranosides. *J Med Chem.* 7:574-5
- Horwitz J.P., Chua J., Noel M., Donatti J.T., Freisler J., 1966: Substrates for cytochemical demonstration of enzyme activity. II. Some dihalo-3-indolyl phosphates and sulfates. *J Med Chem.* 9(3):447
- Hsu J.C., Feng H.T., Wu W.J., Geib S.M., Mao C., Vontas J., 2012: Truncated transcripts of nicotinic acetylcholine subunit gene *Bda6* are associated with spinosad resistance in *Bactrocera dorsalis*. *Insect Biochem Mol Biol.* 42:806–815
- Hsu J.C., Haymer D.S., Chou M.Y., Feng H.T., Chen H.H., Huang Y.B., Mau R.F.L., 2012: Monitoring resistance to spinosad in the melon fly (*Bactrocera cucurbitae*) in Hawaii and Taiwan. *Scientific World J:* 750576
- Hsu J.C., Haymer D.S., Wu W.J., Feng H.T., 2006: Mutations in the acetylcholinesterase gene of *Bactrocera dorsalis* associated with resistance to organophosphorus insecticides. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 36:396–402
- Hughes C., Ma B., Lajoie G.A., 2010: *De novo* sequencing methods in proteomics. *Methods Mol. Biol.* 604:105–121
- Hummon A.B., Richmond T.A., Verleyen P., Baggerman G., Huybrechts J., Ewing M.A., Vierstraete E., Rodriguez-Zas S.L., Schoofs L., Robinson G.E., Sweedler J.V., 2006: From the genome to the proteome: uncovering peptides in the *Apis* brain. *Science* 314:647–649
- Hunwattanakul N., Baimai V., 1994: Mitotic karyotype of four species of fruit flies (*Bactrocera*) in Thailand. *Kasetsart J Nat Sci* 28:142–148
- Iannotta N., Noce M.E., Ripa V., Scalercio S., Vizzarri V., 2007: Assessment of susceptibility of olive cultivars to the *Bactrocera oleae* (Gmelin, 1790) and *Camarosporium dalmaticum* (Thum.) Zachos & Tzav.-Klon., attacks in

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Calabria (Southern Italy). *J. Environ. Sci. Health Part B* 42:789–93
- Inoue H., Fukumori Y., Hiroyoshi T., 1983: Mapping of autosomal maledetermining factors of the housefly, *Musca domestica* L., by means of sex-reversal. *Jpn J Genet* 58: 451–61
- Intelicato-Young J., Fox A., 2013: Mass spectrometry and tandem mass spectrometry characterization of protein patterns, protein markers and whole proteomes for pathogenic bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 92(3):381-386
- Ish-Horowicz D., Burke J.F., 1981: Rapid and efficient cosmid cloning. *Nucleic Acids Res.* 9(13):2989-98
- Itô Y. & Koyama J., 1982: Eradication of the melon fly: role of population ecology in the successful implementation of the sterile insect release method. *Protection Ecology* 4, 1–28
- Jalkanen J., Huhtaniemi I., Poutanen M., 2005: Mouse cysteine-rich secretory protein 4 (CRISP4): A member of the Crisp family exclusively expressed in the epididymis in an androgen-dependent manner. *Biol Reprod* 72:1268–1274
- Jang A.C., Chang Y.C., Bai J., Montell D., 2009: Border-cell migration requires integration of spatial and temporal signals by the BTB protein Abrupt. *Nat. Cell Biol.* 11,569–579
- Jordan K.C., Hatfield S.D., Tworoger M., Ward E.J., Fischer K.A., Bowers S., and Ruohola-Baker H., 2005: Genome Wide Analysis of Transcript Levels After Perturbation of the EGFR Pathway in the *Drosophila* Ovary. *Developmental Dynamics* 232:709–724
- Kakani E.G., Ioannides I.M., Margaritopoulos J.T., Seraphides N.A., Skouras P.J., Tsitsipis J.A. and Mathiopoulos K.D., 2008: A small deletion in the olive fly acetylcholinesterase gene associated with high levels of organophosphate resistance. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 38, 781–787
- Kakani E.G., Zygouridis N.E., Tsoumani K.T., Seraphides N., Zalom F.G., Mathiopoulos K.D., 2010: Spinosad resistance development in wild olive fruit fly *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae) populations in California. *Pest Manag Sci* 66:447–453
- Kakinohana H., Kuba H., Kohama T., Kinjo K., Taniguchi M., Nakamori H., Tanahara A. & Sokei Y., 1997: Eradication of the melon fly, *Bactrocera cucurbitae* Coquillett, by mass release of sterile flies in Okinawa prefecture, Japan. *Jpn. Agric. Res. Q.* 31(2), 91–100
- Kang J.L., Rajpert-De Meyts E., Wiels J., Skakkebaek N.E., 1995: Expression of the glycolipid globotriaosylceramide (Gb3) in testicular carcinoma in situ. *Virchows Arch* 426:369–374
- Kanost M., Kawooya J., Law J., Ryan R., Van Heusden M., Ziegler R., 1990: Insect hemolymph proteins. *Adv Insect Physiol* 22:299–396
- Kapatos E.T. and Fletcher B.S., 1986: Mortality factors and life-budgets for immature stages of the olive fruit fly, *Dacus oleae* (Gmel.) (Diptera, Tephritidae), in Corfu. *J. Appl. Entomol.* 102:326–42
- Kashimada K., Koopman P., 2010: *Sry*: the master switch in mammalian sex determination. *Development* 137: 3921–3930
- Katsoyannos P., 1992: Olive pests and their control in the Near East. *FAO Plant Prod. Prot. Pap.* 115. Rome: Food Agric. Organ. United Nations. 178 pp.
- Kawaguchi N., Komano H., Natori S., 1991: Involvement of *Sarcophaga lectin* in the development of imaginal discs of *Sarcophaga peregrina* in an autocrine manner. *Dev Biol* 144:86–93
- Kelleher, E. S., Watts, T. D., LaFlamme, B. A., Haynes, P. A., & Markow, T. A., 2009: Proteomic analysis of *Drosophila mojavensis* male accessory glands suggests novel classes of seminal fluid proteins. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 39, 366–371
- Khurana B., Kristie T.M., 2004: A protein sequestering system reveals control of cellular programs by the transcriptional coactivator HCF-1. *J Biol Chem* 279:33673-83
- Kimble J., Edgar L., Hirsh D., 1984: Specification of male development in *Caenorhabditis elegans*: the *fem* genes. *Dev Biol* 105:234-9
- King-Jones K., Thummel C.S., 2005: Nuclear receptors – a perspective from *Drosophila*. *Nat. Rev. Genet.* 6, 311–323
- Knipling E., 1979: *The Basic Principles of Insect Population Suppression and Management* USDA, Washington, DC
- Knipling E.F., 1955: Possibilities of insect control or eradication through use of sexually sterile males. *J Econ Entomol* 48:459/62

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Knipling E.F., 1964: The potential role of the sterility method for insect population control with special reference to combining this method with conventional methods, USDA/ARS, Washington, DC, USA. Series 33-98
- Knochenmuss R., 2006: Ion formation mechanisms in UV-MALDI. *Analyst*, 131, 966–986
- Koerich L.B., Wang X., Clark A.G., Carvalho A.B., 2008: Low conservation of gene content in the *Drosophila* Y chromosome. *Nature* 456:949-51
- Koh H.J., Lee S.M., Son B.G., Lee S.H., Ryoo Z.Y., Chang K.T., Park J.W., Park D.C., Song B.J., Veech R.L., Song H., Huh T.L., 2004: Cytosolic NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase plays a key role in lipid metabolism. *J Biol Chem.* 279(38):39968-74
- Konig A., Yatsenko A.S., Weiss M., Shcherbata H.R., 2011: Ecdysteroids affect *Drosophila* ovarian stem cell niche formation and early germline differentiation. *The EMBO journal* 30: 1549–1562
- Konus M., Koy C., Mikkat S., Kreutzer M., Zimmermann R., Iscan M., Glocker M.O., 2013: Molecular adaptations of *Helicoverpa armigera* midgut tissue under pyrethroid insecticide stress characterized by differential proteome analysis and enzyme activity assays. *Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics* 8:152–162
- Koppers A.J., Reddy T., O'Bryan M.K., 2011: The role of cysteine-rich secretory proteins in male fertility. *Asian J Androl* 13(1):111–117
- Korn E.D., 1978: Biochemistry of actomyosin-dependent cell motility (a review). *Proc Natl Acad Sci USA* 75(2):588-99
- Koukidou M., Klinakis A., Reboulakis C., Zagoraiou L., Tavernarakis N., Livadaras I., Economopoulos A., Savakis C., 2006: Germ line transformation of the olive fly *Bactrocera oleae* using a versatile transgenesis marker. *Insect Mol Biol* 15:95-103
- Kounatidis I., Papadopoulos N., Bourtzis K., Mavragani-Tsipidou P., 2008: Genetic and cytogenetic analysis of the fruit fly *Rhagoletis cerasi* (Diptera: Tephritidae). *Genome* 51(7):479-91. doi: 10.1139/G08-032
- Kozaki T., Shono T., Tomita T., Kono Y., 2001: Fenitroxon insensitive acetylcholinesterases of the housefly, *Musca domestica* associated with point mutations. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 31, 991–997
- Kraaijeveld K., Chapman T., 2004: Effects of male sterility on female remating in the mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*. *Proc Biol Sci.* 271 Suppl 4:S209-11
- Kramer K.J., Muthukrishnan S., 1997: Insect chitinases: molecular biology and potential use as biopesticides. *Insect Biochem Mol Biol* 27:887–900
- Krätzschmar J., et al., 1996: The human cysteine-rich secretory protein (CRISP) family. Primary structure and tissue distribution of CRISP-1, CRISP-2 and CRISP-3. *Eur J Biochem* 236:827–836
- Krishnamoorthy, M., Jurat-Fuentes, J. L., McNall, R. J., Andacht, T., & Adang, M. J., 2007: Identification of novel Cry1Ac binding proteins in midgut membranes from *Heliothis virescens* using proteomic analyses. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 37, 189–201
- Kuballa A.V., Elizur A., 2008: Differential expression profiling of components associated with exoskeletal hardening in crustaceans. *BMC Genomics* 9:575
- Kubista M., Andrade J. M., Bengtsson M., Forootan A., Jonak J., Lind K., Sindelka R., Sjoback R., Sjogreen B., Strombom L., et al., 2006: The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med* 27, 95-125
- Kwak J.E. and Wickens M., 2007: A family of poly(U) polymerases. *RNA* 13: 860–867
- Kwak J.E., Wang L., Ballantyne S., Kimble J. and Wickens M., 2004: Mammalian GLD-2 homologs are poly(A) polymerases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 4407–4412
- Lagos D., Koukidou M., Savakis C., Komitopoulou K., 2007: The *transformer* gene in *Bactrocera oleae*: the genetic switch that determines its sex fate. *Insect Mol Biol* 16:221–230
- Lagos D., Ruiz M.F., Sánchez L., Komitopoulou K., 2005: Isolation and characterization of the *Bactrocera oleae* genes orthologous to the sex determining *Sex-lethal* and *doublesex* genes of *Drosophila melanogaster*. *Gene* 2005, 348:111-21
- Lam H., 2011: Building and searching tandem mass spectral libraries for peptide identification. *Mol. Cell Proteomics.* 10(R111):008565
- Lam H., Aebersold R., 2011: Building and searching tandem mass (MS/MS) spectral libraries for peptide identification in proteomics. *Methods* 54:424–431

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Lea A.O., Van Handel E., 1982: A neurosecretory hormone-releasing factor from ovaries of mosquitoes fed blood. *J Insect Physiol* 28:503–508
- Lesch C., Goto A., Lindgren M., Bidla G., Dushay M.S., Theopold U., 2007: A role for Hemolactin in coagulation and immunity in *Drosophila melanogaster*. *Dev Comp Immunol* 31:1255–1263
- Lewin B., 2004: GENESVII.Ακαδημαϊκές Εκδόσεις I. Μπάσδρα και ΣΙΑ Ο.Ε.
- Li M., Reid W.R., Zhang L., Scott J.G., Gao X., Kristensen M., Liu N., 2013: A whole transcriptomal linkage analysis of gene co-regulation in insecticide resistant house flies. *Musca domestica*. *BMC Genomics* 14:803
- Li X., Kuromi H., Briggs L., Green D. B., Rocha J. J., Sweeney S. T. and Bullock S. L., 2010: Bicaudal-D binds clathrin heavy chain to promote its transport and augments synaptic vesicle recycling. *EMBO J.* 29, 992-1006
- Li X., Schuler M.A., Berenbaum M.R., 2007: Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. *Annu Rev Entomol* 52:231–253
- Li H., Cui X., Arnheim N., 1990: Direct electrophoretic detection of the allelic state of single DNA molecules in human sperm by using the polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 87(12):4580-4
- Li, A. Q., Popova-Butler, A., Dean, D. H., & Denlinger, D. L., 2007: Proteomics of the flesh fly brain reveals an abundance of upregulated heat shock proteins during pupal diapause. *J. Insect Physiol.*, 53, 385–391
- Li, J. K., Feng, M., Zhang, L., Zhang, Z. H., & Pan, Y. H., 2008b: Proteomics analysis of major royal jelly protein changes under different storage conditions. *J. Proteome Res.*, 7, 3339–3353
- Li, J., Zhang, L., Feng, M., Zhang, Z., & Pan, Y., 2009: Identification of the proteome composition occurring during the course of embryonic development of bees (*Apis mellifera*). *Insect Mol. Biol.*, 18, 1–9
- Li, X. H., Wu, X. F., Yue, W. F., Liu, J. M., Li, G. L., & Miao, Y. G., 2006: Proteomic analysis of the silkworm (*Bombyx mori* L.) hemolymph during developmental stage. *J. Proteome Res.*, 5, 2809–2814
- Lichtenstein A.V., Moiseev V.L., Zaboikin M.M., 1990: A procedure for DNA and RNA transfer to membrane filters avoiding weight-induced gel flattening. *Anal Biochem.* 191(1):187-91
- Lifschytz E. and Lindsley D. L., 1972: The role of X-chromosome inactivation during spermatogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 69, no. 1, pp. 182–186
- Lindquist D.A., Abusowa M., Hall M.J., 1992: The New World screwworm fly in Libya: a review of its introduction and eradication. *Med Vet Entomol* 6:2/8
- Liu N., Reid W.R., Zhang L., 2012: A whole transcriptome approach to investigate the genes involved in permethrin resistance in the southern house mosquito *Culex quinquefasciatus*. *J Proteomics Bioinform* 5:95
- Liu W., Capuco A.V., Romagnolo D.F., 2006: Expression of cytosolic NADP+-dependent isocitrate dehydrogenase in bovine mammary epithelium: Modulation by regulators of differentiation and metabolic effectors. *Exp Biol Med* (Maywood) 231(5):599-610
- Livak K.J., Schmittgen T.D., 2001: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods* 25:402–408
- Loftus T.M., Hall L.V., Anderson S.L., McAlister-Henn L., 1994: Isolation, characterization, and disruption of the yeast gene encoding cytosolic NADP-specific isocitrate dehydrogenase. *Biochemistry.* 33(32):9661-7
- Loukas M., Economopoulos A.P., Zouros E., Vergini Y., 1985: Genetic changes in artificially reared colonies of the olive fruit fly (Diptera: Tephritidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 78, 159–165
- Maeda T., Nishida J., Nakanishi Y., 1999: Expression pattern, subcellular localization and structure—Function relationship of rat Tpx-1, a spermatogenic cell adhesion molecule responsible for association with Sertoli cells. *Dev Growth Differ* 41:715–722
- Mafra V., Kubo K.S., Alves-Ferreira M., Ribeiro-Alves M., Stuart R.M., Boava L.P., Rodrigues C.M.,
- Machado M.A., 2012: Reference genes for accurate transcript normalization in citrus genotypes under different experimental conditions. *PloS One*, 7(2), e31263. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0031263>
- Mahone M., Saffman E.E. and Lasko P.F., 1995: Localized Bicaudal-C RNA encodes a protein containing a KH domain, the RNA binding motif of FMR1. *EMBO J.* 14: 2043–2055
- Mallona I., Lischewski S., Weiss J., Hause B., Egea-Cortines M., 2010: Validation of reference genes for

- quantitative real-time PCR during leaf and flower development in *Petunia hybrida*. BMC Plant Biol. 10:4. doi: 10.1186/1471-2229-10-4
- Mandel M., Higa A., 1970: Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. J Mol Biol 53(1):159-62
- Mandel U., Petersen O.W., Sørensen H., Vedtofte P., Hakomori S.I., Clausen H., Dabelsteen E., 1991: Simple mucin-type carbohydrates in oral stratified squamous and salivary gland epithelia. J Invest Dermatol 97:713-721
- Manikas G., 1974: Ecological investigations on the olive fly, *Dacus oleae* (In Greek). Ph.D. thesis, Agricultural University of Athens
- Manoukas A.G., Mazomenos B., 1977: Effect of antimicrobials upon eggs and larvae of *Dacus oleae* (Diptera, Tephritidae) and the use of propionates for larval diet preservation. Ann. Zool. Ecol. Anim., 9, 277-285
- Mardis E.R., 2008: Next-Generation DNA Sequencing Methods. Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. 9:387-402
- Margaritopoulos J.T., Skavdis G., Kalogiannis N., Nikou D., Morou E., et al., 2008: Efficacy of the pyrethroid alpha-cypermethrin against *Bactrocera oleae* populations from Greece, and improved diagnostic for an iAChE mutation. Pest Manage. Sci. 64:900-8
- Marin I., Baker B.S., 1998: The evolutionary dynamics of sex determination. Science 281: 1990-4
- Marinotti O., James A.A., Ribeiro J.M.C., 1990: Diet and salivation in female *Aedes aegypti* mosquito. J Insect Physiol 36:545-548
- Markussen M.D.K., Kristensen M., 2012: Spinosad resistance in female *Musca domestica* L. from a field-derived population. Pest Manag Sci 68:75-82
- Marshall Graves J.A., 2008: Weird animal genomes and the evolution of vertebrate sex and sex chromosomes. Annu Rev Genet 42: 565-86
- Matsuda M., 2005: Sex determination in the teleost medaka, *Oryzias latipes*. Annu Rev Genet 39: 293-307
- Mavragani-Tsipidou P., 2002: Genetic and cytogenetic analysis of *Bactrocera oleae* (*Dacus oleae*) (Diptera: Tephritidae). Genetica 116:45-57
- Mavragani-Tsipidou P., Karamanlidou G., Zacharopoulou A., Koliais S., Kastritsis C.D., 1992: Mitotic and polytene chromosome analysis in *Dacus oleae* (Diptera: Tephritidae). Genome 35:373-378
- McDonald I.C., Evenson P., Nickel C.A., Johnson O.A., 1978: Housefly genetics: isolation of a female determining factor on chromosome 4. Ann Entomol Soc Am 71: 692-4
- McInnis D.O., Tam S.Y.T., Grace C. and Miyashita D., 1994: Population suppression and sterility rates induced by variable sex-ratio, sterile insect releases of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) in Hawaii. Ann. Entomol. Soc. Am. 87: 231II240
- McKeon J., Sinclair D.A., Cheng N., Couling M. and Brock H.W., 1994: Mutations in some *Polycomb* group genes of *Drosophila* interfere with regulation of segmentation genes. Mol. Gen. Genet. 244, 474-483
- McNall, R.J., Adang, M.J., 2003: Identification of novel *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac binding proteins in *Manduca sexta* midgut through proteomic analysis. Insect Biochem. Mol. Biol., 33, 999-1010
- Megraw T., Kaufman T.C., Kovalick G.E., 1998: Sequence and expression of *Drosophila Antigen 5-related 2*, a new member of the CAP gene family. Gene 222:297-304
- Meiklejohn C. D., Landeen E. L., Cook J. M., Kingan S. B. and Presgraves D. C., 2011: Sex chromosome-specific regulation in the *Drosophila* male germline but little evidence for chromosomal dosage compensation or meiotic inactivation. PLoS Biology, vol. 9, no. 8, Article ID e1001126
- Meisel R. P., Hilldorfer B. B., Koch J. L., Lockton S., and Schaeffer S. W., 2010: Adaptive evolution of genes duplicated from the *Drosophila pseudoobscura* neo-X chromosome. Molecular Biology and Evolution, vol. 27, no. 8, pp. 1963-1978
- Meisel R. P., Malone J. H., and Clark A. G., 2012: Disentangling the relationship between sex-biased gene expression and X linkage. Genome Research, vol. 22, no. 7, pp. 1255-1265
- Mertz F.P., Yao R.C., 1990: Saccharopolyspora spinosa sp. nov. Isolated from soil Collected in a Sugar Mill Rum Still. International Journal of Systematic Bacteriology 40 (1): 34-39. doi:10.1099/00207713-40-1-34
- Merzendorfer H., Zimoch L., 2003: Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. J Exp Biol 206(Pt 24):4393-4412
- Miake F., Torikata T., Koga K., Hayashi K., 1977a: Isolation and characterization of NADP⁺-specific isocitrate dehydrogenase from the pupa of *Bombyx mori*. J Biochem. 82(2):449-54

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Mikhaylova L. M. and Nurminsky D. I., 2011: Lack of global meiotic sex chromosome inactivation, and paucity of tissue specific gene expression on the *Drosophila* X chromosome. *BMC Biology*, vol. 9, article 29
- Mikhaylova L. M. and Nurminsky D. I., 2012: No severe and global X chromosome inactivation in meiotic male germline of *Drosophila*. *BMC Biology*, vol. 10, article 50
- Moriya M., Fujinaga K., Yazawa M., Katagiri C., 1995: Immunohistochemical localization of the calcium/calmodulin-dependent protein phosphatase, calcineurin, in the mouse testis: its unique accumulation in spermatid nuclei. *Cell Tissue Res.* 281(2):273-81
- Moriya M., Katagiri C., Ikebe M., Yagi K., 2000: Immunohistochemical detection of calmodulin and calmodulin-dependent protein kinase II in the mouse testis. *Zygote* 8(4):303-14
- Morris L.X., Spradling A.C., 2012: Steroid Signaling within *Drosophila* Ovarian Epithelial Cells Sex-Specifically Modulates Early Germ Cell Development and Meiotic Entry. *PLoS ONE* 7(10): e46109. doi:10.1371/journal.pone.0046109
- Morrison D.K. 2009: The 14-3-3 proteins: integrators of diverse signaling cues that impact cell fate and cancer development. *Trends Cell Biol* 19: 16–23
- Mota-Sanchez D., Hollingworth R.M., Grafius E.J., Moyer D.D., 2006: Resistance and cross-resistance to neonicotinoid insecticides and spinosad in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Coleoptera: Chrysomelidae). *Pest Manag Sci* 2006. 62:30–37
- Moulton J.K., Pepper D.A., Dennehy T.J., 1999: Studies of Resistance of Beet Armyworm (*Spodoptera exigua*) to Spinosad in Field Populations From the Southern USA and Southeast Asia. In *Proc Beltwide Cott Conf*, Volume 2. Orlando, Florida, USA: 884–887
- Moulton J.K., Pepper D.A., Dennehy T.J., 2000: Beet armyworm (*Spodoptera exigua*) resistance to spinosad. *Pest Manag Sci.* 848: 842–848
- Mueller O., Lightfoot S., Schroeder A., 2004: RNA Integrity Number (RIN) – Standardization of RNA Quality Control. Agilent Technologies, Publication Number 5989-1165EN
- Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G., Erlich H., 1986: Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 51 Pt 1:263-73
- Mullis K.B., Faloona F.A., Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155:335-50
- Mutero A., Pralavorio M., Bride J.M., Fournier D., 1994 : Resistance associated point mutations in insecticide-insensitive acetylcholinesterase, *Proc. Natl Acad. Sci. (USA)* 91 5922
- Narbonne K., Besse F., Brissard-Zahraoui J., Pret A.M. and Busson D., 2003: *polyhomeotic* is required for somatic cell proliferation and differentiation during ovarian follicle formation in *Drosophila*. *Development* 131, 1389-1400 doi:10.1242/dev.01003
- Nardi F., Carapelli A., Dallai R., Frati F., 2003: The mitochondrial genome of the olive fly *Bactrocera oleae*: two haplotypes from distant geographical locations. *Insect Mol Biol* 12:605–611
- Nardi F., Carapelli A., Dallai R., Roderick G.K., Frati F., 2005: Population structure and colonization history of the olive fly, *Bactrocera oleae* (Diptera, Tephritidae). *Mol Ecol* 14:2729–2738
- Natori S., 2001: *Insect Lectins and Innate Immunity*. In *Phylogenetic Perspect Vertebr Immune Syst*, volume 484. Edited by Beck G, Sugumaran M, Cooper EL. New York: Kluwere Academic/Plenum Publishers 223–228
- Neuenschwander P., Canard M., Michelakis S., 1981: The attractivity of protein hydrolysate baited McPhail traps to different chrysopid and hemerobiid species (Neuroptera) in an Cretan olive orchard. *Ann. Soc. Entomol. France* 17, 213-220
- Neuenschwander P., Michelakis S., 1978: Infestation of *Dacus oleae* (Gmel.) (Diptera, Tephritidae) at harvest time and its influence on yield and quality of olive oil in Crete. *Z. Ang. Entomol.* 86:420-433
- Neuenschwander P., Michelakis S., 1981: Olive Fruit Drop Caused by *Dacus oleae* (Gmel) (Dipt. Tephritidae). *Journal of Applied Entomology*, 91, 193-205
- Neuenschwander P., Michelakis S., Kapatos E., 1986: Tephritidae. *Traite d' entomologie oleicole*. (Ed: Arambourg Y.) Conseil Oleicole International, Madrid, pp. 115-150
- Neumann E., Schaefer-Ridder M., Wang Y., Hofschneider P.H., 1982: Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J.* 1(7):841-5

- Nolan M.A., et al., 2006: Identification of rat cysteine-rich secretory protein 4 (Crisp4) as the ortholog to human CRISP1 and mouse Crisp4. *Biol Reprod* 74:984–991
- O'Bryan M.K. et al., 2001: Tpx-1 is a component of the outer dense fibers and acrosome of rat spermatozoa. *Mol Reprod Dev* 58:116–125
- O'Keefe L., Somers W.G., Harley A., Saint R., 2001: The pebble GTP exchange factor and the control of cytokinesis. *Cell Struct Funct* 26:619-26
- Oakeshott J.G., Home I., Sutherland T.D., Russell R.J.: 2003. The genomics of insecticide resistance. *Genome Biol.* 4(1):202
- O'Farrell P.H., 1975: "High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250 (10): 4007–21. PMC 2874754. PMID 236308
- Oleaga A., Escudero-Poblacion A., Camafeita E., Perez-Sanchez R., 2007: A proteomic approach to the identification of salivary proteins from the argasid ticks *Ornithodoros moubata* and *Ornithodoros erraticus*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 37, 1149–1159
- Olie R.A., Fenderson B., Daley K., Oosterhuis J.W., Murphy J., Looijenga L.H. 1996: Glycolipids of human primary testicular germ cell tumours. *Br J Cancer* 74:133–140
- Oliver C.P. and Green M.M., 1944: Heterosis in compounds of lozenge alleles in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 29: 331-347
- Pane A., Salvemini M., Bovi P.D., Polito C., et al., 2002: The transformer gene in *Ceratitis capitata* provides a genetic basis for selecting and remembering the sexual fate. *Development* 129: 3715–25
- Panja S., Aich P., Jana B., Basu T., 2008: How does plasmid DNA penetrate cell membranes in artificial transformation process of *Escherichia coli*? *Mol Membr Biol.* 25(5):411-22. doi: 10.1080/09687680802187765
- Parisi M. J., Gupta V., Sturgill D. et al., 2010: Germline-dependent gene expression in distant non-gonadal somatic tissues of *Drosophila*. *BMC Genomics*, vol. 11, no. 1, article 346
- Parisi M., Nuttall R., Naiman D. et al., 2003: Paucity of genes on the *Drosophila* X chromosome showing male-biased expression. *Science*, vol. 299, no. 5607, pp. 697–700
- Parisi M., Nuttall R., Naiman D. et al., 2004: A survey of ovary-, testis-, and soma-biased gene expression in *Drosophila melanogaster* adults. *Genome biology*, vol. 5, no. 6, p. R40
- Parker G. A., 1998: Sexual conflict and speciation. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, vol. 353, no. 1366, pp. 261–274
- Parker G. A., 2006: Sexual conflict over mating and fertilization: an overview. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, vol. 361, no. 1466, pp. 235–259
- Parkinson J., Blaxter M., 2009: Expressed sequence tags: an overview. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.), 533, 1–12. http://doi.org/10.1007/978-1-60327-136-3_1
- Pavlidis N., Dermauw W., Rombauts S., Chrisargiris A., Van Leeuwen T., Vontas J., 2013: Analysis of the Olive Fruit Fly *Bactrocera oleae* Transcriptome and Phylogenetic Classification of the Major Detoxification Gene Families. *PLoS One*, 8:e66533
- Pereira J.A., Alves M.R., Casal S., Oliveira M.B.P.P., 2004: Effect of olive fruit fly infestation on the quality of olive oil from cultivars Cobrancosa, Madural and Verdeal Transmontana. *Ital. J. Food Sci.* 16:355–65
- Perkins D.N., Pappin D.J., Creasy D.M., Cottrell J.S., 1999: Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* 20:3551–3567
- Perry T., McKenzie J.A., Batterham P., 2007: A Dalpha6 knockout strain of *Drosophila melanogaster* confers a high level of resistance to spinosad. *Insect Biochem Mol Biol.* 37:184–188
- Peters W., 1992: Peritrophic Membranes. In *Zoophysiol*, Volume 30. Edited by Bradshaw S.D., Burggren W., Heller H.C., Ishii S., Langer H., Neuweiler G., Randall D.J. Berlin: Springer: 1–238
- Pfaffl M.W., Tichopad A., Prgomet C., Neuvians T.P., 2004: Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper–Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett* 26:509–515
- Plapp F.W.Jr, Hoyer R.F., 1968: Insecticide resistance in the house fly: decreased rate of absorption as the mechanism of action of a gene that acts as an intensifier of resistance. *J Econ Entomol.* 61(5):1298-303

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Plaut G.W., Cook M., Aogaichi T., 1983: The subcellular location of isozymes of *NADP-isocitrate dehydrogenase* in tissues from pig, ox and rat. *Biochim Biophys Acta* 760(2):300-8
- Politzar H., Cuisance D., 1984: An integrated campaign against riverine tsetse, *Glossina palpalis gambiensis* and *Glossina tachinoides*, by trapping and the release of sterile males. *Insect Science and its Application* 5: 439–442
- Pollard T.D., Weihing R.R., 1974: Actin and myosin and cell movement. *CRC Crit Rev Biochem.* 2(1):1-65
- Pommois P., Brunetti P., Bruno V., Mazzei A., Baldacchini V. and Di Gregorio S., 2006: FlySim: A Cellular Automata Model of *Bactrocera Oleae* (Olive Fruit Fly) Infestation and First Simulations
- Pondeville E., Maria A., Jacques J.C., Bourgooin C., Dauphin-Villemant C., 2008: *Anopheles gambiae* males produce and transfer the vitellogenic steroid hormone 20-hydroxyecdysone to females during mating. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:19631-6
- Postlethwait J.H., Handler A., 1979: The roles of juvenile hormone and 20-hydroxy-ecdysone during vitellogenesis in isolated abdomens of *Drosophila melanogaster*. *J Insect Physiol* 25:455–460
- Prausnitz M.R., Edelman E.R., Gimm J.A., Langer R., Weaver J.C., 1995: Transdermal delivery of heparin by skin electroporation. *Biotechnology (NY)* 13(11):1205-9
- Procunier W.S., Smith J.J., 1993: Localization of ribosomal DNA in *Rhagoletis pomonella* (Diptera: Tephritidae) by in situ hybridization. *Insect Mol Biol* 2:163–174
- Prokopenko S.N., Brumby A., O’Keefe L., Prior L., He Y., Saint R., Bellen H.J., 1999: A putative exchange factor for Rho1 GTPase is required for initiation of cytokinesis in *Drosophila*. *Genes Dev* 13:2301-14
- Proschel M., Zhang Z., and Parsch J., 2006: Widespread adaptive evolution of *Drosophila* genes with sex-biased expression. *Genetics*, vol. 174, no. 2, pp. 893–900
- Puinean A.M., Lansdell S.J., Collins T., Bielza P., Millar N.S., 2013: A nicotinic acetylcholine receptor transmembrane point mutation (G275E) associated with resistance to spinosad in *Frankliniella occidentalis*. *J Neurochem.* 124:590–601
- Purves R., Gabryelski W., Li L., 1998: Investigation of the quantitative capabilities of an electrospray ionization ion trap linear time-of-flight mass spectrometer. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 12: 695–700. doi: 10.1002/(SICI)1097-0231(19980615)12:11<695::AID-RCM220>3.0.CO;2-2
- Qiao M., Snyder D.E., Meyer J., Zimmerman A.G., Qiao M., Gissendanner S.J., Cruthers L.R., Slone R.L., Young D.R., 2007: Preliminary Studies on the effectiveness of the novel pulicide, spinosad, for the treatment and control of fleas on dogs. *Veterinary Parasitology*: 345–351. doi:10.1016/j.vetpar.2007.09.011
- Radyuk S.N., Klichko V.I., Spinola B., Sohal R.S., Orr W.C., 2001: The peroxiredoxin gene family in *Drosophila melanogaster*. *Free Radic Biol Med* 31(9):1090-100
- Rajpert-De Meyts E., Poll S.N., Goukasian I., Jeanneau C., Herlihy A.S., Bennett E.P., Skakkebaek N.E., Clausen H., Giwercman A., Mandel U., 2007: Changes in the profile of simple mucin-type O-glycans and polypeptide GalNAc-transferases in human testis and testicular neoplasms are associated with germ cell maturation and tumour differentiation. *Virchows Arch.* 451(4):805-14. Epub 2007 Aug 11.
- Randsholt N. B. and Santamaria P., 2008: How *Drosophila* change their combs: the *Hox* gene sex combs reduced and sex comb variation among *Sophophora* species. *Evolution and Development.* 10, 121-133
- Ranson H., Rossiter L., Orтели F., Jensen B., Wang X., Roth C.W., Collins F.H., Hemingway J., 2001: Identification of a novel class of insect glutathione S-transferases involved in resistance to DDT in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Biochem J.* 359(Pt 2):295-304
- Ranz J. M., Castillo-Davis C. I., Meiklejohn C. D., and Hartl D. L., 2003: Sex-dependent gene expression and evolution of the *Drosophila* transcriptome. *Science*, vol. 300, no. 5626, pp. 1742–1745
- Reiher W., Shirras C., Kahnt J., Baumeister S., Isaac R.E., Wegener C., 2011: Peptidomics and peptide hormone processing in the *Drosophila* midgut. *J Proteome Res.* 1;10(4):1881-92. doi: 10.1021/pr101116g
- Reinartz J., Bruyins E., Lin J., Burcham T., Brenner S., Bowen B., Kramer M., Woychik R., 2002: Massively Parallel signature sequencing (MPSS) as a tool for in depth quantitative gene expression profiling in all organisms. *Brief Funct Genomic Proteomic* 1(1):95-104
- Rendón P., McInnis D., Lance D., and Stewart J., 2004: Medfly (Diptera: Tephritidae) Genetic sexing: large-scale field comparison of males-only and bisexual sterile fly releases in Guatemala. *J. Econ. Entomol.* 97: 1547III1553

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Rendón P., McInnis D., Lance D., Stewart J., 2000: Comparison of Medfly male-only and bisexual releases in large scale field trials. Working Group on Malaysian Fruit Flies (Malaysia), p.517-525. Joint international conference on area-wide control of insect pests. 5. International symposium on fruit flies of economic importance. Penang (Malaysia)
- Rewitz, K. F., Larsen, M. R., Lobner-Olesen, A., Rybczynski, R., O'Connor, M. B., & Gilbert, L. I., 2009: A phosphoproteomics approach to elucidate neuropeptide signal transduction controlling insect metamorphosis. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 39, 475–483
- Reyes M., Rocha K., Alarcón L., Siegwart M., Sauphanor B., 2012: Metabolic mechanisms involved in the resistance of field populations of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) to spinosad. *Pestic Biochem Physiol.* 102:45–50
- Rhode R.H., Simon J., Perdomo A., Gutierrez C., Dowling F. and Lindquist D.A., 1971: Application of the sterile release technique in Mediterranean fruit fly suppression. *J. Econ. Entomol.* 64: 708-713
- Rice Richard E., U.C., 2000: Bionomics of the olive fruit fly *Bactrocera (dacus) oleae*. University of California Plant Protection Quarterly. pp 1-5
- Rice W. R., 1984: Sex chromosomes and the evolution of sexual dimorphism. *Evolution*, vol. 38, no. 4, pp. 735–742
- Riddiford L.M., Cherbas P., Truman J.W., 2000: Ecdysone receptors and their biological actions. *Vitam Horm.* 60:1-73
- Rinkevich F.D., Chen M., Shelton A.M., Scott J.G., 2010: Transcripts of the nicotinic acetylcholine receptor subunit gene *Pxyla6* with premature stop codons are associated with spinosad resistance in diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Invert Neurosci.* 10:25–33
- Risinger C., Deitcher D.L., Lundell I., Schwarz T.L., Larhammar D., 1997: Complex gene organization of synaptic protein SNAP-25 in *Drosophila melanogaster*. *Gene* 194(2):169-77
- Rivett A.J., 1990: Intracellular protein degradation. *Essays Biochem* 25:39–81
- Robinson A.S., 2002a: Genetica Introduction. *Genetica* 116 (1) 1-3
- Robinson A.S., 2002b: Genetic sexing strains in medfly, *Ceratitidis capitata*, sterile insect technique programmes. *Genetica.* 116(1):5-13
- Robinson A.S., van Heemert C., 1982: *Ceratitidis capitata*-a suitable case for genetic sexing. *Genetica* 58, Issue 3, pp 229-237
- Robinson, A.S., Cayol J.P. and Hendrichs J., 2002: Recent findings on medfly sexual behaviour: implications for SIT. *Florida Entomologist* 85: 171–181. <http://www.fcla.edu/FlaEnt/fe85p171.pdf>
- Rössler Y., 1979: The Genetics of the Mediterranean Fruit Fly: a “White Pupae” Mutant. *Annals of the Entomological Society of America*, 72: 583-585. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/aesa/72.5.583>
- Ruiz M.F., Milano A., Salvemini M., Eirin-Lopez J.M., Perondini A.L.P, et al., 2007: The Gene *Transformer* of *Anastrepha* Fruit Flies (Diptera, Tephritidae) and Its Evolution in Insects. *PLoS ONE* 2(11): e1239. doi:10.1371/journal.pone.0001239
- Saffman E.E., Styhler S., Rother K., Li W., Richard S. et al., 1998: Premature translation of oskar in oocytes lacking the RNA-binding protein bicaudal-C. *Mol. Cell. Biol.* 18: 4855– 4862
- Sagri E., Reczko M., Gregoriou M.E., Tsoumani K.T, Zygouridis N.E., Salpea K.D., Zalom F.G., Ragoussis J., Mathiopoulos K.D.: Olive fly transcriptomics analysis implicates energy metabolism genes in spinosad resistance. *BMC.Genomics* 15:714
- Sagri E., Reczko M., Tsoumani K.T., Gregoriou M-E., Harokopos V., Mavridou A-M., Tastsoglou S., Athanasiadis K., Ragoussis J., Mathiopoulos K.D., 2014: The molecular biology of the olive fly comes of age. *BMC Genetics*, 15 (Suppl 2):S8 <http://www.biomedcentral.com/1471-2156/15/S2/S8>
- Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B., Erlich H.A., 1988: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239(4839):487-91
- Saiki R.K., Scharf S., Faloona F., Mullis K.B., Horn G.T., Erlich H.A., Arnheim N., 1985: Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230(4732):1350-4
- Saleem M.A., Ashfaq M., Shakoori A.R., 2009: In vivo Effect of Spinosad on Proteases of Insecticide-Resistant and Susceptible Strains of *Musca domestica*. *Pakistan J Zool* 41:455–462

BIBΛIOΓΡΑΦΙΑ

- Salvemini M., Robertson M., Aronson B., Atkinson P., et al., 2009: *Ceratitis capitata transformer-2* gene is required to establish and maintain the autoregulation of *Cctra*, the master gene of female sex determination. *Int J Dev Biol* 53: 109–20
- Salz H.K., 2011: Sex determination in insects: a binary decision based on alternative splicing. *Current opinion in genetics & development* 21: 395–400
- Sanchez L., 2008: Sex-determining mechanisms in insects. *Int J Dev Biol* 52: 837–56
- Sanchez F., Tobin S.L., Rdest U., Zulauf E., McCarthy B.J., 1983: Two *Drosophila* actin genes in detail. Gene structure, protein structure and transcription during development. *J Mol Biol.* 163(4):533-51
- Sandhoff R., Geyer R., Jennemann R., Paret C., Kiss E., Yamashita T., Gorgas K., Sijmonsma T.P., Iwamori M., Finaz C., Proia R.L., Wiegandt H., Gröne H.J., 2005: Novel class of glycosphingolipids involved in male fertility. *J Biol Chem* 29:27310–27318
- Schetelig M.F. and Handler A.M., 2012: Strategy for enhanced transgenic strain development for embryonic conditional lethality in *Anastrepha suspensa*. *PNAS* 109 (24): 9348-9353
- Schetelig M.F., Caceres C., Zacharopoulou A., Franz G., Wimmer E.A., 2009: Conditional embryonic lethality to improve the sterile insect technique in *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *BMC Biol* 2009, 7:4
- Schlessinger J., 2000: Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 103:211–225
- Schlessinger J., 2002: Ligand-induced, receptor-mediated dimerization and activation of EGF Receptor. *Cell* 110:669– 672
- Schroeder A., Mueller O., Stocker S., Salowsky R., Leiber M., Gassmann M., Lightfoot S., Menzel W., Granzow M. and Ragg T., 2006: The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Molecular Biology* 7:3 doi:10.1186/1471-2199-7-3
- Scolari F., Schetelig M.F., Bertin S., Malacrida A.R., Gasperi G., Wimmer E.A., 2008: Fluorescent sperm marking to improve the fight against the pest insect *Ceratitis capitata* (Wiedemann; Diptera: Tephritidae). *N. Biotechnol.* 25(1):76-84. doi: 10.1016/j.nbt.2008.02.001
- Scott J.G., 1999: Cytochromes P450 and insecticide resistance. *Insect Biochem Mol Biol* 29:757–777
- Scott J.G., 2008: Unraveling the mystery of spinosad resistance in insects. *J Pestic Sci.* 33:221–227
- Seeburg P.H., Shine J., Martial J.A., Baxter J.D., Goodman H.M., 1977: Nucleotide sequence and amplification in bacteria of structural gene for rat growth hormone. *Nature* 270(5637):486-94
- Seehuus S.C., Norberg K., Gimsa U., Krekling T., Amdam G.V., 2006: Reproductive protein protects functionally sterile honey bee workers from oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:962–967
- Seidler J., Zinn N., Boehm M.E., Lehmann W.D., 2010: *De novo* sequencing of peptides by MS/MS. *Proteomics.* 10:634–649
- Selivon D., Perondini A.L.P., Rocha L.S., 2005: Systematics, morphology and physiology—Karyotype characterization of *Anastrepha* fruit flies (Diptera: Tephritidae). *Neotrop Entomol* 34:273–279
- Sgaramella V., Ehrlich S.D., 1978: Use of the T4 polynucleotide ligase in the joining of flush-ended DNA segments generated by restriction endonucleases. *Eur J Biochem* 86(2):531-7
- Sgaramella V., Khorana H.G., 1972: CXII. Total synthesis of the structural gene for an alanine transfer RNA from yeast. Enzymic joining of the chemically synthesized polydeoxynucleotides to form the DNA duplex representing nucleotide sequence 1 to 20. *J Mol Biol* 72(2):427-44
- Shahjahan R.M., Yesmin F., 2002: Polytene chromosome maps of the melon fly *Bactrocera curcubitae* (Diptera, Tephritidae). *Genome* 45:1167–1174
- Shelly T.E., McInnis D.O., Rodd C., Edu J. and Pahio E., 2007: Sterile Insect Technique and Mediterranean Fruit Fly (Diptera: Tephritidae): Assessing the Utility of Aromatherapy in a Hawaiian Coffee Field. *J. Econ. Entomol.* 100(2): 273-282
- Shen Z., Jacobs-Lorena M., 1997: Characterization of a novel gut-specific *chitinase* gene from the human malaria vector *Anopheles gambiae*. *J Biol Chem* 272:28895–28900
- Shono T., Scott J.G., 2003: Spinosad resistance in the housefly, *Musca domestica*, is due to a recessive factor on autosome 1. *Pestic Biochem Physiol.* 75:1–7
- Silvestri F. 1914. Viaggio in Eritrea per cercare parassiti della mosca delle olive. *Boll. Lab. Zool. Gen. Agrar. Portici* 9:186–226

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Silvestri F., 1914: Report on an expedition to Africa in search of natural enemies of fruit flies (Trupaneidae) with descriptions, observations and biological notes. Hawaii Board Agric. For. Div. Entomol. Bull. 3:1–146
- Singh O.P., Gupta J.P., 1984: Studies on mitotic and salivary chromosomes of *Dacus curcubitae* Coquille (Diptera, Tephritidae). *Genetica* 62:217–221
- Skoulakis E.M., Davis R.L., 1998: 14-3-3 proteins in neuronal development and function. *Mol Neurobiol* 16: 269–284
- Skouras P.J., Margaritopoulos J.T., Seraphides N.A., Ioannides I.M., Kakani E.G., Mathiopoulos K.D. and Tsitsipis J.A., 2007: Organophosphate resistance in olive fruit fly, *Bactrocera oleae*, populations in Greece and Cyprus. Society of Chemical Industry. *Pest Manag Sci* 63(1):42-8
- Soto M.C., Chou T.B. and Bender W., 1995: Comparison of germline mosaics of genes in the *Polycomb* group of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 140, 231-243
- Soudi M., Zamocky M., Jakopitsch C., Furtmüller P.G., Obinger C., 2012: Molecular evolution, structure, and function of peroxidasins. *Chem Biodivers* 9:1776–1793
- Southern E.M., 1975: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol.* 98(3):503-17
- Sparks T.C., Thompson G.D., Kirst H.A., Hertlein M.B., Larson L.L., Worden T.V., Thibault S.T., 1998: Biological activity of the spinosyns, new fermentation derived insect control agents, on tobacco budworm (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. *J. Econ. Entomol.* 91, 1277–1283
- Spence A.M., Coulson A., Hodgkin J., 1990: The product of *fem-1*, a nematode sex-determining gene, contains a motif found in cell cycle control proteins and receptors for cell-cell interactions. *Cell* 60:981-90
- Steiner L. F., 1965: *A Rapid Method for Identifying Dye-Marked Fruit Flies.* *Journal of Economic Entomology* 58: 374-375
- Stone B.L., Thummel C.S., 1993: The *Drosophila* 78 C early late puff contains E78, an ecdysone-inducible gene that encodes a novel member of the nuclear hormone receptor superfamily. *Cell* 75, 307–320
- Stratikopoulos E.E., Augustinos A.A., Pavlopoulos I.D., Economou K.P., Mintzas A., Mathiopoulos K.D., Zacharopoulou A., 2009: Isolation and characterization of microsatellite markers from the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*: cross-species amplification in other Tephritidae species reveals a varying degree of transferability. *Mol Genet Genomics* 282(3):283-306. doi: 10.1007/s00438-009-0465-3
- Svensson M., Skold K., Svenningsson P., Andren P.E., 2003: Peptidomics-based discovery of novel neuropeptides. *J Proteome Res.* 2:213–219
- Tabb D.L., Fernando C.G., Chambers M.C., 2007: MyriMatch: highly accurate tandem mass spectral peptide identification by multivariate hypergeometric analysis. *J. Proteome Res.* 6:654–661
- Tadros W., Houston S.A., Bashirullah A., Cooperstock R.L., Semotok J.L. et al., 2003: Regulation of maternal transcript destabilization during egg activation in *Drosophila*. *Genetics* 164: 989–1001
- Takemori, N., & Yamamoto, M. T., 2009: Proteome mapping of the *Drosophila melanogaster* male reproductive system. *Proteomics*, 9, 2484–2493
- Talbo G., Højrup P., Rahbek-Nielsen H., Andersen S.O., Roepstorff P., 1991: Determination of the covalent structure of an N- and C-terminally blocked glycoprotein from endocuticle of *Locusta migratoria*. Combined use of plasma desorption mass spectrometry and Edman degradation to study post-translationally modified proteins. *Eur J Biochem* 195:495-504
- Tanaka K., Barmina O. and Kopp A., 2009: Distinct developmental mechanisms underlie the evolutionary diversification of *Drosophila* sex combs. *PNAS.* 106, 4764-4769
- Tang A.H., Tu C.P., 1994: Biochemical characterization of *Drosophila glutathione S-transferases D1* and *D21*. *J Biol Chem.* 269(45):27876-84
- Tawfik A.I., Kellner R., Hoffmann K.H., Lorenz M.W., 2006: Purification, characterisation and titre of the haemolymph juvenile hormone binding proteins from *Schistocerca gregaria* and *Gryllus bimaculatus*. *J Insect Physiol* 52:255–268
- Telfer W.H., Kunkel J.G., 1991: The function and evolution of insect storage hexamers. *Annu Rev Entomol* 36:205–228
- Thomas D.B., Mangan R.L., 2005: Non target impact of spinosad GF-120 bait sprays for control of the Mexican fruit fly (Diptera: Tephritidae) in Texas citrus. *J. Econ. Entomol.* 98:1950–56

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Thomas D.D., Donnelly C.A., Wood R.J., Alphey L.S., 2000: Insect population control using a dominant, repressible, lethal genetic system. *Science* 287(5462):2474–2476. Doi: 10.1126/science.287.5462.2474
- Thompson G. D., Dutton B., and Sparks T. C., 2000: Spinosad-a case study: an example from a natural products discovery programme. *Pest Manag. Sci.* 56: 696-702
- Thompson P.E., Bowen J.S., 1972: Interactions of differentiated primary sex factors in *Chironomus tentans*. *Genetics* 70: 491–3
- Tobin S.L., Zulauf E., Sánchez F., Craig E.A., McCarthy B.J., 1980: Multiple actin-related sequences in the *Drosophila melanogaster* genome. *Cell* 19(1):121-31
- Toda S., Komazaki S., Tomita T., Kono Y., 2004: Two amino acid substitutions in acetylcholinesterase associated with pirimicarb and organophosphorous insecticide resistance in the cotton aphid, *Aphis gossypii* Glover (Homoptera: Aphididae). *Insect Mol. Biol.* 13, 549– 553
- Tong W., Harris S., Cao X., Fang H., Shi L., Sun H., Fuscoe J., Harris A., Hong H., Xie Q., Perkins R., Casciano D., 2004: Development of public toxicogenomics software for microarray data management and analysis. *Mutation Research*, 549(1-2), 241–53
- Töpfer-Petersen E., 1999: Carbohydrate-based interactions on the route of a spermatozoon to fertilization. *Hum Reprod Updat* 5:314–329
- Traut W., 1994: Sex determination in the fly *Megaselia scalaris*, a model system for primary steps of sex chromosome evolution. *Genetics* 136:1097–1104
- True J. R., 2008: Combing evolution. *Evolution & Development*. 10, 400-402
- Tsapakis E. M., Basu A, Aitchison K.J., 2004: Transcriptomics and proteomics: advancing the understanding of psychiatric pharmacogenomics. *Clinical Neuropsychiatry* 1, 2, 117-124
- Tsiropoulos GJ., 1977: Reproduction and survival of adult *Dacus oleae* feeding on pollens and honeydews (Diptera: Tephritidae). *Environ. Entomol.* 6:390–92
- Tsiropoulos GJ., 1983: The importance of dietary amino acids on the reproduction and longevity of adult *Dacus oleae* (Gmelin) (Diptera: Tephritidae). *Arch. Int. Physiol. Biochim. Biophys.* 91:159–64
- Tsiropoulos GJ., 1984: Amino acid synthesis in adult *Dacus oleae* (Gmelin) (Diptera: Tephritidae) determined with (U-C-14) glucose. *Arch. Int. Physiol. Biochim. Biophys.* 92:313–16
- Tsitsipis J.A., 1975: Mass rearing of the olive fruit fly, *Dacus oleae* (Gmelin), at “Demokritos”. In *Controlling Fruit Flies by the Sterile-Insect Technique*. Int. At. En. Agency, Vienna, STWUBI 392, p. 93-100
- Tsitsipis J.A., Kontos A., 1983: Improved solid adult diet for the olive fruit fly *Dacus oleae*. *Entomol Hell* 1983, 1:24–29
- Tsoumani K.T., Augustinos A.A., Kakani E.G., Drosopoulou E., Mavragani-Tsipidou P., Mathiopoulos K.D., 2011: Isolation, annotation and applications of expressed sequence tags from the olive fly, *Bactrocera oleae*. *Mol Genet Genomics* 285:33-45
- Tufail M., Takeda M., 2008: Molecular characteristics of insect vitellogenins. *J Insect Physiol* 54:1447–1458
- Tzanakakis M. E., 2005: Olive Fruit Fly, *Bactrocera oleae* (Rossi) (= *Dacus oleae*) (Diptera: Tephritidae). *Encyclopedia of Entomology*, Pages 1589-1591
- Tzanakakis M.E., 1989: Small-scale rearing *Dacus oleae*. In: *World Crop Pests: Fruit Flies: their biology, natural enemies, and control*. Vol. 3B. Ed. by Robinson A.S., Hooper G., Elsevier, Amsterdam, 105-118
- Tzanakakis M.E., 2003: Seasonal development and dormancy of insects and mites feeding on olive: a review. *Neth. J. Zool.* 52:87–224
- Tzanakakis M.E., 2006: *Insects and Mites Feeding on Olive: Distribution, Importance, Habits, Seasonal Development and Dormancy*. Leiden: Brill Acad. Publ. 182 PP
- Ullmann A., Jacob F., Monod J., 1967: Characterization by in vitro complementation of a peptide corresponding to an operator-proximal segment of the beta-galactosidase structural gene of *Escherichia coli*. *J Mol Biol.* 24(2):339-43
- Ullrich A., Shine J., Chirgwin J., Pictet R., Tischer E., Rutter W.J., Goodman H.M., 1977: Rat insulin genes: construction of plasmids containing the coding sequences. *Science* 196(4296):1313-9
- Valenzuela J.G., Pham V.M., Garfield M.K., Francischetti I.M., Ribeiro J.M., 2002: Toward a description of the

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- sialome of the adult female mosquito *Aedes aegypti*. Insect Biochem Mol Biol 32:1101–1122
- van Hemert M.J., Steensma H.Y., van Heusden G.P., 2001: 14-3-3 proteins: key regulators of cell division, signalling and apoptosis. Bioessays 23: 936–946
- Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F., Poppe B., Van Roy N., De Paepe A., Speleman F., 2002: Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. Genome Biol. 3(7):RESEARCH0034
- Vaughan A., Rochelaeau T., French-Constant R., 1997: Site-directed mutagenesis of an acetylcholinesterase gene from the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* confers insecticide insensitivity. Exp. Parasitol. 87, 237–244
- Vazquez-Pianzola P., Adam J., Haldemann D., Hain D., Urlaub H. and Suter B., 2014: Clathrin heavy chain plays multiple roles in polarizing the *Drosophila* oocyte downstream of Bic-D. Development 141, 1915-1926 doi:10.1242/dev.099432
- Verhulst E.C., Beukeboom L.W., van de Zande L., 2010: Maternal control of haplodiploid sex determination in the wasp *Nasonia*. Science 328: 620–3
- Vibransovski M. D., Lopes H. F., Karr T. L., and Long M., 2009: Stage-specific expression profiling of *Drosophila* spermatogenesis suggests that meiotic sex chromosome inactivation drives genomic relocation of testis-expressed genes. PLoS Genetics, vol. 5, no. 11, Article ID e1000731
- Vibransovski M. D., Zhang Y. E., Kemkemmer C., Lopes H. F., Karr T. L., and Long M., 2012: Re-analysis of the larval testis data on meiotic sex chromosome inactivation revealed evidence for tissue-specific gene expression related to the *Drosophila* X chromosome. BMC Biology, vol. 10, article 49
- Vilain C., Libert F., Venet D., Costagliola S., Vassart G., 2003: Small amplified RNA-SAGE: an alternative approach to study transcriptome from limiting amount of mRNA. Nucleic Acids Research, Vol. 31, No. 6, DOI: 10.1093/nar/gng024
- Vontas J. G., Hejazi M. J., Hawkes N. J., Cosmidis N., Loukas M. and Hemingway J., 2002: Resistance-associated point mutations of organophosphate insensitive acetylcholinesterase, in the olive fruit fly *Bactrocera oleae*. Insect Molecular Biology 11, 329–336
- Vossen P., Varela L. G. and Devarenne A., 2004: Olive Fruit Fly. Sources of Products for Olive Fly Control. University of California Cooperative Extension
- Wahl G.M., Stern M., Stark G.R., 1979: Efficient transfer of large DNA fragments from agarose gels to diazobenzoyloxymethyl-paper and rapid hybridization by using dextran sulfate. Proc Natl Acad Sci USA. 76(8):3683–7
- Wallimann T., Wyss M., Brdiczka D., Nicolay K. and Eppenberger H.M., 1992: Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the 'phosphocreatine circuit' for cellular energy homeostasis. Biochem. J. 281, (Pt 1): 21-40
- Walsh S.B., Dolden T.A., Moores G.D., Kristensen M., Lewis T., Devonshire A.L., Williamson M.S., 2001: Identification and characterisation of mutations in housefly (*Musca domestica*) acetylcholinesterase involved in insecticide resistance, Biochem. J. 359, 175-181
- Wang D., Qiu X., Ren X., Niu F., Wang K., 2009: Resistance selection and biochemical characterization of spinosad resistance in *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). Pestic Biochem Physiol. 95:90–94
- Wang D., Qiu X., Ren X., Zhang W., Wang K., 2009: Effects of spinosad on *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) from China: tolerance status, synergism and enzymatic responses. Pest Manag Sci 65:1040–1046
- Wang W., Mo J., Cheng J., Zhuang P., Tang Z., 2006: Selection and characterization of spinosad resistance in *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). Pestic Biochem Physiol. 84:180–187
- Wang W., Shakes D.C., 1996: Molecular evolution of the 14-3-3 protein family. J Mol Evol 43: 384–398
- Wang Z., Gerstein M. and Snyder M., 2009: RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. Nat Rev Genet. 10(1): 57–63. doi:10.1038/nrg2484
- Ware G., 1989: The Pesticide Book (3rd edn), Thomson Pubs., Fresno, Calif
- Watson G.B., Chouinard S.W., Cook K.R., Geng C., Gifford J.M., Gustafson G.D., Hasler J.M., Larrinua I.M., Letherer T.J., Mitchell J.C., Pak W.L., Salgado V.L., Sparks T.C., Stilwell G.E., 2010: A spinosyn-sensitive *Drosophila melanogaster* nicotinic acetylcholine receptor identified through chemically induced target site resistance,

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- resistance gene identification, and heterologous expression. *Insect Biochem Mol Biol.* 40:376–384
- Watson J., Myers R.M., Caudy A.A., Witkowski J.A., 2007: Ανασυνδρασμένο DNA. Πρώτη ελληνική έκδοση. Ακαδημαϊκές Εκδόσεις Λ. Μπάσδρα και ΣΙΑ Ο.Ε
- Weems H. V. and Nation J. L., 1999: Olive Fruit Fly, *Bactrocera oleae* (Gmelin) (Insecta: Diptera: Tephritidae). University of Florida IFAS Extension
- Weill M., Malcolm C., Chandre F., Mogensen K., Berthomieu A., Marguine M., Raymond M., 2004: The unique mutation in ace-1 giving high insecticide resistance is easily detectable in mosquito vectors. *Insect Mol. Biol.* 13, 1–7
- Wenk J., Andrews P.W., Casper J., Hata J., Pera M.F., von Keitz A., Damjanov I., Fenderson B.A., 1994: Glycolipids of germ cell tumors: extended globo-series glycolipids are a hallmark of human embryonal carcinoma cells. *Int J Cancer* 58:108–115
- Wexelsen H., 1928: Two new mutant characters of the spermathecae of the females of *Drosophila melanogaster*. Cell degeneration and supernumerary spermathecae. *Genetics* 13 : 389-400
- Wheeler D.E., Tuchinskaya I.I., Buck N.A., Tabashnik B.E., 2000: Hexameric storage proteins during metamorphosis and egg production in the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera). *J Insect Physiol* 46:951–958
- White I.M., Elson-Harris M.M., 1992: Fruit Flies of Economic Significance: Their Identification and Bionomics. Oxon, UK: CAB Int
- White M.F., 1985: The transport of cationic amino acids across the plasma membrane of mammalian cells. *Biochim Biophys Acta* 822:355–374
- Whitten M.J., 1969: Automated sexing of pupae and its usefulness in control by sterile insects. *J Econ Entomol.* 62: 272-273
- Wilkins M.R., Pasquali C., Appel R.D., Ou K., Golaz O., Sanchez J-C., Yan J.X., Gooley A.A., Hughes G., Humphery-Smith I. et al., 1996: From Proteins to Proteomes: Large Scale Protein Identification by Two-Dimensional Electrophoresis and Amino Acid Analysis. *Nat Biotech.* 14(1):61-65
- Wilkins R.M., Ahmed S., Mantle D., 1998: Intracellular proteases: their role, insecticide toxicity and resistance mechanisms. The 1998 Brighton Conference-Pests & Diseases 511–516
- Willhoeft U., Franz G., 1996: Identification of the sex-determining region of the *Ceratitis capitata* Y chromosome by deletion mapping. *Genetics* 144: 737–45
- Williamson D.L., Dame D.A., Gates D.B., Cobb P.E., Bakuli B., Werner P.V., 1983: Integration of insect sterility and insecticides for control of *Glossina morsitans morsitans* Westwood (Diptera: Glossinidae) in Tanzania: The impact of sequential releases of sterilised flies. *Bulletin of Entomological Research.* 73:393–404
- Williamson M.S., Moores G.D., Devonshire A.L., 1992: Altered forms of acetylcholinesterase in insecticide-resistant houseflies (*Musca domestica*). In: *Multidisciplinary Approaches to Cholinesterase Functions.* Ed. by Shafferman A and Velan B, Plenum Press, New York, 83–86
- Williamson J.H., Krochko D., Geer B.W., 1980: 6-Phosphogluconate dehydrogenase from *Drosophila melanogaster*. I. Purification and properties of the A isozyme. *Biochem Genet.* 18(1-2):87-101
- Willoughby L., Chung H., Lumb C., Robin C., Batterham P., Daborn P.J., 2006: A comparison of *Drosophila melanogaster* detoxification gene induction responses for six insecticides, caffeine and phenobarbital. *Insect Biochem Mol Biol* 36:934–942
- Wilson M.J., Dearden P.K., 2008: Evolution of the insect *Sox* genes. *BMC Evol Biol* 8:120
- Wirth R., Friesenegger A., Fiedler S., 1989: Transformation of various species of gram-negative bacteria belonging to 11 different genera by electroporation. *Mol Gen Genet.* 216(1):175-7
- Wolstenholme A.J., Kaplan R.M., 2012: Resistance to macrocyclic lactones. *Curr Pharm Biotechnol.* 13:873–887
- Wong T.T.Y., Kobayashi R.M. and McInnis D.O., 1986: Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae): methods of assessing the effectiveness of sterile insect releases. *J. Econ. Entomol.* 79: 1501III1506
- Wu, X. F., Li, X. H., Yue, W. F., Roy, B., Li, G. L., et al., 2009: Proteomic identification of the silkworm (*Bombyx mori* L) prothoracic glands during the fifth instar stage. *Biosci. Rep.*, 29, 121–129

- Xu J., Strange J.P., Welker D.L., James R.R., 2013: Detoxification and stress response genes expressed in a western North American bumble bee, *Bombus huntii* (Hymenoptera: Apidae). *BMC Genomics* 14:874
- Yamamoto-Kihara M., Kotani E., 2004: Isolation and characterization of a C-type lectin cDNA specifically expressed in the tip of mouthparts of the flesh fly *Sarcophaga peregrina*. *Insect Mol Biol* 13:133–140
- Yamazaki Y., Morita T., 2004: Structure and function of snake venom cysteine-rich secretory proteins. *Toxicon* 44:227–231
- Yang Q., Zhou D., Sun L., Zhang D., Qian J., Xiong C., Sun Y., Ma L., Zhu C., 2008: Expression and characterization of two pesticide resistance-associated serine protease genes (*NYD-tr* and *NYD-ch*) from *Culex pipiens pallens* for metabolism of deltamethrin. *Parasitol Res* 103:507–516
- Yang X., Schadt E. E., Wang S. et al., 2006: Tissue-specific expression and regulation of sexually dimorphic genes in mice. *Genome Research*, vol. 16, no. 8, pp. 995–1004
- Yang Y., Cochran D.A., Gargano M.D., King I., Samhat N.K., Burger B.P., Sabourin K.R., Hou Y., Awata J., Parry D.A.D., Marshall W.F., Witman G.B., Lu X., 2011: Regulation of flagellar motility by the conserved flagellar protein CG34110/Ccdc135/FAP50. *Mol Biol Cell* 22:976–87
- Yang X., Wang Y., Lee W.H., Zhang Y., 2013: Antimicrobial peptides from the venom gland of the social wasp *Vespa tropica*. *Toxicon* 74:151–7. doi: 10.1016/j.toxicon.2013.08.056
- Yeh S.D., Chen Y.J., Chang A.C., Ray R., She B.R., Lee W.S., Chiang H.S., Cohen S.N., Lin-Chao S., 2002: Isolation and properties of *Gas8*, a growth arrest-specific gene regulated during male gametogenesis to produce a protein associated with the sperm motility apparatus. *J Biol Chem* 277:6311–7
- Young H.P., Bailey W.D., Roe R.M., 2003: Spinosad selection of a laboratory strain of the tobacco budworm, *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae), and characterization of resistance. *Crop Prot.* 22:265–273
- Yu, F., Mao, F., & Jianke, L., 2010: Royal jelly proteome comparison between *A. mellifera ligustica* and *A. cerana cerana*. *J. Proteome Res.*, 9, 2207–2215
- Zacharopoulou A., Augustinos A.A., Sayed W.A., Robinson A.S., Franz G., 2011: Mitotic and polytene chromosomes analysis of the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel) (Diptera: Tephritidae). *Genetica* 139:79–90
- Zalom F.G., Ragoussis J., Mathiopoulos K.D., 2014: Olive fly transcriptomics analysis implicates energy metabolism genes in spinosad resistance. *BMC Genomics*, 15:714
- Zambetaki A., Kleanthous K., Mavragani-Tsipidou P., 1995: Cytogenetic analysis of Malpighian tubule and salivary gland polytene chromosomes of *Bactrocera oleae* (*Dacus oleae*) (Diptera: Tephritidae). *Genome* 38:1070–1081
- Zambetaki A., Zacharopoulou A., Scouras Z.G., Mavragani-Tsipidou P., 1999: The genome of the olive fruit *Bactrocera oleae*: localization of molecular markers by in situ hybridization to salivary gland polytene chromosomes. *Genome* 42:744–751
- Zervas G.A, Economopoulos A.P., 1982: Mating frequency in caged populations of wild and artificially reared (normal or gamma-sterilized) olive fruit flies, *Dacus oleae* (Gmelin) (Diptera:Tephritidae) *Environ Entomol.* 11:17–20
- Zhang Y., Sturgill D., Parisi M., Kumar S., and Oliver B., 2007: Constraint and turnover in sex-biased gene expression in the genus *Drosophila*, *Nature*, vol. 450, no. 7167, pp. 233– 237
- Zhang Z., Hambuch T. M., and Parsch J., 2004: Molecular evolution of sex-biased genes in *Drosophila*. *Molecular Biology and Evolution*, vol. 21, no. 11, pp. 2130–2139
- Zhang, P., Aso, Y., Yamamoto, K., Banno, Y., Wang, Y., et al., 2006: Proteome analysis of silk gland proteins from the silkworm, *Bombyx mori*. *Proteomics*, 6, 2586–2599
- Zhao J.T., Frommer M., Sved J.A., Zacharopoulou A., 1998: Mitotic and polytene analyses in the Queensland fruit fly, *Bactrocera tryoni* (Diptera: Tephritidae). *Genome* 41:510–526
- Zhao, X. F., He, H. J., Dong, D. J., & Wang, J. X., 2006: Identification of differentially expressed proteins during larval molting of *Helicoverpa armigera*. *J. Proteome Res.*, 5, 164–169
- Zhou X., Oi F.M., Scharf M.E., 2006: Social exploitation of hexamerin: RNAi reveals a major caste-regulatory factor in termites. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:4499–4504

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Zhou X., Tarver M.R., Scharf M.E., 2007: Hexamerin-based regulation of *juvenile hormone*-dependent gene expression underlies phenotypic plasticity in a social insect. *Development* 134:601–610
- Zhu K.Y., Lee S.H., Clark M., 1996: A point mutation of acetylcholinesterase associated with azinphosmethyl resistance and reduced fitness in Colorado potato beetle. *Pestic. Biochem. Physiol.* 55, 100–108
- Zoepfel J., Reiher W., Rexer K.H., Kahnt J., Wegener C., 2012: Peptidomics of the agriculturally damaging larval stage of the cabbage root fly *Delia radicum* (Diptera: Anthomyiidae). *PLoS One* 7(7):e41543. doi: 10.1371/journal.pone.0041543
- Zulauf E., Sánchez F., Tobin S.L., Rdest U., McCarthy B.J., 1981: Developmental expression of a *Drosophila actin* gene encoding *actin I*. *Nature* 292(5823):556-8
- Zygouridis N.E., Argov Y., Nemny-Lavy E., Augustinos A.A., Nestel D. and Mathiopoulos K.D., 2014: Genetic changes during laboratory domestication of an olive fly SIT strain. *Journal of Applied Entomology*, 138: 423–432. doi: 10.1111/jen.12042. Article first published online: 27 FEB 2013

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Ελένα Κ., 2000: Μυκητολογικές ασθένειες της ελιάς στην Ελλάδα. Τεχνικό δελτίο αρ. 11. Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο. Κηφισιά, σελ. 32
- Μαλαθράκης Ν.Ε., 2005: Επιλεγμένες ασθένειες των καρποφόρων δένδρων και του αμπελιού, σελ 91
- Παναγόπουλος Χ.Γ., 1997: Ασθένειες καρποφόρων δένδρων και αμπελού. Εκδόσεις: Α. Σταμούλης. Αθήνα. σελ. 429
- Τζανακάκης Ε. Μ., 1995: Εντομολογία, University studio press
- Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων: www.minagric.gr

ΠΗΓΕΣ ΑΠΟ ΔΙΑΔΥΚΤΙΟ-ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΑ

Adgèn phytodiagnosics: www.plant.neogeneurope.com

- Applied Biosystems SOLiD™ 4 System Templated Bead Preparation Guide
- Applied Biosystems SOLiD™4 System Templated Bead Preparation Guide
- Biorad: www.bio-rad.com
- Dow AgroSciences: www.dowagro.com
- DuPont: www.dupont.com
- Eurogentec 2004: <http://www.eurogentec.com>
- FAOSTAT: <http://faostat.fao.org/>
- Fermentas: www.thermofisher.com
- Flybase: <http://www.flybase.org>
- GeneON: <http://www.taq-dna.com>
- GeneOntology (GO): <http://geneontology.org>
- GraphPad Prism ver.6 (GraphPad Software, Inc.): <http://www.graphpad.com>
- InterPro: protein sequence analysis & classification: <http://www.ebi.ac.uk/interpro/>
- Invitrogen: <http://www.biosciences.ie/>
- IRAC International MoA Working Group, 2011:
- IRAC MoA Classification Scheme 1–23
- IRAC Organization Resistance: The Facts-History & overview of resistance. www.irac-online.org
- NCSS: <http://www.ncss.com/>
- Normfinder: <http://moma.dk/normfinder-software>
- OXITEC: www.oxitec.com
- Primer-Blast: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>
- RefFinder: <http://www.leonxie.com/referencegene.php>
- RiboMinus™ Eukaryote Kit for RNA-Seq, Catalog #s A10837-08
- SOLiD® Total RNA-Seq Kit, Catalog #s 4445374
- SOLiD™ 4 System SETS Software, User Guide
- SOLiD™ 4 System SETS Software, User Guide
- SOLiD™ RNA Barcoding Kit, Module 33-48, Catalog #s 4452781



ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι- ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ RNA-seq

Πίνακας 1: Γονίδια με υπερέκφραση στο αναπαραγωγικό σύστημα των θηλυκών εντόμων *Bactrocera oleae*

	Gene ID	Gene	Value 1	Value 2	Log ₂ (Fold change)	Test Stat	P value	Q value
1	XP_001993685	GH21097 [Drosophila grimshawi]	1723,24	1,74887	-9,94448	5,02444	5,05E-07	0,0024075
2	AEJ88361	peroxidase isoform A [Bactrocera dorsalis]	1804,8	2,13792	-9,72142	5,06495	4,09E-07	0,0024075
3	XP_001661917	venom allergen [Aedes aegypti]	14055,1	16,9913	-9,69208	4,93148	8,16E-07	0,0024075
4	EHK24630	hypothetical protein TRIVIDRAFT 71933 [Trichoderma virens Gv29-8]	1215,75	1,61387	-9,55711	4,88073	1,06E-06	0,0024805
5	XP_002006001	G118785 [Drosophila mojavensis]	2272,68	3,29945	-9,42795	4,44559	8,77E-06	0,0040422
6	AAQ17521	glucose dehydrogenase [Drosophila erecta]	2184,24	3,32861	-9,358	4,9312	8,17E-07	0,0024075
7	XP_002017169	GL22161 [Drosophila persimilis]	1742,86	2,96992	-9,19682	4,35379	1,34E-05	0,0045129
8	XP_001358555	GA20090 [Drosophila pseudoobscura pseudoobscura]	12469,1	22,0562	-9,14296	4,84947	1,24E-06	0,0024805
9	AAV98012	serine protease Ssp3-2 precursor [Stomoxys calcitrans]	6338,33	11,5186	-9,104	4,91807	8,74E-07	0,0024075
10	XP_002059659	GJ14891 [Drosophila virilis]	6543,39	13,1978	-8,9536	4,83213	1,35E-06	0,0024805
11	AAB61390	transposase [Hydra vulgaris]	4048,56	8,49566	-8,89647	4,23173	2,32E-05	0,0045837
12	AAX13070	glucose dehydrogenase [Drosophila miranda]	5977,89	13,7118	-8,76807	4,56847	4,91E-06	0,0040422
13	XP_002063124	GK21756 [Drosophila willistoni]	1421,28	3,29945	-8,75075	4,17159	3,02E-05	0,004761
14	EFN79524	hypothetical protein EAI_06736 [Harpegnathos saltator]	4467,52	10,5237	-8,72969	4,55259	5,30E-06	0,0040422
15	ADQ64521	hypothetical protein [Bactrocera oleae]	2636,58	6,5989	-8,64223	4,51614	6,30E-06	0,0040422
16	XP_002076166	GD12041 [Drosophila simulans]	1943,78	4,94216	-8,61951	4,11696	3,84E-05	0,0048681
17	EGX96098	tRNA ligase [Cordyceps militaris CM01]	32085,8	89,643	-8,48353	4,62776	3,70E-06	0,0036795
18	XP_002134111	GA29233 [Drosophila pseudoobscura pseudoobscura]	20366,6	57,8803	-8,45892	4,65165	3,29E-06	0,003628
19	XP_002082774	GD11758 [Drosophila simulans]	4177,23	12,1749	-8,42249	4,66142	3,14E-06	0,003628
20	XP_001354610	GA18700 [Drosophila pseudoobscura pseudoobscura]	121234	360,252	-8,39457	4,27242	1,93E-05	0,0045837
21	YP_003427454	polycyclic aromatic hydrocarbon dioxygenase large subunit [Bacillus pseudofirmus OF4]	30946,3	94,4192	-8,35647	4,39468	1,11E-05	0,0041669
22	XP_002070440	GK11029 [Drosophila willistoni]	1653,42	5,26184	-8,29567	3,97946	6,91E-05	0,0054716
23	ADD18879	salivary antigen 5 precursor [Glossina morsitans morsitans]	65323,9	213,834	-8,25497	4,4792	7,49E-06	0,0040422
24	EFN71731	hypothetical protein EAG 11590 [Camponotus floridanus]	11495,2	37,7491	-8,25038	4,48782	7,20E-06	0,0040422
25	XP_001986176	GH21214 [Drosophila grimshawi]	7681,61	25,3991	-8,24049	4,58585	4,52E-06	0,0039329
26	XP_002010117	G115747 [Drosophila mojavensis]	156567	527,912	-8,21227	7,30069	2,86E-13	4,73E-09
27	XP_002048998	GJ21005 [Drosophila virilis]	1634,33	5,60976	-8,18655	3,93206	8,42E-05	0,0057007
28	AAR10045	similar to Drosophila melanogaster Ag5r, partial [Drosophila yakuba]	33125,1	115,255	-8,16695	4,46976	7,83E-06	0,0040422
29	NP_989320	serine protease ami precursor [Xenopus (Silurana) tropicalis]	1964,4	6,96663	-8,13941	4,29999	1,71E-05	0,0045837
30	XP_001953586	GF17838 [Drosophila ananassae]	219,287	0,786394	-8,12335	3,90434	9,45E-05	0,00596
31	XP_002013949	GL24419 [Drosophila persimilis]	2563,18	9,29596	-8,10711	4,28571	1,82E-05	0,0045837
32	XP_001985929	GH20821 [Drosophila grimshawi]	3996,72	15,2186	-8,03683	4,49945	6,81E-06	0,0040422
33	XP_002071447	GK25805 [Drosophila willistoni]	4886,75	19,4879	-7,97015	4,48302	7,36E-06	0,0040422
34	AAM00373	vitellogenin 2 precursor [Bactrocera dorsalis]	4583,01	18,3528	-7,96415	4,44556	8,77E-06	0,0040422
35	XP_001960524	GF11466 [Drosophila ananassae]	1712,05	6,85592	-7,96415	3,83351	0,0001263	0,0066189
36	XP_002054823	GJ22580 [Drosophila virilis]	1835,95	7,35208	-7,96415	3,83351	0,0001263	0,0066189
37	XP_002053787	GJ23153 [Drosophila virilis]	736,87	3,01788	-7,93173	4,46313	8,08E-06	0,0040422
38	XP_002075502	GK18435 [Drosophila willistoni]	840,851	3,48332	-7,91525	3,81145	0,0001382	0,0066704
39	XP_001959800	GF11856 [Drosophila ananassae]	1549,29	6,66433	-7,86093	4,43894	9,04E-06	0,0040422
40	ZP_14656410	PF12650 domain protein [Capnocytophaga sp. oral taxon 335 str. F0486]	76938	342,135	-7,81299	4,20733	2,58E-05	0,0045837
41	AAB87896	glucose dehydrogenase [Drosophila subobscura]	4121,35	18,3378	-7,81215	4,35798	1,31E-05	0,0045129
42	AAM00372	vitellogenin 1 precursor [Bactrocera dorsalis]	15305,7	69,7158	-7,77836	4,21255	2,53E-05	0,0045837
43	XP_003861499	hypothetical protein, conserved [Leishmania donovani]	2000,56	9,15575	-7,77151	3,7458	0,0001798	0,0073129

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι- ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ RNA-seq

44	ZP_16362079	hypothetical protein OOA_12048 [Providencia burhodogranariae DSM 19968]	4297,89	19,6697	-7,77151	3,7458	0,0001798	0,0073129
45	AAK51353	anterior fat body protein [Calliphora vicina]	13116,2	60,8582	-7,75168	4,20301	2,63E-05	0,0045837
46	XP_001986137	GH20700 [Drosophila grimshawi]	228,136	1,0748	-7,72969	3,7265	0,0001942	0,0075426
47	XP_002000872	GI10470 [Drosophila mojavensis]	1974,72	9,88477	-7,64223	3,68589	0,0002279	0,0080092
48	XP_003458838	PREDICTED: trypsin-1-like [Oreochromis niloticus]	5259,47	26,7292	-7,62035	4,33612	1,45E-05	0,0045837
49	XP_001988757	GH11338 [Drosophila grimshawi]	1171,52	5,98901	-7,61185	3,67172	0,0002409	0,0082098
50	XP_001999011	GI23310 [Drosophila mojavensis]	1422,86	7,35208	-7,59642	3,66451	0,0002478	0,0083325
51	XP_001968687	GG16684 [Drosophila erecta]	311,609	1,64551	-7,56506	3,64983	0,0002624	0,008571
52	NP_731781	CG8630 [Drosophila melanogaster]	3976,24	21,207	-7,55072	4,30235	1,69E-05	0,0045837
53	XP_001374677	PREDICTED: 60S acidic ribosomal protein P2-like [Monodelphis domestica]	20046,6	106,917	-7,55072	4,30235	1,69E-05	0,0045837
54	EFA05959	hypothetical protein TeasGA2_TC008777 [Tribolium castaneum]	831,167	4,4379	-7,54912	4,03286	5,51E-05	0,0052038
55	XP_002060733	GK10778 [Drosophila willistoni]	870,513	4,64798	-7,54912	3,64236	0,0002702	0,0087253
56	XP_320275	AGAP012265-PA [Anopheles gambiae str. PEST]	3982,62	21,3834	-7,54108	4,02913	5,60E-05	0,0052347
57	XP_001843958	deoxyribonuclease I [Culex quinquefasciatus]	6348,84	34,2796	-7,533	4,27477	1,91E-05	0,0045837
58	XP_002019067	GL25629 [Drosophila persimilis]	4866,06	26,5722	-7,5167	3,62714	0,0002866	0,0090214
59	NP_995924	CG9826, isoform B [Drosophila melanogaster]	923,641	5,07256	-7,50848	4,22796	2,36E-05	0,0045837
60	P27587	RecName: Full=Vitellogenin-2	22965,4	127,435	-7,49356	4,24123	2,22E-05	0,0045837
61	ZP_04445271	hypothetical protein COLINT_01976 [Collinsella intestinalis DSM 13280]	132,296	0,747928	-7,46666	3,60361	0,0003138	0,0094648
62	XP_002024099	GL22854 [Drosophila persimilis]	680,938	3,89547	-7,44958	3,59556	0,0003237	0,0096498
63	XP_002071267	GK25699 [Drosophila willistoni]	15225	87,3989	-7,44461	3,98139	6,85E-05	0,0054701
64	XP_002056410	glucose dehydrogenase [Drosophila virilis]	694,479	4,0208	-7,4323	4,2402	2,23E-05	0,0045837
65	XP_001962692	GF14303 [Drosophila ananassae]	1562,34	9,15575	-7,41482	3,57917	0,0003447	0,009921
66	NP_611721	CG30265 [Drosophila melanogaster]	446,245	2,64197	-7,40008	4,23397	2,30E-05	0,0045837
67	XP_002002721	GI11295 [Drosophila mojavensis]	273,065	1,63615	-7,38279	4,20735	2,58E-05	0,0045837
68	XP_002090973	GE13408 [Drosophila yakuba]	1013,16	6,08582	-7,37919	4,09789	4,17E-05	0,0048952
69	YP_006809449	putative Rhs protein [Nocardia brasiliensis ATCC 700358]	933,905	5,60976	-7,37919	3,56236	0,0003675	0,0101917
70	XP_002071621	GK10081 [Drosophila willistoni]	2595,1	15,7855	-7,36104	4,08937	4,33E-05	0,0048963
71	XP_002032795	GM20976 [Drosophila sechellia]	764,117	4,64798	-7,36104	3,55379	0,0003797	0,0103389
72	XP_002050512	GJ20164 [Drosophila virilis]	959,652	5,98901	-7,32405	3,53631	0,0004058	0,0107297
73	EEQ89163	predicted protein [Ajellomyces dermatitidis ER-3]	15051,1	99,0779	-7,24709	4,03563	5,45E-05	0,0051724
74	XP_002049631	GJ20649 [Drosophila virilis]	710,692	4,8074	-7,20782	4,03983	5,35E-05	0,00511
75	ZP_17122678	hypothetical protein HMPREF9715_02453 [Myroides odoratimimus CIP 101113]	828,841	5,60976	-7,20701	3,48094	0,0004996	0,0118704
76	XP_002004538	GI19988 [Drosophila mojavensis]	871,428	5,93983	-7,19682	3,86621	0,0001105	0,0065056
77	AEI91710	corazonin receptor [Musca domestica]	515,085	3,72211	-7,11255	3,82523	0,0001307	0,0066568
78	XP_002065351	GK15404 [Drosophila willistoni]	1357,62	9,88477	-7,10166	3,43113	0,0006011	0,0129655
79	NP_995719	CG15270, isoform B [Drosophila melanogaster]	2877,37	21,207	-7,08406	4,10232	4,09E-05	0,0048952
80	XP_003736737	GA16316, isoform B [Drosophila pseudoobscura pseudoobscura]	418,363	3,08701	-7,0824	4,10397	4,06E-05	0,0048952
81	XP_001953073	GF17588 [Drosophila ananassae]	1315,18	9,72307	-7,07963	4,08396	4,43E-05	0,0049158
82	AAAX13081	glucose dehydrogenase [Drosophila miranda]	10172,4	75,4152	-7,07559	4,09424	4,24E-05	0,0048952
83	CAA31918	glucose dehydrogenase [Drosophila melanogaster]	621,703	4,62469	-7,07073	4,06347	4,83E-05	0,0050255
84	XP_002133445	GA22811 [Drosophila pseudoobscura pseudoobscura]	130,586	0,9805	-7,05726	3,41016	0,0006492	0,0134801
85	ZP_10629372	DNA/RNA helicase, superfamily II, SNF2 family [Pseudomonas sp. GM74]	1823,78	13,6938	-7,05726	3,41016	0,0006492	0,0134801
86	EFX66834	hypothetical protein DAPPUDRAFT_64323 [Daphnia pulex]	19941	150,632	-7,04857	4,07057	4,69E-05	0,0049866
87	XP_002081274	GD25800 [Drosophila simulans]	3929,88	29,9316	-7,03667	3,84329	0,0001214	0,0065667
88	AAC31949	glutamate gated chloride channel [Lucilia cuprina]	599,686	4,64798	-7,01146	3,38855	0,0007026	0,0140755
89	XP_001957585	GF23954 [Drosophila ananassae]	6077,76	47,9915	-6,98462	4,05544	5,00E-05	0,0050377
90	XP_001986851	GH21602 [Drosophila grimshawi]	962,759	7,60932	-6,98326	4,02223	5,77E-05	0,0052933
91	XP_002070694	GK10887 [Drosophila willistoni]	459,672	3,68153	-6,96415	3,36627	0,0007619	0,0147969

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι- ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ RNA-seq

92	XP_001992242	GH24644 [Drosophila grimshawi]	1141,27	9,29544	-6,93991	3,96146	7,45E-05	0,0056193
93	XP_002003306	GI23251 [Drosophila mojavensis]	1037,09	8,48281	-6,93378	3,9585	7,54E-05	0,0056193
94	XP_002019237	GL26257 [Drosophila persimilis]	3208,29	26,3092	-6,93009	3,99696	6,42E-05	0,005438
95	XP_001358822	GA12399 [Drosophila pseudoobscura pseudoobscura]	176,849	1,46523	-6,91525	3,34327	0,000828	0,0155148
96	XP_002067303	GK16351 [Drosophila willistoni]	5317,11	44,4795	-6,90136	4,02273	5,75E-05	0,0052933
97	YP_246986	Na+/proline symporter [Rickettsia felis URRWXCal2]	17536,7	147,844	-6,89015	3,97788	6,95E-05	0,0054722
98	XP_002052136	GJ17388 [Drosophila virilis]	784,688	6,85592	-6,83862	3,30714	0,0009425	0,0166069
99	XP_002066495	GK18314 [Drosophila willistoni]	2700,81	23,7593	-6,82875	3,98808	6,66E-05	0,0054499
100	XP_001999101	GI24327 [Drosophila mojavensis]	1321,17	11,904	-6,79423	3,83354	0,0001263	0,0066189
101	XP_001959468	GF12892 [Drosophila ananassae]	22659,5	205,516	-6,78472	3,66426	0,0002481	0,0083325
102	ADD18829	tetraspanin 42Ed [Glossina morsitans morsitans]	2679,82	24,5055	-6,77288	3,89973	9,63E-05	0,006006
103	XP_001956181	GF25080 [Drosophila ananassae]	692,883	6,40307	-6,7577	3,26887	0,0010798	0,0181912
104	XP_671803	hypothetical protein [Plasmodium berghei strain ANKA]	1335,44	12,583	-6,72969	3,2556	0,0011316	0,0187432
105	XP_002053955	GJ24166 [Drosophila virilis]	215,153	2,04059	-6,72023	3,78022	0,0001567	0,0069515
106	XP_002050666	GJ20082 [Drosophila virilis]	13108	125,145	-6,71071	3,77546	0,0001597	0,0069531
107	XP_002048767	GJ21146 [Drosophila virilis]	3089,74	29,695	-6,70112	3,93056	8,47E-05	0,0057007
108	AAQ57577	troponin C 73F [Drosophila virilis]	13635,8	133,137	-6,67834	3,61911	0,0002956	0,0091837
109	XP_001362066	GA10744 [Drosophila pseudoobscura pseudoobscura]	1825,07	17,8984	-6,67197	3,22822	0,0012456	0,0198905
110	AEN03038	chitinase [Bactrocera dorsalis]	3990,58	39,5391	-6,65718	3,82346	0,0001316	0,0066568
111	NP_001245876	dumpy, isoform J [Drosophila melanogaster]	217,027	2,21895	-6,61185	3,19966	0,0013759	0,0212515
112	XP_001356462	GA20075 [Drosophila pseudoobscura pseudoobscura]	514,641	5,26184	-6,61185	3,19966	0,0013759	0,0212515
113	XP_002003390	GI17886 [Drosophila mojavensis]	772,345	7,89669	-6,61185	3,19966	0,0013759	0,0212515
114	XP_001353962	GA18924 [Drosophila pseudoobscura pseudoobscura]	107,168	1,1147	-6,58709	3,8304	0,0001279	0,0066491
115	XP_001970015	GG23623 [Drosophila erecta]	389,49	4,13475	-6,55764	3,84069	0,0001227	0,0065833
116	AEN03033	chitinase [Bactrocera dorsalis]	430,848	4,58816	-6,55312	3,85819	0,0001142	0,0065061
117	AAN71355	RE29976p [Drosophila melanogaster]	366,242	3,94018	-6,53839	3,68832	0,0002257	0,0080092
118	XP_002051314	GJ15159 [Drosophila virilis]	2553,1	27,4673	-6,53839	3,68832	0,0002257	0,0080092
119	BAD83405	takeout like protein [Phormia regina]	1348,26	14,5681	-6,53214	3,80208	0,0001435	0,0068341
120	XP_002000474	GI22505 [Drosophila mojavensis]	693,658	7,68046	-6,49689	3,81316	0,0001372	0,0066704
121	XP_002021404	GL24822 [Drosophila persimilis]	1104,07	12,2436	-6,49467	3,79241	0,0001492	0,0069034
122	AEN03034	chitinase [Bactrocera dorsalis]	1332,77	14,8449	-6,48831	3,82005	0,0001334	0,0066568
123	ADQ64576	hypothetical protein [Bactrocera oleae]	1520,42	16,9913	-6,48353	3,50435	0,0004577	0,0114792
124	XP_002052883	GJ19630 [Drosophila virilis]	1046,89	11,978	-6,44958	3,48649	0,0004894	0,0117805
125	XP_001657029	inositol 1,4,5-trisphosphate receptor [Aedes aegypti]	321,77	3,68153	-6,44958	3,1225	0,0017932	0,0254829
126	XP_002005465	GI19056 [Drosophila mojavensis]	690,181	7,89669	-6,44958	3,1225	0,0017932	0,0254829
127	XP_001988089	GH10758 [Drosophila grimshawi]	1783,38	20,5678	-6,43809	3,6366	0,0002763	0,0088482
128	NP_001036734	CG17271, isoform B [Drosophila melanogaster]	2957,48	34,8332	-6,40776	3,79199	0,0001494	0,0069034
129	XP_002061354	GK20875 [Drosophila willistoni]	6589,58	78,9669	-6,38279	3,78006	0,0001568	0,0069515
130	XP_002004517	GI19571 [Drosophila mojavensis]	3370,93	40,4968	-6,37919	3,77682	0,0001588	0,0069531
131	EGT46399	hypothetical protein CAEBREN_31161 [Caenorhabditis brenneri]	1243,28	14,9362	-6,37919	3,08902	0,0020082	0,0274743
132	YP_005036757	2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase [Bacteriovorax marinus SJ]	21502,9	259,252	-6,37403	3,76396	0,0001672	0,0070538
133	XP_001993701	GH21174 [Drosophila grimshawi]	544,876	6,65685	-6,35494	3,59316	0,0003267	0,0096577
134	XP_002081275	GD25799 [Drosophila simulans]	567,473	7,16362	-6,30772	3,72616	0,0001944	0,0075426
135	XP_001355855	GA11052 [Drosophila pseudoobscura pseudoobscura]	494,816	6,25738	-6,30519	3,41027	0,000649	0,0134801
136	XP_001996166	GH13970 [Drosophila grimshawi]	3056,51	39,4835	-6,27449	3,67415	0,0002386	0,0081617
137	XP_966367	PREDICTED: similar to n-acetylgalactosaminyltransferase [Tribolium castaneum]	741,538	9,89835	-6,22719	3,52531	0,000423	0,0109767
138	AAM52754	SD02173p [Drosophila melanogaster]	1027,23	13,7118	-6,22719	3,36901	0,0007544	0,0147026
139	XP_001991796	GH11873 [Drosophila grimshawi]	75,693	1,01038	-6,22719	3,01681	0,0025545	0,0323264
140	XP_002106118	GD16687 [Drosophila simulans]	309,151	4,12668	-6,22719	3,01681	0,0025545	0,0323264
141	NP_001245596	CG32694, isoform F [Drosophila melanogaster]	106,719	1,46523	-6,18655	2,99753	0,0027217	0,0338212

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι- ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ RNA-seq

142	XP_001359770	GA10907 [Drosophila pseudoobscura pseudoobscura]	161,616	2,21895	-6,18655	2,99753	0,0027217	0,0338212
143	AAM75089	RH44244p [Drosophila melanogaster]	529,169	7,31934	-6,17587	3,56252	0,0003673	0,0101917
144	XP_002040862	GM22113 [Drosophila sechellia]	3553,34	50,2215	-6,14473	3,53632	0,0004057	0,0107297
145	XP_001974380	GG21118 [Drosophila erecta]	492,913	6,96663	-6,14473	3,32539	0,000883	0,0161086
146	XP_002100632	GE17168 [Drosophila yakuba]	153,412	2,18973	-6,13051	3,47319	0,0005143	0,0120227
147	XP_002002767	GI11215 [Drosophila mojavensis]	488,427	6,97158	-6,13051	3,47319	0,0005143	0,0120227
148	XP_002057612	GJ18229 [Drosophila virilis]	140,873	2,02076	-6,12335	3,31409	0,0009194	0,0164163
149	XP_002052054	GJ17339 [Drosophila virilis]	689,065	9,88432	-6,12335	3,31409	0,0009194	0,0164163
150	XP_002081573	GD25643 [Drosophila simulans]	439,714	6,40307	-6,10166	2,95734	0,0031031	0,0373674
151	CAD32744	alcohol dehydrogenase-2I [Bactrocera oleae]	504,885	7,35208	-6,10166	2,95734	0,0031031	0,0373674
152	ADQ64461	hypothetical protein [Bactrocera oleae]	705,061	10,471	-6,07328	3,62024	0,0002943	0,0091821
153	XP_002063189	GK21795 [Drosophila willistoni]	489,585	7,35208	-6,05726	2,93636	0,0033209	0,0389532
154	XP_002002637	GI11650 [Drosophila mojavensis]	176,797	2,70568	-6,02996	3,54854	0,0003874	0,0104954
155	ABJ74305	CG16799-like protein [Drosophila miranda]	4143,97	64,0307	-6,01611	3,60084	0,0003172	0,0095485
156	ABN58710	Tsal2 form B [Glossina morsitans morsitans]	2802,97	43,832	-5,99883	3,44858	0,0005635	0,0125722
157	XP_002047438	GJ13442 [Drosophila virilis]	1162,23	18,3115	-5,988	3,24265	0,0011842	0,0193207
158	EHH64134	Histone acetyltransferase MYST3 [Macaca fascicularis]	1896	29,8724	-5,988	3,24265	0,0011842	0,0193207
159	ADD20455	hypothetical conserved protein [Glossina morsitans morsitans]	3051,24	48,1456	-5,98585	3,58584	0,000336	0,0097765
160	XP_002062983	GK21625 [Drosophila willistoni]	167,586	2,68441	-5,96415	2,89245	0,0038225	0,0429169
161	AAS93722	RE64616p [Drosophila melanogaster]	3353,01	53,7088	-5,96415	2,89245	0,0038225	0,0429169
162	XP_001964473	GF23198 [Drosophila ananassae]	810,629	13,1306	-5,94804	3,37346	0,0007423	0,0145872
163	XP_002059979	GJ14942 [Drosophila virilis]	1727,72	28,0488	-5,94479	3,50391	0,0004585	0,0114797
164	XP_002042482	GM23377 [Drosophila sechellia]	390,58	6,36238	-5,93991	3,56267	0,0003671	0,0101917
165	XP_001997075	GH23630 [Drosophila grimshawi]	395,884	6,44878	-5,93991	3,52876	0,0004175	0,0109007
166	AAM12297	RH37201p [Drosophila melanogaster]	169,744	2,78393	-5,93009	3,55773	0,0003741	0,0102694
167	XP_002002651	GI17497 [Drosophila mojavensis]	1911,1	31,6678	-5,91525	3,54695	0,0003897	0,0104989
168	XP_001215405	predicted protein [Aspergillus terreus NIH2624]	6898,39	114,309	-5,91525	3,53216	0,0004122	0,0108301
169	NP_726461	piopio, isoform B [Drosophila melanogaster]	229,818	3,80819	-5,91525	3,44046	0,0005807	0,0127119
170	XP_002067566	GK16499 [Drosophila willistoni]	2797,05	46,3483	-5,91525	3,44046	0,0005807	0,0127119
171	XP_001985840	GH21033 [Drosophila grimshawi]	6837,23	113,296	-5,91525	2,86944	0,004112	0,0452453
172	ADD18313	salivary alkaline phosphatase [Glossina morsitans morsitans]	659,214	10,9486	-5,91192	3,53784	0,0004034	0,010719
173	EFA07069	hypothetical protein TeasGA2_TC010048 [Tribolium castaneum]	1681,03	28,0488	-5,90526	3,48302	0,0004958	0,0118268
174	XP_002041428	GM10352 [Drosophila sechellia]	1172,44	19,7686	-5,89015	3,4268	0,0006107	0,0130408
175	XP_002039729	GM15819 [Drosophila sechellia]	499,431	8,47051	-5,88169	3,49848	0,0004679	0,0115443
176	XP_002072901	GK13851 [Drosophila willistoni]	15759,1	268,544	-5,87489	3,46689	0,0005265	0,0121723
177	XP_001989316	GH10127 [Drosophila grimshawi]	19804,4	339,888	-5,86462	3,32746	0,0008764	0,0160763
178	XP_001996646	GH22520 [Drosophila grimshawi]	373,091	6,40307	-5,86462	2,8456	0,0044328	0,0475099
179	ZP_00367725	conserved hypothetical protein [Campylobacter coli RM2228]	6601,47	113,296	-5,86462	2,8456	0,0044328	0,0475099
180	XP_002072444	GK22841 [Drosophila willistoni]	441,466	7,66783	-5,84734	3,3179	0,000907	0,0164163
181	XP_002010866	GI21781 [Drosophila mojavensis]	588,196	10,2783	-5,83862	3,47594	0,0005091	0,0119678
182	XP_002052327	GJ17493 [Drosophila virilis]	903,808	15,7934	-5,83862	3,16397	0,0015563	0,0231469
183	XP_001988170	GH10713 [Drosophila grimshawi]	553,302	9,80221	-5,81882	3,49211	0,0004792	0,0116813
184	XP_002133278	GA28054 [Drosophila pseudoobscura pseudoobscura]	513,03	9,09342	-5,81808	3,49797	0,0004688	0,0115443
185	AAAY85548	male accessory gland protein [Drosophila simulans]	675,438	12,1716	-5,79423	3,45259	0,0005552	0,0124848
186	XP_002083319	GD13415 [Drosophila simulans]	580,339	10,5237	-5,78518	3,13571	0,0017144	0,0247027
187	XP_001970012	GG23626 [Drosophila erecta]	1391,85	25,3991	-5,77608	3,47634	0,0005083	0,0119678
188	XP_002002430	GI12813 [Drosophila mojavensis]	922,231	16,8293	-5,77608	3,27844	0,0010438	0,0177836
189	XP_001357829	GA14328 [Drosophila pseudoobscura pseudoobscura]	5206,33	96,2255	-5,7577	3,46685	0,0005266	0,0121723
190	XP_003358537	PREDICTED: hypothetical protein LOC100622030 [Sus scrofa]	2345,72	43,3546	-5,7577	3,12115	0,0018015	0,025578
191	XP_002002512	GI17426 [Drosophila mojavensis]	742,764	13,9972	-5,72969	3,4129	0,0006428	0,0134801

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι- ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ RNA-seq

192	XP_002065660	GK14551 [Drosophila willistoni]	679,558	12,8061	-5,72969	3,1063	0,0018945	0,0264218
193	XP_001988524	GH11214 [Drosophila grimshawi]	240,69	4,56559	-5,72023	3,24746	0,0011644	0,0191293
194	XP_002026203	GL24630 [Drosophila persimilis]	404,234	7,66783	-5,72023	3,24746	0,0011644	0,0191293
195	XP_002048789	GJ21130 [Drosophila virilis]	1069,09	20,4476	-5,70832	3,43482	0,000593	0,0128837
196	1KQQ_A	Chain A, Solution Structure Of The Dead Ringer Arid-Dna Complex	875,536	16,8293	-5,70112	3,23685	0,0012086	0,0195439
197	XP_002042642	GM15006 [Drosophila sechellia]	253,462	4,87197	-5,70112	3,09114	0,0019939	0,0273474
198	XP_002065717	GK19935 [Drosophila willistoni]	2892,24	55,733	-5,69751	3,42821	0,0006076	0,0130255
199	XP_001354692	GA13565 [Drosophila pseudoobscura pseudoobscura]	828,247	16,0631	-5,68824	3,43084	0,0006017	0,0129655
200	XP_002008006	G112072 [Drosophila mojavensis]	32,6585	0,634092	-5,68662	3,31425	0,0009189	0,0164163
201	XP_002014051	GL23065 [Drosophila persimilis]	1865,94	36,2562	-5,68553	3,18557	0,0014447	0,0220059
202	XP_002007776	G112200 [Drosophila mojavensis]	547,886	10,653	-5,68454	3,41204	0,0006448	0,0134801
203	NP_835253	RNA polymerase [Cucumber Bulgarian latent virus]	438,923	8,53932	-5,6837	3,40181	0,0006694	0,0137164
204	Q9VP61	RecName: Full=Acetyl-coenzyme A synthetase	158,592	3,0896	-5,68176	3,42747	0,0006092	0,0130255
205	XP_001978936	GG10986 [Drosophila erecta]	290,124	5,69048	-5,67197	3,40638	0,0006583	0,0136199
206	EFR26584	hypothetical protein AND_07242 [Anopheles darlingi]	355,187	6,96663	-5,67197	3,07566	0,0021004	0,0284113
207	XP_002010288	G114773 [Drosophila mojavensis]	699,085	13,7118	-5,67197	3,07566	0,0021004	0,0284113
208	NP_730939	CG31547, isoform A [Drosophila melanogaster]	654,506	13,0274	-5,65079	3,39422	0,0006882	0,0138713
209	XP_317106	AGAP008350-PA [Anopheles gambiae str. PEST]	585,762	11,978	-5,61185	3,0437	0,0023369	0,0304111
210	XP_001999412	GI24495 [Drosophila mojavensis]	1061,25	21,9008	-5,59864	3,36655	0,0007611	0,0147969
211	YP_002455904	128 kDa [Cactus mild mottle virus]	4945,69	102,71	-5,58952	2,98082	0,0028748	0,0352986
212	XP_001961951	GF14680 [Drosophila ananassae]	212,409	4,4379	-5,58083	3,02719	0,0024684	0,0316733
213	NP_609883	CG10211 [Drosophila melanogaster]	395,027	8,25335	-5,58083	3,02719	0,0024684	0,0316733
214	XP_002097264	GE26127 [Drosophila yakuba]	23837,3	498,036	-5,58083	3,02719	0,0024684	0,0316733
215	XP_002038096	GM17940 [Drosophila sechellia]	1624,96	34,5951	-5,55369	3,34257	0,0008301	0,0155364
216	XP_002016247	GL10597 [Drosophila persimilis]	857,846	18,3528	-5,54665	3,36151	0,0007752	0,0149689
217	XP_002156183	PREDICTED: similar to SET domain and mariner transposase fusion [Hydra magnipapillata]	2369,03	50,974	-5,53839	3,31537	0,0009152	0,0164163
218	XP_002066762	GK24383 [Drosophila willistoni]	181,596	3,922	-5,533	3,22774	0,0012477	0,0199045
219	XP_002006763	GI21245 [Drosophila mojavensis]	8167,84	178,409	-5,5167	3,31481	0,0009171	0,0164163
220	XP_001962623	GF15554 [Drosophila ananassae]	7542,69	165,831	-5,5073	3,31017	0,0009324	0,0165517
221	XP_002063980	GK15957 [Drosophila willistoni]	748,404	16,4972	-5,50352	3,26393	0,0010988	0,0183802
222	ADD18854	conserved hypothetical protein [Glossina morsitans morsitans]	802,132	17,7103	-5,50118	3,32592	0,0008813	0,0161086
223	XP_001953331	GF17705 [Drosophila ananassae]	661,66	14,6523	-5,49689	3,33464	0,0008541	0,0157858
224	XP_003377175	putative glucagon receptor [Trichinella spiralis]	106083	2359,92	-5,49031	2,93158	0,0033724	0,0393301
225	XP_001962688	GF14305 [Drosophila ananassae]	747,225	16,6238	-5,49022	3,28061	0,0010358	0,0177324
226	XP_002065262	GK15356 [Drosophila willistoni]	411,906	9,37602	-5,45719	3,30975	0,0009338	0,0165559
227	XP_002047453	GJ11926 [Drosophila virilis]	7834,91	179,286	-5,44958	3,24465	0,0011759	0,0192525
228	XP_002011331	G116055 [Drosophila mojavensis]	1727,88	39,5391	-5,44958	3,1804	0,0014707	0,0223204
229	XP_001984782	GH16660 [Drosophila grimshawi]	1401,7	32,0752	-5,44958	3,09725	0,0019532	0,0268561
230	XP_002053412	GJ23863 [Drosophila virilis]	193,939	4,4379	-5,44958	2,95731	0,0031034	0,0373674
231	XP_002059852	TpnC47D [Drosophila virilis]	532,922	12,2679	-5,44097	3,29926	0,0009694	0,016972
232	XP_002001221	G110670 [Drosophila mojavensis]	806,572	18,7287	-5,42848	3,03337	0,0024184	0,0312009
233	XP_001994318	GH23882 [Drosophila grimshawi]	1283,69	29,945	-5,42184	3,21782	0,0012917	0,0204086
234	XP_001991874	GH11830 [Drosophila grimshawi]	146,158	3,4261	-5,41482	2,93879	0,0032949	0,0387912
235	NP_001246914	neprilysin 2, isoform B [Drosophila melanogaster]	1401,29	32,9526	-5,41022	3,05828	0,0022261	0,0294803
236	XP_002079181	GD23811 [Drosophila simulans]	288,751	6,8522	-5,39711	3,15052	0,0016298	0,0238788
237	XP_001355458	GA10981 [Drosophila pseudoobscura pseudoobscura]	1432,02	33,9826	-5,39711	3,15052	0,0016298	0,0238788
238	XP_001966607	GF22264 [Drosophila ananassae]	22576,9	537,088	-5,39355	3,28018	0,0010374	0,0177324
239	XP_001961618	GF15059 [Drosophila ananassae]	369,408	8,8758	-5,37919	3,14031	0,0016877	0,024455
240	XP_001973440	GG16083 [Drosophila erecta]	1065,97	25,6123	-5,37919	3,14031	0,0016877	0,024455
241	XP_001982261	GG12507 [Drosophila erecta]	570,682	13,7118	-5,37919	2,91982	0,0035023	0,0402738
242	XP_001988210	GH10691 [Drosophila grimshawi]	1397,72	33,8655	-5,36712	3,26904	0,0010791	0,0181912
243	NP_476980	sugarless [Drosophila melanogaster]	3102,38	75,5156	-5,36046	3,18561	0,0014445	0,0220059

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι- ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ RNA-seq

244	XP_002031085	GM24220 [Drosophila sechellia]	659,172	16,1065	-5,35494	3,21394	0,0013093	0,0205435
245	XP_002006866	GI21300 [Drosophila mojavensis]	452,01	11,0446	-5,35494	3,04492	0,0023274	0,0303349
246	XP_002064521	GK23891 [Drosophila willistoni]	3330,26	81,6495	-5,35005	3,17696	0,0014883	0,0225047
247	XP_001987875	GH19714 [Drosophila grimshawi]	2598,31	64,0307	-5,34267	3,2532	0,0011411	0,0188784
248	NP_523754	Stretchin-Mlck, isoform B [Drosophila melanogaster]	689,493	16,9913	-5,34267	2,90038	0,0037271	0,0420754
249	XP_002068625	GK20324 [Drosophila willistoni]	2019,57	50,4879	-5,32197	3,23766	0,0012052	0,019537
250	XP_001980037	GG16913 [Drosophila erecta]	181,263	4,58445	-5,30519	3,09807	0,0019478	0,0268379
251	XP_002012670	GI11285 [Drosophila mojavensis]	367,55	9,29596	-5,30519	2,88043	0,0039713	0,0440196
252	ADY48029	Phosphatidylinositol N-acetylglucosaminyltransferase subunit Q [Ascaris suum]	1370,93	35,934	-5,25366	3,15675	0,0015954	0,0235627
253	XP_002070257	GK11130 [Drosophila willistoni]	112,957	3,0156	-5,22719	3,1865	0,0014401	0,0219962
254	XP_001980789	GG17351 [Drosophila erecta]	1027,23	27,4237	-5,22719	3,0535	0,0022619	0,0298577
255	NP_729327	Ect4, isoform E [Drosophila melanogaster]	1862,07	50,059	-5,21714	3,18379	0,0014536	0,0221211
256	ZP_10126696	anti sigma-E protein RseA, N-terminal domain protein [Pasteurella bettyae CCUG 2042]	3261,2	88,7064	-5,20022	2,9592	0,0030844	0,0372627
257	XP_002037992	GM17998 [Drosophila sechellia]	1265	34,5951	-5,19242	3,14457	0,0016633	0,0241564
258	XP_001995052	GH22941 [Drosophila grimshawi]	697,276	19,0863	-5,19112	3,16688	0,0015408	0,023076
259	XP_001988104	GH10985 [Drosophila grimshawi]	2638,28	72,9269	-5,177	3,16812	0,0015343	0,0230098
260	XP_002053548	GJ23291 [Drosophila virilis]	1016,14	28,171	-5,17274	2,98678	0,0028193	0,0348239
261	EFA07904	hypothetical protein TeasGA2_TC005479 [Tribolium castaneum]	709,634	19,7686	-5,16579	3,01841	0,002541	0,0322455
262	NP_724601	CG30497, isoform C [Drosophila melanogaster]	1236,16	34,5557	-5,1608	3,1359	0,0017133	0,0247027
263	AEC12188	heat shock protein 70 [Liriomyza huidobrensis]	61235,2	1750,38	-5,12863	2,9798	0,0028843	0,0353368
264	ZP_10999452	glycosyl transferase, group 1 family protein [Staphylococcus arlettae CVD059]	16781	479,999	-5,12765	3,04885	0,0022972	0,0301314
265	NP_001163654	Gluc4alpha, isoform E [Drosophila melanogaster]	713,353	20,5678	-5,11616	2,9124	0,0035867	0,0408806
266	NP_001036695	pasilla, isoform K [Drosophila melanogaster]	387,604	11,2885	-5,10166	2,98178	0,0028658	0,0352928
267	XP_002090904	GE13364 [Drosophila yakuba]	464,553	13,612	-5,09289	3,11875	0,0018162	0,0257433
268	XP_002005201	GI20362 [Drosophila mojavensis]	3023,79	88,9629	-5,08701	3,10976	0,0018724	0,0262242
269	XP_002058158	GJ15645 [Drosophila virilis]	116,962	3,44112	-5,08701	3,06103	0,0022058	0,0293215
270	XP_002032789	GM20765 [Drosophila sechellia]	213,97	6,32749	-5,07963	2,96921	0,0029857	0,0362706
271	XP_001846859	vacuolar sorting protein [Culex quinquefasciatus]	2752,56	81,6495	-5,07519	3,0184	0,0025411	0,0322455
272	XP_002011108	GI16360 [Drosophila mojavensis]	2338,91	69,5225	-5,07221	3,05245	0,0022698	0,0298946
273	XP_002007135	GI12767 [Drosophila mojavensis]	966,791	29,6543	-5,02689	2,86258	0,0042021	0,0459313
274	XP_001988597	GH10490 [Drosophila grimshawi]	540,862	16,6489	-5,02177	3,07515	0,002104	0,0284113
275	XP_001994488	GH17274 [Drosophila grimshawi]	1599,31	50,4879	-4,98537	3,05327	0,0022637	0,0298577
276	XP_001958363	GF10882 [Drosophila ananassae]	916,726	29,301	-4,96747	3,00088	0,002692	0,0336033
277	XP_002051432	GJ12249 [Drosophila virilis]	297,9	9,54358	-4,96415	3,05194	0,0022737	0,0299183
278	NP_001137636	CAP, isoform K [Drosophila melanogaster]	148,133	4,74561	-4,96415	2,82752	0,0046911	0,0495394
279	NP_612029	methuselah-like 9 [Drosophila melanogaster]	1282,35	41,0814	-4,96415	2,82752	0,0046911	0,0495394
280	XP_002037987	GM18001 [Drosophila sechellia]	635,682	20,4215	-4,96014	3,01961	0,002531	0,0322256
281	XP_002048285	GJ11432 [Drosophila virilis]	171,305	5,54962	-4,94804	2,98006	0,002882	0,035334
282	NP_001137811	CG13124, isoform D [Drosophila melanogaster]	866,976	28,1154	-4,94656	3,0421	0,0023493	0,0305483
283	XP_001955734	GF16094 [Drosophila ananassae]	799,057	26,0236	-4,94041	2,90413	0,0036827	0,0417166
284	XP_001991604	GH12750 [Drosophila grimshawi]	1202,4	39,2683	-4,93641	2,99807	0,002717	0,0338212
285	XP_001956782	GF10104 [Drosophila ananassae]	649,229	21,3061	-4,92939	3,03455	0,0024089	0,0311574
286	XP_001990086	GH18429 [Drosophila grimshawi]	1587,72	52,6184	-4,91525	3,02078	0,0025212	0,0321266
287	XP_002059462	GJ18871 [Drosophila virilis]	2218,43	73,5208	-4,91525	3,02078	0,0025212	0,0321266
288	NP_001137632	KCNQ potassium channel, isoform D [Drosophila melanogaster]	121,95	4,04152	-4,91525	2,8756	0,0040326	0,0445717
289	ADQ64530	hypothetical protein [Bactrocera oleae]	2450,7	82,1629	-4,89857	2,95105	0,0031669	0,0377359
290	NP_788434	retained, isoform B [Drosophila melanogaster]	967,236	32,5359	-4,89377	2,97321	0,002947	0,0359182
291	NP_523507	thiolester containing protein III [Drosophila melanogaster]	1004,25	33,8655	-4,89015	3,01313	0,0025857	0,0325945
292	XP_001960383	GF13338 [Drosophila ananassae]	102,282	3,51078	-4,86462	2,93111	0,0033775	0,0393379
293	XP_001961663	GF14819 [Drosophila ananassae]	312,828	10,7376	-4,86462	2,84676	0,0044166	0,0474567
294	XP_002055072	GJ18999 [Drosophila virilis]	274,766	9,52842	-4,84982	2,94749	0,0032036	0,0380362

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι- ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ RNA-seq

295	XP_001996032	GH14273 [Drosophila grimshawi]	169,353	5,883	-4,84734	2,92095	0,0034897	0,0402691
296	XP_001357229	GA10794 [Drosophila pseudoobscura pseudoobscura]	246,668	8,60865	-4,84064	2,94911	0,0031869	0,0379197
297	XP_001617595	hypothetical protein NEMVEDRAFT_v1g157243 [Nematostella vectensis]	2880,35	100,664	-4,83862	2,95835	0,0030929	0,0373384
298	AAL13602	GH14066p [Drosophila melanogaster]	66,9705	2,34052	-4,83862	2,83193	0,0046269	0,0489865
299	XP_002056818	GJ16729 [Drosophila virilis]	327,357	11,4596	-4,83624	2,98107	0,0028725	0,035296
300	XP_001999546	GI24580 [Drosophila mojavensis]	487,161	17,2024	-4,82372	2,95257	0,0031514	0,0375901
301	XP_002051078	GJ14274 [Drosophila virilis]	652,279	23,0961	-4,81976	2,92984	0,0033913	0,0394431
302	AER93669	actin, gamma 1 [Mustela putorius furo]	2882,36	102,256	-4,817	2,95286	0,0031484	0,0375901
303	XP_001861539	conserved hypothetical protein [Culex quinquefasciatus]	5385,3	191,694	-4,81215	2,94296	0,0032509	0,0384037
304	XP_002105954	csw [Drosophila simulans]	1544,69	55,2769	-4,8045	2,92086	0,0034906	0,0402691
305	XP_002022081	GL14455 [Drosophila persimilis]	1165,07	42,414	-4,77973	2,94007	0,0032814	0,0387146
306	CAB72287	EG:BACR25B3.2 [Drosophila melanogaster]	235,278	8,56525	-4,77973	2,84637	0,0044221	0,0474567
307	XP_001984488	GH16491 [Drosophila grimshawi]	601,141	21,8844	-4,77973	2,84637	0,0044221	0,0474567
308	XP_001982188	GG12464 [Drosophila erecta]	1077,09	39,2654	-4,77774	2,93206	0,0033672	0,0393301
309	XP_002026181	GL16202 [Drosophila persimilis]	984,578	35,934	-4,77608	2,87897	0,0039897	0,0441947
310	XP_002071901	GK24915 [Drosophila willistoni]	638,008	23,3763	-4,77045	2,91251	0,0035854	0,0408806
311	XP_001966606	GF22263 [Drosophila ananassae]	238,972	8,77731	-4,76692	2,91872	0,0035147	0,0403667
312	ADD19800	tetraspanin [Glossina morsitans morsitans]	3396,5	124,985	-4,76422	2,94003	0,0032819	0,0387146
313	ABC73568	CG7915 [Drosophila miranda]	1838,65	67,9653	-4,7577	2,91117	0,0036008	0,0408964
314	XP_001844814	conserved hypothetical protein [Culex quinquefasciatus]	632,299	23,3728	-4,7577	2,86813	0,004129	0,0453426
315	AAX12426	Dbuz/abd-A-PA [Drosophila buzzatii]	2905,21	107,391	-4,7577	2,86813	0,004129	0,0453426
316	ADB91418	MIP15789p [Drosophila melanogaster]	2481,36	94,7603	-4,71071	2,91369	0,0035719	0,0407961
317	XP_002137268	GA27104 [Drosophila pseudoobscura pseudoobscura]	4623,66	179,286	-4,6887	2,86148	0,0042167	0,0460381
318	XP_002014681	GL18823 [Drosophila persimilis]	1041,92	40,4968	-4,6853	2,8962	0,0037771	0,0425519
319	XP_002055181	GJ18933 [Drosophila virilis]	1215,67	47,9761	-4,66329	2,88512	0,0039127	0,0437222
320	YP_001406010	hypothetical protein CHAB381_0411 [Campylobacter hominis ATCC BAA-381]	6150,78	244,949	-4,65022	2,88119	0,0039618	0,0439999
321	NP_788481	Z band alternatively spliced PDZ-motif protein 66, isoform 1 [Drosophila melanogaster]	741,641	29,6992	-4,64223	2,8658	0,0041596	0,0456175
322	XP_001964642	GF23291 [Drosophila ananassae]	300,691	12,0748	-4,63821	2,82685	0,0047008	0,0496008
323	XP_002102136	GD19662 [Drosophila simulans]	8053,57	324,438	-4,63361	2,83253	0,0046181	0,0489252
324	XP_002133565	GA22746 [Drosophila pseudoobscura pseudoobscura]	981,851	39,5934	-4,63217	2,8695	0,0041112	0,0452453
325	XP_001988556	cabut [Drosophila grimshawi]	481,034	19,7009	-4,60981	2,85885	0,0042518	0,0463209
326	XP_002055932	GJ10501 [Drosophila virilis]	1718,88	70,4338	-4,60906	2,85271	0,0043348	0,0468549
327	EFR20984	hypothetical protein AND_17801 [Anopheles darlingi]	825,53	33,882	-4,60673	2,83356	0,0046033	0,0488313
328	XP_002009371	GI15313 [Drosophila mojavensis]	2068,48	84,9566	-4,6057	2,84463	0,0044464	0,0476204
329	XP_002072074	GK22516 [Drosophila willistoni]	955,241	40,2661	-4,56823	2,83578	0,0045714	0,0486215
330	EFY91223	Vacuolar protein sorting-associated protein 27 [Metarhizium acridum CQMa 102]	5922,16	250,578	-4,56279	2,83303	0,0046109	0,0488806

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι- ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ RNA-seq

Πίνακας 2: Γονίδια με υπερέκφραση στο αναπαραγωγικό σύστημα των αρσενικών εντόμων *Bactrocera oleae*

	Gene ID	Gene	Value 1	Value 2	Log ₂ (Fold change)	Test Stat	P value	Q value
1	ZP_00373035	conserved hypothetical protein [Wolbachia endosymbiont of <i>Drosophila ananassae</i>]	43,4923	1027,58	4,56234	-2,8311	0,004639	0,049082
2	XP_002081291	GD25790 [<i>Drosophila simulans</i>]	25,3462	608,997	4,58659	-2,83638	0,004563	0,048622
3	XP_002039806	GM15856 [<i>Drosophila sechellia</i>]	81,064	1975	4,60665	-2,84423	0,004452	0,04762
4	XP_002062979	GK21630 [<i>Drosophila willistoni</i>]	30,6448	747,35	4,60807	-2,82796	0,004685	0,049534
5	ACM78499	MIP03092p [<i>Drosophila melanogaster</i>]	36,9408	903,113	4,61162	-2,85753	0,00427	0,046422
6	XP_001991666	GH12782 [<i>Drosophila grimshawi</i>]	71,3353	1748,26	4,61516	-2,85291	0,004332	0,046855
7	XP_002063626	GK22014 [<i>Drosophila willistoni</i>]	41,0913	1008,7	4,61752	-2,83575	0,004572	0,048622
8	XP_001845714	DNA repair protein Rad21 [<i>Culex quinquefasciatus</i>]	33,5172	824,114	4,61987	-2,86364	0,004188	0,045812
9	ACA62135	HERC2 [<i>Drosophila melanogaster</i>]	21,2755	523,969	4,62222	-2,83634	0,004563	0,048622
10	XP_001842749	leucine-rich repeat-containing protein 40 [<i>Culex quinquefasciatus</i>]	87,2411	2150,05	4,62322	-2,86659	0,004149	0,045534
11	XP_002068317	GK13402 [<i>Drosophila willistoni</i>]	16,2393	402,541	4,63157	-2,84324	0,004466	0,047677
12	ACN32197	MIP06387p [<i>Drosophila melanogaster</i>]	8,49766	210,708	4,63203	-2,85799	0,004263	0,046386
13	XP_002098483	GE23919 [<i>Drosophila yakuba</i>]	12,4273	308,147	4,63203	-2,85799	0,004263	0,046386
14	XP_001998002	GH23801 [<i>Drosophila grimshawi</i>]	17,8484	444,775	4,63921	-2,87545	0,004035	0,044572
15	XP_002051288	GJ13103 [<i>Drosophila virilis</i>]	42,9377	1072,94	4,64318	-2,86904	0,004117	0,045272
16	XP_001982854	GG13080 [<i>Drosophila erecta</i>]	113,986	2848,31	4,64318	-2,84873	0,004389	0,047352
17	XP_001972447	GG13881 [<i>Drosophila erecta</i>]	9,54015	239,537	4,65009	-2,85282	0,004333	0,046855
18	XP_002092558	GE14263 [<i>Drosophila yakuba</i>]	22,2847	562,209	4,65698	-2,88451	0,00392	0,043747
19	XP_002066012	GK11056 [<i>Drosophila willistoni</i>]	8,65014	218,39	4,65804	-2,84919	0,004383	0,047315
20	XP_002070877	GK18850 [<i>Drosophila willistoni</i>]	7,45869	188,427	4,65894	-2,88636	0,003897	0,043579
21	XP_002064678	GK23992 [<i>Drosophila willistoni</i>]	76,4977	1940,95	4,6652	-2,88169	0,003955	0,043963
22	XP_002016490	GL10460 [<i>Drosophila persimilis</i>]	10,202	260,813	4,67609	-2,88793	0,003878	0,043451
23	ACC62148	kl-2 1-beta dynein heavy chain [<i>Drosophila virilis</i>]	19,2478	495,766	4,6869	-2,88761	0,003882	0,043466
24	XP_001974823	GG20903 [<i>Drosophila erecta</i>]	10,2728	264,927	4,68869	-2,83423	0,004594	0,048791
25	XP_001661858	hypothetical protein AaeL_AAEL011719 [<i>Aedes aegypti</i>]	45,8986	1183,68	4,68869	-2,83423	0,004594	0,048791
26	XP_001661804	ribose-5-phosphate isomerase [<i>Aedes aegypti</i>]	46,6953	1206,1	4,69093	-2,87687	0,004016	0,04446
27	ADQ64510	hypothetical protein [<i>Bactrocera oleae</i>]	42,8012	1110,66	4,69762	-2,83951	0,004518	0,048207
28	XP_002007923	GI12104 [<i>Drosophila mojavensis</i>]	43,5232	1131,72	4,70059	-2,90121	0,003717	0,042075
29	XP_002065818	GK18793 [<i>Drosophila willistoni</i>]	61,1982	1595,4	4,70429	-2,88472	0,003918	0,043747
30	XP_002106431	GD16130 [<i>Drosophila simulans</i>]	41,1095	1075,23	4,70903	-2,91396	0,003569	0,040789
31	XP_003245892	PREDICTED: hypothetical protein LOC100575767 [<i>Acyrtosiphon pisum</i>]	27,7056	725,597	4,71092	-2,91468	0,003561	0,040762
32	ZP_05854809	polysaccharide lyase family 8, super-sandwich domain protein [<i>Blautia hansenii</i> DSM 20583]	63,7573	1676,34	4,71658	-2,91811	0,003522	0,040418
33	XP_002052528	GJ17590 [<i>Drosophila virilis</i>]	43,7992	1152,34	4,71752	-2,89248	0,003822	0,042917
34	XP_002065502	GK15485 [<i>Drosophila willistoni</i>]	77,3789	2049,76	4,72737	-2,92079	0,003491	0,040269
35	NP_724256	spire, isoform C [<i>Drosophila melanogaster</i>]	23,8504	634,946	4,73455	-2,9132	0,003577	0,040832
36	XP_002064825	GK15140 [<i>Drosophila willistoni</i>]	12,4538	331,81	4,73571	-2,92023	0,003498	0,040269
37	XP_001984959	GH14760 [<i>Drosophila grimshawi</i>]	10,4669	279,154	4,73715	-2,9146	0,003562	0,040762
38	XP_002060034	GJ15510 [<i>Drosophila virilis</i>]	34,8554	930,527	4,7386	-2,92179	0,00348	0,040269
39	XP_001996015	GH14263 [<i>Drosophila grimshawi</i>]	16,6953	445,838	4,73901	-2,93041	0,003385	0,039399
40	XP_001655638	nuclear pore complex protein nup93 (nucleoporin nup93) (dead eye protein) [<i>Aedes aegypti</i>]	49,2986	1318,75	4,74148	-2,86545	0,004164	0,045638

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι- ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ RNA-seq

41	XP_002091659	GE12127 [Drosophila yakuba]	26,3348	707,097	4,74687	-2,93139	0,003374	0,03933
42	XP_002025875	GL10166 [Drosophila persimilis]	11,047	296,87	4,74811	-2,89647	0,003774	0,042545
43	XP_002014901	GL18704 [Drosophila persimilis]	11,5136	309,835	4,75009	-2,91408	0,003567	0,040789
44	XP_002027947	GL15629 [Drosophila persimilis]	6,71687	180,754	4,75009	-2,91154	0,003597	0,040896
45	XP_001971473	GG14415 [Drosophila erecta]	30,8536	830,283	4,75009	-2,87054	0,004098	0,045149
46	XP_002015027	GL18641 [Drosophila persimilis]	6,47927	174,982	4,75523	-2,93299	0,003357	0,039322
47	AAX09923	aldehyde reductase [Aurelia aurita]	206,179	5581,39	4,75865	-2,87559	0,004033	0,044572
48	ABV81309	putative CG9461-like protein [Antheraea paukstadorum]	11,1423	303,414	4,76716	-2,88062	0,003969	0,04402
49	XP_002008125	GI13325 [Drosophila mojavensis]	46,9823	1281,25	4,76928	-2,94356	0,003245	0,038385
50	XP_001953621	GF17855 [Drosophila ananassae]	58,0342	1584,96	4,7714	-2,94828	0,003195	0,037994
51	XP_001958362	GF10881 [Drosophila ananassae]	6,12863	168,851	4,78404	-2,94629	0,003216	0,038156
52	AAM53609	glutathione S-transferase D11 [Anopheles gambiae]	111,246	3068,52	4,78571	-2,95023	0,003175	0,03781
53	XP_002008575	GI11742 [Drosophila mojavensis]	20,1297	555,67	4,78683	-2,9478	0,0032	0,038026
54	CAT02601	hypothetical protein [Torque teno virus]	1178,91	32621,8	4,79032	-2,92713	0,003421	0,039677
55	XP_001355998	GA15483 [Drosophila pseudoobscura pseudoobscura]	6,12121	169,627	4,7924	-2,89552	0,003785	0,042616
56	XP_002035678	GM14831 [Drosophila sechellia]	14,8565	412,286	4,79448	-2,9374	0,00331	0,03885
57	XP_002047631	GJ13548 [Drosophila virilis]	12,3262	342,363	4,79573	-2,95587	0,003118	0,037367
58	NP_649172	CG14183 [Drosophila melanogaster]	12,7378	355,894	4,80427	-2,96607	0,003016	0,036521
59	XP_002101975	GE15307 [Drosophila yakuba]	8,41033	235,419	4,80692	-2,94461	0,003234	0,038324
60	NP_001245657	drosophila Nna1 ortholog, isoform G [Drosophila melanogaster]	13,5328	380,43	4,8131	-2,95513	0,003125	0,037403
61	ACD63048	heat shock protein 70 [Loxostege sticticalis]	6,09825	171,432	4,8131	-2,82651	0,004706	0,049601
62	XP_002098909	GE23675 [Drosophila yakuba]	17,1751	482,821	4,8131	-2,82651	0,004706	0,049601
63	XP_001958495	GF23486 [Drosophila ananassae]	227,973	6422,4	4,81618	-2,96895	0,002988	0,036271
64	XP_001354960	GA14212 [Drosophila pseudoobscura pseudoobscura]	52,8809	1496,46	4,82266	-2,8905	0,003846	0,043125
65	ACH56892	saccharopine dehydrogenase domain-containing protein [Simulium vittatum]	9,57345	271,426	4,82538	-2,97808	0,002901	0,035431
66	XP_002009227	GI11369 [Drosophila mojavensis]	16,9958	481,866	4,82538	-2,97808	0,002901	0,035431
67	XP_002068810	GK17830 [Drosophila willistoni]	111,246	3154,06	4,82538	-2,97255	0,002953	0,035943
68	XP_002045757	GM16564 [Drosophila sechellia]	45,9672	1306,94	4,82945	-2,98032	0,002879	0,03533
69	ZP_01749528	transcriptional regulator, AraC family protein [Roseobacter sp. CCS2]	56,7448	1616,62	4,83235	-2,98135	0,00287	0,035296
70	XP_971117	PREDICTED: similar to putative phosphoglycerate mutase [Tribolium castaneum]	30,9826	884,001	4,83452	-2,97886	0,002893	0,035393
71	ADD20186	hypothetical conserved protein [Glossina morsitans morsitans]	4,42765	126,597	4,83755	-2,96811	0,002996	0,036306
72	YP_374310	hypothetical protein Plut_0379 [Chlorobium luteolum DSM 273]	8,49791	243,655	4,84159	-2,92451	0,00345	0,039957
73	XP_001352907	GA17756 [Drosophila pseudoobscura pseudoobscura]	91,7973	2646,75	4,84963	-2,99141	0,002777	0,034455
74	XP_001954155	GF16889 [Drosophila ananassae]	6,08823	175,539	4,84963	-2,98614	0,002825	0,034846
75	ADD20387	aldo-keto reductase [Glossina morsitans morsitans]	9,87554	284,737	4,84963	-2,92924	0,003398	0,039447
76	XP_001986836	GH21591 [Drosophila grimshawi]	42,8012	1234,07	4,84963	-2,92924	0,003398	0,039447
77	XP_002009774	GI15050 [Drosophila mojavensis]	15,3224	441,783	4,84963	-2,84739	0,004408	0,047397
78	YP_003890853	hypothetical protein Cyan7822_6837 [Cyanothecce sp. PCC 7822]	19,3447	557,758	4,84963	-2,84739	0,004408	0,047397
79	XP_001354957	GA11764 [Drosophila pseudoobscura pseudoobscura]	26,6493	768,368	4,84963	-2,84739	0,004408	0,047397
80	XP_002038852	GM17200 [Drosophila sechellia]	44,4986	1283,01	4,84963	-2,84739	0,004408	0,047397
81	XP_002048563	GJ11287 [Drosophila virilis]	9,24166	267,349	4,85443	-2,93334	0,003353	0,039306
82	AAL47978	GH09538p [Drosophila melanogaster]	20,277	587,073	4,85563	-2,97275	0,002951	0,035943
83	XP_001978678	GG17547 [Drosophila erecta]	6,07571	176,638	4,8616	-2,97619	0,002919	0,035624

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι- ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ RNA-seq

84	XP_002137966	GA26214 [Drosophila pseudoobscura pseudoobscura]	49,3046	1433,42	4,8616	-2,89323	0,003813	0,042899
85	XP_001652913	hypothetical protein AaeL_AAEL007797 [Aedes aegypti]	24,926	724,67	4,8616	-2,85423	0,004314	0,046789
86	XP_001845901	sodium-dependent phosphate transporter [Culex quinquefasciatus]	28,5341	829,567	4,8616	-2,85423	0,004314	0,046789
87	XP_001955492	GF16226 [Drosophila ananassae]	16,8914	491,893	4,86398	-2,93821	0,003301	0,038791
88	XP_001990438	GH18239 [Drosophila grimshawi]	430,725	12625,9	4,87347	-3,00366	0,002668	0,033421
89	XP_002048134	GJ13794 [Drosophila virilis]	6,70989	196,688	4,87347	-2,94326	0,003248	0,038395
90	XP_001969927	GG10363 [Drosophila erecta]	18,2164	533,978	4,87347	-2,861	0,004223	0,046038
91	XP_002049450	GJ21592 [Drosophila virilis]	30,5991	896,954	4,87347	-2,861	0,004223	0,046038
92	XP_001954122	GF16901 [Drosophila ananassae]	41,14	1205,94	4,87347	-2,861	0,004223	0,046038
93	XP_001960023	GF11741 [Drosophila ananassae]	12,045	353,462	4,87505	-2,94384	0,003242	0,038377
94	XP_001965339	GF24632 [Drosophila ananassae]	24,4848	718,707	4,87544	-2,97156	0,002963	0,036033
95	ADJ11899	GA20218 [Drosophila miranda]	18,2947	537,741	4,87741	-3,00664	0,002642	0,033124
96	XP_001984886	GH14795 [Drosophila grimshawi]	11,7513	345,879	4,87937	-2,9864	0,002823	0,034841
97	AEV21242	lysergyl peptide synthetase subunit 1 LPS1 [Epichloe typhina]	313,462	9270,71	4,88632	-2,98585	0,002828	0,034852
98	XP_003736963	GA15779 [Drosophila pseudoobscura pseudoobscura]	4,59314	135,938	4,88732	-2,93173	0,003371	0,03933
99	XP_002008808	GJ13698 [Drosophila mojavensis]	27,769	822,396	4,88829	-2,8548	0,004306	0,046789
100	XP_001996854	GH23824 [Drosophila grimshawi]	17,6184	522,093	4,88915	-2,95247	0,003152	0,03759
101	XP_002063565	GK21345 [Drosophila willistoni]	20,5983	610,398	4,88915	-2,95247	0,003152	0,03759
102	ZP_10921302	peptidoglycan-binding LysM [Paenibacillus sp. JC66]	98,5972	2937,57	4,89693	-3,01731	0,00255	0,032322
103	ADQ64433	hypothetical protein [Bactrocera oleae]	183,295	5461,03	4,89693	-3,01635	0,002558	0,03235
104	EFA12307	hypothetical protein TeasGA2_TC016102 [Tribolium castaneum]	39,974	1190,97	4,89693	-2,95704	0,003106	0,037367
105	XP_002070434	GK11032 [Drosophila willistoni]	23,4912	702,709	4,90274	-2,99979	0,002702	0,033699
106	XP_002052354	GJ17506 [Drosophila virilis]	13,7322	412,431	4,90852	-2,881	0,003964	0,044
107	XP_001957935	GF23766 [Drosophila ananassae]	5,78012	173,798	4,91017	-3,0235	0,002499	0,031987
108	AEJ88366	heat shock protein 40 [Bactrocera dorsalis]	39,0644	1176,39	4,91236	-3,02573	0,00248	0,031777
109	ABJ74531	nompA [Drosophila miranda]	7,24963	218,606	4,91428	-2,95439	0,003133	0,037465
110	XP_001990122	GH19166 [Drosophila grimshawi]	31,159	941,952	4,91793	-3,00237	0,002679	0,033515
111	XP_002092137	GE11834 [Drosophila yakuba]	7,19936	217,955	4,92002	-3,02882	0,002455	0,031576
112	XP_001961698	GF15098 [Drosophila ananassae]	30,0646	910,181	4,92002	-3,00345	0,002669	0,033421
113	XP_001986926	GH20256 [Drosophila grimshawi]	8,37776	254,524	4,9251	-3,02166	0,002514	0,032083
114	XP_001848831	endothelin-converting enzyme 1 [Culex quinquefasciatus]	14,8565	451,552	4,92573	-3,01291	0,002588	0,032595
115	XP_002062989	GK21621 [Drosophila willistoni]	8,49288	259,155	4,93142	-3,03612	0,002396	0,031039
116	ADD20590	putative zinc transporter [Glossina morsitans morsitans]	78,1289	2387,19	4,93331	-3,00154	0,002686	0,033582
117	AAL39405	GM05016p [Drosophila melanogaster]	39,974	1222,99	4,9352	-2,97947	0,002887	0,035349
118	XP_001985850	GH20864 [Drosophila grimshawi]	442,369	13551,8	4,93709	-3,03403	0,002413	0,031157
119	XP_001850398	valyl-tRNA synthetase [Culex quinquefasciatus]	53,2987	1632,78	4,93709	-3,01938	0,002533	0,032226
120	XP_002083275	GD13441 [Drosophila simulans]	4,47326	137,574	4,94274	-2,90054	0,003725	0,042075
121	XP_002061778	GK17182 [Drosophila willistoni]	23,3476	718,05	4,94274	-2,90054	0,003725	0,042075
122	XP_002053740	GJ24058 [Drosophila virilis]	28,5341	877,558	4,94274	-2,90054	0,003725	0,042075
123	XP_002082254	GD11473 [Drosophila simulans]	26,4789	818,591	4,95023	-3,04635	0,002316	0,030239
124	XP_001959566	GF11982 [Drosophila ananassae]	39,974	1235,79	4,95023	-2,98826	0,002806	0,034682
125	XP_001355888	GA19123 [Drosophila pseudoobscura pseudoobscura]	93,2458	2882,68	4,95023	-2,98826	0,002806	0,034682
126	XP_002028905	GL15334 [Drosophila persimilis]	61,7073	1912,62	4,95396	-3,04838	0,002301	0,030142
127	YP_613480	NAD-dependent epimerase/dehydratase [Ruegeria sp. TM1040]	137,453	4260,35	4,95396	-2,90696	0,00365	0,04137
128	XP_002068859	GK17802 [Drosophila willistoni]	22,2847	692,498	4,95769	-3,0504	0,002285	0,030011
129	XP_002042422	GM23344 [Drosophila sechellia]	35,2368	1097,81	4,9614	-3,05241	0,00227	0,029895

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι- ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ RNA-seq

130	XP_002072697	GK13547 [Drosophila willistoni]	26,3898	823,023	4,96288	-3,03416	0,002412	0,031157
131	XP_002064451	GK23857 [Drosophila willistoni]	120,562	3765,8	4,9651	-3,05029	0,002286	0,030011
132	XP_001361405	GA15267 [Drosophila pseudoobscura pseudoobscura]	13,8528	434,914	4,97248	-3,00127	0,002689	0,033586
133	XP_002068694	GK17890 [Drosophila willistoni]	16,2128	510,306	4,97616	-2,91966	0,003504	0,040274
134	XP_312777	AGAP003090-PA [Anopheles gambiae str. PEST]	8,39609	264,675	4,97836	-3,0576	0,002231	0,029523
135	XP_001358508	GA11123 [Drosophila pseudoobscura pseudoobscura]	41,9805	1330,64	4,98626	-2,91557	0,00355	0,040721
136	XP_001966779	GF19101 [Drosophila ananassae]	12,6155	400,111	4,98713	-3,06636	0,002167	0,028857
137	XP_002049231	GJ21472 [Drosophila virilis]	37,082	1176,09	4,98713	-3,06636	0,002167	0,028857
138	AAL48025	LD30968p [Drosophila melanogaster]	7,64933	242,605	4,98713	-3,00982	0,002614	0,032879
139	EKG18929	Glycogen synthase [Macrophomina phaseolina MS6]	74,4926	2362,59	4,98713	-2,92593	0,003434	0,039802
140	XP_001990537	GH19407 [Drosophila grimshawi]	15,4913	493,179	4,99258	-3,05084	0,002282	0,030004
141	XP_002064389	GK19723 [Drosophila willistoni]	15,8339	504,72	4,9944	-3,0703	0,002138	0,028756
142	NP_727103	lethal (1) G0148 [Drosophila melanogaster]	203,893	6499,3	4,9944	-3,0703	0,002138	0,028756
143	XP_002050220	GJ22024 [Drosophila virilis]	56,1297	1790,09	4,99512	-2,88651	0,003895	0,043579
144	XP_001961292	GF11068 [Drosophila ananassae]	61,7073	1971,92	4,99802	-3,07225	0,002124	0,028616
145	ACN94705	GA10033 [Drosophila miranda]	12,3607	394,999	4,99802	-2,93217	0,003366	0,03933
146	XP_001361783	GA19540 [Drosophila pseudoobscura pseudoobscura]	5,94358	190,409	5,00163	-3,01827	0,002542	0,032246
147	XP_001959464	GF12889 [Drosophila ananassae]	37,389	1197,8	5,00163	-3,01827	0,002542	0,032246
148	ADD19046	hypothetical conserved protein [Glossina morsitans morsitans]	5,27795	169,931	5,00882	-2,93835	0,0033	0,038791
149	XP_002094439	GE20201 [Drosophila yakuba]	21,8996	710,349	5,01955	-2,9445	0,003235	0,038324
150	XP_001980089	GG16943 [Drosophila erecta]	7,227	235,384	5,02548	-3,07465	0,002108	0,028411
151	XP_002005727	G118917 [Drosophila mojavenis]	15,113	493,845	5,0302	-3,07713	0,00209	0,02836
152	XP_001963484	GF20266 [Drosophila ananassae]	34,3305	1125,11	5,03444	-3,08838	0,002013	0,027488
153	NP_650674	CG7794 [Drosophila melanogaster]	38,264	1254,29	5,03474	-3,03426	0,002411	0,031157
154	XP_001961930	GF14691 [Drosophila ananassae]	135,929	4474,39	5,04077	-3,07796	0,002084	0,028304
155	EHH75449	hypothetical protein KGM_13338 [Danaus plexippus]	11,7456	386,631	5,04077	-2,95665	0,00311	0,037367
156	XP_002036759	GM12508 [Drosophila sechellia]	33,3586	1098,31	5,04109	-2,89076	0,003843	0,04312
157	XP_001648041	hypothetical protein AaeL_AAEL014112 [Aedes aegypti]	15,2077	504,249	5,05126	-3,04711	0,002311	0,03021
158	XP_001983233	GH15699 [Drosophila grimshawi]	5,87566	194,822	5,05126	-2,96266	0,00305	0,036873
159	XP_002004826	G120131 [Drosophila mojavenis]	6,58369	218,298	5,05126	-2,96266	0,00305	0,036873
160	XP_001987806	GH22114 [Drosophila grimshawi]	2,75607	91,7152	5,05648	-3,08677	0,002023	0,027615
161	XP_002064713	GK15077 [Drosophila willistoni]	10,1385	338,602	5,06168	-2,96863	0,002991	0,036271
162	XP_002066695	GK24624 [Drosophila willistoni]	17,1751	573,608	5,06168	-2,96863	0,002991	0,036271
163	ZP_08259168	carbamoyl-phosphate synthase small subunit [Gemella haemolysans M341]	657,88	21982,7	5,0624	-2,85411	0,004316	0,046789
164	XP_002001246	G122080 [Drosophila mojavenis]	24,5471	822,568	5,06651	-3,04026	0,002364	0,030712
165	XP_002071868	GK10221 [Drosophila willistoni]	77,3789	2593,57	5,06686	-3,10304	0,001915	0,026513
166	XP_002032791	GM20974 [Drosophila sechellia]	10,202	342,195	5,06789	-3,10665	0,001892	0,026418
167	NP_570022	CG2681 [Drosophila melanogaster]	21,1075	707,983	5,06789	-3,10665	0,001892	0,026418
168	ADD20075	hypothetical conserved protein [Glossina morsitans morsitans]	27,4644	923,846	5,07202	-3,09546	0,001965	0,026997
169	XP_002009552	G115174 [Drosophila mojavenis]	32,8494	1104,99	5,07202	-3,05914	0,00222	0,029443
170	XP_002002087	G114160 [Drosophila mojavenis]	26,4405	892,227	5,07659	-3,10142	0,001926	0,026614
171	XP_002062280	GK17459 [Drosophila willistoni]	14,2593	481,367	5,07716	-3,09833	0,001946	0,026838
172	NP_523714	vismay, isoform A [Drosophila melanogaster]	19,5322	660,153	5,07887	-3,06311	0,002191	0,029149
173	XP_001955008	GF16464 [Drosophila ananassae]	76,0386	2569,97	5,07887	-3,04642	0,002316	0,030239
174	EGI64147	Thioredoxin-2 [Acromyrmex echinator]	99,8694	3379,97	5,08082	-3,11511	0,001839	0,025842
175	XP_001953218	GF17658 [Drosophila ananassae]	23,088	783,29	5,08433	-3,11561	0,001836	0,025833

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι- ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ RNA-seq

176	YP_006067947	glucosyltransferase-I [Streptococcus salivarius 57.I]	226,27	7680,46	5,08507	-3,08878	0,00201	0,027474
177	XP_002018328	GL17652 [Drosophila persimilis]	1,26117	42,8271	5,08569	-3,06705	0,002162	0,028837
178	ABK91833	NADH dehydrogenase subunit 2 [Artemia franciscana]	49,2986	1674,1	5,08569	-3,06705	0,002162	0,028837
179	XP_001654055	sodium/dicarboxylate cotransporter, putative [Aedes aegypti]	32,4256	1102,42	5,08739	-3,10404	0,001909	0,026473
180	XP_001358020	GA18009 [Drosophila pseudoobscura pseudoobscura]	10,5318	358,205	5,08796	-3,10736	0,001888	0,026416
181	NP_688816	deoxynucleoside kinase family protein [Streptococcus agalactiae 2603V/R]	18,5706	631,815	5,08841	-3,11783	0,001822	0,02578
182	XP_002038719	GM10971 [Drosophila sechellia]	91,7973	3131,99	5,09248	-3,12313	0,001789	0,025472
183	XP_002019317	GL12304 [Drosophila persimilis]	14,9404	510,378	5,09427	-2,91004	0,003614	0,040993
184	XP_002258004	hypothetical protein, conserved in Plasmodium species [Plasmodium knowlesi strain H]	7,51243	257,035	5,09654	-3,10366	0,001911	0,02648
185	AAL28854	LD22256p [Drosophila melanogaster]	9,50091	325,679	5,09924	-3,07487	0,002106	0,028411
186	XP_001965439	GF22449 [Drosophila ananassae]	22,9836	787,847	5,09924	-3,07487	0,002106	0,028411
187	AAA28278	transposase, partial [Ctenocephalides felis]	21,8996	752,444	5,10261	-2,9921	0,002771	0,034403
188	XP_002068494	GK20389 [Drosophila willistoni]	52,9185	1821,21	5,10498	-2,91497	0,003557	0,040762
189	XP_002048448	GJ11348 [Drosophila virilis]	22,1383	763,623	5,10825	-2,84822	0,004396	0,047397
190	ADB91415	MIP15848p [Drosophila melanogaster]	6,7664	234,111	5,11266	-3,13099	0,001742	0,024995
191	ABM65758	trypsin [Portunus pelagicus]	82,2801	2846,81	5,11266	-3,1181	0,00182	0,025778
192	XP_002001084	GI22167 [Drosophila mojavenis]	7,69911	267,307	5,11766	-3,12087	0,001803	0,02558
193	XP_002068944	GK17751 [Drosophila willistoni]	25,9002	904,78	5,12653	-2,99764	0,002721	0,033821
194	YP_005168745	DNA topoisomerase I [Desulfovibrio desulfuricans ND132]	246,129	8634,09	5,13256	-3,12914	0,001753	0,025065
195	XP_002064665	GK23987 [Drosophila willistoni]	5,03766	176,719	5,13256	-3,09407	0,001974	0,027101
196	XP_002011537	GI11083 [Drosophila mojavenis]	9,23519	323,967	5,13256	-3,00928	0,002619	0,032887
197	XP_002054940	GJ19063 [Drosophila virilis]	30,5991	1073,4	5,13256	-3,00928	0,002619	0,032887
198	XP_002009539	GI15409 [Drosophila mojavenis]	53,2987	1876,1	5,13749	-3,13187	0,001737	0,024963
199	XP_002049894	GJ20498 [Drosophila virilis]	12,0795	426,764	5,1428	-2,98995	0,00279	0,034582
200	XP_002002194	GI13947 [Drosophila mojavenis]	8,41033	299,073	5,15219	-3,14	0,001689	0,024455
201	XP_002047307	GJ13363 [Drosophila virilis]	5,77433	205,336	5,15219	-3,10534	0,001901	0,02644
202	XP_001663450	hypothetical protein AaeL_AAEL013304 [Aedes aegypti]	10,1591	361,636	5,15369	-3,10398	0,001909	0,026473
203	XP_001961048	GF11201 [Drosophila ananassae]	11,1832	400,899	5,16384	-3,15868	0,001585	0,023429
204	XP_001966081	GF19492 [Drosophila ananassae]	29,0155	1041,09	5,16513	-3,16198	0,001567	0,023247
205	XP_001991646	GH12769 [Drosophila grimshawi]	29,5504	1060,96	5,16605	-3,16037	0,001576	0,023355
206	XP_002023843	GL27291 [Drosophila persimilis]	8,71301	312,881	5,1663	-3,13022	0,001747	0,024995
207	XP_002056213	GJ10812 [Drosophila virilis]	106,39	3829,72	5,1698	-3,02633	0,002475	0,031739
208	XP_001954858	GF16532 [Drosophila ananassae]	15,1903	546,946	5,17018	-3,10196	0,001922	0,026588
209	XP_002085451	GD12302 [Drosophila simulans]	39,5021	1430,01	5,17795	-3,12627	0,00177	0,025278
210	XP_001957917	GF10653 [Drosophila ananassae]	3,78347	137,268	5,18114	-3,15597	0,0016	0,023584
211	XP_003690909	PREDICTED: mediator of DNA damage checkpoint protein 1-like [Apis florea]	4,08081	148,056	5,18114	-3,03715	0,002388	0,030958
212	XP_002075654	GK19299 [Drosophila willistoni]	429,377	15660,7	5,18876	-2,88391	0,003928	0,043802
213	XP_002733831	PREDICTED: hypothetical protein, partial [Saccoglossus kowalevskii]	235,767	8610,49	5,19066	-2,83375	0,004601	0,048831
214	XP_001984348	GH16406 [Drosophila grimshawi]	50,3466	1844,3	5,19504	-3,12464	0,00178	0,025364
215	XP_002002253	GI17284 [Drosophila mojavenis]	6,2257	228,118	5,1954	-3,16381	0,001557	0,023147
216	ZP_11346595	protein-tyrosine sulfotransferase [Glaciecola lipolytica E3]	274,906	10072,9	5,1954	-3,16381	0,001557	0,023147
217	XP_001993650	GH20888 [Drosophila grimshawi]	12,3607	454,397	5,20012	-3,04803	0,002303	0,030142
218	XP_003513496	PREDICTED: WD repeat-containing protein WRAP73-like, partial [Cricetulus griseus]	15,3224	563,274	5,20012	-3,04803	0,002303	0,030142
219	ADD18449	putative RNA methylase [Glossina morsitans morsitans]	15,6889	578,93	5,20557	-3,0697	0,002143	0,028756

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι- ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ RNA-seq

220	XP_002015515	GL11117 [Drosophila persimilis]	19,5113	721,953	5,20952	-3,17038	0,001522	0,022894
221	B7FF07	RecName: Full=WD repeat-containing protein on Y chromosome	2,59171	95,8977	5,20952	-3,05342	0,002262	0,029858
222	XP_002016575	GL11656 [Drosophila persimilis]	1,08502	40,1476	5,20952	-2,84383	0,004457	0,04762
223	XP_002610189	hypothetical protein BRAFLDRAFT_121525 [Branchiostoma floridae]	11,6738	431,952	5,20952	-2,84383	0,004457	0,04762
224	EFR21127	hypothetical protein AND_17518 [Anopheles darlingi]	68,7264	2543	5,20952	-2,84383	0,004457	0,04762
225	NP_608764	CG8837 [Drosophila melanogaster]	16,1667	602,081	5,21886	-3,17668	0,00149	0,022505
226	ADQ64585	hypothetical protein [Bactrocera oleae]	28,5341	1062,67	5,21886	-3,05878	0,002222	0,029455
227	XP_002046607	GJ12391 [Drosophila virilis]	200,243	7473,51	5,22196	-3,17678	0,001489	0,022505
228	XP_002031983	GM26309 [Drosophila sechellia]	10,5847	395,566	5,22386	-3,13898	0,001695	0,024514
229	XP_002067484	GK16164 [Drosophila willistoni]	72,1895	2701,07	5,2256	-2,89649	0,003774	0,042545
230	ABJ16965	IP02433p [Drosophila melanogaster]	10,9498	410,424	5,22814	-2,85378	0,00432	0,046789
231	EFN84732	hypothetical protein EAI_10534 [Harpegnathos saltator]	170,84	6403,47	5,22814	-2,85378	0,00432	0,046789
232	ADL59625	MIP24405p [Drosophila melanogaster]	15,8495	595,982	5,23275	-3,18993	0,001423	0,021797
233	XP_001952884	GF17500 [Drosophila ananassae]	20,5456	773,389	5,23429	-3,19878	0,00138	0,021277
234	XP_003736348	GA27045, isoform B [Drosophila pseudoobscura pseudoobscura]	535,909	20194,9	5,23586	-2,93206	0,003367	0,03933
235	XP_002004115	GI19175 [Drosophila mojavensis]	3,03785	114,596	5,23736	-3,06938	0,002145	0,028756
236	XP_002051977	GJ17296 [Drosophila virilis]	3,96239	149,471	5,23736	-3,06938	0,002145	0,028756
237	XP_001998402	GI23945 [Drosophila mojavensis]	184,596	6978,24	5,24042	-3,15566	0,001601	0,023588
238	XP_002007662	GI13065 [Drosophila mojavensis]	15,2456	577,302	5,24286	-3,20113	0,001369	0,021223
239	XP_002030683	GM24447 [Drosophila sechellia]	57,1588	2169,91	5,24652	-3,15912	0,001582	0,023414
240	XP_002136937	GA26940 [Drosophila pseudoobscura pseudoobscura]	19,3447	734,381	5,24652	-3,07464	0,002108	0,028411
241	CCG18675	putative lysophospholipid acyltransferase (LPLAT) superfamily [Taylorella equigenitalis 14/56]	44,4986	1689,29	5,24652	-3,07464	0,002108	0,028411
242	XP_001992018	GH24443 [Drosophila grimshawi]	7,66119	290,841	5,24652	-2,86361	0,004188	0,045812
243	XP_002012807	GL23802 [Drosophila persimilis]	17,6793	671,157	5,24652	-2,86361	0,004188	0,045812
244	NP_001163789	hephaestus, isoform Q [Drosophila melanogaster]	28,4482	1084,72	5,25283	-2,8359	0,00457	0,048622
245	XP_001356811	GA20558 [Drosophila pseudoobscura pseudoobscura]	32,8657	1255,57	5,25562	-3,07985	0,002071	0,028148
246	ADX35953	AT09970p [Drosophila melanogaster]	21,2755	815,346	5,26015	-3,19924	0,001378	0,021263
247	XP_002052919	GJ19571 [Drosophila virilis]	3,19115	122,679	5,26466	-3,08504	0,002035	0,027753
248	XP_002009182	GII1401 [Drosophila mojavensis]	6,51074	250,295	5,26466	-2,87332	0,004062	0,044784
249	AAO13291	alpha-amylase [Drosophila funebris]	19,0529	732,46	5,26466	-2,87332	0,004062	0,044784
250	YP_561361	hypothetical protein Sden_0343 [Shewanella denitrificans OS217]	61,5321	2365,5	5,26466	-2,87332	0,004062	0,044784
251	XP_002059910	GJ15101 [Drosophila virilis]	13,0075	502,138	5,27066	-3,21807	0,001291	0,020409
252	XP_001952889	GF17502 [Drosophila ananassae]	17,0501	658,601	5,27155	-2,93165	0,003372	0,03933
253	XP_001360885	GA16380 [Drosophila pseudoobscura pseudoobscura]	16,6348	645,058	5,27715	-3,06872	0,00215	0,028756
254	XP_001958510	GF10958 [Drosophila ananassae]	15,1755	590,689	5,28259	-3,22164	0,001275	0,020216
255	XP_002055790	GJ10577 [Drosophila virilis]	41,1382	1601,26	5,28259	-3,21146	0,001321	0,020649
256	XP_001981914	GG12306 [Drosophila erecta]	9,10819	354,527	5,28259	-2,88291	0,00394	0,043823
257	XP_002068629	GK20322 [Drosophila willistoni]	10,2845	400,315	5,28259	-2,88291	0,00394	0,043823
258	XP_002068679	GK17906 [Drosophila willistoni]	13,3247	518,649	5,28259	-2,88291	0,00394	0,043823
259	XP_002105251	GD18017 [Drosophila simulans]	15,2995	595,518	5,28259	-2,88291	0,00394	0,043823
260	NP_723158	stathmin, isoform A [Drosophila melanogaster]	34,6868	1353,27	5,28592	-3,13783	0,001702	0,024567
261	XP_002086237	GE23029 [Drosophila yakuba]	24,7214	965,223	5,28703	-3,21387	0,00131	0,020544
262	XP_002014200	GL19072 [Drosophila persimilis]	27,3246	1067,96	5,28851	-3,18283	0,001458	0,022174
263	XP_002103209	GD19085 [Drosophila simulans]	42,9377	1687,81	5,29676	-3,22991	0,001238	0,019831

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι- ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ RNA-seq

264	ADD20147	solute carrier family 2 [Glossina morsitans morsitans]	22,1688	872,028	5,29777	-3,22957	0,00124	0,019835
265	XP_002412953	hypothetical protein IscW_ISCW012587 [Ixodes scapularis]	61,1982	2411,48	5,30029	-3,22107	0,001277	0,020237
266	AAM76432	gamma dynein heavy chain [Drosophila biarmipes]	4,33585	170,852	5,30029	-3,10544	0,0019	0,02644
267	XP_001953992	GF16960 [Drosophila ananassae]	12,3562	488,871	5,30614	-3,01237	0,002592	0,032628
268	XP_001998262	GL23730 [Drosophila mojavensis]	36,9785	1465,41	5,30847	-3,15931	0,001581	0,023414
269	XP_002059482	GJ19005 [Drosophila virilis]	24,3192	966,076	5,31197	-3,19601	0,001393	0,021402
270	XP_001956216	GF25097 [Drosophila ananassae]	3,97529	158,555	5,31778	-3,23054	0,001236	0,019806
271	XP_001990496	GH18215 [Drosophila grimshawi]	49,852	1988,35	5,31778	-3,23054	0,001236	0,019806
272	XP_002071051	GK25588 [Drosophila willistoni]	18,3636	732,434	5,31778	-3,22582	0,001256	0,02
273	XP_001986399	GH21341 [Drosophila grimshawi]	4,47326	178,416	5,31778	-3,11545	0,001837	0,025833
274	XP_002100557	GE17131 [Drosophila yakuba]	4,47326	178,416	5,31778	-3,11545	0,001837	0,025833
275	XP_002068315	GK25428 [Drosophila willistoni]	7,74564	308,935	5,31778	-3,11545	0,001837	0,025833
276	XP_002003729	GI18069 [Drosophila mojavensis]	11,1724	445,612	5,31778	-3,11545	0,001837	0,025833
277	XP_002023511	GL20155 [Drosophila persimilis]	11,7456	468,473	5,31778	-3,11545	0,001837	0,025833
278	XP_001987877	GH22156 [Drosophila grimshawi]	28,5341	1138,08	5,31778	-3,11545	0,001837	0,025833
279	XP_003768578	PREDICTED: protein hid-1 homolog [Sarcophilus harrisii]	39,974	1600,77	5,32356	-3,20251	0,001362	0,021142
280	XP_001984741	GH16635 [Drosophila grimshawi]	6,89845	276,388	5,32428	-3,23723	0,001207	0,019537
281	XP_002032640	GM20896 [Drosophila sechellia]	36,9408	1480,04	5,32428	-3,23723	0,001207	0,019537
282	XP_002050735	GJ20045 [Drosophila virilis]	104,74	4202,73	5,32644	-3,23523	0,001215	0,019606
283	XP_002060988	GK10684 [Drosophila willistoni]	8,18236	328,713	5,32817	-3,2466	0,001168	0,019168
284	XP_001956121	GF24750 [Drosophila ananassae]	295,792	11884,5	5,32836	-3,13796	0,001701	0,024567
285	XP_002071016	GK18849 [Drosophila willistoni]	5,31887	214,699	5,33505	-2,91099	0,003603	0,040896
286	EGB09747	hypothetical protein AURANDRAFT_24188, partial [Aureococcus anophagefferens]	10,2845	415,142	5,33505	-2,91099	0,003603	0,040896
287	EFR21188	hypothetical protein AND_17426 [Anopheles darlingi]	10,9498	441,995	5,33505	-2,91099	0,003603	0,040896
288	AFN83942	ubiquitin-protein ligase [Encephalitozoon romaleae SJ-2008]	26,185	1056,97	5,33505	-2,91099	0,003603	0,040896
289	XP_003701837	PREDICTED: cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1, mitochondrial-like [Megachile rotundata]	78,1289	3156,85	5,33648	-3,20536	0,001349	0,020992
290	XP_002082736	GD25077 [Drosophila simulans]	32,8494	1331,25	5,34077	-3,21213	0,001318	0,02062
291	XP_002007182	GI12524 [Drosophila mojavensis]	46,9823	1904,93	5,34148	-3,24607	0,00117	0,019185
292	NP_729429	orb2, isoform A [Drosophila melanogaster]	5,296	215,049	5,34362	-3,2445	0,001177	0,019253
293	XP_001953588	GF17839 [Drosophila ananassae]	7,42823	301,629	5,34362	-3,13024	0,001747	0,024995
294	XP_001984205	GH15139 [Drosophila grimshawi]	19,3447	785,509	5,34362	-3,13024	0,001747	0,024995
295	XP_001989257	GH11625 [Drosophila grimshawi]	7,66119	312,93	5,35213	-2,92013	0,003499	0,040269
296	BAJ78684	RNA polymerase II largest subunit [Papilio polytes]	10,9498	447,257	5,35213	-2,92013	0,003499	0,040269
297	XP_001664010	hypothetical protein AaeL_AAEL013815 [Aedes aegypti]	17,6793	722,131	5,35213	-2,92013	0,003499	0,040269
298	XP_002137008	GA26821 [Drosophila pseudoobscura pseudoobscura]	13,6657	559,505	5,35552	-3,26111	0,00111	0,018515
299	XP_002031027	GM24251 [Drosophila sechellia]	43,7992	1794,29	5,35636	-3,25137	0,001148	0,018943
300	XP_002021663	GL26632 [Drosophila persimilis]	20,5691	845,11	5,36059	-3,13994	0,00169	0,024455
301	XP_002048913	GJ21055 [Drosophila virilis]	4,38502	180,282	5,36153	-3,24805	0,001162	0,019128
302	XP_001955385	GF18734 [Drosophila ananassae]	26,5944	1096,5	5,36564	-3,26647	0,001089	0,01829
303	XP_001653243	phosphatidylserine synthase [Aedes aegypti]	43,4923	1797,39	5,369	-3,26992	0,001076	0,018163
304	XP_002005106	GI20290 [Drosophila mojavensis]	111,246	4597,44	5,369	-3,26825	0,001082	0,018194
305	XP_002068478	GK20399 [Drosophila willistoni]	48,225	1992,98	5,369	-3,14475	0,001662	0,024156
306	EJY83078	hypothetical protein OXYTRI_19303 [Oxytricha trifallax]	471,533	19486,9	5,369	-3,14475	0,001662	0,024156
307	XP_001993794	GH21724 [Drosophila grimshawi]	9,10819	376,411	5,369	-2,92916	0,003399	0,039447

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι- ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ RNA-seq

308	ZP_06142192	hypothetical protein RflaF_03070 [Ruminococcus flavefaciens FD-1]	88,9971	3688,64	5,37319	-3,26043	0,001112	0,018515
309	XP_002089280	GE19028 [Drosophila yakuba]	5,94358	246,58	5,37458	-3,23097	0,001234	0,019806
310	XP_002033023	GM20636 [Drosophila sechellia]	25,7626	1068,81	5,37458	-3,23097	0,001234	0,019806
311	XP_002105202	GD18047 [Drosophila simulans]	6,33392	263,164	5,37672	-3,21431	0,001308	0,020544
312	XP_001986587	GH20443 [Drosophila grimshawi]	5,27795	219,388	5,37736	-3,14953	0,001635	0,023918
313	ABC73441	CG13930 [Drosophila miranda]	15,3224	636,904	5,37736	-3,14953	0,001635	0,023918
314	XP_001845195	ubiquitin-conjugating enzyme E2-230k [Culex quinquefasciatus]	24,926	1042,09	5,38568	-3,15427	0,001609	0,023679
315	XP_001653307	kinase suppressor of ras (ksr) [Aedes aegypti]	4,6176	193,049	5,38568	-2,93809	0,003302	0,038791
316	XP_001962421	GF15454 [Drosophila ananassae]	10,9498	457,78	5,38568	-2,93809	0,003302	0,038791
317	YP_003247071	hypothetical protein Metvu_0731 [Methanocaldococcus vulcanius M7]	24,1125	1008,08	5,38568	-2,93809	0,003302	0,038791
318	XP_002008092	G112016 [Drosophila mojavensis]	5,16407	216,392	5,38899	-3,14739	0,001647	0,024051
319	XP_002013993	GL23096 [Drosophila persimilis]	17,5963	737,642	5,38958	-3,04421	0,002333	0,030383
320	XP_001992370	GH24712 [Drosophila grimshawi]	45,8986	1926,25	5,3912	-3,24019	0,001194	0,01943
321	XP_002032014	GM23748 [Drosophila sechellia]	9,90596	417,949	5,39888	-3,28404	0,001023	0,017543
322	XP_001658126	4-nitrophenylphosphatase [Aedes aegypti]	7,42823	314,123	5,40217	-3,16368	0,001558	0,023147
323	NP_610838	CG13326 [Drosophila melanogaster]	8,44298	357,035	5,40217	-3,16368	0,001558	0,023147
324	XP_002001106	G110599 [Drosophila mojavensis]	12,3607	522,705	5,40217	-3,16368	0,001558	0,023147
325	AEE62053	unknown [Dendroctonus ponderosae]	335,907	14213,2	5,40303	-3,16351	0,001559	0,023147
326	XP_002070802	GK10830 [Drosophila willistoni]	131,463	5567,17	5,40422	-3,27817	0,001045	0,017784
327	XP_001962764	GF14268 [Drosophila ananassae]	17,707	750,491	5,40544	-3,26055	0,001112	0,018515
328	XP_002138405	GA24751 [Drosophila pseudoobscura pseudoobscura]	16,1555	684,97	5,40595	-3,22857	0,001244	0,019886
329	XP_002135340	GA28491 [Drosophila pseudoobscura pseudoobscura]	25,5292	1083,41	5,40728	-3,19616	0,001393	0,021402
330	XP_002001751	G117021 [Drosophila mojavensis]	5,05433	214,708	5,40871	-3,28923	0,001005	0,017349
331	AAC47288	Dreg-3 protein [Drosophila melanogaster]	13,7322	584,002	5,41034	-3,16835	0,001533	0,02301
332	XP_001994931	GH13365 [Drosophila grimshawi]	30,5991	1301,32	5,41034	-3,16835	0,001533	0,02301
333	XP_002018664	GL25917 [Drosophila persimilis]	19,7875	841,524	5,41034	-3,10659	0,001893	0,026418
334	XP_001843195	aldose 1-epimerase [Culex quinquefasciatus]	231,864	9866,88	5,41125	-3,09951	0,001938	0,026764
335	XP_001999929	G122810 [Drosophila mojavensis]	142,124	6062,62	5,41472	-2,97475	0,002932	0,035765
336	XP_002066011	GK21197 [Drosophila willistoni]	4,58898	195,987	5,41644	-3,2844	0,001022	0,01754
337	XP_001961695	GF15095 [Drosophila ananassae]	26,6493	1139,75	5,41847	-3,17298	0,001509	0,02276
338	XP_002081354	GD10971 [Drosophila simulans]	43,8696	1876,23	5,41847	-3,17076	0,00152	0,022885
339	XP_002006112	G120855 [Drosophila mojavensis]	6,86609	293,651	5,41847	-2,95564	0,00312	0,037367
340	XP_001651753	ubiquitin-protein ligase [Aedes aegypti]	8,1064	346,697	5,41847	-2,95564	0,00312	0,037367
341	XP_002050963	GJ19910 [Drosophila virilis]	10,9498	468,304	5,41847	-2,95564	0,00312	0,037367
342	XP_002044572	GM19975 [Drosophila sechellia]	11,6738	499,269	5,41847	-2,95564	0,00312	0,037367
343	XP_002059360	GJ17730 [Drosophila virilis]	26,185	1119,89	5,41847	-2,95564	0,00312	0,037367
344	AEY75233	Hsp6, partial [Bactrocera dorsalis]	33,9917	1459,21	5,42386	-3,24837	0,001161	0,019125
345	XP_002014205	GL19070 [Drosophila persimilis]	15,3224	658,994	5,42655	-3,17759	0,001485	0,022496
346	XP_002106058	GD16327 [Drosophila simulans]	93,2458	4017,83	5,42924	-3,26123	0,001109	0,018515
347	XP_002035964	GM16204 [Drosophila sechellia]	135,929	5862,44	5,43058	-3,29118	0,000998	0,017302
348	XP_002020864	GL16129 [Drosophila persimilis]	4,17375	180,51	5,43459	-3,27509	0,001056	0,017923
349	DAA06417	TPA_inf: protein phosphatase [Drosophila ananassae]	35,3586	1529,22	5,43459	-3,18217	0,001462	0,022205
350	XP_002012192	G116835 [Drosophila mojavensis]	19,3447	841,284	5,44258	-3,18672	0,001439	0,021996
351	NP_610232	phtf [Drosophila melanogaster]	7,6479	333,213	5,44524	-3,29028	0,001001	0,017312
352	XP_002076670	GD15082 [Drosophila simulans]	5,49747	240,881	5,45341	-3,27383	0,001061	0,017967
353	XP_002062862	GK19470 [Drosophila willistoni]	31,9132	1403,21	5,45844	-3,31662	0,000911	0,016416
354	XP_001995026	GH22863 [Drosophila grimshawi]	19,3436	850,533	5,45844	-3,30604	0,000946	0,016655
355	XP_003485557	PREDICTED: hypothetical protein LOC100740206 [Bombus impatiens]	25,7626	1134,84	5,46106	-3,27874	0,001043	0,017784

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι- ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ RNA-seq

356	XP_002068026	GK10791 [Drosophila willistoni]	25,7555	1134,84	5,46146	-3,25553	0,001132	0,018743
357	XP_002186955	PREDICTED: uridine phosphorylase 2 [Taeniopygia guttata]	76,6119	3375,96	5,46159	-3,28851	0,001007	0,017376
358	XP_001962921	GF14190 [Drosophila ananassae]	34,3502	1518,62	5,4663	-3,31022	0,000932	0,016552
359	XP_002084320	GD12896 [Drosophila simulans]	45,1101	1994,31	5,4663	-2,98125	0,002871	0,035296
360	XP_002056921	GJ16626 [Drosophila virilis]	8,35439	369,921	5,46854	-3,31788	0,000907	0,016416
361	AAL90068	AT13740p [Drosophila melanogaster]	12,4975	554,823	5,47232	-3,26078	0,001111	0,018515
362	XP_001358519	GA16196 [Drosophila pseudoobscura pseudoobscura]	41,1906	1832,49	5,47535	-3,19737	0,001387	0,021342
363	XP_002021609	GL26603 [Drosophila persimilis]	628,747	28025,8	5,47813	-3,08947	0,002005	0,02746
364	XP_002089370	GE19073 [Drosophila yakuba]	25,3462	1130,3	5,47879	-3,3261	0,000881	0,016109
365	XP_001960488	GF13384 [Drosophila ananassae]	15,9566	713,109	5,48189	-3,29016	0,001001	0,017312
366	EGB12172	hypothetical protein AURANDRAFT_36241 [Aureococcus anophagefferens]	4,47326	199,912	5,48189	-3,20908	0,001332	0,020742
367	XP_002091859	GE13881 [Drosophila yakuba]	15,3224	684,764	5,48189	-3,20908	0,001332	0,020742
368	XP_001993305	GH13143 [Drosophila grimshawi]	7,66119	342,382	5,48189	-2,9896	0,002793	0,034582
369	XP_002046271	GJ12805 [Drosophila virilis]	31,0819	1389,06	5,48189	-2,9896	0,002793	0,034582
370	XP_001356668	GA17808 [Drosophila pseudoobscura pseudoobscura]	10,439	466,91	5,48309	-3,26598	0,001091	0,018303
371	XP_002059444	exuperantia [Drosophila virilis]	415,981	18656,4	5,48701	-2,85052	0,004365	0,047148
372	XP_001356185	GA10587 [Drosophila pseudoobscura pseudoobscura]	8,45686	379,504	5,48785	-3,26828	0,001082	0,018194
373	XP_002003790	G118099 [Drosophila mojavenis]	8,44298	379,349	5,48963	-3,21347	0,001311	0,020544
374	XP_002048778	GJ21233 [Drosophila virilis]	14,4974	651,38	5,48963	-3,21347	0,001311	0,020544
375	XP_002053466	GJ23898 [Drosophila virilis]	1620,12	73111,7	5,49593	-3,29471	0,000985	0,017176
376	XP_002020374	GL13951 [Drosophila persimilis]	26,6493	1203,78	5,49732	-3,21784	0,001292	0,020409
377	ZP_08678158	hypothetical membrane spanning protein [Sporosarcina newyorkensis 2681]	26,185	1182,8	5,49732	-2,99785	0,002719	0,033821
378	AEY75236	Hsp9, partial [Bactrocera dorsalis]	19,0803	867,607	5,50689	-3,33023	0,000868	0,01597
379	XP_002000252	GI22625 [Drosophila mojavenis]	9,57345	435,509	5,50752	-3,34206	0,000832	0,015547
380	ZP_06693212	conserved hypothetical protein [Acinetobacter sp. SH024]	95,2647	4348,98	5,51259	-3,34383	0,000826	0,015501
381	XP_001361007	GA18804 [Drosophila pseudoobscura pseudoobscura]	12,4273	567,325	5,51259	-3,31375	0,000921	0,016416
382	XP_002053584	GJ23270 [Drosophila virilis]	14,6558	669,058	5,51259	-3,22483	0,00126	0,02005
383	XP_002012075	G116633 [Drosophila mojavenis]	19,5118	891,294	5,51348	-3,23573	0,001213	0,019602
384	XP_002138914	GA24136 [Drosophila pseudoobscura pseudoobscura]	25,3813	1162,9	5,51782	-3,13319	0,001729	0,024894
385	XP_002074038	GK14425 [Drosophila willistoni]	10,5129	481,951	5,51865	-3,347	0,000817	0,015377
386	XP_001999857	GI24757 [Drosophila mojavenis]	22,3448	1025,44	5,52016	-3,3388	0,000841	0,015652
387	ADD18441	fructose-biphosphate aldolase [Glossina morsitans morsitans]	11,702	537,026	5,52016	-3,31749	0,000908	0,016416
388	XP_001359011	GA10590 [Drosophila pseudoobscura pseudoobscura]	58,3691	2681,47	5,52167	-3,34858	0,000812	0,015324
389	XP_002315122	predicted protein [Populus trichocarpa]	276,481	12728,1	5,52469	-3,35016	0,000808	0,015272
390	XP_002104862	GD18228 [Drosophila simulans]	9,57345	440,876	5,52519	-3,35119	0,000805	0,01525
391	XP_002072267	GK22422 [Drosophila willistoni]	11,3117	521,194	5,52593	-3,24157	0,001189	0,019375
392	XP_002132450	GA25469 [Drosophila pseudoobscura pseudoobscura]	312,828	14428,7	5,52743	-3,00786	0,002631	0,033016
393	XP_001657331	sex-determining protein fem-1 [Aedes aegypti]	14,4974	668,797	5,5277	-3,23506	0,001216	0,019606
394	XP_001958966	GF12292 [Drosophila ananassae]	1,72392	79,5281	5,5277	-3,0141	0,002577	0,032516
395	XP_002043619	GM16187 [Drosophila sechellia]	2,30892	106,515	5,5277	-3,0141	0,002577	0,032516
396	XP_002052009	GJ17315 [Drosophila virilis]	6,51074	300,354	5,5277	-3,0141	0,002577	0,032516
397	XP_002732131	PREDICTED: major facilitator superfamily domain containing 11-like [Saccoglossus kowalevskii]	28,2917	1307,1	5,52984	-3,34919	0,00081	0,015308

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι- ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ RNA-seq

398	EIW61737	peroxisomal 3-ketoacyl-CoA-thiolase [Trametes versicolor FP-101664 SS1]	9,86092	456,09	5,53145	-3,34477	0,000824	0,015466
399	XP_002104858	GD21179 [Drosophila simulans]	81,1079	3756,29	5,53332	-3,25592	0,00113	0,018743
400	XP_001998877	GI23389 [Drosophila mojavensis]	23,3476	1082,68	5,53519	-3,23931	0,001198	0,019453
401	XP_002070057	GK11229 [Drosophila willistoni]	28,5341	1323,19	5,53519	-3,23931	0,001198	0,019453
402	XP_002048436	GJ13968 [Drosophila virilis]	6,37263	295,653	5,53587	-3,31424	0,000919	0,016416
403	XP_001357589	GA13804 [Drosophila pseudoobscura pseudoobscura]	6,58369	306,883	5,54265	-3,24353	0,001181	0,0193
404	ADU59484	kl3 [Drosophila recens]	10,9498	510,399	5,54265	-3,0221	0,00251	0,032063
405	XP_002095611	GE19605 [Drosophila yakuba]	15,2995	713,152	5,54265	-3,0221	0,00251	0,032063
406	XP_003955271	hypothetical protein KAFR_0A07010 [Kazachstania africana CBS 2517]	72,3375	3395,01	5,55253	-3,32863	0,000873	0,016027
407	YP_101800	arabinose-proton symporter [Bacteroides fragilis YCH46]	6,22699	292,65	5,5545	-3,33439	0,000855	0,015786
408	XP_001760406	predicted protein [Physcomitrella patens subsp. patens]	781,466	36752,2	5,5555	-2,92111	0,003488	0,040269
409	EJF60906	OPT oligopeptide transporter [Dichomitus squalens LYAD-421 SS1]	66,7478	3143,37	5,55745	-3,33129	0,000864	0,015945
410	XP_002051446	GJ12206 [Drosophila virilis]	13,2421	623,614	5,55745	-3,29013	0,001001	0,017312
411	XP_002092972	GE21064 [Drosophila yakuba]	17,6793	832,575	5,55745	-3,03001	0,002445	0,031476
412	XP_002063245	GK21821 [Drosophila willistoni]	22,2493	1047,79	5,55745	-3,03001	0,002445	0,031476
413	YP_004511405	prepilin peptidase [Methylomonas methanica MC09]	37,2463	1754,05	5,55745	-3,03001	0,002445	0,031476
414	XP_001983256	GH15689 [Drosophila grimshawi]	9,44146	444,931	5,55843	-3,27904	0,001042	0,017784
415	XP_002095333	GE19750 [Drosophila yakuba]	18,1968	859,568	5,56186	-3,338	0,000844	0,015652
416	XP_002048102	GJ13778 [Drosophila virilis]	24,2501	1153,67	5,57209	-3,37534	0,000737	0,014505
417	XP_001663541	protein phosphatase-7 [Aedes aegypti]	1,63647	77,853	5,57209	-3,03784	0,002383	0,030911
418	XP_002046253	GJ12612 [Drosophila virilis]	9,10819	433,31	5,57209	-3,03784	0,002383	0,030911
419	XP_002085783	GD14954 [Drosophila simulans]	14,0078	667,9	5,57533	-3,35515	0,000793	0,015121
420	XP_001969558	GG23895 [Drosophila erecta]	5,58059	266,204	5,57597	-3,28733	0,001011	0,017406
421	AAG35632	STATHMIN-13, partial [Drosophila melanogaster]	16,886	809,414	5,58298	-3,37192	0,000746	0,014634
422	XP_002064413	GK20155 [Drosophila willistoni]	17,6526	846,16	5,58298	-3,37192	0,000746	0,014634
423	XP_001746247	hypothetical protein [Monosiga brevicollis MX1]	29,364	1411,06	5,58659	-3,38248	0,000718	0,014257
424	XP_002058970	GJ15250 [Drosophila virilis]	12,125	582,659	5,58659	-3,34705	0,000817	0,015377
425	EEC75286	hypothetical protein OsL_11627 [Oryza sativa Indica Group]	9,67236	464,798	5,58659	-3,04559	0,002322	0,030291
426	XP_001976479	GG19988 [Drosophila erecta]	8,25731	397,196	5,58803	-3,35084	0,000806	0,015253
427	ZP_08938512	ABC superfamily ATP binding cassette transporter, ABC/membrane protein [Neisseria wadsworthii 9715]	108,731	5238,91	5,59043	-3,29414	0,000987	0,017193
428	XP_003393806	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: centrosomal protein of 120 kDa-like [Bombus terrestris]	3,37829	163,423	5,59618	-3,35222	0,000802	0,015247
429	XP_002023551	GL19861 [Drosophila persimilis]	42,8012	2077,34	5,60095	-3,35478	0,000794	0,015123
430	CCK68513	hypothetical protein KNAG_0B00650 [Kazachstania naganishii CBS 8797]	137,453	6671,24	5,60095	-3,27643	0,001051	0,017875
431	XP_001356708	GA16856 [Drosophila pseudoobscura pseudoobscura]	14,2671	692,448	5,60095	-3,05326	0,002264	0,029858
432	ADD20287	hypothetical conserved protein [Glossina morsitans morsitans]	28,3264	1377,54	5,6038	-3,35855	0,000784	0,015058
433	XP_002063869	GK15906 [Drosophila willistoni]	36,8243	1795,43	5,60752	-3,32567	0,000882	0,016109
434	XP_002055305	GJ18863 [Drosophila virilis]	10,6548	520,421	5,6101	-3,31511	0,000916	0,016416
435	XP_002015891	GL10775 [Drosophila persimilis]	45,9672	2253,1	5,61516	-3,39741	0,00068	0,013795
436	XP_002017289	GL22231 [Drosophila persimilis]	17,6184	863,57	5,61516	-3,36243	0,000773	0,014955
437	DAA05699	TPA: dynein heavy chain [Drosophila pseudoobscura]	6,51074	319,126	5,61516	-3,06086	0,002207	0,029322
438	XP_002070910	GK25413 [Drosophila willistoni]	25,3462	1244,79	5,61799	-3,39879	0,000677	0,013776

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι- ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ RNA-seq

439	XP_001954786	GF18446 [Drosophila ananassae]	9,87554	485,635	5,61987	-3,36496	0,000766	0,01485
440	XP_001953252	GF17676 [Drosophila ananassae]	26,043	1285,89	5,62573	-3,39435	0,000688	0,013871
441	XP_002086294	GE23060 [Drosophila yakuba]	37,389	1850,6	5,62924	-3,36999	0,000752	0,014668
442	EKC23957	Endo-1,4-beta-xylanase A [Crassostrea gigas]	28,5341	1412,32	5,62924	-3,29233	0,000994	0,017249
443	XP_002100086	GE16848 [Drosophila yakuba]	9,10819	450,818	5,62924	-3,06837	0,002152	0,028756
444	XP_001953580	GF17158 [Drosophila ananassae]	11,6738	577,806	5,62924	-3,06837	0,002152	0,028756
445	XP_002001993	GI17137 [Drosophila mojavensis]	15,2995	757,264	5,62924	-3,06837	0,002152	0,028756
446	YP_001224331	hypothetical protein SynWH7803_0608 [Synechococcus sp. WH 7803]	68,7264	3401,67	5,62924	-3,06837	0,002152	0,028756
447	XP_002095675	GE22540 [Drosophila yakuba]	553,789	27499	5,6339	-3,38405	0,000714	0,014205
448	XP_002003468	GI22366 [Drosophila mojavensis]	9,23519	459,323	5,63622	-3,29626	0,00098	0,017116
449	XP_002069909	GK11772 [Drosophila willistoni]	11,8002	587,044	5,63659	-3,13085	0,001743	0,024995
450	XP_001984074	GH15209 [Drosophila grimshawi]	14,4802	721,64	5,63912	-3,2264	0,001254	0,019979
451	XP_001848697	amino acid transporter [Culex quinquefasciatus]	61,1982	3051,11	5,6397	-3,40167	0,00067	0,013716
452	ADQ64612	hypothetical protein [Bactrocera oleae]	99,7041	4988,84	5,64491	-3,39931	0,000676	0,013767
453	XP_002000504	GI22488 [Drosophila mojavensis]	8,94653	448,19	5,64664	-3,40529	0,000661	0,01362
454	AAL68780	antigen 5-related 3 protein [Anopheles gambiae]	26,043	1304,66	5,64664	-3,40529	0,000661	0,01362
455	XP_001964425	GF23056 [Drosophila ananassae]	2,44263	122,465	5,64779	-3,37993	0,000725	0,014316
456	ABB76243	kl-2 protein [Drosophila sechellia]	5,61297	281,415	5,64779	-3,37993	0,000725	0,014316
457	ACQ45354	MIP05150p [Drosophila melanogaster]	135,33	6785	5,64779	-3,37993	0,000725	0,014316
458	XP_002054745	GJ22634 [Drosophila virilis]	30,3805	1527,69	5,65207	-3,20018	0,001373	0,021252
459	NP_723314	CG7196, isoform B [Drosophila melanogaster]	32,0834	1613,69	5,65239	-3,39314	0,000691	0,013909
460	XP_001956241	GF25110 [Drosophila ananassae]	22,9836	1156	5,65239	-3,38239	0,000719	0,014257
461	XP_002051175	GJ14645 [Drosophila virilis]	19,3447	976,076	5,65698	-3,30789	0,00094	0,01658
462	XP_002067324	GK16240 [Drosophila willistoni]	3,56482	179,87	5,65698	-3,08318	0,002048	0,027858
463	XP_002024590	GL22543 [Drosophila persimilis]	5,87279	296,323	5,65698	-3,08318	0,002048	0,027858
464	XP_001962277	GF15387 [Drosophila ananassae]	16,4329	829,153	5,65698	-3,08318	0,002048	0,027858
465	NP_724715	CG30350 [Drosophila melanogaster]	36,9408	1866,14	5,6587	-3,40615	0,000659	0,01362
466	XP_002011380	GI16031 [Drosophila mojavensis]	34,3502	1737,33	5,66041	-3,41249	0,000644	0,01348
467	XP_002080657	GD10604 [Drosophila simulans]	9,25632	469,023	5,66308	-3,39838	0,000678	0,01378
468	XP_001954013	GF18061 [Drosophila ananassae]	36,1625	1838,9	5,6682	-3,08942	0,002005	0,02746
469	XP_002055881	GJ10524 [Drosophila virilis]	13,0215	663,282	5,67066	-3,31554	0,000915	0,016416
470	XP_002006839	GI18371 [Drosophila mojavensis]	17,7823	907,716	5,67373	-3,1883	0,001431	0,0219
471	XP_001843601	conserved hypothetical protein [Culex quinquefasciatus]	5,61297	286,81	5,67519	-3,39457	0,000687	0,013871
472	XP_002091482	GE12219 [Drosophila yakuba]	7,27872	373,383	5,68083	-3,42314	0,000619	0,013184
473	XP_002102004	GE15287 [Drosophila yakuba]	25,4937	1309,48	5,6827	-3,40799	0,000654	0,013571
474	XP_002078756	GD23594 [Drosophila simulans]	7,24872	372,715	5,6842	-3,09769	0,00195	0,026839
475	AEY75232	Hsp5, partial [Bactrocera dorsalis]	10,6325	547,432	5,68613	-3,42808	0,000608	0,013026
476	XP_001989822	GH19008 [Drosophila grimshawi]	16,7586	864,38	5,68869	-3,40176	0,00067	0,013716
477	EJY83922	hypothetical protein OXYTRL_18343 [Oxytricha trifallax]	26,5944	1377,65	5,69495	-3,43856	0,000585	0,012756
478	ZP_11372861	hypothetical protein LEP1GSC041_3742 [Leptospira noguchii str. 2006001870]	142,483	7394,66	5,69762	-3,43994	0,000582	0,01272
479	XP_002077593	GD22984 [Drosophila simulans]	19,3447	1003,96	5,69762	-3,3306	0,000867	0,015967
480	CCE78959	Piso0_000995 [Milleromyza farinosa CBS 7064]	11,6738	605,854	5,69762	-3,10485	0,001904	0,02644
481	ADD19033	hypothetical conserved protein [Glossina morsitans morsitans]	24,1125	1251,4	5,69762	-3,10485	0,001904	0,02644
482	XP_001966136	GF19513 [Drosophila ananassae]	49,8639	2587,87	5,69762	-3,10485	0,001904	0,02644
483	XP_001986406	GH21345 [Drosophila grimshawi]	5,05433	262,799	5,70029	-3,44131	0,000579	0,012712
484	NP_609000	CG13991 [Drosophila melanogaster]	14,2593	741,75	5,70096	-3,43362	0,000596	0,012884
485	XP_002063188	GK19405 [Drosophila willistoni]	4,33585	227,108	5,71092	-3,33801	0,000844	0,015652

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι- ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ RNA-seq

486	EFY87569	hypothetical protein MAC_06413 [Metarhizium acridum CQMa 102]	44,4986	2330,8	5,71092	-3,33801	0,000844	0,015652
487	XP_001976596	GG19932 [Drosophila erecta]	5,87279	307,612	5,71092	-3,11193	0,001859	0,026055
488	XP_002057184	GJ16955 [Drosophila virilis]	11,6738	611,464	5,71092	-3,11193	0,001859	0,026055
489	XP_001958201	GF10804 [Drosophila ananassae]	22,2493	1165,4	5,71092	-3,11193	0,001859	0,026055
490	ADD19448	phosphoglucomutase [Glossina morsitans morsitans]	11,052	579,423	5,71224	-3,41121	0,000647	0,01348
491	YP_004372910	cell division protein FtsK/SpoIIIE [Coriobacterium glomerans PW2]	62,3151	3270	5,71356	-3,44813	0,000564	0,012572
492	XP_001982157	GG12445 [Drosophila erecta]	38,6894	2031,17	5,71423	-3,44052	0,000581	0,012712
493	XP_002077084	GD24472 [Drosophila simulans]	41,1095	2158,93	5,7147	-3,44236	0,000577	0,012691
494	XP_002026103	GL16089 [Drosophila persimilis]	8,69121	456,63	5,71533	-3,44834	0,000564	0,012572
495	NP_001097774	flyers-cup, isoform E [Drosophila melanogaster]	48,3591	2549,27	5,72016	-3,41503	0,000638	0,013437
496	XP_002017293	GL22235 [Drosophila persimilis]	83,7931	4426,59	5,72322	-3,35621	0,00079	0,015082
497	ABC73495	CG32227 [Drosophila miranda]	5,05433	267,17	5,7241	-3,45354	0,000553	0,012485
498	XP_002067137	GK24831 [Drosophila willistoni]	11,8639	627,124	5,7241	-3,43846	0,000585	0,012756
499	XP_001361258	GA14893 [Drosophila pseudoobscura pseudoobscura]	17,6184	939,768	5,73715	-3,42748	0,000609	0,013026
500	XP_002098455	GE23936 [Drosophila yakuba]	3,71411	198,112	5,73715	-3,12589	0,001773	0,025278
501	XP_002052467	GJ21452 [Drosophila virilis]	12,463	664,78	5,73715	-3,12589	0,001773	0,025278
502	XP_001989083	GH11526 [Drosophila grimshawi]	4,55172	242,972	5,73823	-3,39972	0,000675	0,013763
503	XP_002068830	GK17990 [Drosophila willistoni]	10,1991	546,473	5,74364	-3,45579	0,000549	0,012439
504	XP_002047688	GJ13569 [Drosophila virilis]	11,7456	629,334	5,74364	-3,35618	0,00079	0,015082
505	XP_002011559	GII1031 [Drosophila mojavensis]	13,7322	735,777	5,74364	-3,35618	0,00079	0,015082
506	XP_002076133	GD12025 [Drosophila simulans]	41,14	2204,3	5,74364	-3,35618	0,00079	0,015082
507	AAD34782	unknown [Drosophila melanogaster]	22,9836	1233,31	5,74579	-3,43205	0,000599	0,012941
508	NP_612101	mitotic spindle density 5 [Drosophila melanogaster]	1,89173	101,814	5,75009	-3,35976	0,00078	0,015009
509	XP_001973424	GG13351 [Drosophila erecta]	6,33394	340,897	5,75009	-3,35976	0,00078	0,015009
510	EFN63856	Bestrophin-2 [Camponotus floridanus]	11,7456	632,156	5,75009	-3,35976	0,00078	0,015009
511	XP_001959596	GF12949 [Drosophila ananassae]	9,10819	490,21	5,75009	-3,13277	0,001732	0,024907
512	XP_002002462	GII2636 [Drosophila mojavensis]	76,4977	4124,52	5,75266	-3,46817	0,000524	0,01217
513	NP_611450	CG10822 [Drosophila melanogaster]	11,5883	625,082	5,75331	-3,45282	0,000555	0,012485
514	XP_002067094	GK24200 [Drosophila willistoni]	20,2173	1094,91	5,75908	-3,31748	0,000908	0,016416
515	XP_001999843	GI22853 [Drosophila mojavensis]	23,7508	1287,16	5,76007	-3,44567	0,00057	0,012654
516	XP_003226940	PREDICTED: uncharacterized protein C4orf22 homolog [Anolis carolinensis]	115,03	6246,28	5,76291	-3,46635	0,000528	0,012175
517	ADF77083	CG1691 [Drosophila melanogaster]	35,5309	1933,31	5,76586	-3,40043	0,000673	0,013745
518	XP_001983595	GH15982 [Drosophila grimshawi]	11,8133	643,371	5,76716	-3,31121	0,000929	0,016544
519	XP_002021822	GL26291 [Drosophila persimilis]	631,541	34445,3	5,76928	-3,38972	0,0007	0,014033
520	XP_002038303	GM10760 [Drosophila sechellia]	18,2164	993,55	5,76928	-3,37038	0,000751	0,014664
521	XP_001359330	GA19834 [Drosophila pseudoobscura pseudoobscura]	19,3447	1055,09	5,76928	-3,37038	0,000751	0,014664
522	XP_001507421	PREDICTED: pyruvate kinase isozymes M1/M2-like [Ornithorhynchus anatinus]	10,3435	564,981	5,7714	-3,47662	0,000508	0,011968
523	XP_002069866	GK11339 [Drosophila willistoni]	5,58621	306,023	5,77563	-3,14635	0,001653	0,024073
524	XP_002051748	GJ10640 [Drosophila virilis]	8,1064	444,083	5,77563	-3,14635	0,001653	0,024073
525	XP_003662341	hypothetical protein MYCTH_2302881 [Myceliophthora thermophila ATCC 42464]	31,0819	1702,72	5,77563	-3,14635	0,001653	0,024073
526	XP_001955641	GF18866 [Drosophila ananassae]	13,285	728,154	5,77637	-3,35736	0,000787	0,015082
527	NP_001036757	lost boys [Drosophila melanogaster]	9,50091	521,999	5,77984	-3,45001	0,000561	0,01257
528	XP_001688178	AGAP011330-PA [Anopheles gambiae str. PEST]	13,8535	762,251	5,78194	-3,48191	0,000498	0,011856
529	DAA06423	TPA_inf: occludin-related Y protein [Drosophila mojavensis]	123,064	6771,26	5,78194	-3,37737	0,000732	0,014433

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι- ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ RNA-seq

530	XP_002132263	GA25300 [Drosophila pseudoobscura pseudoobscura]	28,1768	1551,42	5,78293	-3,33854	0,000842	0,015652
531	XP_002068879	GK17793 [Drosophila willistoni]	22,9836	1266,45	5,78404	-3,45222	0,000556	0,012485
532	XP_001867120	phosphoglucomutase [Culex quinquefasciatus]	5,84889	322,968	5,78708	-3,4351	0,000592	0,012884
533	XP_786600	PREDICTED: hydroxyacylglutathione hydrolase, mitochondrial-like [Strongylocentrotus purpuratus]	8,85351	489,266	5,78823	-3,48633	0,00049	0,011781
534	XP_002078408	GD23426 [Drosophila simulans]	10,2728	567,701	5,78823	-3,45443	0,000551	0,012485
535	NP_001015505	male fertility factor kl2, partial [Drosophila melanogaster]	15,2995	845,489	5,78823	-3,15304	0,001616	0,023737
536	EJK52674	hypothetical protein THAOC_28024 [Thalassiosira oceanica]	68,7264	3797,99	5,78823	-3,15304	0,001616	0,023737
537	XP_002007192	G112518 [Drosophila mojavensis]	4,15125	230,073	5,7924	-3,45662	0,000547	0,012434
538	XP_002068326	GK13466 [Drosophila willistoni]	10,3435	574,094	5,79448	-3,48821	0,000486	0,011781
539	AAV54271	sodium/calcium exchanger [Caenorhabditis remanei]	4,77008	264,752	5,79448	-3,38428	0,000714	0,014205
540	XP_001953936	GF18018 [Drosophila ananassae]	24,926	1383,46	5,79448	-3,38428	0,000714	0,014205
541	XP_001984932	GH14771 [Drosophila grimshawi]	30,5991	1698,33	5,79448	-3,38428	0,000714	0,014205
542	NP_572435	CG1571 [Drosophila melanogaster]	13,7322	765,472	5,80072	-3,38771	0,000705	0,014102
543	XP_002064395	GK20143 [Drosophila willistoni]	42,3451	2363,21	5,80241	-3,31736	0,000909	0,016416
544	ADD19213	flavin-containing amine oxidase [Glossina morsitans morsitans]	49,852	2784,89	5,80382	-3,48693	0,000489	0,011781
545	XP_002024234	GL14926 [Drosophila persimilis]	11,1423	622,891	5,80486	-3,46316	0,000534	0,012254
546	XP_002085581	GD12231 [Drosophila simulans]	9,67182	541,459	5,80692	-3,39112	0,000696	0,013978
547	XP_002030501	GM24536 [Drosophila sechellia]	115,03	6443,7	5,80781	-3,48857	0,000486	0,011781
548	XP_002127972	PREDICTED: similar to phosphoglucomutase 2-like 1 [Ciona intestinalis]	30,8536	1734,7	5,8131	-3,46749	0,000525	0,012172
549	XP_002034653	GM21999 [Drosophila sechellia]	9,98093	561,163	5,8131	-3,39771	0,00068	0,013795
550	XP_001956213	GF25094 [Drosophila ananassae]	9,10819	512,094	5,8131	-3,16623	0,001544	0,023076
551	XP_001994679	GH14769 [Drosophila grimshawi]	9,67236	543,814	5,8131	-3,16623	0,001544	0,023076
552	XP_002062607	GK16568 [Drosophila willistoni]	15,2995	860,193	5,8131	-3,16623	0,001544	0,023076
553	XP_002073681	GK14237 [Drosophila willistoni]	17,8594	1005,49	5,81507	-3,296	0,000981	0,017116
554	ACV44473	MIP08202p [Drosophila melanogaster]	11,4775	646,408	5,81556	-3,4608	0,000539	0,012311
555	XP_001984284	GH16368 [Drosophila grimshawi]	3,25684	183,502	5,81618	-3,49331	0,000477	0,011646
556	XP_001968628	GG24975 [Drosophila erecta]	28,9949	1633,68	5,81618	-3,49331	0,000477	0,011646
557	ADQ64544	hypothetical protein [Bactrocera oleae]	39,0235	2204,52	5,81997	-3,23201	0,001229	0,019781
558	XP_002068418	GK20432 [Drosophila willistoni]	27,4644	1554,04	5,82232	-3,49648	0,000471	0,011578
559	XP_001968953	GG24217 [Drosophila erecta]	9,347	529,264	5,82334	-3,30833	0,000939	0,016572
560	ACC62134	kl-3 gamma dynein heavy chain [Drosophila ananassae]	16,4329	931,81	5,82538	-3,17274	0,00151	0,02276
561	EKV32260	virulence factor SrfC like protein [Caenispirillum salinarum AK4]	6,50377	369,832	5,82945	-3,47605	0,000509	0,011968
562	XP_002073431	GK13153 [Drosophila willistoni]	52,5646	2992,75	5,83124	-3,30309	0,000956	0,01676
563	XP_002017753	GL17345 [Drosophila persimilis]	21,8996	1247,06	5,83148	-3,4046	0,000663	0,013621
564	XP_002979205	hypothetical protein SELMODRAFT_110542 [Selaginella moellendorffii]	48,225	2746,14	5,83148	-3,4046	0,000663	0,013621
565	XP_003231791	hypothetical protein TERG_07410 [Trichophyton rubrum CBS 118892]	15,2995	874,898	5,83755	-3,17919	0,001477	0,022393
566	XP_002047915	GJ13701 [Drosophila virilis]	3,83893	219,732	5,8389	-3,48373	0,000494	0,011827
567	XP_001968998	GG25175 [Drosophila erecta]	23,8472	1365,77	5,83976	-3,46001	0,00054	0,012331
568	XP_002003230	GL23623 [Drosophila mojavensis]	22,1688	1273,8	5,84446	-3,50663	0,000454	0,011399
569	XP_002028011	GL15062 [Drosophila persimilis]	3,71146	213,353	5,84511	-3,49764	0,000469	0,011544
570	XP_002050210	GJ22018 [Drosophila virilis]	25,3289	1458,57	5,84762	-3,51477	0,00044	0,011212
571	XP_002049588	GJ20671 [Drosophila virilis]	170,309	9816,86	5,84903	-3,06041	0,00221	0,029342
572	XP_002012349	G114245 [Drosophila mojavensis]	7,12965	411,132	5,84963	-3,41452	0,000639	0,013437

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι- ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ RNA-seq

573	XP_001358764	GA12404 [Drosophila pseudoobscura pseudoobscura]	17,6793	1019,48	5,84963	-3,18558	0,001445	0,022006
574	ZP_09944608	SusC/RagA family TonB-linked outer membrane protein [Bacteroides sp. 1_1_6]	481,085	27774,8	5,85134	-3,51001	0,000448	0,011321
575	BAE96011	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [Bombyx mori]	30,8544	1782,19	5,85203	-3,27251	0,001066	0,018032
576	XP_001979401	GG15258 [Drosophila erecta]	24,926	1443,35	5,85563	-3,4178	0,000631	0,013342
577	XP_002054479	GJ24476 [Drosophila virilis]	105,537	6118,27	5,8573	-3,31449	0,000918	0,016416
578	XP_002068550	GK20532 [Drosophila willistoni]	4,60514	267,137	5,85819	-3,51338	0,000442	0,011233
579	XP_002056020	GJ10708 [Drosophila virilis]	4,1076	238,444	5,85921	-3,36237	0,000773	0,014955
580	XP_002017757	GL17347 [Drosophila persimilis]	12,3607	718,72	5,8616	-3,42105	0,000624	0,013234
581	XP_002005289	GI19162 [Drosophila mojavensis]	13,0215	757,142	5,8616	-3,42105	0,000624	0,013234
582	XP_002019841	GL11991 [Drosophila persimilis]	37,2463	2165,71	5,8616	-3,19192	0,001413	0,021668
583	XP_002004889	GI20165 [Drosophila mojavensis]	45,1101	2622,96	5,8616	-3,19192	0,001413	0,021668
584	XP_002014766	GL18773 [Drosophila persimilis]	4,44254	258,741	5,86398	-3,52478	0,000424	0,010979
585	XP_003736731	GA11508, isoform C [Drosophila pseudoobscura pseudoobscura]	114,318	6665,39	5,86557	-3,52371	0,000426	0,011006
586	XP_002022602	GL12881 [Drosophila persimilis]	229,493	13395,5	5,86715	-3,42247	0,000621	0,013199
587	ZP_06927572	chromosome segregation ATPase [Gardnerella vaginalis AMD]	18,2164	1063,58	5,86755	-3,42429	0,000616	0,013145
588	XP_002044593	GM17693 [Drosophila sechellia]	16,2128	950,494	5,87347	-3,42752	0,000609	0,013026
589	XP_002155689	PREDICTED: similar to predicted protein [Hydra magnipapillata]	10,9498	641,945	5,87347	-3,1982	0,001383	0,0213
590	XP_001980550	GG17215 [Drosophila erecta]	8,85351	519,898	5,87584	-3,53077	0,000414	0,01087
591	NP_001188569	CG32703, isoform C [Drosophila melanogaster]	7,91693	466,675	5,88134	-3,50313	0,00046	0,01148
592	XP_002033689	GM20292 [Drosophila sechellia]	18,5706	1097,65	5,88525	-3,53552	0,000407	0,010745
593	XP_002006026	GI20802 [Drosophila mojavensis]	9,23519	545,862	5,88525	-3,43392	0,000595	0,012884
594	XP_002049364	GJ1546 [Drosophila virilis]	2,93783	173,645	5,88525	-3,20442	0,001353	0,021021
595	XP_002071776	GK10168 [Drosophila willistoni]	7,24872	428,448	5,88525	-3,20442	0,001353	0,021021
596	XP_002022162	GL25481 [Drosophila persimilis]	13,0918	775,385	5,88818	-3,5185	0,000434	0,01112
597	XP_001658563	hypothetical protein AaeL_AAEL007654 [Aedes aegypti]	599,321	35519,9	5,88915	-3,5072	0,000453	0,011392
598	XP_002066979	GK24269 [Drosophila willistoni]	14,7333	874,647	5,89155	-3,17261	0,001511	0,02276
599	XP_002071077	GK25605 [Drosophila willistoni]	19,5113	1159,5	5,89305	-3,50967	0,000449	0,011321
600	XP_001959082	GF12238 [Drosophila ananassae]	20,404	1213,86	5,8946	-3,49833	0,000468	0,011544
601	XP_002069073	GK24050 [Drosophila willistoni]	406,646	24216	5,89605	-3,02208	0,00251	0,032063
602	Q71Q10	RecName: Full=Snake venom serine protease KN7 homolog	20,57	1225,71	5,89693	-3,2106	0,001325	0,020672
603	XP_002059439	GJ18733 [Drosophila virilis]	37,2463	2219,4	5,89693	-3,2106	0,001325	0,020672
604	XP_002067048	GK24232 [Drosophila willistoni]	4,40602	262,845	5,89859	-3,53317	0,000411	0,010806
605	NP_523940	tektin C, isoform A [Drosophila melanogaster]	5,27795	315,767	5,90274	-3,44341	0,000574	0,012666
606	XP_001988147	GH10725 [Drosophila grimshawi]	23,3476	1396,83	5,90274	-3,44341	0,000574	0,012666
607	XP_002087911	GE18281 [Drosophila yakuba]	7,39333	443,213	5,90563	-3,47816	0,000505	0,011937
608	XP_003493688	PREDICTED: fidgetin-like protein 1-like [Bombus impatiens]	1,87099	112,386	5,90852	-3,21672	0,001297	0,020428
609	XP_001996634	GH19681 [Drosophila grimshawi]	49,8639	2995,22	5,90852	-3,21672	0,001297	0,020428
610	XP_773530	hypothetical protein CNBI1440 [Cryptococcus neoformans var. neoformans B-3501A]	98,2423	5901,2	5,90852	-3,21672	0,001297	0,020428
611	XP_002160652	PREDICTED: similar to hAT family dimerisation domain containing protein, expressed [Hydra magnipapillata]	21,1264	1273,2	5,91326	-3,41937	0,000628	0,013282
612	XP_002053900	GJ24133 [Drosophila virilis]	196,485	11849,6	5,91428	-3,44965	0,000561	0,01257
613	XP_002046293	GJ12819 [Drosophila virilis]	72,9576	4401,88	5,91492	-3,5201	0,000431	0,011071
614	AEO36108	hypothetical protein [Amblyomma maculatum]	35,0214	2114,88	5,91619	-3,52123	0,00043	0,011054

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι- ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ RNA-seq

615	ADD18590	purine nucleoside phosphorylase [Glossina morsitans morsitans]	467,333	28237,3	5,91701	-3,14776	0,001645	0,024042
616	NP_001245441	CG17636, isoform B [Drosophila melanogaster]	14,3602	867,951	5,91747	-3,52132	0,000429	0,011054
617	XP_002068396	GK20442 [Drosophila willistoni]	3,5414	214,426	5,92002	-3,45275	0,000555	0,012485
618	XP_002138872	GA24159 [Drosophila pseudoobscura pseudoobscura]	137,453	8322,54	5,92002	-3,45275	0,000555	0,012485
619	ZP_03515388	succinate dehydrogenase flavoprotein subunit [Rhizobium etli IE4771]	4,83591	292,806	5,92002	-3,22281	0,001269	0,020153
620	ZP_09167683	Ferredoxin--NAD(+) reductase [Frankia sp. CN3]	6,51074	394,215	5,92002	-3,22281	0,001269	0,020153
621	XP_001984857	GH14806 [Drosophila grimshawi]	51,4227	3123,45	5,92459	-3,55531	0,000378	0,010296
622	NP_001097257	CG34222 [Drosophila melanogaster]	1039,32	63166,3	5,92544	-3,09795	0,001949	0,026838
623	XP_001963031	GF15738 [Drosophila ananassae]	7,51243	457,031	5,92687	-3,51356	0,000442	0,011233
624	XP_002082684	GD11715 [Drosophila simulans]	2,49757	152,724	5,93426	-3,54071	0,000399	0,010655
625	XP_001991207	GH12189 [Drosophila grimshawi]	270,826	16597,9	5,93749	-3,32436	0,000886	0,01613
626	XP_001967144	GF19302 [Drosophila ananassae]	23,4912	1444,93	5,94274	-3,55829	0,000373	0,010269
627	XP_002096722	GE24888 [Drosophila yakuba]	223,534	13749,4	5,94274	-3,465	0,00053	0,012188
628	XP_002033100	GM21131 [Drosophila sechellia]	2,0404	125,504	5,94274	-3,23484	0,001217	0,019606
629	XP_001354968	GA15557 [Drosophila pseudoobscura pseudoobscura]	7,12965	440,254	5,94836	-3,46803	0,000524	0,01217
630	XP_002134775	GA23665 [Drosophila pseudoobscura pseudoobscura]	10,9326	676,397	5,95116	-3,56259	0,000367	0,010192
631	XP_002000380	GI10195 [Drosophila mojavenis]	20,404	1262,88	5,95172	-3,52526	0,000423	0,010977
632	XP_002057016	GJ16579 [Drosophila virilis]	50,7936	3144,25	5,95193	-3,51256	0,000444	0,01125
633	XP_002019598	GL12482 [Drosophila persimilis]	35,2368	2184,33	5,95396	-3,56747	0,00036	0,010148
634	XP_002052033	GJ17328 [Drosophila virilis]	8,94653	554,595	5,95396	-3,56401	0,000365	0,010192
635	ADI94405	hypothetical protein [Lagopus lagopus scotica]	4,66928	289,448	5,95396	-3,54077	0,000399	0,010655
636	XP_002046295	GJ12586 [Drosophila virilis]	17,1751	1064,68	5,95396	-3,47104	0,000518	0,012085
637	XP_003537790	PREDICTED: uncharacterized protein LOC100792853 [Glycine max]	33,9822	2106,56	5,95396	-3,24078	0,001192	0,019409
638	XP_002092649	GE14309 [Drosophila yakuba]	14,8991	924,535	5,95543	-3,26527	0,001094	0,01833
639	XP_002064864	GK14978 [Drosophila willistoni]	57,0682	3565,08	5,9651	-3,56969	0,000357	0,01014
640	AAS55568	MST98CB [Drosophila simulans]	299,498	18725,3	5,9663	-3,41449	0,000639	0,013437
641	XP_002006646	GI21175 [Drosophila mojavenis]	11,43	716,1	5,96926	-3,45643	0,000547	0,012434
642	XP_002062701	GK19591 [Drosophila willistoni]	18,2164	1142,36	5,97064	-3,48	0,000501	0,011889
643	XP_001996730	GH23644 [Drosophila grimshawi]	3,40479	214,335	5,97616	-3,58114	0,000342	0,0099
644	XP_002062491	GK17569 [Drosophila willistoni]	1,86172	117,198	5,97616	-3,48295	0,000496	0,011827
645	XP_001987141	GH20138 [Drosophila grimshawi]	2,17004	136,606	5,97616	-3,48295	0,000496	0,011827
646	XP_003689859	PREDICTED: DC-STAMP domain-containing protein 1-like [Apis florea]	5,31887	334,829	5,97616	-3,25255	0,001144	0,018884
647	XP_001863551	receptor tyrosine phosphatase type r2a [Culex quinquefasciatus]	10,2845	647,423	5,97616	-3,25255	0,001144	0,018884
648	AAL16723	putative transposase [Ochlerotatus atropalpus]	147,896	9318,1	5,97738	-3,54976	0,000386	0,010464
649	XP_003693075	PREDICTED: L-lactate dehydrogenase-like [Apis florea]	7,23251	456,684	5,98056	-3,53878	0,000402	0,010701
650	XP_001963465	GF20415 [Drosophila ananassae]	3,58045	226,54	5,98348	-3,55599	0,000377	0,010287
651	XP_001958075	GF23697 [Drosophila ananassae]	14,8565	942,369	5,98713	-3,58089	0,000342	0,0099
652	XP_001955858	GF24898 [Drosophila ananassae]	8,49791	539,036	5,98713	-3,55787	0,000374	0,010269
653	XP_001974902	GG22031 [Drosophila erecta]	24,3192	1542,61	5,98713	-3,55787	0,000374	0,010269
654	XP_001989254	GH10154 [Drosophila grimshawi]	12,3607	784,058	5,98713	-3,48883	0,000485	0,011781
655	XP_002009296	GI11323 [Drosophila mojavenis]	4,04168	256,37	5,98713	-3,25837	0,001121	0,018612
656	XP_002258547	hypothetical protein, conserved in Plasmodium species [Plasmodium knowlesi strain H]	68,7264	4359,43	5,98713	-3,25837	0,001121	0,018612

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι- ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ RNA-seq

657	XP_003873157	putative vacuolar ATP synthase subunit [Leishmania mexicana MHOM/GT/2001/U1103]	21,8996	1399,65	5,99802	-3,49465	0,000475	0,011623
658	XP_002068090	GK12348 [Drosophila willistoni]	4,83591	309,073	5,99802	-3,26414	0,001098	0,01838
659	XP_002007982	GI13249 [Drosophila mojavensis]	3,90316	249,772	5,99982	-3,59	0,000331	0,00969
660	XP_002014987	GL18660 [Drosophila persimilis]	209,582	13413,2	5,99999	-3,53488	0,000408	0,010754
661	EHJ76362	hypothetical protein KGM_19114 [Danaus plexippus]	61,71	3953,91	6,00163	-3,56533	0,000363	0,01018
662	XP_001993985	GH22459 [Drosophila grimshawi]	6,21364	398,919	6,00451	-3,59527	0,000324	0,00965
663	XP_001954884	GF16519 [Drosophila ananassae]	9,0984	584,996	6,00667	-3,59635	0,000323	0,00965
664	XP_003706152	PREDICTED: uncharacterized protein LOC100881508 [Megachile rotundata]	18,2947	1176,58	6,00703	-3,59353	0,000326	0,009658
665	XP_001958375	GF10886 [Drosophila ananassae]	24,393	1569,27	6,00748	-3,57576	0,000349	0,009985
666	XP_001870697	conserved hypothetical protein [Culex quinquefasciatus]	12,125	780,763	6,00882	-3,56902	0,000358	0,01014
667	XP_001658247	dynein heavy chain [Aedes aegypti]	15,2995	985,179	6,00882	-3,26988	0,001076	0,018163
668	XP_002051921	GJ24494 [Drosophila virilis]	24,4848	1578,61	6,01062	-3,52661	0,000421	0,010972
669	XP_002077765	GD22904 [Drosophila simulans]	6,19871	400,216	6,01267	-3,50129	0,000463	0,011504
670	XP_001963952	GF21298 [Drosophila ananassae]	5,66528	366,164	6,0142	-3,50328	0,00046	0,01148
671	XP_002006522	GI21103 [Drosophila mojavensis]	39,974	2593,24	6,01955	-3,57453	0,000351	0,010015
672	XP_001985585	GH14425 [Drosophila grimshawi]	13,3247	864,414	6,01955	-3,27557	0,001054	0,017911
673	XP_001962083	GF14614 [Drosophila ananassae]	51,4227	3345,84	6,02382	-3,60487	0,000312	0,009436
674	XP_002073375	GK14096 [Drosophila willistoni]	50,3766	3282,61	6,02595	-3,34637	0,000819	0,015395
675	XP_002053504	GJ23924 [Drosophila virilis]	15,3982	1010,03	6,03549	-3,5891	0,000332	0,009706
676	AAW31960	alpha amylase [Drosophila melanogaster]	3,96239	260,861	6,04077	-3,5174	0,000436	0,011132
677	XP_002060869	GK21220 [Drosophila willistoni]	9,23519	607,993	6,04077	-3,5174	0,000436	0,011132
678	AAW23309	gamma dynein heavy chain [Drosophila guanche]	9,67236	636,773	6,04077	-3,28684	0,001013	0,017406
679	YP_006865044	TetR-type transcriptional regulator [Bifidobacterium asteroides PRL2011]	55,2962	3640,38	6,04077	-3,28684	0,001013	0,017406
680	XP_001361793	GA13025 [Drosophila pseudoobscura pseudoobscura]	30,9017	2037,36	6,04287	-3,61433	0,000301	0,009251
681	XP_001998919	GI23362 [Drosophila mojavensis]	8,49766	560,254	6,04287	-3,56785	0,00036	0,010148
682	XP_001377527	PREDICTED: tripartite motif-containing protein 65-like [Monodelphis domestica]	22,1871	1463,04	6,04311	-3,58073	0,000343	0,0099
683	ADD19731	fructose-biphosphate aldolase [Glossina morsitans morsitans]	5,1424	340,029	6,04707	-3,61641	0,000299	0,009212
684	XP_002065994	GK21154 [Drosophila willistoni]	221,802	14669,5	6,0474	-3,45627	0,000548	0,012434
685	XP_002013262	GL24039 [Drosophila persimilis]	12,1965	807,344	6,04864	-3,61203	0,000304	0,009298
686	YP_001918182	ATPase AAA [Natranaerobius thermophilus JW/NM-WN-LF]	41,14	2728,2	6,05126	-3,52297	0,000427	0,01102
687	XP_317894	AGAP011414-PA [Anopheles gambiae str. PEST]	1,21765	80,748	6,05126	-3,29241	0,000993	0,017249
688	XP_002018248	GL16864 [Drosophila persimilis]	32,8494	2183,67	6,05474	-3,59256	0,000327	0,009658
689	XP_001973668	GG16215 [Drosophila erecta]	6,09825	405,87	6,05648	-3,52573	0,000422	0,010977
690	XP_001995287	GH22716 [Drosophila grimshawi]	2,98147	198,671	6,05821	-3,59433	0,000325	0,00965
691	ADJ12406	GA12872 [Drosophila miranda]	11,3306	755,468	6,05908	-3,61729	0,000298	0,009212
692	ADD19061	pyruvate dehydrogenase E1 alpha subunit [Glossina morsitans morsitans]	10,2845	686,961	6,06168	-3,29795	0,000974	0,017033
693	ZP_07807536	ATPase [Bacteroides fragilis 3_1_12]	78,5551	5259,7	6,06513	-3,59787	0,000321	0,009623
694	XP_002050072	GJ20394 [Drosophila virilis]	11,7513	789,169	6,06944	-3,62251	0,000292	0,009132
695	XP_002054368	GJ24407 [Drosophila virilis]	5,1424	345,466	6,06996	-3,62773	0,000286	0,009021
696	XP_001986786	GH20338 [Drosophila grimshawi]	8,1064	545,366	6,07202	-3,30344	0,000955	0,016756
697	XP_002060060	GJ15520 [Drosophila virilis]	13,3247	896,43	6,07202	-3,30344	0,000955	0,016756
698	XP_002022645	GL14648 [Drosophila persimilis]	40,9323	2753,76	6,07202	-3,30344	0,000955	0,016756
699	XP_001989002	GH10275 [Drosophila grimshawi]	12,125	821,549	6,08229	-3,60663	0,00031	0,009407
700	XP_002064752	GK15038 [Drosophila willistoni]	7,24872	491,147	6,08229	-3,3089	0,000937	0,016556

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι- ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ RNA-seq

701	AFD30556	endophilin B, partial [Chymomyza procnemis]	16,4329	1113,43	6,08229	-3,3089	0,000937	0,016556
702	EIE84915	hypothetical protein RO3G_09625 [Rhizopus delemar RA 99-880]	20,57	1393,75	6,08229	-3,3089	0,000937	0,016556
703	XP_002091732	GE12087 [Drosophila yakuba]	4,83651	327,884	6,08307	-3,5463	0,000391	0,010499
704	XP_001993559	GH13001 [Drosophila grimshawi]	11,047	749,32	6,08386	-3,54665	0,00039	0,010499
705	XP_001352776	GA20221 [Drosophila pseudoobscura pseudoobscura]	34,3305	2329,41	6,08433	-3,63483	0,000278	0,008875
706	XP_003736241	GA15947, isoform C [Drosophila pseudoobscura pseudoobscura]	16,1792	1098,94	6,08582	-3,15082	0,001628	0,023879
707	XP_002061991	GK16887 [Drosophila willistoni]	3,31559	225,715	6,08909	-3,6101	0,000306	0,009333
708	XP_002091080	GE13456 [Drosophila yakuba]	9,10819	621,516	6,09248	-3,31432	0,000919	0,016416
709	NP_650077	CG17230, isoform A [Drosophila melanogaster]	9,45748	645,634	6,09312	-3,51171	0,000445	0,011269
710	XP_001960443	GF11508 [Drosophila ananassae]	13,24	905,367	6,09553	-3,59226	0,000328	0,009658
711	XP_001357952	GA19516, isoform A [Drosophila pseudoobscura pseudoobscura]	39,7183	2716,62	6,09587	-3,60543	0,000312	0,009433
712	XP_002031308	GM24116 [Drosophila sechellia]	19,3447	1324,67	6,09755	-3,54742	0,000389	0,010499
713	XP_002059072	GJ15189 [Drosophila virilis]	42,8012	2934,34	6,09924	-3,61527	0,0003	0,009234
714	XP_002010577	GI16005 [Drosophila mojavensis]	28,4966	1958,21	6,10261	-3,3197	0,000901	0,016384
715	XP_002003678	GI18045 [Drosophila mojavensis]	4,26211	293,906	6,10764	-3,64171	0,000271	0,008725
716	XP_002631067	C. briggsae CBR-TRR-1 protein [Caenorhabditis briggsae]	8,94653	618,008	6,11015	-3,64297	0,00027	0,008725
717	YP_003795360	NADH dehydrogenase subunit 2 [Oratosquilla oratoria]	64,6007	4464,6	6,11084	-3,58588	0,000336	0,009777
718	XP_001663204	cytochrome c oxidase subunit iv [Aedes aegypti]	23,5026	1626,34	6,11266	-3,6256	0,000288	0,009041
719	XP_001358375	GA15982 [Drosophila pseudoobscura pseudoobscura]	5,31887	368,056	6,11266	-3,32505	0,000884	0,016109
720	XP_002471893	predicted protein [Postia placenta Mad-698-R]	7,66119	530,14	6,11266	-3,32505	0,000884	0,016109
721	XP_002065313	GK15382 [Drosophila willistoni]	10,1255	702,404	6,11623	-3,54788	0,000388	0,010499
722	XP_001991243	GH12552 [Drosophila grimshawi]	6,3439	440,206	6,11666	-3,65075	0,000261	0,008571
723	XP_002034621	GM19817 [Drosophila sechellia]	23,088	1602,08	6,11666	-3,65075	0,000261	0,008571
724	XP_001359519	GA16215 [Drosophila pseudoobscura pseudoobscura]	3,27294	227,268	6,11766	-3,55799	0,000374	0,010269
725	XP_002058720	GJ14154 [Drosophila virilis]	70,4735	4918,97	6,12513	-3,57881	0,000345	0,009921
726	XP_002069995	GK11815 [Drosophila willistoni]	13,1413	918,095	6,12647	-3,56585	0,000363	0,010179
727	NP_001012513	zinc finger protein 510-like [Danio rerio]	51,1411	3576,9	6,12808	-3,31367	0,000921	0,016416
728	XP_001957089	GF24236 [Drosophila ananassae]	22,0657	1545,99	6,13058	-3,65759	0,000255	0,008501
729	XP_002068439	GK20472 [Drosophila willistoni]	26,043	1827,15	6,13256	-3,65419	0,000258	0,008541
730	AAW29330	CG17629 [Drosophila mauritiana]	8,82628	619,245	6,13256	-3,5658	0,000363	0,010179
731	XP_001981307	GG12000 [Drosophila erecta]	6,51074	456,788	6,13256	-3,33563	0,000851	0,015751
732	XP_001957746	GF10567 [Drosophila ananassae]	11,6738	819,025	6,13256	-3,33563	0,000851	0,015751
733	XP_002047048	GJ12141 [Drosophila virilis]	130,759	9206,3	6,13764	-3,21563	0,001302	0,020487
734	XP_001656965	rho gtpase activating protein [Aedes aegypti]	8,1064	572,634	6,14241	-3,34087	0,000835	0,015579
735	XP_002041520	GM16710 [Drosophila sechellia]	31,0819	2195,62	6,14241	-3,34087	0,000835	0,015579
736	XP_001965342	GF20681 [Drosophila ananassae]	7,32788	519,205	6,14676	-3,62911	0,000284	0,009004
737	XP_002027141	GL20086 [Drosophila persimilis]	23,0191	1633,72	6,14919	-3,57606	0,000349	0,009985
738	XP_002064336	GK20112 [Drosophila willistoni]	268,498	19062	6,14964	-3,45887	0,000542	0,012366
739	XP_001355207	GA10651 [Drosophila pseudoobscura pseudoobscura]	5,3121	377,798	6,15219	-3,64219	0,00027	0,008725
740	XP_001958509	GF10957 [Drosophila ananassae]	5,535	394,316	6,15462	-3,66521	0,000247	0,008333
741	XP_002069984	GK11277 [Drosophila willistoni]	87,0513	6205,05	6,15543	-3,63314	0,00028	0,008916
742	CBE66577	CG10252-PA [Drosophila ananassae]	579,456	41323,7	6,15613	-3,15603	0,001599	0,023584
743	XP_002008463	GI16947 [Drosophila mojavensis]	6,84953	490,066	6,16083	-3,63563	0,000277	0,008864
744	ACC62142	kl-2 1-beta dynein heavy chain [Drosophila ananassae]	16,4329	1176,61	6,1619	-3,35123	0,000805	0,01525

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι- ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ RNA-seq

745	CCA26036	conserved hypothetical protein [Albugo laibachii Nc14]	16,4329	1176,61	6,1619	-3,35123	0,000805	0,01525
746	XP_002046562	GJ12416 [Drosophila virilis]	8,91036	640,647	6,1679	-3,41338	0,000642	0,013474
747	XP_002073094	GK13946 [Drosophila willistoni]	6,18793	445,494	6,1698	-3,61275	0,000303	0,00929
748	XP_001957352	GF10377 [Drosophila ananassae]	86,8079	6257,23	6,17155	-3,35637	0,00079	0,015082
749	XP_002065203	GK15324 [Drosophila willistoni]	14,3102	1032,65	6,17316	-3,67411	0,000239	0,008162
750	XP_002014433	GL18955 [Drosophila persimilis]	6,3823	460,812	6,17396	-3,67484	0,000238	0,008162
751	XP_002025929	GL10138 [Drosophila persimilis]	3,88756	281,466	6,17795	-3,65525	0,000257	0,008541
752	XP_001356030	GA10053 [Drosophila pseudoobscura pseudoobscura]	24,1125	1749,65	6,18114	-3,36146	0,000775	0,014969
753	XP_002733481	PREDICTED: hypothetical protein [Saccoglossus kowalevskii]	115,03	8370,49	6,18523	-3,67099	0,000242	0,008216
754	XP_002072975	GK13400 [Drosophila willistoni]	26,185	1912,62	6,19066	-3,36653	0,000761	0,014797
755	XP_002063086	GK21735 [Drosophila willistoni]	3,30292	242,047	6,1954	-3,6855	0,000228	0,008009
756	XP_003848216	hypothetical protein MYCGRDRAFT_106278, partial [Zymoseptoria tritici IPO323]	914,542	67047,6	6,19599	-3,31057	0,000931	0,016552
757	YP_003120699	chromate transporter [Chitinophaga pinensis DSM 2588]	45,6232	3354,35	6,20012	-3,6538	0,000258	0,008541
758	ACE79734	coiled-coil Y protein [Drosophila ananassae]	8,37165	615,509	6,20012	-3,6265	0,000287	0,009027
759	XP_001357172	GA12680 [Drosophila pseudoobscura pseudoobscura]	12,463	916,318	6,20012	-3,37156	0,000747	0,014636
760	ZP_10750906	polyribonucleotide nucleotidyltransferase [Caulobacter sp. AP07]	14,2671	1055,81	6,20952	-3,37656	0,000734	0,014458
761	XP_001358904	GA14724 [Drosophila pseudoobscura pseudoobscura]	4,93046	366,056	6,2142	-3,60832	0,000308	0,009363
762	XP_001958512	GF10959 [Drosophila ananassae]	5,46629	405,838	6,2142	-3,60832	0,000308	0,009363
763	NP_608810	CG3964, isoform A [Drosophila melanogaster]	14,6891	1094,11	6,21886	-3,7007	0,000215	0,007844
764	XP_001962365	GF14476 [Drosophila ananassae]	9,50091	707,667	6,21886	-3,67593	0,000237	0,008162
765	XP_001359639	GA19994 [Drosophila pseudoobscura pseudoobscura]	16,4329	1223,99	6,21886	-3,38152	0,000721	0,014285
766	XP_309320	AGAP011329-PA [Anopheles gambiae str. PEST]	2,92939	218,545	6,22119	-3,69829	0,000217	0,007867
767	XP_002070675	GK10904 [Drosophila willistoni]	10,8953	815,784	6,2264	-3,57036	0,000356	0,01014
768	XP_002003569	GI17988 [Drosophila mojavensis]	1,67922	125,882	6,22814	-3,38646	0,000708	0,014149
769	XP_002071759	GK10154 [Drosophila willistoni]	4,65431	349,803	6,23183	-3,707	0,00021	0,007784
770	XP_002010296	GI14764 [Drosophila mojavensis]	16,7586	1261,67	6,23429	-3,68372	0,00023	0,008042
771	XP_002004090	GI18260 [Drosophila mojavensis]	28,9949	2187,52	6,23736	-3,70629	0,00021	0,007784
772	XP_002087747	GE18188 [Drosophila yakuba]	83,8497	6326,05	6,23736	-3,5387	0,000402	0,010701
773	AAO39649	AT13908p, partial [Drosophila melanogaster]	6,86609	518,013	6,23736	-3,39136	0,000695	0,013978
774	EGU81730	hypothetical protein FOXB_07737 [Fusarium oxysporum Fo5176]	270,661	20441,7	6,23889	-3,70558	0,000211	0,007784
775	NP_609068	tubulin tyrosine ligase-like 3B [Drosophila melanogaster]	39,6386	2996,4	6,24018	-3,61667	0,000298	0,009212
776	XP_002062436	GK17535 [Drosophila willistoni]	2,98147	225,415	6,24042	-3,68681	0,000227	0,008009
777	XP_001993209	GHI3688 [Drosophila grimshawi]	22,9836	1745,04	6,24652	-3,68988	0,000224	0,008009
778	XP_001600747	PREDICTED: UDP-GlcNAc:betaGal beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase-like protein 1-like [Nasonia vitripennis]	3,29185	249,936	6,24652	-3,39623	0,000683	0,013821
779	XP_002048299	GJ11424 [Drosophila virilis]	3,71411	281,997	6,24652	-3,39623	0,000683	0,013821
780	XP_002029754	GM25075 [Drosophila sechellia]	406,624	30890,2	6,24731	-3,50017	0,000465	0,011504
781	XP_002073945	GK12876 [Drosophila willistoni]	53,1052	4039,82	6,24929	-3,50101	0,000464	0,011504
782	XP_001957154	GF10279 [Drosophila ananassae]	35,3586	2693,12	6,25107	-3,62738	0,000286	0,009021
783	XP_002053216	GJ23766 [Drosophila virilis]	41,7438	3182,45	6,25243	-3,29281	0,000992	0,017249
784	XP_002088763	GE11117 [Drosophila yakuba]	8,16161	622,618	6,25335	-3,71419	0,000204	0,007674
785	XP_002001085	GI22166 [Drosophila mojavensis]	2,63898	201,634	6,25562	-3,40106	0,000671	0,01373

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι- ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ RNA-seq

786	XP_002089326	GE24787 [Drosophila yakuba]	992,422	75935,6	6,25768	-3,51468	0,00044	0,011212
787	XP_002004528	GI19563 [Drosophila mojavensis]	1,95158	149,426	6,25864	-3,69599	0,000219	0,007921
788	NP_501626	Protein F49C12.4 [Caenorhabditis elegans]	11,7456	900,258	6,26015	-3,63206	0,000281	0,008919
789	XP_002007766	G112205 [Drosophila mojavensis]	13,7322	1052,52	6,26015	-3,63206	0,000281	0,008919
790	DAA34561	TPA_exp: fructose 1,6-bisphosphate aldolase [Amblyomma variegatum]	2,9667	227,744	6,26241	-3,71866	0,0002	0,007646
791	XP_002094684	GE21961 [Drosophila yakuba]	4,22149	324,577	6,26466	-3,40587	0,00066	0,01362
792	XP_002052700	GJ20295 [Drosophila virilis]	9,86092	759,359	6,26692	-3,72088	0,000199	0,007624
793	XP_002000460	GI22514 [Drosophila mojavensis]	3,14726	243,495	6,27365	-3,68756	0,000226	0,008009
794	XP_002012193	GI16836 [Drosophila mojavensis]	16,2128	1254,34	6,27365	-3,639	0,000274	0,0088
795	XP_002039537	GM23028 [Drosophila sechellia]	5,31887	411,507	6,27365	-3,41065	0,000648	0,01348
796	XP_002057652	GJ18249 [Drosophila virilis]	13,2394	1026,42	6,27664	-3,70505	0,000211	0,007784
797	XP_002067088	GK24808 [Drosophila willistoni]	11,6738	908,782	6,28259	-3,41539	0,000637	0,013437
798	XP_001352713	GA10385 [Drosophila pseudoobscura pseudoobscura]	2,44263	190,545	6,28555	-3,70953	0,000208	0,007781
799	EFR23705	hypothetical protein AND_12412 [Anopheles darlingi]	11,9252	931,789	6,28792	-3,73413	0,000188	0,007468
800	XP_002011512	GI11058 [Drosophila mojavensis]	29,364	2300,03	6,29146	-3,73584	0,000187	0,007452
801	XP_002049897	GJ20495 [Drosophila virilis]	10,3668	812,017	6,29146	-3,70895	0,000208	0,007781
802	NP_001003746	acetyl-CoA acetyltransferase, mitochondrial precursor [Danio rerio]	13,3247	1043,7	6,29146	-3,42011	0,000626	0,013263
803	XP_002011785	GI10894 [Drosophila mojavensis]	61,1982	4800,91	6,29367	-3,73405	0,000188	0,007468
804	XP_002089443	GE19115 [Drosophila yakuba]	5,41321	425,309	6,29588	-3,73267	0,000189	0,007473
805	XP_002050362	GJ22114 [Drosophila virilis]	27,524	2167,71	6,29934	-3,28015	0,001038	0,017732
806	XP_002023141	GL21116 [Drosophila persimilis]	16,2128	1277,71	6,30029	-3,65267	0,00026	0,008561
807	XP_002094534	GE21877 [Drosophila yakuba]	102,845	8134,8	6,30556	-3,68816	0,000226	0,008009
808	XP_002076275	GD15384 [Drosophila simulans]	1,08502	86,0305	6,30906	-3,42945	0,000605	0,013015
809	XP_002063910	GK15925 [Drosophila willistoni]	4,31153	343,102	6,31429	-3,74683	0,000179	0,007313
810	XP_002014014	GL24452 [Drosophila persimilis]	65,7315	5235,51	6,3156	-3,74481	0,000181	0,007313
811	XP_001986187	GH21220 [Drosophila grimshawi]	1,67922	133,951	6,31778	-3,43408	0,000595	0,012884
812	XP_001962090	GF15293 [Drosophila ananassae]	10,9498	873,466	6,31778	-3,43408	0,000595	0,012884
813	XP_001957936	GF10659 [Drosophila ananassae]	2,11716	169,225	6,32067	-3,72716	0,000194	0,007543
814	XP_002050417	GJ22140 [Drosophila virilis]	13,2624	1061,66	6,32284	-3,66737	0,000245	0,008287
815	AAAY55190	IP13950p [Drosophila melanogaster]	10,2983	829,615	6,33197	-3,41088	0,000648	0,01348
816	NP_723738	arrest, isoform C [Drosophila melanogaster]	9,55447	769,909	6,33237	-3,61637	0,000299	0,009212
817	XP_002065031	GK15243 [Drosophila willistoni]	48,225	3893,26	6,33505	-3,67044	0,000242	0,008217
818	XP_002046799	GJ12288 [Drosophila virilis]	2,10258	169,744	6,33505	-3,44324	0,000575	0,012666
819	NP_001246661	pebble, isoform F [Drosophila melanogaster]	3,56482	287,792	6,33505	-3,44324	0,000575	0,012666
820	XP_002019200	GL26232 [Drosophila persimilis]	6,86609	554,307	6,33505	-3,44324	0,000575	0,012666
821	XP_002039149	GM17374 [Drosophila sechellia]	11,6738	942,44	6,33505	-3,44324	0,000575	0,012666
822	XP_002011110	GI16362 [Drosophila mojavensis]	130,215	10515,5	6,33548	-3,56908	0,000358	0,01014
823	XP_002066330	GK18155 [Drosophila willistoni]	30,4155	2460,35	6,33791	-3,75253	0,000175	0,007266
824	XP_002031855	GM23827 [Drosophila sechellia]	8,81348	712,934	6,33791	-3,73579	0,000187	0,007452
825	AFD54028	GAPDH [Locusta migratoria]	5,31717	431,561	6,34276	-3,70491	0,000211	0,007784
826	XP_002065077	GK15266 [Drosophila willistoni]	8,82628	716,797	6,34362	-3,6748	0,000238	0,008162
827	XP_002098534	GE10426 [Drosophila yakuba]	6,18034	501,916	6,34362	-3,44778	0,000565	0,012572
828	XP_001953899	GF17999 [Drosophila ananassae]	15,2995	1242,5	6,34362	-3,44778	0,000565	0,012572
829	AAM29377	LP02990p [Drosophila melanogaster]	10,5559	858,531	6,34575	-3,75956	0,00017	0,007122
830	AAAY54684	IP11422p [Drosophila melanogaster]	88,9971	7238,3	6,34575	-3,75956	0,00017	0,007122
831	XP_002052646	GJ20536 [Drosophila virilis]	8,08335	658,405	6,34788	-3,67698	0,000236	0,008162
832	XP_002016703	GL11722 [Drosophila persimilis]	52,0558	4251,74	6,35185	-3,47255	0,000516	0,012034
833	XP_001964427	GF23170 [Drosophila ananassae]	16,9958	1397,96	6,36199	-3,76386	0,000167	0,007054
834	XP_001990807	GH18056 [Drosophila grimshawi]	5,45904	449,459	6,3634	-3,74852	0,000178	0,007313
835	XP_002009274	GI11337 [Drosophila mojavensis]	35,0214	2883,42	6,3634	-3,74852	0,000178	0,007313

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι- ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ RNA-seq

836	XP_002074241	GK18410 [Drosophila willistoni]	4,7692	393,044	6,3648	-3,68592	0,000228	0,008009
837	XP_002066948	GK24283 [Drosophila willistoni]	9,7736	806,112	6,36595	-3,70086	0,000215	0,007844
838	XP_002003426	GI22585 [Drosophila mojavensis]	76,4977	6315,44	6,36732	-3,77224	0,000162	0,006991
839	XP_002053966	GJ23052 [Drosophila virilis]	3,03785	251,089	6,369	-3,68772	0,000226	0,008009
840	XP_002096321	GE25127 [Drosophila yakuba]	44,4986	3677,95	6,369	-3,68772	0,000226	0,008009
841	XP_002024591	GL22542 [Drosophila persimilis]	0,993824	82,1428	6,369	-3,46124	0,000538	0,012308
842	XP_002082213	GD25329 [Drosophila simulans]	16,4329	1358,23	6,369	-3,46124	0,000538	0,012308
843	ABE68625	beta-tubulin [Teleopsis thaii]	1,38375	115,037	6,37736	-3,46567	0,000529	0,012175
844	EJD37827	hypothetical protein AURDEDRAFT_129225 [Auricularia delicata TFB-10046 SS5]	28,4966	2369,03	6,37736	-3,46567	0,000529	0,012175
845	XP_002004903	GI19344 [Drosophila mojavensis]	50,3466	4189,23	6,37865	-3,6777	0,000235	0,008162
846	NP_195291	uncharacterized protein [Arabidopsis thaliana]	24,926	2078,19	6,38153	-3,69408	0,000221	0,007946
847	XP_002075207	GK16729 [Drosophila willistoni]	32,8657	2740,15	6,38153	-3,69408	0,000221	0,007946
848	XP_003488195	PREDICTED: hypothetical protein LOC100744967 [Bombus impatiens]	4,37608	365,903	6,38568	-3,781	0,000156	0,006951
849	XP_002136215	GA26136 [Drosophila pseudoobscura pseudoobscura]	14,2671	1192,93	6,38568	-3,47007	0,00052	0,012112
850	XP_001980910	GG17421 [Drosophila erecta]	5,296	444,731	6,39188	-3,78204	0,000156	0,006951
851	XP_002132205	GA25333 [Drosophila pseudoobscura pseudoobscura]	5,87279	493,872	6,39395	-3,47445	0,000512	0,012
852	XP_002001753	GI15288 [Drosophila mojavensis]	28,4966	2396,42	6,39395	-3,47445	0,000512	0,012
853	XP_002003425	GI22596 [Drosophila mojavensis]	77,4564	6532,3	6,39806	-3,59538	0,000324	0,00965
854	YP_002823647	LysR family transcriptional regulator [Sinorhizobium fredii NGR234]	294,727	24879,5	6,39943	-3,76645	0,000166	0,007018
855	XP_002021525	GL26467 [Drosophila persimilis]	93,2727	7875,78	6,39982	-3,77123	0,000162	0,006991
856	AAL90134	AT22192p [Drosophila melanogaster]	6,12863	517,677	6,40034	-3,74506	0,00018	0,007313
857	XP_001650658	Na/Ca exchanger [Aedes aegypti]	4,66928	394,906	6,40217	-3,76781	0,000165	0,007018
858	XP_002030870	GM24347 [Drosophila sechellia]	170,84	14448,9	6,40217	-3,4788	0,000504	0,011926
859	XP_001660494	dimeric dihydrodiol dehydrogenase [Aedes aegypti]	13,9135	1179,61	6,40568	-3,67532	0,000238	0,008162
860	XP_001959939	GF13119 [Drosophila ananassae]	232,088	19685,5	6,40631	-3,27474	0,001058	0,017927
861	ZP_00374029	pol protein [Wolbachia endosymbiont of Drosophila ananassae]	19,0529	1620,57	6,41034	-3,48313	0,000496	0,011827
862	XP_002020943	GL16505 [Drosophila persimilis]	22,2493	1892,43	6,41034	-3,48313	0,000496	0,011827
863	XP_001973563	GG13268 [Drosophila erecta]	5,77433	492,991	6,41577	-3,77456	0,00016	0,006953
864	XP_002008003	GI13265 [Drosophila mojavensis]	41,5584	3548,1	6,41577	-3,752	0,000175	0,007266
865	XP_002059827	GJ15062 [Drosophila virilis]	10,2845	879,705	6,41847	-3,48742	0,000488	0,011781
866	ADJ12661	GA15328 [Drosophila affinis]	33,9822	2906,72	6,41847	-3,48742	0,000488	0,011781
867	XP_002076151	GD11964 [Drosophila simulans]	61,7073	5288,11	6,42117	-3,79159	0,00015	0,006903
868	XP_001608962	hypothetical protein [Babesia bovis T2Bo]	74,4926	6389,74	6,42252	-3,71482	0,000203	0,007674
869	XP_002098410	GE23968 [Drosophila yakuba]	91,7973	7888,78	6,42521	-3,79347	0,000149	0,006903
870	XP_002048006	GJ11593 [Drosophila virilis]	35,0214	3012,44	6,42655	-3,77991	0,000157	0,006951
871	XP_001994101	GH17462 [Drosophila grimshawi]	18,2164	1566,92	6,42655	-3,71685	0,000202	0,007646
872	XP_002076572	GD15132 [Drosophila simulans]	3,16697	272,414	6,42655	-3,4917	0,00048	0,011682
873	XP_001353218	GA10418 [Drosophila pseudoobscura pseudoobscura]	9,54788	822,428	6,42857	-3,7717	0,000162	0,006991
874	XP_002133394	GA22840 [Drosophila pseudoobscura pseudoobscura]	11,1846	967,438	6,43459	-3,76046	0,00017	0,007122
875	XP_002051789	GJ17183 [Drosophila virilis]	8,08335	699,191	6,43459	-3,72091	0,000199	0,007624
876	ADD19203	retrotransposon protein [Glossina morsitans morsitans]	9,67236	836,636	6,43459	-3,49594	0,000472	0,011583
877	XP_002136579	GA22209 [Drosophila pseudoobscura pseudoobscura]	4,54422	394,156	6,43859	-3,77625	0,000159	0,006953
878	XP_002074419	GK10591 [Drosophila willistoni]	79,1743	6869,69	6,43907	-3,55985	0,000371	0,010269
879	XP_002117373	hypothetical protein TRIADDRAFT_61380 [Trichoplax adhaerens]	6,51074	566,292	6,44258	-3,50016	0,000465	0,011504

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι- ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ RNA-seq

880	XP_001956334	GF24648 [Drosophila ananassae]	10,2845	894,531	6,44258	-3,50016	0,000465	0,011504
881	XP_001994655	GH17359 [Drosophila grimshawi]	10,9498	952,394	6,44258	-3,50016	0,000465	0,011504
882	XP_002097686	GE24345 [Drosophila yakuba]	41,772	3641,85	6,44599	-3,48081	0,0005	0,01187
883	XP_002731001	PREDICTED: ATPase, H+ transporting, lysosomal, V1 subunit G2-like [Saccoglossus kowalevskii]	11,419	996,864	6,44789	-3,76642	0,000166	0,007018
884	XP_002093936	GE21566 [Drosophila yakuba]	4,88088	426,205	6,44826	-3,79352	0,000149	0,006903
885	XP_002074220	GK14527 [Drosophila willistoni]	8,22784	718,608	6,44855	-3,78076	0,000156	0,006951
886	NP_611635	CG2921 [Drosophila melanogaster]	10,202	893,236	6,45211	-3,81256	0,000138	0,00667
887	XP_002072039	GK22632 [Drosophila willistoni]	63,8265	5607,74	6,45712	-3,72644	0,000194	0,007543
888	XP_002133449	GA22900 [Drosophila pseudoobscura pseudoobscura]	206,179	18131,3	6,45844	-3,79567	0,000147	0,006903
889	XP_003418168	PREDICTED: tigger transposable element-derived protein 1-like [Loxodonta africana]	5,87566	516,701	6,45844	-3,73291	0,000189	0,007473
890	XP_001961159	GF11139 [Drosophila ananassae]	15,2995	1345,43	6,45844	-3,50853	0,000451	0,011352
891	XP_002077315	GD20583 [Drosophila simulans]	3,80235	335,974	6,46532	-3,78835	0,000152	0,006936
892	XP_001953706	GF17094 [Drosophila ananassae]	7,92477	700,707	6,4663	-3,81805	0,000135	0,006657
893	XP_003876122	conserved hypothetical protein [Leishmania mexicana MHOM/GT/2001/U1103]	7,91693	700,013	6,4663	-3,79955	0,000145	0,006884
894	XP_002061294	GK20841 [Drosophila willistoni]	41,0913	3638,22	6,46826	-3,7313	0,00019	0,007496
895	XP_002134694	GA24316 [Drosophila pseudoobscura pseudoobscura]	70,7172	6286,79	6,47412	-3,82181	0,000132	0,006657
896	XP_001962148	GF15320 [Drosophila ananassae]	4,45725	396,251	6,47412	-3,79233	0,000149	0,006903
897	XP_001984872	GH14800 [Drosophila grimshawi]	28,5027	2533,9	6,47412	-3,77816	0,000158	0,006953
898	NP_723977	CG31816 [Drosophila melanogaster]	57,0682	5080,24	6,47607	-3,82275	0,000132	0,006657
899	XP_001847813	dihydropyrimidine dehydrogenase [Culex quinquefasciatus]	2,13105	189,963	6,47801	-3,74274	0,000182	0,00732
900	XP_001993571	GH20406 [Drosophila grimshawi]	10,6377	948,255	6,47801	-3,74274	0,000182	0,00732
901	XP_001989925	GH18526 [Drosophila grimshawi]	10,6945	954,168	6,47931	-3,80596	0,000141	0,006786
902	XP_002053811	GJ23139 [Drosophila virilis]	15,2995	1367,49	6,48189	-3,5209	0,00043	0,011054
903	XP_002081368	GD10979 [Drosophila simulans]	256,126	22908,9	6,48291	-3,28796	0,001009	0,017392
904	XP_002062047	GK16865 [Drosophila willistoni]	10,3298	926,041	6,4862	-3,78356	0,000155	0,006951
905	XP_003425981	PREDICTED: transketolase-like isoform 2 [Nasonia vitripennis]	3,14715	282,203	6,48654	-3,82881	0,000129	0,006657
906	XP_001993449	GH13815 [Drosophila grimshawi]	81,9737	7370,65	6,49049	-3,78547	0,000153	0,006951
907	XP_002017131	GL21687 [Drosophila persimilis]	2,79259	251,393	6,4922	-3,81231	0,000138	0,00667
908	XP_002086457	GE23141 [Drosophila yakuba]	30,5991	2757,03	6,49348	-3,7505	0,000176	0,007292
909	XP_002015057	GL18622 [Drosophila persimilis]	15,6889	1414,19	6,49409	-3,64718	0,000265	0,008609
910	XP_002002696	GI17526 [Drosophila mojavenis]	76,4977	6896,25	6,49425	-3,83244	0,000127	0,006619
911	YP_813318	hypothetical protein LBUL_1364 [Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus ATCC BAA-365]	102,85	9291,68	6,49732	-3,83389	0,000126	0,006619
912	XP_001957480	GF24009 [Drosophila ananassae]	6,86609	620,296	6,49732	-3,52903	0,000417	0,010901
913	XP_001353289	GA19963 [Drosophila pseudoobscura pseudoobscura]	8,58754	775,815	6,49732	-3,52903	0,000417	0,010901
914	XP_002098862	GE10606 [Drosophila yakuba]	9,83324	890,344	6,50055	-3,64987	0,000262	0,008571
915	XP_001962984	GF15713 [Drosophila ananassae]	3,74198	339,856	6,50498	-3,75625	0,000172	0,00718
916	XP_002059183	GJ16252 [Drosophila virilis]	8,08335	734,15	6,50498	-3,75625	0,000172	0,00718
917	ZP_10104809	hypothetical protein Thini_3491 [Thiothrix nivea DSM 5205]	61,5321	5618,07	6,51259	-3,53706	0,000405	0,01073
918	NP_001185710	cytochrome c oxidase subunit VIIa polypeptide 2 (liver) [Taeniopygia guttata]	106,597	9751,88	6,51544	-3,81094	0,000138	0,00667
919	XP_002067073	GK24805 [Drosophila willistoni]	27,931	2555,56	6,51563	-3,84249	0,000122	0,006567
920	ZP_07091237	DNA polymerase III subunit epsilon [Corynebacterium genitalium ATCC 33030]	11,7513	1075,75	6,51638	-3,84211	0,000122	0,006567

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι- ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ RNA-seq

921	XP_002024733	GL22457 [Drosophila persimilis]	3,65294	334,695	6,51764	-3,82481	0,000131	0,006657
922	XP_001954448	GF16726 [Drosophila ananassae]	5,58621	512,722	6,52016	-3,54104	0,000399	0,010655
923	CCE88421	Piso0_001926 [Milleromyza farinosa CBS 7064]	95,2647	8752,9	6,52167	-3,84533	0,00012	0,006567
924	XP_002071960	GK22594 [Drosophila willistoni]	3,08453	284,221	6,52582	-3,84663	0,00012	0,006567
925	ACC62149	kl-2 1-beta dynein heavy chain [Drosophila mojavensis]	9,10819	840,359	6,5277	-3,545	0,000393	0,010534
926	XP_001958035	GF23716 [Drosophila ananassae]	18,364	1698,2	6,53098	-3,70107	0,000215	0,007844
927	AAAY88833	alpha-amylase [Coelopa frigida]	2,96598	276,505	6,54265	-3,77505	0,00016	0,006953
928	NP_524547	string [Drosophila melanogaster]	6,86609	640,093	6,54265	-3,55284	0,000381	0,010359
929	XP_002025337	GL13433 [Drosophila persimilis]	38,6894	3620,78	6,54822	-3,85734	0,000115	0,006506
930	XP_002073668	GK13014 [Drosophila willistoni]	20,1506	1887,42	6,54945	-3,76655	0,000166	0,007018
931	XP_002007148	GI12776 [Drosophila mojavensis]	3,16697	296,763	6,55007	-3,55673	0,000375	0,010275
932	EFN69485	Protein lin-54-like protein [Camponotus floridanus]	13,3247	1248,6	6,55007	-3,55673	0,000375	0,010275
933	ZP_16500472	glutamate--cysteine ligase/gamma-glutamylcysteine synthetase [Listeria seeligeri FSL S4-171]	21,8996	2062,64	6,55745	-3,78242	0,000155	0,006951
934	XP_001988283	GH11081 [Drosophila grimshawi]	15,8349	1494,47	6,56039	-3,86346	0,000112	0,006506
935	XP_002000805	GI10433 [Drosophila mojavensis]	5,06924	479,889	6,56479	-3,56445	0,000365	0,010192
936	XP_001954102	GF16910 [Drosophila ananassae]	16,7922	1592,08	6,56698	-3,80436	0,000142	0,006811
937	XP_002037634	GM18368 [Drosophila sechellia]	14,5077	1375,72	6,56723	-3,84906	0,000119	0,006567
938	XP_003736954	GA13470 [Drosophila pseudoobscura pseudoobscura]	3,44785	327,225	6,56844	-3,78789	0,000152	0,006936
939	NP_524130	adenosine deaminase-related growth factor A, isoform A [Drosophila melanogaster]	6,70989	637,354	6,56966	-3,85025	0,000118	0,006567
940	XP_002079292	GD23870 [Drosophila simulans]	9,10819	866,621	6,57209	-3,56827	0,000359	0,010148
941	CAL25907	CG7387 [Drosophila melanogaster]	21,4653	2050,39	6,57775	-3,82419	0,000131	0,006657
942	XP_001954282	GF18196 [Drosophila ananassae]	1,48299	141,815	6,57936	-3,57208	0,000354	0,010092
943	XP_001978783	GG12176 [Drosophila erecta]	18,4714	1767,19	6,58002	-3,79486	0,000148	0,006903
944	XP_002068841	GK17808 [Drosophila willistoni]	9,10819	875,374	6,58659	-3,57586	0,000349	0,009985
945	XP_001979160	GG13919 [Drosophila erecta]	6,49186	624,703	6,58839	-3,72518	0,000195	0,007554
946	XP_002052173	GJ23159 [Drosophila virilis]	51,5252	4960,27	6,58899	-3,86917	0,000109	0,006506
947	ADQ64513	hypothetical protein [Bactrocera oleae]	72,3375	6963,83	6,58899	-3,85967	0,000114	0,006506
948	XP_001987580	GH19885 [Drosophila grimshawi]	2,85751	275,661	6,59199	-3,87818	0,000105	0,006371
949	XP_002154675	PREDICTED: hypothetical protein [Hydra magnipapillata]	49,8639	4816,31	6,59379	-3,57962	0,000344	0,009921
950	XP_002035430	GM14700 [Drosophila sechellia]	10,1502	982,841	6,59737	-3,84759	0,000119	0,006567
951	XP_001998108	GH23773 [Drosophila grimshawi]	287,639	27896,3	6,59967	-3,3291	0,000871	0,016017
952	XP_002064523	GK23775 [Drosophila willistoni]	3,44325	334,235	6,60095	-3,86548	0,000111	0,006506
953	XP_002075719	GK21954 [Drosophila willistoni]	7,24872	703,63	6,60095	-3,58336	0,000339	0,009852
954	XP_002004358	GI19892 [Drosophila mojavensis]	7,24872	707,113	6,60807	-3,58708	0,000334	0,009764
955	XP_001964957	GF21754 [Drosophila ananassae]	50,741	4956,76	6,6101	-3,86705	0,00011	0,006506
956	XP_002016516	GL11615 [Drosophila persimilis]	105,066	10272,9	6,61141	-3,72124	0,000198	0,007624
957	EHI78071	tubulin-tyrosine ligase [Danaus plexippus]	3,29185	322,702	6,61516	-3,59078	0,00033	0,009678
958	AAR14958	RNA polymerase II largest subunit [Chthamalus fragilis]	31,0819	3046,98	6,61516	-3,59078	0,00033	0,009678
959	XP_003704008	PREDICTED: uncharacterized protein LOC100877623 [Megachile rotundata]	8,36342	820,18	6,61571	-3,78002	0,000157	0,006951
960	ADD19100	cytochrome c oxidase subunit Va COX6 [Glossina morsitans morsitans]	6,51011	640,276	6,61987	-3,88328	0,000103	0,006308
961	XP_001956193	GF25086 [Drosophila ananassae]	13,0215	1282,76	6,62222	-3,81455	0,000136	0,00667
962	XP_002047482	GI13472 [Drosophila virilis]	2,83264	279,047	6,62222	-3,59446	0,000325	0,00965
963	XP_001982339	GG11098 [Drosophila erecta]	10,5559	1041,14	6,62397	-3,89335	9,89E-05	0,00612
964	AFS17318	sorbitol dehydrogenase [Belgica antarctica]	37,082	3667,85	6,62807	-3,88702	0,000101	0,006235
965	XP_001988789	GH11352 [Drosophila grimshawi]	9,23519	914,208	6,62924	-3,81802	0,000135	0,006657

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι- ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ RNA-seq

966	XP_002094265	GE20291 [Drosophila yakuba]	35,3586	3500,21	6,62924	-3,81802	0,000135	0,006657
967	XP_001968358	GG24831 [Drosophila erecta]	3,96239	393,196	6,63273	-3,81974	0,000134	0,006657
968	ADD20265	succinyl-CoA synthetase alpha subunit [Glossina morsitans morsitans]	335,217	33613,2	6,64779	-3,85499	0,000116	0,006506
969	XP_001361444	GA12588 [Drosophila pseudoobscura pseudoobscura]	8,41033	844,678	6,65009	-3,90569	9,40E-05	0,00595
970	XP_002051275	GJ14979 [Drosophila virilis]	6,20115	625,452	6,65622	-3,85868	0,000114	0,006506
971	NP_001162984	yuri gagarin, isoform J [Drosophila melanogaster]	4,55678	460,573	6,65927	-3,89374	9,87E-05	0,00612
972	CAH67150	OSIGBa0122F23.7 [Oryza sativa Indica Group]	7,74564	783,504	6,66041	-3,8334	0,000126	0,006619
973	XP_002068709	GK18883 [Drosophila willistoni]	2,3404	238,428	6,67066	-3,83845	0,000124	0,006601
974	AAP49009	transposase [Rana pipiens]	41,14	4191,14	6,67066	-3,83845	0,000124	0,006601
975	ADQ64609	hypothetical protein [Bactrocera oleae]	6,86609	699,483	6,67066	-3,61964	0,000295	0,009182
976	YP_003051809	hypothetical protein Msip34_2040 [Methylovorus glucosetrophus SIP3-4]	24,1125	2456,46	6,67066	-3,61964	0,000295	0,009182
977	XP_002055799	GJ10572 [Drosophila virilis]	6,33394	649,836	6,68083	-3,84345	0,000121	0,006567
978	AAK07478	putative zinc-metalloproteinase precursor [Glossina morsitans morsitans]	57,1588	5896,3	6,68869	-3,90793	9,31E-05	0,005917
979	XP_001996319	GH25091 [Drosophila grimshawi]	3,19658	331,796	6,69762	-3,91222	9,15E-05	0,005836
980	XP_002058081	GJ15687 [Drosophila virilis]	7,74564	803,975	6,69762	-3,85171	0,000117	0,006567
981	XP_001359648	GA21019 [Drosophila pseudoobscura pseudoobscura]	6,09825	635,911	6,70429	-3,85498	0,000116	0,006506
982	XP_002050531	GJ22207 [Drosophila virilis]	2,73315	285,006	6,70429	-3,63705	0,000276	0,008848
983	XP_001998291	GI23711 [Drosophila mojavenis]	9,50091	996,821	6,71312	-3,91967	8,87E-05	0,005747
984	XP_002002157	GI14005 [Drosophila mojavenis]	10,5559	1109,62	6,71588	-3,93661	8,26E-05	0,005701
985	XP_002676968	hypothetical protein NAEGRDRAFT_380 [Naegleria gruberi]	29,0171	3058,37	6,71972	-3,92283	8,75E-05	0,005715
986	EFR23623	hypothetical protein AND_12543 [Anopheles darlingi]	5,06924	535,917	6,7241	-3,64727	0,000265	0,008609
987	XP_001603323	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: band 7 protein AAEL010189-like [Nasonia vitripennis]	10,6377	1129,73	6,73064	-3,86791	0,00011	0,006506
988	ADN84935	V ATPase A, partial [Helicoverpa armigera]	5,58621	593,254	6,73064	-3,65064	0,000262	0,008571
989	XP_002025517	GL15238 [Drosophila persimilis]	27,4644	2920,01	6,73227	-3,94428	8,00E-05	0,005629
990	XP_001956898	GF24338 [Drosophila ananassae]	214,513	22832,8	6,7339	-3,64808	0,000264	0,008609
991	AAO84985	stress-sensitive B [Drosophila miranda]	5,77433	615,083	6,73498	-3,93015	8,49E-05	0,005701
992	ACA28836	immediate early protein US12 [Human herpesvirus 2]	4,41314	470,796	6,73715	-3,654	0,000258	0,008541
993	XP_002051616	GJ16521 [Drosophila virilis]	9,67236	1031,85	6,73715	-3,654	0,000258	0,008541
994	XP_662867	hypothetical protein AN5263.2 [Aspergillus nidulans FGSC A4]	32,8494	3509,65	6,73932	-3,93223	8,42E-05	0,005701
995	AAAY54762	IP04482p [Drosophila melanogaster]	7,08281	759	6,74364	-3,94959	7,83E-05	0,005629
996	XP_002005251	GI20387 [Drosophila mojavenis]	62,3151	6689,72	6,74622	-3,94934	7,84E-05	0,005629
997	XP_002074871	GK22916 [Drosophila willistoni]	199,739	21500,2	6,75009	-3,82154	0,000133	0,006657
998	XP_002060096	GJ15416 [Drosophila virilis]	4,41314	475,037	6,75009	-3,66065	0,000252	0,008417
999	XP_002003262	GI23484 [Drosophila mojavenis]	6,86609	739,077	6,75009	-3,66065	0,000252	0,008417
1000	XP_003699132	PREDICTED: uncharacterized protein LOC100866403 [Apis florea]	11,7456	1267,13	6,75331	-3,87901	0,000105	0,006371
1001	XP_002063025	GK21700 [Drosophila willistoni]	212,792	22956,4	6,75331	-3,71717	0,000201	0,007646
1002	XP_002878419	ATHB-12 [Arabidopsis lyrata subsp. lyrata]	41,14	4448,14	6,75652	-3,88058	0,000104	0,006355
1003	XP_002007466	GI12374 [Drosophila mojavenis]	70,7172	7671,58	6,76132	-3,95783	7,56E-05	0,005619
1004	XP_001356097	GA16341 [Drosophila pseudoobscura pseudoobscura]	2,16975	235,641	6,76291	-3,94351	8,03E-05	0,005629
1005	XP_002069970	GK11284 [Drosophila willistoni]	10,2845	1116,93	6,76291	-3,66723	0,000245	0,008287
1006	XP_002019392	GL12383 [Drosophila persimilis]	36,9457	4013,66	6,76337	-3,82706	0,00013	0,006657
1007	XP_002069248	GK21096 [Drosophila willistoni]	17,8484	1940,84	6,76474	-3,93602	8,28E-05	0,005701

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι- ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ RNA-seq

1008	XP_003997939	PREDICTED: WD repeat-containing protein 87-like [Felis catus]	109,498	11912,8	6,76547	-3,89036	0,0001	0,006173
1009	XP_002025208	GL13355 [Drosophila persimilis]	45,8986	5028,82	6,77563	-3,94957	7,83E-05	0,005629
1010	XP_001965127	GF23547 [Drosophila ananassae]	5,31887	582,755	6,77563	-3,67375	0,000239	0,008162
1011	EGX49421	hypothetical protein AOL_s00078g454 [Arthrotrichy oligospora ATCC 24927]	372,983	40984,9	6,77984	-3,86479	0,000111	0,006506
1012	XP_002027269	GL24745 [Drosophila persimilis]	13,3247	1466,3	6,78194	-3,67698	0,000236	0,008162
1013	AAQ23634	AT28101p [Drosophila melanogaster]	14,2671	1576,86	6,78823	-3,6802	0,000233	0,008126
1014	ZP_01445341	glutamate--cysteine ligase family protein [Pelagibaca bermudensis HTCC2601]	49,8639	5535,16	6,79448	-3,68339	0,00023	0,008042
1015	XP_001999662	GI22950 [Drosophila mojavensis]	20,8703	2324,83	6,79953	-3,74704	0,000179	0,007313
1016	XP_001849706	conserved hypothetical protein [Culex quinquefasciatus]	16,4329	1839,93	6,80692	-3,68974	0,000224	0,008009
1017	XP_002003179	GI17773 [Drosophila mojavensis]	16,0797	1804,48	6,8102	-3,8026	0,000143	0,006834
1018	XP_001989304	GH11655 [Drosophila grimshawi]	2,0404	231,398	6,82538	-3,69914	0,000216	0,007858
1019	NP_571735	nitric oxide synthase, brain [Danio rerio]	20,57	2332,8	6,82538	-3,69914	0,000216	0,007858
1020	XP_002523458	conserved hypothetical protein [Ricinus communis]	41,14	4685,38	6,83148	-3,91715	8,96E-05	0,005762
1021	XP_001958583	GF10999 [Drosophila ananassae]	17,6793	2013,47	6,83148	-3,70224	0,000214	0,007844
1022	XP_002059146	GJ16190 [Drosophila virilis]	114,318	13028,6	6,83249	-3,97904	6,92E-05	0,005472
1023	XP_002073606	GK13055 [Drosophila willistoni]	10,9498	1252,32	6,83755	-3,70533	0,000211	0,007784
1024	XP_002042290	GM13460 [Drosophila sechellia]	3,75637	429,814	6,83823	-3,93752	8,23E-05	0,005701
1025	AA98019	hypothetical protein [Stomoxys calcitrans]	26,4789	3036,85	6,84159	-3,98309	6,80E-05	0,005458
1026	AAZ76394	kl-2 [Drosophila simulans]	3,29185	378,067	6,8436	-3,70839	0,000209	0,007781
1027	XP_002104860	GD18229 [Drosophila simulans]	12,463	1431,37	6,8436	-3,70839	0,000209	0,007781
1028	ADD20501	adenylate kinase [Glossina morsitans morsitans]	7,64933	883,424	6,85163	-3,98565	6,73E-05	0,00545
1029	XP_002056712	GJ11084 [Drosophila virilis]	3,19115	369,569	6,85563	-3,92889	8,53E-05	0,005701
1030	XP_002006551	GI18515 [Drosophila mojavensis]	6,86609	795,167	6,85563	-3,71449	0,000204	0,007674
1031	XP_002139019	GA24075 [Drosophila pseudoobscura pseudoobscura]	13,7322	1593,63	6,85862	-3,93035	8,48E-05	0,005701
1032	XP_002064010	GK15978 [Drosophila willistoni]	8,84157	1027,14	6,86011	-3,96281	7,41E-05	0,005619
1033	ADD19424	sorbitol dehydrogenase [Glossina morsitans morsitans]	18,9631	2203,59	6,86051	-3,91464	9,05E-05	0,0058
1034	XP_001953932	GF18014 [Drosophila ananassae]	7,24872	842,962	6,8616	-3,71751	0,000201	0,007646
1035	XP_002006204	GI20909 [Drosophila mojavensis]	332,362	38670,3	6,86233	-3,59836	0,00032	0,009623
1036	XP_002002352	GI17338 [Drosophila mojavensis]	284,695	33223,3	6,86663	-3,71821	0,000201	0,007646
1037	XP_002075580	GK18585 [Drosophila willistoni]	8,58754	1002,78	6,86755	-3,72052	0,000199	0,007624
1038	XP_002027481	GL15298 [Drosophila persimilis]	30,9826	3625,33	6,87051	-3,9673	7,27E-05	0,005614
1039	XP_002091696	GE12107 [Drosophila yakuba]	9,62388	1126,57	6,87111	-4,006	6,18E-05	0,005376
1040	XP_003424528	PREDICTED: WD repeat and HMG-box DNA-binding protein 1-like isoform 2 [Nasonia vitripennis]	24,926	2940,6	6,88232	-3,94185	8,09E-05	0,005638
1041	XP_001356013	GA13606 [Drosophila pseudoobscura pseudoobscura]	19,3447	2286,81	6,88525	-3,94328	8,04E-05	0,005629
1042	ABY85290	occludin-related Y protein [Drosophila erecta]	20,5691	2431,54	6,88525	-3,94328	8,04E-05	0,005629
1043	XP_002087547	GE15588 [Drosophila yakuba]	3,42427	404,795	6,88525	-3,72945	0,000192	0,007516
1044	ACO12404	Malate dehydrogenase, mitochondrial precursor [Lepeophtheirus salmonis]	9,10819	1076,71	6,88525	-3,72945	0,000192	0,007516
1045	XP_002016613	GL10408 [Drosophila persimilis]	6,50377	770,917	6,88915	-4,00334	6,25E-05	0,005376
1046	XP_003251627	PREDICTED: hypothetical protein LOC725238 [Apis mellifera]	5,93197	704,089	6,8911	-4,01782	5,87E-05	0,005305
1047	XP_001355548	GA13906 [Drosophila pseudoobscura pseudoobscura]	4,61785	549,22	6,89402	-3,94753	7,90E-05	0,005629
1048	XP_002046859	GJ12258 [Drosophila virilis]	1,11169	132,485	6,89693	-4,02049	5,81E-05	0,005303
1049	XP_002049538	GJ20697 [Drosophila virilis]	373,436	44547,8	6,89835	-3,61141	0,000305	0,009303
1050	XP_002003889	GI18152 [Drosophila mojavensis]	56,9931	6805,82	6,89984	-3,95034	7,80E-05	0,005629

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι- ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ RNA-seq

1051	XP_003440159	PREDICTED: interleukin-11 receptor subunit alpha-like [Oreochromis niloticus]	14,2671	1707,12	6,90274	-3,73825	0,000185	0,007416
1052	XP_001968543	GG24930 [Drosophila erecta]	24,1125	2885,18	6,90274	-3,73825	0,000185	0,007416
1053	XP_002059324	GJ18358 [Drosophila virilis]	6,33394	762,454	6,9114	-3,95594	7,62E-05	0,005619
1054	XP_002098049	GE10146 [Drosophila yakuba]	7,24872	874,312	6,91428	-3,74404	0,000181	0,007317
1055	XP_002095962	GE25344 [Drosophila yakuba]	4,93771	597,347	6,91858	-3,92265	8,76E-05	0,005715
1056	XP_001964623	GF22948 [Drosophila ananassae]	4,66928	565,434	6,92002	-4,01784	5,87E-05	0,005305
1057	XP_001647568	hypothetical protein AaeL_AAEL015651 [Aedes aegypti]	24,926	3036,43	6,92858	-3,96423	7,36E-05	0,005619
1058	NP_996130	CG33285 [Drosophila melanogaster]	24,926	3042,42	6,93142	-3,96561	7,32E-05	0,005619
1059	XP_002026129	GL16166 [Drosophila persimilis]	99,8694	12258,4	6,93951	-4,01248	6,01E-05	0,005368
1060	AAM49859	LD04137p [Drosophila melanogaster]	1,21932	150,292	6,94555	-3,97242	7,11E-05	0,00552
1061	XP_001360387	GA22079 [Drosophila pseudoobscura pseudoobscura]	3,03785	375,903	6,95116	-3,97512	7,03E-05	0,00551
1062	ADD19550	hypothetical conserved protein [Glossina morsitans morsitans]	48,3618	6000,54	6,95508	-4,04363	5,26E-05	0,005087
1063	NP_732415	CG31245 [Drosophila melanogaster]	35,6615	4428,92	6,95645	-3,84715	0,00012	0,006567
1064	XP_002019894	GL11966 [Drosophila persimilis]	10,2845	1280,02	6,95954	-3,76667	0,000165	0,007018
1065	XP_001997348	GH11347 [Drosophila grimshawi]	11,6738	1452,93	6,95954	-3,76667	0,000165	0,007018
1066	XP_002006518	GI21100 [Drosophila mojavenis]	32,8494	4114,76	6,9688	-4,04065	5,33E-05	0,00511
1067	XP_001360672	GA12207 [Drosophila pseudoobscura pseudoobscura]	9,67236	1217,77	6,97616	-3,77494	0,00016	0,006953
1068	XP_003738859	PREDICTED: mitochondrial import receptor subunit TOM20 homolog [Metaseiulus occidentalis]	18,2164	2297,86	6,97891	-3,98846	6,65E-05	0,00545
1069	AAG23076	hexokinase-C [Drosophila melanogaster]	221,185	27953,9	6,98165	-4,05914	4,93E-05	0,005038
1070	ABB76230	kl-2 protein [Drosophila bipectinata]	5,87279	742,219	6,98165	-3,77767	0,000158	0,006953
1071	XP_001956372	GF24628 [Drosophila ananassae]	54,9287	6945,34	6,98234	-4,01525	5,94E-05	0,005334
1072	XP_002094494	GE21855 [Drosophila yakuba]	12,1965	1547,29	6,98713	-4,06162	4,87E-05	0,005034
1073	XP_002087500	GE17297 [Drosophila yakuba]	2,43529	308,949	6,98713	-3,9924	6,54E-05	0,00545
1074	XP_002054311	GJ22871 [Drosophila virilis]	2,73315	346,736	6,98713	-3,78039	0,000157	0,006951
1075	NP_608713	CG2964 [Drosophila melanogaster]	7,74564	984,498	6,98986	-3,99371	6,50E-05	0,00545
1076	XP_002068330	GK25376 [Drosophila willistoni]	3,88756	496,925	6,99802	-4,05426	5,03E-05	0,005038
1077	XP_002019154	GL26212 [Drosophila persimilis]	8,49791	1087,6	6,99982	-4,05509	5,01E-05	0,005038
1078	ADQ64572	hypothetical protein [Bactrocera oleae]	98,5482	12628,4	7,00163	-4,00694	6,15E-05	0,005376
1079	XP_001996353	GH25135 [Drosophila grimshawi]	15,2995	1963,01	7,00343	-3,78847	0,000152	0,006936
1080	AEO34289	hypothetical protein [Amblyomma maculatum]	6,18034	795,937	7,00882	-3,79114	0,00015	0,006903
1081	XP_002036785	GM12487 [Drosophila sechellia]	1,44854	187,246	7,0142	-3,7938	0,000148	0,006903
1082	XP_002010049	GI14903 [Drosophila mojavenis]	17,6793	2285,33	7,0142	-3,7938	0,000148	0,006903
1083	XP_002068262	GK13104 [Drosophila willistoni]	85,8754	11166,8	7,02275	-3,99896	6,36E-05	0,005438
1084	NP_611453	CG11041 [Drosophila melanogaster]	16,9958	2226,93	7,03373	-4,06749	4,75E-05	0,004989
1085	XP_002042047	GM26816 [Drosophila sechellia]	11,6738	1548,29	7,05126	-3,81208	0,000138	0,00667
1086	XP_002055688	GJ19500 [Drosophila virilis]	13,1949	1751,3	7,05231	-4,08673	4,38E-05	0,004916
1087	XP_002036932	GM12399 [Drosophila sechellia]	24,926	3311,92	7,05387	-4,0243	5,71E-05	0,005293
1088	XP_001959181	GF12186 [Drosophila ananassae]	16,7586	2230,74	7,05648	-4,08133	4,48E-05	0,004934
1089	XP_308120	AGAP003892-PA [Anopheles gambiae str. PEST]	3,71411	494,387	7,05648	-3,81464	0,000136	0,00667
1090	XP_002009422	GI15342 [Drosophila mojavenis]	9,10819	1212,39	7,05648	-3,81464	0,000136	0,00667
1091	XP_002019870	GL12635 [Drosophila persimilis]	4,44898	594,342	7,06168	-4,08373	4,43E-05	0,004916
1092	ZP_12122258	putative exported protein [Salmonella enterica subsp. enterica serovar Baildon str. R6-199]	31,0819	4197,07	7,07716	-3,82479	0,000131	0,006657
1093	XP_002061088	GK10636 [Drosophila willistoni]	1,7707	239,953	7,08229	-3,8273	0,00013	0,006657
1094	XP_002085722	GD14921 [Drosophila simulans]	5,45904	741,519	7,08569	-4,0948	4,23E-05	0,004895
1095	XP_002133606	GA22993 [Drosophila pseudoobscura pseudoobscura]	10,2845	1403,57	7,09248	-3,83229	0,000127	0,006619

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι- ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ RNA-seq

1096	XP_001607680	PREDICTED: acyl-CoA synthetase family member 3, mitochondrial-like isoform 1 [Nasonia vitripennis]	1,12508	154,085	7,09755	-4,04506	5,23E-05	0,005087
1097	XP_002009285	GI11331 [Drosophila mojavensis]	32,4256	4444,73	7,09882	-4,11194	3,92E-05	0,004872
1098	XP_002065839	GK20327 [Drosophila willistoni]	11,1724	1532,8	7,10008	-4,04625	5,20E-05	0,005087
1099	XP_001983858	GH15340 [Drosophila grimshawi]	7,12965	985,003	7,11015	-4,05102	5,10E-05	0,005047
1100	XP_001965555	GF22554 [Drosophila ananassae]	30,5991	4227,45	7,11015	-4,05102	5,10E-05	0,005047
1101	CAM34504	putative phosphoglycerate mutase [Cotesia congregata]	9,67236	1338,62	7,11266	-3,84215	0,000122	0,006567
1102	NP_477229	GS1-like, isoform B [Drosophila melanogaster]	19,3436	2686,38	7,11766	-4,12036	3,78E-05	0,004868
1103	XP_001986942	GH21643 [Drosophila grimshawi]	19,3436	2691,03	7,12016	-4,12147	3,76E-05	0,004868
1104	XP_001352383	GA11010 [Drosophila pseudoobscura pseudoobscura]	44,4986	6190,51	7,12016	-4,05576	5,00E-05	0,005038
1105	XP_002072834	GK13478 [Drosophila willistoni]	4,1879	583,614	7,12264	-4,1176	3,83E-05	0,004868
1106	EJU00627	DUF89-domain-containing protein [Dacryopinax sp. DJM-731 SS1]	2,93783	410,82	7,12761	-3,84943	0,000118	0,006567
1107	ADD18282	trypsin [Glossina morsitans morsitans]	16,4329	2321,63	7,14241	-3,85662	0,000115	0,006506
1108	XP_002025930	GL10137 [Drosophila persimilis]	1,72392	244,383	7,14731	-3,859	0,000114	0,006506
1109	XP_002086288	GE22956 [Drosophila yakuba]	1,67147	237,751	7,15219	-4,12527	3,70E-05	0,004868
1110	XP_001360127	GA18378 [Drosophila pseudoobscura pseudoobscura]	2,25219	320,353	7,15219	-4,07088	4,68E-05	0,004987
1111	ACD81789	IP20990p [Drosophila melanogaster]	32,8657	4674,84	7,15219	-4,07088	4,68E-05	0,004987
1112	XP_002006487	GI21078 [Drosophila mojavensis]	7,24872	1031,06	7,15219	-3,86137	0,000113	0,006506
1113	XP_002091754	GE12072 [Drosophila yakuba]	10,9498	1557,51	7,15219	-3,86137	0,000113	0,006506
1114	XP_002008684	GI13633 [Drosophila mojavensis]	7,12965	1017,55	7,15705	-4,07317	4,64E-05	0,004987
1115	XP_002066908	GK24302 [Drosophila willistoni]	2,46523	351,841	7,15705	-3,86373	0,000112	0,006506
1116	XP_002056295	GJ10870 [Drosophila virilis]	5,87279	838,171	7,15705	-3,86373	0,000112	0,006506
1117	XP_002036991	GM12357 [Drosophila sechellia]	151,76	21743,4	7,16265	-4,00512	6,20E-05	0,005376
1118	NP_001017020	ADP-ribosylation factor-like protein 2-binding protein [Xenopus (Silurana) tropicalis]	45,541	6539,05	7,16577	-4,1364	3,53E-05	0,004868
1119	XP_002012339	GI23032 [Drosophila mojavensis]	0,916314	132,098	7,17155	-3,87075	0,000109	0,006506
1120	AAC02220	putative trypsin-like protein [Scirpophaga incertulas]	26,185	3800,07	7,18114	-3,87539	0,000106	0,006421
1121	XP_001957594	GF10489 [Drosophila ananassae]	3,72819	548,812	7,20169	-4,1478	3,36E-05	0,004824
1122	NP_652334	CG18675 [Drosophila melanogaster]	6,70989	996,336	7,2142	-4,15347	3,27E-05	0,004824
1123	XP_002032806	GM20756 [Drosophila sechellia]	14,2593	2119,04	7,21537	-4,16373	3,13E-05	0,004824
1124	AAC24597	xylitol dehydrogenase [Candida sp. HA 167]	76,6486	11402,4	7,21686	-4,13071	3,62E-05	0,004868
1125	XP_001996253	GH22389 [Drosophila grimshawi]	30,5991	4580,35	7,22582	-4,10543	4,04E-05	0,004895
1126	XP_001988464	GH10562 [Drosophila grimshawi]	3,29185	496,708	7,23736	-3,90245	9,52E-05	0,005961
1127	XP_003638257	hypothetical protein MTR_123s0012, partial [Medicago truncatula]	20,57	3103,82	7,23736	-3,90245	9,52E-05	0,005961
1128	ADD18737	transketolase [Glossina morsitans morsitans]	11,1724	1693,86	7,24423	-4,11403	3,89E-05	0,004868
1129	XP_002037727	GM18142 [Drosophila sechellia]	19,8935	3027,77	7,24981	-3,96011	7,49E-05	0,005619
1130	NP_729842	CG10960, isoform A [Drosophila melanogaster]	5,46629	837,945	7,26015	-4,12145	3,77E-05	0,004868
1131	AAX33506	LP14969p [Drosophila melanogaster]	6,72943	1033,42	7,26273	-4,14991	3,33E-05	0,004824
1132	XP_001984190	GH16306 [Drosophila grimshawi]	40,9323	6313,98	7,26917	-3,91768	8,94E-05	0,005762
1133	XP_001354084	GA16901 [Drosophila pseudoobscura pseudoobscura]	10,6377	1643,47	7,27141	-4,12669	3,68E-05	0,004868
1134	XP_002074074	GK14449 [Drosophila willistoni]	6,95676	1075,5	7,27237	-4,15393	3,27E-05	0,004824
1135	XP_001961130	GF11159 [Drosophila ananassae]	2,63898	409,609	7,27813	-3,92196	8,78E-05	0,005715
1136	ZP_09644070	thiamine-monophosphate kinase [Odoribacter laneus YIT 12061]	16,4329	2558,53	7,28259	-3,92408	8,71E-05	0,005715
1137	XP_001998313	GI23893 [Drosophila mojavensis]	6,86609	1072,32	7,28703	-3,9262	8,63E-05	0,005705

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι- ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ RNA-seq

1138	ABY85287	occludin-related Y protein [Drosophila willistoni]	9,10819	1422,48	7,28703	-3,9262	8,63E-05	0,005705
1139	XP_002054309	GJ22873 [Drosophila virilis]	15,2995	2396,78	7,29146	-3,92832	8,55E-05	0,005701
1140	XP_001962677	GF14312 [Drosophila ananassae]	17,707	2781,58	7,29544	-4,11039	3,95E-05	0,004872
1141	XP_003568849	PREDICTED: UDP-glycosyltransferase 91B1-like [Brachypodium distachyon]	62,1638	9783,2	7,29809	-4,13908	3,49E-05	0,004868
1142	XP_002021326	GL24868 [Drosophila persimilis]	12,463	1964,39	7,30029	-3,93252	8,41E-05	0,005701
1143	XP_003861981	hypothetical protein, conserved [Leishmania donovani]	149,592	23770	7,31197	-4,19752	2,70E-05	0,004598
1144	ADQ64552	hypothetical protein [Bactrocera oleae]	99,7278	16030,4	7,3286	-4,1532	3,28E-05	0,004824
1145	XP_001356280	GA14557 [Drosophila pseudoobscura pseudoobscura]	2,46523	396,857	7,33075	-3,94699	7,91E-05	0,005629
1146	ABY85406	kl-5 beta dynein heavy chain [Drosophila erecta]	0,657877	106,855	7,34362	-3,95309	7,71E-05	0,005629
1147	XP_001954776	GF18439 [Drosophila ananassae]	3,56482	580,724	7,34788	-3,9551	7,65E-05	0,005619
1148	XP_002082428	GD11563 [Drosophila simulans]	3,87282	630,897	7,34788	-3,9551	7,65E-05	0,005619
1149	XP_002056267	GJ10850 [Drosophila virilis]	36,2436	5935,57	7,35552	-4,21798	2,47E-05	0,004584
1150	BAM26200	aquaporin [Phormia regina]	8,58754	1411,32	7,36059	-3,96111	7,46E-05	0,005619
1151	NP_001097458	CG34453 [Drosophila melanogaster]	11,1423	1840,12	7,3676	-4,22236	2,42E-05	0,004584
1152	XP_002021125	GL24992 [Drosophila persimilis]	3,65294	606,78	7,37597	-4,22609	2,38E-05	0,004584
1153	XP_002017020	GL21738 [Drosophila persimilis]	9,10819	1523,15	7,38568	-3,97295	7,10E-05	0,00552
1154	XP_001956989	GF24290 [Drosophila ananassae]	4,78672	802,778	7,38982	-4,23224	2,31E-05	0,004584
1155	XP_001361599	GA12222 [Drosophila pseudoobscura pseudoobscura]	1,58418	265,682	7,38982	-4,1814	2,90E-05	0,004742
1156	CCL99704	predicted protein [Fibroporia radiculosa]	608,258	102010	7,38982	-4,12973	3,63E-05	0,004868
1157	YP_006440826	HAD-superfamily hydrolase, subfamily IA, variant 1 [Tumeriella parva DSM 21527]	85,6023	14404,3	7,39463	-4,22099	2,43E-05	0,004584
1158	NP_726214	CG4329, isoform B [Drosophila melanogaster]	1,29585	220,44	7,41034	-3,98456	6,76E-05	0,00545
1159	EFR28456	hypothetical protein AND_03577 [Anopheles darlingi]	4,6176	787,728	7,41441	-3,98647	6,71E-05	0,00545
1160	AAL49244	RE67391p [Drosophila melanogaster]	1,38375	236,723	7,41847	-3,98838	6,65E-05	0,00545
1161	ABY85291	occludin-related Y protein [Drosophila yakuba]	1,1052	189,6	7,42252	-3,99028	6,60E-05	0,00545
1162	ACT66227	IP11002p [Drosophila melanogaster]	11,6738	2002,69	7,42252	-3,99028	6,60E-05	0,00545
1163	XP_001354767	GA10667 [Drosophila pseudoobscura pseudoobscura]	6,09825	1052,04	7,43058	-4,20006	2,67E-05	0,004594
1164	XP_002049610	GJ20661 [Drosophila virilis]	7,24872	1257,48	7,43859	-3,99781	6,39E-05	0,005438
1165	XP_001986893	GH21620 [Drosophila grimshawi]	2,63898	461,603	7,45053	-4,0034	6,24E-05	0,005376
1166	XP_002053337	GJ23394 [Drosophila virilis]	7,74564	1356,71	7,45251	-4,21007	2,55E-05	0,004584
1167	YP_924674	histidine kinase, dimerisation and phosphoacceptor region [Nocardioides sp. JS614]	17,6793	3109,41	7,45844	-4,0071	6,15E-05	0,005376
1168	XP_001964139	GF20878 [Drosophila ananassae]	28,4966	5025,63	7,46237	-4,00894	6,10E-05	0,005376
1169	XP_002091757	GE12070 [Drosophila yakuba]	24,3192	4292,81	7,46368	-4,26487	2,00E-05	0,004584
1170	XP_001967351	GF13897 [Drosophila ananassae]	101,947	18060,9	7,46891	-4,26717	1,98E-05	0,004584
1171	XP_002063726	GK15752 [Drosophila willistoni]	74,7781	13391,4	7,48448	-4,25822	2,06E-05	0,004584
1172	NP_730300	CG32181 [Drosophila melanogaster]	2,70656	488,381	7,4954	-4,22957	2,34E-05	0,004584
1173	XP_001957640	GF23924 [Drosophila ananassae]	19,0529	3460,87	7,50498	-4,0288	5,61E-05	0,005235
1174	XP_002033365	GM20454 [Drosophila sechellia]	42,8012	7856,89	7,52016	-4,28964	1,79E-05	0,004584
1175	AFK28501	pyruvate kinase [Helicoverpa armigera]	5,06924	942,727	7,53893	-4,04457	5,24E-05	0,005087
1176	XP_001843421	paramyosin [Culex quinquefasciatus]	18,2164	3409,58	7,54822	-4,25345	2,11E-05	0,004584
1177	ZP_11190740	hypothetical protein PsR81_28346 [Pseudomonas sp. R81]	31,0819	5974,47	7,58659	-4,06662	4,77E-05	0,004989
1178	XP_002017962	GL17451 [Drosophila persimilis]	1,14775	221,72	7,59379	-4,06994	4,70E-05	0,004987
1179	XP_002366878	hypothetical protein, conserved [Toxoplasma gondii ME49]	44,4986	8649,6	7,60273	-4,27795	1,89E-05	0,004584
1180	XP_002014988	GL19472 [Drosophila persimilis]	32,8657	6451,6	7,61693	-4,28431	1,83E-05	0,004584
1181	XP_001956343	GF25162 [Drosophila ananassae]	1,08502	215,858	7,63622	-4,08948	4,32E-05	0,004896

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι- ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ RNA-seq

1182	XP_003427825	PREDICTED: zinc finger BED domain-containing protein 4-like [Nasonia vitripennis]	40,9323	8162,93	7,6397	-4,09108	4,29E-05	0,004896
1183	XP_002058945	GJ15265 [Drosophila virilis]	3,16697	634,617	7,64664	-4,09427	4,24E-05	0,004895
1184	AEL97641	guanylyl cyclase receptor [Bactrocera dorsalis]	5,31887	1070,94	7,65354	-4,09744	4,18E-05	0,004895
1185	XP_001956365	GF25173 [Drosophila ananassae]	12,3607	2491,76	7,65526	-4,30141	1,70E-05	0,004584
1186	XP_002061216	GK18869 [Drosophila willistoni]	16,4329	3316,61	7,65698	-4,09901	4,15E-05	0,004895
1187	NP_647937	CG17150, isoform D [Drosophila melanogaster]	2,23663	462,162	7,69093	-4,11457	3,88E-05	0,004868
1188	XP_002138760	GA24220 [Drosophila pseudoobscura pseudoobscura]	4,04168	848,74	7,71423	-4,12522	3,70E-05	0,004868
1189	XP_001984331	GH16392 [Drosophila grimshawi]	2,93783	625,406	7,7339	-4,1342	3,56E-05	0,004868
1190	XP_002063409	GK21411 [Drosophila willistoni]	106,205	22839,7	7,74855	-4,06972	4,71E-05	0,004987
1191	XP_001954846	GF16539 [Drosophila ananassae]	13,3247	2868,58	7,75009	-4,14159	3,45E-05	0,004868
1192	XP_002005548	GI19008 [Drosophila mojavensis]	0,781473	168,613	7,75331	-4,14305	3,43E-05	0,004868
1193	XP_002063261	GK21484 [Drosophila willistoni]	2,73315	594,967	7,7661	-4,14888	3,34E-05	0,004824
1194	XP_001960338	GF11565 [Drosophila ananassae]	20,57	4477,8	7,7661	-4,14888	3,34E-05	0,004824
1195	XP_001351577	chromosome assembly factor 1, CAF-1 [Plasmodium falciparum 3D7]	184,596	40272,7	7,76928	-4,39689	1,10E-05	0,004167
1196	XP_002002865	GI17612 [Drosophila mojavensis]	3,29185	721,333	7,77563	-4,15322	3,28E-05	0,004824
1197	XP_002052540	GJ21047 [Drosophila virilis]	49,8639	10998,4	7,78509	-4,15752	3,22E-05	0,004824
1198	NP_998476	purine nucleoside phosphorylase 5a [Danio rerio]	79,7831	17728	7,79573	-4,20805	2,58E-05	0,004584
1199	XP_002102115	GD19672 [Drosophila simulans]	8,94653	1991,6	7,79838	-4,41226	1,02E-05	0,004167
1200	XP_001965705	GF22311 [Drosophila ananassae]	2,38697	531,653	7,79916	-4,36496	1,27E-05	0,004513
1201	XP_002047171	GJ13285 [Drosophila virilis]	3,29185	741,898	7,81618	-4,17164	3,02E-05	0,004761
1202	XP_001970189	GG10492 [Drosophila erecta]	2,48546	563,144	7,82385	-4,37576	1,21E-05	0,004444
1203	XP_001655793	hypothetical protein AaeL_AAEL011980 [Aedes aegypti]	1,87099	424,371	7,82538	-4,17582	2,97E-05	0,004761
1204	XP_002006049	GI18762 [Drosophila mojavensis]	4,04168	920,601	7,83148	-4,17858	2,93E-05	0,004753
1205	XP_001992960	GH13353 [Drosophila grimshawi]	8,1064	1854,24	7,83755	-4,18134	2,90E-05	0,004742
1206	XP_002106233	GD16753 [Drosophila simulans]	10,9498	2509,9	7,84058	-4,18271	2,88E-05	0,004742
1207	XP_001959273	GF12792 [Drosophila ananassae]	5,06924	1171,71	7,85263	-4,18817	2,81E-05	0,004742
1208	XP_002056731	GJ11096 [Drosophila virilis]	21,8996	5125,04	7,87051	-4,39608	1,10E-05	0,004167
1209	XP_001962841	GF14227 [Drosophila ananassae]	10,9498	2588,83	7,88525	-4,20293	2,63E-05	0,004584
1210	XP_001953934	GF18016 [Drosophila ananassae]	16,4329	3916,76	7,89693	-4,20821	2,57E-05	0,004584
1211	XP_001984705	GH16616 [Drosophila grimshawi]	3,56482	854,812	7,90563	-4,21213	2,53E-05	0,004584
1212	XP_002059967	GJ14950 [Drosophila virilis]	3,27294	789,54	7,91428	-4,41504	1,01E-05	0,004167
1213	AEW07663	Pinus taeda anonymous locus 0_8467_01 genomic sequence	7,66119	1848,13	7,91428	-4,21603	2,49E-05	0,004584
1214	XP_001846016	conserved hypothetical protein [Culex quinquefasciatus]	109,498	26809,1	7,93567	-4,35639	1,32E-05	0,004513
1215	XP_002038214	GM17875 [Drosophila sechellia]	7,15512	1752,41	7,93615	-4,46695	7,93E-06	0,004042
1216	XP_001653119	actin binding protein, putative [Aedes aegypti]	0,60966	150,878	7,95116	-4,23262	2,31E-05	0,004584
1217	XP_001997256	GH22570 [Drosophila grimshawi]	6,86609	1705,82	7,95676	-4,23513	2,28E-05	0,004584
1218	XP_002080489	GD10219 [Drosophila simulans]	6,33394	1587,3	7,96926	-4,43872	9,05E-06	0,004042
1219	XP_002064021	GK19930 [Drosophila willistoni]	6,18034	1603,75	8,01955	-4,26321	2,02E-05	0,004584
1220	XP_002078278	GD22629 [Drosophila simulans]	16,2128	4226,58	8,02622	-4,46309	8,08E-06	0,004042
1221	NP_728408	CG1801 [Drosophila melanogaster]	0,761059	198,952	8,0302	-4,26796	1,97E-05	0,004584
1222	XP_002085786	GD14955 [Drosophila simulans]	3,42427	901,739	8,04077	-4,27266	1,93E-05	0,004584
1223	XP_001961883	GF14717 [Drosophila ananassae]	0,945866	249,536	8,0434	-4,27383	1,92E-05	0,004584
1224	ZP_10260276	ABC transporter family protein [Xanthomonas axonopodis pv. punicea str. LMG 859]	9,10819	2437,92	8,06427	-4,28311	1,84E-05	0,004584
1225	XP_001999396	GI23090 [Drosophila mojavensis]	61,5321	16676,8	8,08229	-4,2911	1,78E-05	0,004584
1226	XP_001980969	GG10368 [Drosophila erecta]	35,3586	9931,43	8,1338	-4,50868	6,52E-06	0,004042

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι- ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ RNA-seq

1227	XP_002095341	GE19746 [Drosophila yakuba]	7,24872	2051,67	8,14486	-4,31873	1,57E-05	0,004584
1228	EFR19322	hypothetical protein AND_22695 [Anopheles darlingi]	1,7707	524,153	8,20952	-4,3471	1,38E-05	0,00456
1229	XP_001957893	GF23790 [Drosophila ananassae]	3,29185	1063,02	8,33505	-4,40165	1,07E-05	0,004167
1230	EFZ14132	hypothetical protein SINV_09504 [Solenopsis invicta]	55,2962	17909,6	8,33934	-4,4035	1,07E-05	0,004167
1231	YP_001943997	chromosome segregation protein SMC [Chlorobium limicola DSM 245]	13,3247	4680,64	8,45646	-4,45372	8,44E-06	0,004042
1232	XP_001357953	GA14948 [Drosophila pseudoobscura pseudoobscura]	9,67182	3541,56	8,51638	-4,66616	3,07E-06	0,003628
1233	ZP_10867140	flagellar export protein FliJ [Paenibacillus alvei DSM 29]	2,93783	1174,58	8,64318	-4,53251	5,83E-06	0,004042
1234	XP_002064007	GK15975 [Drosophila willistoni]	200,243	88024,9	8,78001	-4,67029	3,01E-06	0,003628
1235	EKE06479	NUDIX hydrolase [uncultured bacterium]	49,8639	22739,7	8,833	-4,611	4,01E-06	0,00368
1236	ACE79730	coiled-coil Y protein [Drosophila virilis]	0,945866	435,893	8,84812	-4,61718	3,89E-06	0,00368
1237	XP_002008256	G113389 [Drosophila mojavensis]	6,33394	2978,29	8,87716	-4,80829	1,52E-06	0,0025
1238	XP_002160969	PREDICTED: similar to GF20795 [Hydra magnipapillata]	5,31887	3312,5	9,28259	-4,7905	1,66E-06	0,0025

Πίνακας 3: Γονίδια με υπερέκφραση σε κεφάλια από ανθεκτικά έντομα *Bactrocera oleae* στο spinosad

	Gene ID	Gene	Value 1	Value 2	Log 2 (fold change)	Test Stat	P value	Q value
1	AFA34424	ATP synthase FO subunit 6, partial [Ostrea edulis]	1485,46	3895,48	1,39089	-3,78977	0,000151	0,047147
2	AAM00373	vitellogenin 2 precursor [Bactrocera dorsalis]	1066,31	2908,44	1,44762	-3,91821	8,92E-005	0,032232
3	XP_002075502	GK18435 [Drosophila willistoni]	2103,2	5743,13	1,44925	-3,9426	8,06E-005	0,029785
4	P27587	RecName: Full=Vitellogenin-2	6839,5	19382,4	1,50279	-4,0494	5,13E-005	0,021647
5	YP_002455928	replicase [Asparagus virus 2]	196,069	585,427	1,57813	-4,05357	5,04E-005	0,021647
6	XP_002066000	GK21181 [Drosophila willistoni]	416,427	1252,22	1,58835	-4,18807	2,81E-005	0,013862
7	XP_001956475	GF25230 [Drosophila ananassae]	122,06	370,912	1,60348	-4,04679	5,19E-005	0,021647
8	XP_002008649	G113608 [Drosophila mojavensis]	940,032	2968,36	1,65889	-4,16004	3,18E-005	0,015216
9	YP_002455904	128 kDa [Cactus mild mottle virus]	589,131	1918,6	1,70339	-4,53766	5,69E-006	0,003391
10	XP_002009350	G115280 [Drosophila mojavensis]	2760,16	9373,1	1,76377	-4,55361	5,27E-006	0,003298
11	ADD18290	midgut trypsin [Glossina morsitans morsitans]	380,008	2649,51	2,80162	-4,7432	2,10E-006	0,001425
12	XP_002010361	G115881 [Drosophila mojavensis]	424,715	3727,8	3,13376	-5,54075	3,01E-008	3,77E-005

Πίνακας 4: Γονίδια με υποέκφραση σε κεφάλια από ανθεκτικά έντομα *Bactrocera oleae* στο spinosad

	Gene ID	Gene	Value 1	Value 2	Log 2 (fold change)	Test Stat	P value	Q value
1	ADQ64613	hypothetical protein [Bactrocera oleae]	2175,8	14,49	-7,23067	5,11937	3,07E-007	0,000289
2	ADD18747	polyprotein [Glossina morsitans morsitans]	1098,4	15,53	-6,14384	12,0549	0	0
3	ZP_16884880	hypothetical protein ESOG_04481, partial [Escherichia coli E101]	5202 198	74,68	-6,12214	4,31818	1,57E-005	0,008251
4	BAC16565	2C protein [Hepatitis A virus]	4547	92,16	-5,62464	3,95396	7,69E-005	0,029065
5	YP_003622540	polyprotein [Slow bee paralysis virus]	164,57	4,765	-5,11007	6,54693	5,87E-011	3,93E-007
6	CCG20229	hypothetical protein KUM_1451, partial [Pavlovella sinigenalis 1445]	2369,5	92,42	-4,68014	4,96643	6,82E-007	0,000562
7	XP_002086515	phosphotransferase system, mannose/fructose/N-	302,25	12,43	-4,60327	6,26424	3,75E-010	1,52E-006

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι- ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ RNA-seq

		acetylglucosamine-specific component IIB [Leuconostoc lactis KCTC 3528]							
8	ZP_03392993	DnaK family protein [Corynebacterium amycolatum SK46]	12374	598,4	-4,37007	3,96068	7,47E-005	0,028933	
9	XP_001961951	GF14680 [Drosophila ananassae]	672,4	62,24	-3,43334	5,29545	1,19E-007	0,000121	
10	ACB55606	heat shock protein 70, partial [Plodia interpunctella]	391,64	46,53	-3,07323	6,51522	7,26E-011	3,93E-007	
11	XP_001988642	GH10465 [Drosophila grimshawi]	566,13	68,85	-3,03968	4,03214	5,53E-005	0,021919	
12	ZP_11266361	conserved exported hypothetical protein [Rhizobium mesoamericanum STM3625]	2871	372,4	-2,94657	4,31938	1,56E-005	0,008251	
13	ACG58884	23 kDa heat shock protein beta [Ceratitis capitata]	480,11	62,31	-2,94576	5,92351	3,15E-009	5,69E-006	
14	ZP_05718698	hypothetical protein VMD_37440 [Vibrio mimicus VM573]	1239,5	167	-2,89153	5,88975	3,87E-009	6,29E-006	
15	ABL06943	small heat shock protein [Sarcophaga crassipalpis]	7002,3	1004	-2,80188	5,36479	8,10E-008	9,41E-005	
16	AAW32098	heat shock protein 70 [Liriomyza huidobrensis]	1555,5	246,3	-2,65917	6,10557	1,02E-009	2,78E-006	
17	XP_002024748	GL22446 [Drosophila persimilis]	1020,6	164,4	-2,63404	6,13104	8,73E-010	2,78E-006	
18	AEY75237	Hsp10, partial [Bactrocera dorsalis]	516,38	85,03	-2,60247	5,6048	2,08E-008	2,82E-005	
19	XP_001988524	GH11214 [Drosophila grimshawi]	671,1	113,8	-2,55955	5,31784	1,05E-007	0,000114	
20	ABL06948	heat shock protein 70 [Rhagoletis pomonella]	5588,4	993,8	-2,49138	4,14362	3,42E-005	0,015881	
21	XP_002074653	GK23051 [Drosophila willistoni]	881,4	159,4	-2,46679	4,91516	8,87E-007	0,000687	
22	ACD63051	heat shock protein 70B [Exorista civilis]	1078,3	197,6	-2,44791	6,06468	1,32E-009	3,07E-006	
23	XP_001356583	GA10160 [Drosophila pseudoobscura pseudoobscura]	1303,2	239,5	-2,44407	4,0589	4,93E-005	0,021647	
24	ACN69123	Arc2-PA [Stomoxys calcitrans]	2147,9	414,1	-2,37501	5,95599	2,58E-009	5,25E-006	
25	XP_001996031	GH14272 [Drosophila grimshawi]	401,77	80,2	-2,32477	4,61718	3,89E-006	0,00253	
26	XP_320076	AGAP009281-PA [Anopheles gambiae str. PEST]	148,58	32,63	-2,18699	4,76684	1,87E-006	0,001323	
27	XP_002066762	GK24383 [Drosophila willistoni]	545,46	122,2	-2,15777	5,11107	3,20E-007	0,000289	
28	XP_002065996	GK21163 [Drosophila willistoni]	2580,1	579,7	-2,15403	5,64294	1,67E-008	2,47E-005	
29	AEC12188	heat shock protein 70 [Liriomyza huidobrensis]	17327	4014	-2,10976	4,96392	6,91E-007	0,000562	
30	XP_317106	AGAP008350-PA [Anopheles gambiae str. PEST]	1422,1	354,7	-2,0035	3,82264	0,000132	0,04332	
31	YP_001152205	ORF58e [Pinus koraiensis]	1475,3	415,9	-1,82669	3,86184	0,000113	0,038931	
32	XP_002030737	GM24419 [Drosophila sechellia]	28512	8157	-1,80541	4,85002	1,23E-006	0,000912	
33	XP_002052824	GJ19766 [Drosophila virilis]	650,55	196,5	-1,72736	4,30952	1,64E-005	0,008313	
34	XP_001961618	GF15059 [Drosophila ananassae]	963,44	297,4	-1,69588	4,03671	5,42E-005	0,021919	
35	ADO24530	heat shock protein 70 BD3 [Bactrocera dorsalis]	9136,8	2854	-1,6788	4,5321	5,84E-006	0,003391	
36	CAI44197	putative heat shock protein 70 [Bactrocera oleae]	10293	3280	-1,64988	4,45989	8,20E-006	0,004597	
37	YP_004278174	hypothetical protein AGROH133_04797 [Agrobacterium sp. H13-3]	3789	1227	-1,62661	3,86467	0,000111	0,038931	
38	NP_609883	CG10211 [Drosophila melanogaster]	1717,1	565,9	-1,60131	3,82043	0,000133	0,04332	
39	XP_001974380	GG21118 [Drosophila erecta]	1480,9	488,5	-1,59991	3,83472	0,000126	0,042581	
40	XP_001356443	GA18037 [Drosophila pseudoobscura pseudoobscura]	697,2	250	-1,47936	3,80253	0,000143	0,045661	

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ- ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ PEPTIDOMICS

Τα αποτελέσματα της πεπτιδομικής ανάλυσης που προέκυψαν από την σύγκριση των πεπτιδίων του εντόμου *B. oleae* με τα δεδομένα της *Drosophila* παρουσιάζονται αναλυτικά παρακάτω. Στον Πίνακα 1 παρουσιάζονται οι πρωτεΐνες που εκφράζονται μόνο στα αρσενικά άτομα. Αντίστοιχα, στον Πίνακα 2 είναι τα αποτελέσματα της ανάλυσης των πεπτιδίων και που εκφράζονται μόνο στα θηλυκά έντομα.

Πίνακας 1: Οι πρωτεΐνες που εντοπίστηκαν από την πεπτιδομική ανάλυση του αναπαραγωγικού συστήματος των αρσενικών ατόμων δάκου.

<i>Batrocera oleae</i> Male blast to <i>Drosophila</i>			
	Protein hits	Gene Name	Male specific
1	G3P2	<i>Gapdh2</i>	
2	ALF	<i>Ald</i>	
3	MOCOS	<i>Mal</i>	
4	ATTC	<i>AttC</i>	
5	TRPCG	<i>Trpm</i>	*
6	LOLA5	<i>Lola</i>	*
7	KCC2A	<i>CaMKII</i>	*
8	GALT7	<i>GalNAc-T2</i>	*
9	H2B	<i>Histone H2B</i>	
10	GCSH	<i>Gclc</i>	
11	LIP3	<i>Lip3</i>	

Πίνακας 2: Οι πρωτεΐνες που εντοπίστηκαν από την πεπτιδομική ανάλυση του αναπαραγωγικού συστήματος θηλυκών ατόμων δάκου.

<i>Batrocera oleae</i> Female blast to <i>Drosophila</i>											
	Peptide	Gene Name	Female specific		Peptide	Gene Name	Female specific		Peptide	Gene Name	Female specific
1	TITIN	<i>sls</i>		192	MED13			383	DM7A	<i>GG19680</i>	
2	ASH1	<i>ash1</i>		193	C4G15	<i>Cyp4g15</i>		384	ENO		
3	RBGPR	<i>rab3-GAP</i>		194	GTPC1	<i>anon-35F/36A</i>		385	DOP1		
4	OR35A	<i>Or35a</i>		195	CLSPN	<i>CG32251</i>		386	CCNB		
5	SYEP	<i>Aats-glupro</i>		196	ACT3	<i>Act57B</i>		387	OR33A		
6	PUR2	<i>ade3</i>		197	BCL9	<i>lgs</i>		388	RPB2		
7	NU301	<i>E(bx)</i>		198	DGK2	<i>rdgA</i>		389	RN	<i>rn</i>	
8	CDGAP			199	XPC			390	SET1		
9	POE	<i>poe</i>		200	HH			391	EGFR	<i>Egfr</i>	*
10	PUR4	<i>ade2</i>		201	NRT			392	MED19		
11	PCX	<i>pcx</i>		202	RG92B			393	CARM1	<i>Art4</i>	
12	ZFY26	<i>CG5270</i>		203	RENT1			394	NCDN	<i>Neurochondrin</i>	
13	CPN	<i>Cpn</i>		204	NIPB	<i>Nipped-B</i>		395	ABL	<i>Abl</i>	
14	RS3A	<i>RpS3A</i>		205	UGGG			396	DPOLA		
15	CLH	<i>Chc</i>	*	206	HR38			397	RPA1	<i>Rp11</i>	
16	DYHC	<i>Dhc64C</i>		207	XPF			398	BOYB		

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ- ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ PEPTIDOMICS

17	SDK	<i>sdk</i>		208	CI	<i>ci</i>		399	PURA		
18	FAM21	<i>CG16742</i>		209	PNO1	<i>l(1)G0004</i>		400	ATNA		
19	RGS	<i>loco</i>		210	ARP8	<i>Arp8</i>		401	KPC4		
20	PHP	<i>ph-p</i>	*	211	Y7065	<i>CG7065</i>		402	ZGPAT	<i>G117578</i>	
21	PYR1	<i>r</i>		212	DAAF1	<i>dtr</i>		403	RS17		
22	MCTS1	<i>MCTS1</i>		213	ENOPH			404	SPIR	<i>spir</i>	
23	SIF1	<i>sif</i>		214	RUVB2			405	SCNA		
24	BRM	<i>brm</i>		215	PDFR	<i>Pdfr</i>		406	GSTT5		
25	FRY	<i>frf</i>		216	NCASE			407	TACHY		
26	KIBRA	<i>Kibra</i>		217	RY44			408	RM41		
27	ANKHM	<i>mask</i>		218	SODC			409	SERB		
28	CTBP	<i>CtBP</i>		219	DEF18			410	Y2138		
29	SPNE	<i>spn</i>		220	KINH			411	SCN60	<i>NaCP60E</i>	
30	NOTCH	<i>N</i>		221	Y8611			412	SUCA	<i>Scsalpha</i>	
31	IF5	<i>elF5</i>		222	DRI	<i>retn</i>		413	CADN2	<i>CadN2</i>	
32	MICAL	<i>Mical</i>		223	PATJ	<i>Patj</i>		414	NUDEL		
33	STRUM	<i>CG12272</i>		224	RAD54	<i>okr</i>		415	TTL3A	<i>TTL3A</i>	
34	MED12	<i>kto</i>		225	RPB1			416	SUS	<i>su(s)</i>	
35	Y1505	<i>CG11505</i>		226	7LESS			417	I28UP		
36	GTR3	<i>Glut3</i>		227	CWC22	<i>ncm</i>		418	RRP1		
37	VIR	<i>vir</i>		228	RL7A	<i>RpL7A</i>		419	LOZEN	<i>lz</i>	*
38	DCO	<i>dco</i>		229	SERC	<i>CG11899</i>		420	ECM29	<i>CG8858</i>	
39	MBN	<i>l(3)mbn</i>		230	HMDH	<i>Hmgcr</i>		421	DEC12		
40	TRX	<i>trx</i>		231	CAD87			422	COG6	<i>CG1968</i>	
41	AFF4	<i>lilli</i>		232	ASPG1			423	NONA		
42	HIW	<i>hiw</i>		233	CP134	<i>Cyp313a4</i>		424	CACT	<i>cact</i>	
43	DSCL	<i>Dscam2</i>		234	NAB			425	NELFE	<i>Nelf-E</i>	
44	CH60	<i>Hsp60</i>		235	TOR			426	PARP		
45	DOM	<i>dom</i>		236	RSSA			427	SYQ		
46	NBEA	<i>rg</i>		237	MTDC			428	GAGY	<i>gag</i>	
47	GUF1			238	PLK4			429	SO		
48	MSH6	<i>Msh6</i>		239	OAT	<i>Oat</i>		430	VMA21		
49	OSA	<i>osa</i>		240	MTA70	<i>lme4</i>		431	WDR48	<i>GH21936</i>	
50	PUM	<i>pum</i>		241	FUR2			432	NCKX		
51	KLP68	<i>Klp68D</i>		242	NDST	<i>sfl</i>		433	GSBN	<i>gsb-n</i>	
52	USH	<i>ush</i>		243	KELC	<i>kel</i>		434	SUH	<i>Su(H)</i>	
53	MESH	<i>mesh</i>		244	SUV42			435	COX5A		
54	G3P1	<i>Gapdh1</i>		245	WARTS	<i>wtg</i>		436	CP190	<i>Cp190</i>	
55	FUSIL			246	HSP7E	<i>Hsc70-5</i>		437	E75BB		
56	IPPK	<i>lpk1</i>		247	SICK	<i>sick</i>		438	FYV1	<i>fab1</i>	
57	HEAT1			248	MYS9	<i>jar</i>		439	TNKS	<i>Tnks</i>	
58	A6	<i>a6</i>		249	PNUT			440	DOS		
59	YEMA	<i>yemalpha</i>		250	LDH	<i>ImpL3</i>		441	KRHI	<i>Kr-h1</i>	

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ- ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ PEPTIDOMICS

60	MS57A	<i>Mst57Da</i>		251	ATRX	<i>XNP</i>	442	E78C	<i>Eip78C</i>	*
61	SPEN	<i>spen</i>		252	NCD	<i>ncd</i>	443	FBP1		
62	IHOG	<i>iHog</i>		253	RGA	<i>Rga</i>	444	TIP60	<i>Tip60</i>	
63	UMPS	<i>r-l</i>		254	C5210	<i>CG5210</i>	445	TAD2A		
64	MED15	<i>MED15</i>		255	MED23	<i>MED23</i>	446	POLR	<i>pol</i>	
65	KPC2	<i>inaC</i>		256	Y0915	<i>CG10915</i>	447	PRP39	<i>CG1646</i>	
66	MED1	<i>MED1</i>		257	CUP	<i>cup</i>	448	ST7		
67	GATC	<i>GF19721</i>		258	CHN	<i>chn</i>	449	IAP2	<i>Iap2</i>	
68	GLT10			259	EAF		450	TM2D2		
69	Y5521	<i>CG5521</i>		260	C3G	<i>C3G</i>	451	CAC1A		
70	TENA	<i>Ten-a</i>		261	AIMP2	<i>CG12304</i>	452	PTP61		
71	RTXE			262	CEP78		453	Y2199	<i>CG2199</i>	
72	C28C1			263	SPRI	<i>spri</i>	454	RL8		
73	IMDH	<i>ras</i>		264	MSL1		455	BROWN		
74	ASP	<i>asp</i>		265	DDRKG		456	CAPON	<i>CG42673</i>	
75	SLE	<i>sle</i>		266	SNMP2		457	PSMD5		
76	WAPL	<i>wapl</i>		267	NU153	<i>Nup153</i>	458	RPAP2	<i>CG34183</i>	
77	CPSF1	<i>Cpsf160</i>		268	NUBP1	<i>GL18780</i>	459	A32CD		
78	SKEL2	<i>Skeletor</i>		269	MILT		460	GLT25		
79	VNNL3	<i>CG32750</i>		270	BCAS3	<i>rudhira</i>	461	STNB	<i>stnB</i>	
80	LAMA	<i>lama</i>		271	CH36		462	CH18		
81	PDE6	<i>Pde6</i>		272	FBRL	<i>Fib</i>	463	NUTC		
82	TAF1	<i>Taf1</i>		273	CUP8		464	U202	<i>l(1)G0020</i>	
83	DOT1L	<i>gpp</i>		274	LIP1	<i>Lip1</i>	465	SPT6H		
84	RTBS	<i>RTase</i>		275	MYSN	<i>zip</i>	466	GTPBA		
85	HR4	<i>Hr4</i>		276	TGT		467	CPSF6		
86	COG1			277	EXOC5		468	SGPL		
87	DYN			278	RL19	<i>RpL19</i>	469	SOSSB	<i>CG5181</i>	
88	BICC	<i>BicC</i>	*	279	41		470	RETM	<i>retm</i>	
89	NAA25	<i>psidin</i>		280	DDX51		471	CP4E5	<i>Cyp4e5</i>	
90	ITPR	<i>Itp-r83A</i>		281	FDL		472	CP6T1		
91	EXPA			282	NUBP1	<i>GG22765</i>	473	IMPE2	<i>ImpE2</i>	
92	TM131	<i>CG8370</i>		283	MAM		474	SETB1		
93	MCM5	<i>Mcm5</i>		284	LIG	<i>lig</i>	475	ABRU		
94	RM10			285	SBNO	<i>sno</i>	476	FEN1		
95	CO4A1	<i>Cg25C</i>		286	UNPG	<i>unpg</i>	477	EFR3		
96	CTU2	<i>GF15629</i>		287	CCNA	<i>CycA</i>	478	KGP24	<i>for</i>	
97	AQP	<i>Drip</i>		288	CAD86	<i>Cad86C</i>	479	IRS1		
98	UFL1	<i>GL22034</i>		289	TGO1	<i>Tango1</i>	480	CF2		
99	GAWKY	<i>gw</i>		290	TTKA	<i>ttk</i>	481	KTU		
100	PROS	<i>pros</i>		291	DYIN		482	SMAL1		
101	SNMP1	<i>Snp1</i>		292	RSMB	<i>SmB</i>	483	RME6		
102	RHDF1	<i>rho-5</i>		293	CRB	<i>crb</i>	484	RDX	<i>rdx</i>	

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ- ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ PEPTIDOMICS

103	TTF2	<i>lds</i>		294	Y9776	<i>CG9776</i>		485	POXM		
104	GLD2A	<i>Gld2</i>		295	ELBOW	<i>elB</i>		486	FACE2		
105	STUM	<i>stum</i>		296	CP4P1	<i>Cyp4p1</i>		487	CP317		
106	ARM	<i>arm</i>		297	NUPL1			488	ANLN	<i>scra</i>	
107	MMS22	<i>CG14803</i>		298	MED30	<i>MED30</i>		489	DAN	<i>dan</i>	
108	FACR1			299	MON2	<i>mon2</i>		490	STC	<i>stc</i>	
109	GR61A	<i>Gr61a</i>		300	OR98A			491	MTNA		
110	SAYP	<i>e(y)3</i>		301	T23O			492	DDX1		
111	HEM	<i>Hem</i>		302	HYD			493	KNIR		
112	NKD	<i>nkd</i>		303	M3KSL	<i>slpr</i>		494	ATPB		
113	HANG	<i>hang</i>		304	SMG9	<i>CG3857</i>		495	TCPG	<i>Cctgamma</i>	
114	MODU			305	AJUBA			496	COX1		
115	EI3F2	<i>elF3-S5-2</i>		306	PTRO	<i>Patronin</i>		497	CATA		
116	L2AM			307	GATC	<i>G117406</i>		498	OR7A		
117	CAZ	<i>caz</i>		308	PICAL			499	OLA1	<i>CG1354</i>	
118	RRF2M	<i>EF-G2</i>		309	PIGE	<i>pigeon</i>		500	FRITZ	<i>frtz</i>	
119	NPLP1	<i>Nplp1</i>		310	Y5098			501	SIM	<i>sim</i>	
120	TCPA	<i>T-cp1</i>		311	TFB1M	<i>mtTFB1</i>		502	S35B4		
121	SUZ2	<i>Su(z)2</i>		312	DCUP			503	UBPE		
122	CITC			313	LIAS			504	NUBP1	<i>GE12759</i>	
123	U586			314	MPND			505	GD		
124	CCAPR	<i>CCAP-R</i>		315	OSM1			506	FCP3C	<i>Fcp3C</i>	
125	FLNA	<i>cher</i>		316	E75BA	<i>Eip75B</i>	*	507	RBP16	<i>Ranbp16</i>	
126	INAD	<i>inaD</i>		317	PEN			508	PPN		
127	CP9F2	<i>Cyp9f2</i>		318	GEN			509	TNG2		
128	SMD3	<i>SmD3</i>		319	EXOC2			510	PCKG	<i>Pepck</i>	
129	ECR	<i>EcR</i>	*	320	AMAL			511	MSL2		
130	PAX6	<i>ey</i>		321	ICE2			512	CA131		
131	FAF	<i>faf</i>		322	GLT			513	HFW1	<i>hfw</i>	
132	SPC25	<i>Spc25</i>		323	TWF	<i>twf</i>		514	RL24		
133	LIMK1	<i>LIMK1</i>		324	SRRT			515	MYSA		
134	DMDA	<i>Dys</i>		325	RL22			516	NU214		
135	RM45	<i>mRpL45</i>		326	CAND1			517	KCNAW	<i>Shaw</i>	
136	TUD	<i>tud</i>		327	PCAT1	<i>CG32699</i>		518	PGSB2		
137	ROP	<i>Rop</i>		328	INSR			519	TRM71	<i>CG5220</i>	
138	LIN54	<i>mip120</i>		329	DEL			520	C4D14		
139	2AAA	<i>Pp2A-29B</i>		330	VNNL1	<i>CG32754</i>		521	GCY3E		
140	UFL1	<i>CG1104</i>		331	TENM			522	DOPR2		
141	CDKAL	<i>GAI9679</i>		332	L2GL			523	NHK1		
142	PIPA	<i>norpA</i>		333	DAAF5			524	GALT5	<i>pgant5</i>	
143	PTK7	<i>otk</i>		334	DANR	<i>danr</i>		525	DISC	<i>disco</i>	
144	WDY	<i>WDY</i>		335	EXT3	<i>botv</i>		526	UFSP2		
145	MIRO	<i>Miro</i>		336	TNG11			527	VASA2		

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ- ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ PEPTIDOMICS

146	TRA1	<i>nipped a</i>		337	CCNT	<i>CycT</i>	528	LTN1		
147	GCL	<i>gcl</i>		338	UTP18	<i>wcd</i>	529	FGFR2		
148	RFC1	<i>Gnfl</i>		339	CP302	<i>dib</i>	530	MDR65	<i>Mdr65</i>	
149	SMG1	<i>nonC</i>		340	TFP8L	<i>CG4091</i>	531	EXOC7	<i>exo70</i>	
150	MED24	<i>MED24</i>		341	LPHN	<i>Cirl</i>	532	INO80		
151	NDUS1	<i>ND75</i>		342	COPB2		533	BCCIP		
152	RL13A			343	ATPA		534	CTNA	<i>alpha-Cat</i>	
153	WNT4	<i>Wnt4</i>		344	BRC4	<i>br</i>	535	MYO7A		
154	ASX	<i>Asx</i>		345	DNL1	<i>DNA-ligl</i>	536	COQ10		
155	ATX2	<i>Atx2</i>		346	ADH		537	MTH1	<i>mth1</i>	
156	WHITE	<i>w</i>		347	PYRD		538	SLOB		
157	STAN	<i>stan</i>		348	COQ4	<i>GL15483</i>	539	TTC30	<i>CG5142</i>	
158	NUMB	<i>numb</i>		349	VPS54		540	CSW		
159	NO66	<i>GMI2339</i>		350	TMTC1		541	ELP1	<i>Elp1</i>	
160	STAU	<i>stau</i>		351	ZASP	<i>Zasp52</i>	542	LAP4	<i>scrib</i>	
161	DDX41			352	MLE	<i>mle</i>	543	ELP3	<i>Elp3</i>	
162	TPC13			353	CAHD1		544	TONSL	<i>CG7457</i>	
163	SWS			354	GALT2	<i>pgant2</i>	545	GLD2B	<i>wisp</i>	*
164	LASP1			355	NSF2		546	A37C	<i>anon-37Cs</i>	
165	SRP	<i>srp</i>		356	TOP2	<i>Top2</i>	547	CH19		
166	ASNA			357	RAGP1		548	HUNB		
167	SIR2			358	UZIP		549	RTJK		
168	MIC60			359	TEF	<i>tef</i>	550	LVA		
169	SETD8			360	RAD50		551	CNN		
170	TRR	<i>trr</i>		361	CLCN2	<i>CIC-a</i>	552	NFT1		
171	ELF1	<i>grh</i>		362	VINC		553	OR56A		
172	COPG			363	RS11		554	PSA1		
173	EYS	<i>eys</i>		364	CTU1	<i>GL16852</i>	555	FMAR	<i>FR</i>	
174	KCNAB	<i>Shab</i>		365	RL23	<i>RpL23</i>	556	SOYB	<i>SoYb</i>	
175	PER	<i>per</i>		366	PERC	<i>Pxt</i>	557	C12B2	<i>Cyp12b2</i>	
176	MVL			367	CLU	<i>clu</i>	558	CK5P3		
177	RNO	<i>rno</i>		368	CUT		559	XDH	<i>ry</i>	
178	UNC80			369	FRIZ4	<i>fz4</i>	560	NUP88	<i>mbo</i>	
179	EWG	<i>ewg</i>		370	PUR6		561	TWIST		
180	TINC			371	FAU		562	SINA	<i>sina</i>	
181	COS	<i>cos</i>		372	DDB1	<i>pic</i>	563	F206		
182	FOSL			373	PYGO	<i>pygo</i>	564	RRP1L	<i>Nnp-1</i>	
183	NADE	<i>CG9940</i>		374	MED8		565	DKC1	<i>Nop60B</i>	
184	SUR	<i>Sur</i>		375	BOULE		566	MOCS3	<i>CG13090</i>	
185	DPOD1	<i>DNApol-delta</i>		376	DGKH	<i>GG14241</i>	567	GTR1	<i>Glut1</i>	
186	OB28A			377	NCBP1		568	TULP		
187	EIF3A			378	ABDA		569	OR33B	<i>Or33b</i>	
188	TIG	<i>Tig</i>		379	ASUN		570	MECR		

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ- ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ PEPTIDOMICS

189	RM51			380	C28A5	<i>Cyp28a5</i>		571	RIG		
190	NMDA1			381	CYA1			572	BSCL2		
191	EFGM	<i>ico</i>		382	WECH			573	NFU1		

1. SAGE (Serial Analysis of Gene Expression)

Διάφορες μέθοδοι είναι πλέον διαθέσιμοι για τον έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης σε μεγάλη κλίμακα. Ανάμεσά τους είναι η τεχνική των μικροσυστοιχιών (De Risi et al., 1997; Wodicka et al., 1997) και μακροσυστοιχιών (Gress et al., 1992; Pietu et al., 1996), ο καθορισμός ετικετών εκφραζόμενων αλληλουχιών (Expressed Sequence Tags, ESTs) (Adams et al., 1995; Okubo et al., 1992) και η σειριακή ανάλυση γονιδιακής έκφρασης (Serial Analysis of Gene Expression, SAGE) (Velculescu et al., 1995). Η τεχνική SAGE (Serial Analysis of Gene Expression: Σειριακή Ανάλυση Γονιδιακής Έκφρασης) (Velculescu et al. 1995) είναι μια μέθοδος ανάλυσης της γονιδιακής έκφρασης σε μεγάλη κλίμακα, που έχει τη δυνατότητα να καθορίσει τα σχετικά επίπεδα όλων των μεταγράφων σε ένα κυτταρικό πληθυσμό. Έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία σε οργανισμούς όπως ο *Saccharomyces cerevisiae* (Velculescu et al. 1997), *Cryptococcus neoformans* (Steen et al. 2002), *Caenorhabditis elegans* (Jones et al. 2001), *Drosophila melanogaster* (Jasper et al. 2001; Fujii and Amrein 2002; Gorski et al. 2003), *Rattus norvegicus* (Madden et al. 1997), *Mus musculus* (Virilon et al. 1999) και *Homo sapiens* (Velculescu et al. 1999). Πρακτικά, καθορίζεται η αλληλουχία μικρών ετικετών μεταγράφων (SAGE tags), έτσι ώστε η αφθονία ενός mRNA να συνάγεται μετρώντας πόσες φορές εκπροσωπείται το mRNA αυτό στο δείγμα. Όμως με τη μέθοδο SAGE και τα παράγωγά της, μια αντίδραση αλληλούχισης αντί να αφιερώνεται στον εντοπισμό ενός μόνο mRNA επιτρέπει τον εντοπισμό μέχρι και 50 μορίων mRNA. Σε αντίθεση με τις μικροσυστοιχίες, η μέθοδος SAGE δεν απαιτεί την πρότερη γνώση των μεταγράφων. Έτσι, μπορεί να παρέχει μια ολοκληρωμένη εικόνα της ποικιλομορφίας και αφθονίας των μεταγράφων σε ένα κύτταρο ή ιστό. Είναι μέθοδος που μπορεί να εφαρμοστεί σε οργανισμούς χωρίς αναπτυγμένα μοριακά και γενετικά εργαλεία, καθώς επίσης και σε εργαστηριακούς χώρους με βασικές υποδομές μοριακής και κυτταρικής βιολογίας. Τα δύο αυτά στοιχεία ήταν από τους βασικούς λόγους που μας οδήγησαν στην επιλογή της προσέγγισης αυτής.

Η σειριακή ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης (SAGE, Serial Analysis of Gene Expression) προσφέρεται κυρίως για την μελέτη των προτύπων γονιδιακής έκφρασης, υπό διαφορετικές πειραματικές συνθήκες σε μία ποικιλία κυτταρικών τύπων. Αποτελεί ένα χρήσιμο εργαλείο για την ανάλυση και σύγκριση μεταγραφωμάτων, χωρίς να απαιτεί πρότερη γνώση της αλληλουχίας των γονιδίων που εξετάζονται. Από την πρώτη περιγραφή της μεθόδου έως σήμερα, η SAGE έχει βρει εφαρμογή σε ένα μεγάλο εύρος πειραματικών ερευνών που ποικίλει από τη μελέτη του καρκίνου έως τη μελέτη της ανάπτυξης των μικροοργανισμών. Η τεχνική βασίζεται στον προσδιορισμό της αφθονίας ενός mRNA που συνάγεται μετρώντας πόσες φορές εκπροσωπείται σε ένα δείγμα και μία αντίδραση αλληλούχισης και επιτρέπει τον εντοπισμό έως και 50 μορίων mRNA (Watson, 2007; Vilain et al., 2003). Η SAGE στοχεύει στον εντοπισμό νέων γονιδίων και εξονίων και δεν περιλαμβάνει τη διαδικασία του υβριδισμού που μπορεί να οδηγήσει σε ψευδώς θετικά ή αρνητικά αποτελέσματα. Παρόλα αυτά η χρήση της χαρακτηρίζεται από ορισμένους περιορισμούς όπως το υψηλό κόστος, τις μεγάλες χρονικές απαιτήσεις, την παραγωγή αποτελεσμάτων με μειωμένη αξιοπιστία και τη μεγάλη ποσότητα αρχικού πολυαδενυλιωμένου RNA (2,5-5μg) που απαιτείται (Grskovic, Ramalho-Santos, 2008). Πολλά από τα μειονεκτήματα της SAGE έχουν αντιμετωπισθεί μέσω ποικίλων τροποποιήσεων στο βασικό πρωτόκολλο. Οι σημαντικότερες από αυτές στοχεύουν στη μείωση της αρχικής ποσότητας RNA. Σημαντικές τροποποιήσεις αποτελούν η PCR-SAGE, η SAGE Lite, η SAR-SAGE (Small Amplified RNA-SAGE), η SADE (a SAGE Adaptation for Downsized Extracts), η micro SAGE, η super SAGE και η long SAGE.

2. PCR-SAGE

Η PCR-SAGE αποτελεί μια τροποποίηση του αρχικού πρωτόκολλου της SAGE που δίνει τη δυνατότητα χαρακτηρισμού της γονιδιακής έκφρασης από κύτταρα που είναι διαθέσιμα σε περιορισμένο αριθμό, καθώς μειώνει την απαιτούμενη ποσότητα του αρχικού υλικού στα 900pg πολυαδενυλιωμένου RNA. Αρχικά, η

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ- SAGE

σύνθεση της πρώτης αλυσίδας του cDNA γίνεται με τη χρήση ενός oligo-dT εκκινητή, ο οποίος υβριδοποιείται στην poly-A ουρά του mRNA. Η σύνθεση του cDNA ολοκληρώνεται με την προσθήκη μιας μικρής αλληλουχίας επαναλαμβανόμενων κυτοσινών στο 5' άκρο του μορίου. Το τμήμα αυτό υβριδοποιείται με ένα ολιγονουκλεοτίδιο που περιέχει μια μικρή αλληλουχία επαναλαμβανόμενων γουανινών και μια θέση αναγνώρισης του ενζύμου περιορισμού SapI. Μετά την ολοκλήρωση της σύνθεσης του μορίου cDNA και οι δύο αλυσίδες έχουν όμοια 3' άκρα, γεγονός που επιτρέπει την ενίσχυση PCR με έναν εκκινητή. Με τη χρήση ενός βιοτινυλωμένου εκκινητή μια ομάδα βιοτίνης συνδέεται στα άκρα του μορίου. Μετά από τη δράση του ενζύμου περιορισμού η ομάδα της βιοτίνης απομακρύνεται από το 5' άκρο. Τα ενισχυμένα μόρια που προκύπτουν χρησιμοποιούνται για την εφαρμογή της SAGE (Neilson et al, 2000).

3. SAGE Lite

Η SAGE-Lite, αποτελεί μια ακόμη τροποποίηση που απαιτεί λιγότερο αρχικό υλικό (50ng συνολικού RNA) και επιτρέπει την ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης σε δείγματα που αποτελούνται από πολύ μικρές ποσότητες ιστών ή καλλιεργούμενων κυττάρων. Η προσέγγιση είναι παρόμοια με αυτή της PCR-SAGE. Η μέθοδος βασίζεται στην δραστηριότητα μεταφοράς πολύ (C) τελικού τμήματος, της αντίστροφης μεταγραφάσης και στην ικανότητά της να αλλάζει εκμαγείο κατά τη διάρκεια του πολυμερισμού του DNA. Η σύνθεση της πρώτης αλυσίδας του cDNA πραγματοποιείται με τη χρήση ενός oligo-dT εκκινητή, παρουσία ενός δεύτερου ολιγονουκλεοτιδίου «αλλαγής εκμαγείου» (TS oligo). Το ολιγονουκλεοτίδιο έχει μια poly-G αλληλουχία στο 3' άκρο του και υβριδοποιείται με το poly-G άκρο που δημιουργήθηκε από την αντίστροφη μεταγραφάση. Το ένζυμο αυτό αλλάζει συνεχώς εκμαγείο και προσθέτει στα νεοσυντιθέμενα 3' άκρα, TS ολιγονουκλεοτίδια. Έτσι, κάθε πρώτη αλυσίδα του cDNA που παράγεται περιέχει μια κοινή αλληλουχία στο 3' άκρο της. Η αλυσίδα αυτή ενισχύεται με PCR με τη χρήση oligo-dT και TS εκκινητών. Ομοίως με την PCR-SAGE, γίνεται χρήση βιοτινυλωμένων εκκινητών και πέψη με ένζυμο περιορισμού, έτσι ώστε να προκύψει το βιοτινυλωμένο 5' άκρο που απαιτείται για τη σύνδεση στα σφαιρίδια, σε επόμενο στάδιο. Η παραπάνω ενίσχυση οδηγεί στη δημιουργία βιβλιοθηκών που αποτελούνται από μόρια cDNA μήκους μεταξύ 500-6000 bp (Peters et al, 1999).

4. Small amplified RNA-SAGE

Η συγκεκριμένη τροποποίηση στοχεύει στη μείωση της απαιτούμενης ποσότητας του αρχικού RNA στα 50ng, χωρίς να περιλαμβάνει επιπλέον στάδια PCR ενίσχυσης. Το πρωτόκολλο αυτό περιλαμβάνει επιπρόσθετους κύκλους ενίσχυσης του mRNA. Αρχικά, τα πολυαδενυλιωμένα mRNA συνδέονται σε σφαιρίδια με βάση την poly-A ουρά, μετατρέπονται σε cDNA με την αντίστροφη μεταγραφή και ακολουθεί πέψη με το ένζυμο περιορισμού NlaIII. Σε αυτό σημείο, συνδέεται ένα μόριο προσαρμογέας (adaptor) στο cDNA που έχει κοπή με το ένζυμο NlaIII, το οποίο περιέχει τη θέση σύνδεσης του ενζύμου T7 RNA πολυμεράση. Από τη δράση του ενζύμου αυτού προκύπτουν τμήματα RNA που θα συνδεθούν εκ νέου σε σφαιρίδια για να ακολουθήσει το κλασσικό πρωτόκολλο της SAGE (Vilain et al, 2003).

5. SADE (SAGE Adaptation For Downsized Extracts)

Το τροποποιημένο πρωτόκολλο της SAGE οδηγεί στη μείωση της ποσότητας του αρχικού RNA, μέσω της μείωσης της απώλειας υλικού κατά τη διάρκεια του πειράματος. Σε σύγκριση με το κλασσικό πρωτόκολλο της SAGE, η SADE παρέχει 4 φορές μεγαλύτερη ποσότητα cDNA και 400 φορές μεγαλύτερη απόδοση μετά το

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ- SAGE

στάδιο της πέψης του cDNA με το ένζυμο αγκυροβόλησης. Η πρώτη βασική διαφοροποίηση πραγματοποιείται στο στάδιο απομόνωσης του mRNA. Το mRNA απομονώνεται απευθείας από τον ομογενοποιημένο ιστό μέσω oligo-dT τμημάτων που είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένα με μαγνητικά σφαιρίδια και η σύνθεση του cDNA ξεκινά αμέσως με τη χρήση βιοτινυλιωμένου oligo-dT εκκινητή. Επιπλέον, το ένζυμο περιορισμού NlaIII αντικαθίσταται από το ένζυμο Saw3AI, το οποίο αναγνωρίζει 4 βάσεις και από τη δράση του προκύπτουν τμήματα 256 βάσεων (4^4) περίπου. Τα 3' άκρα απομονώνονται με σφαιρίδια συζευγμένα με στρεπταβιδίνη και χωρίζονται σε δύο μέρη. Κάθε μέρος συνδέεται με ένα από τα δύο μόρια συνδέτες (linkers). Οι linkers έχουν από μια θέση αναγνώρισης ενός ενζύμου περιορισμού (BsmFI), μέσω της δράσης του οποίου απελευθερώνονται οι ετικέτες. Οι ετικέτες αποκτούν τυφλά άκρα μέσω της δράσης της T7 DNA πολυμεράσης και συνδέονται υπό την επίδραση μιας λιγάσης για να σχηματιστούν τμήματα DNA 110bp. Ακολουθεί καθαρισμός των τμημάτων με gel αгарόζης και ενίσχυση PCR. Τα ditags που περιέχονται στο προϊόν της PCR, καθαρίζονται και σχηματίζουν αλυσομερή (περίπου 350bp) τα οποία κλωνοποιούνται (Virlon et al, 1999).

6. micro SAGE

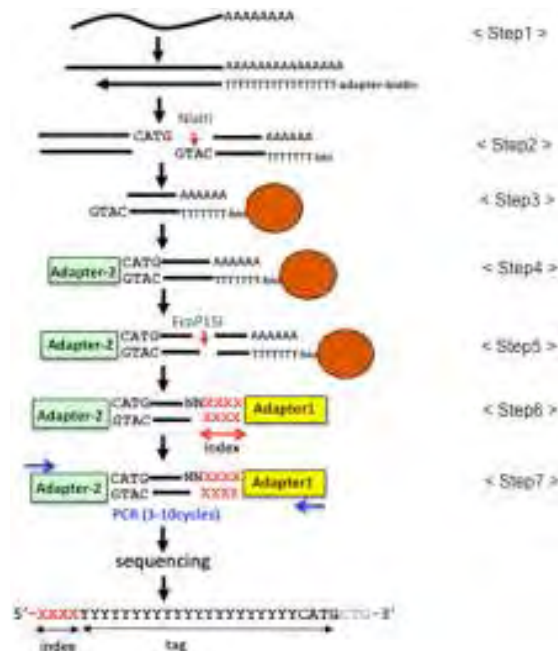
Οι τροποποιήσεις του βασικού πρωτοκόλλου της SAGE που περιλαμβάνονται στο πρωτόκολλο της micro SAGE μειώνουν την αρχική ποσότητα mRNA που απαιτείται στα 1-5ng. Η χρήση ενός μοναδικού tube σε περισσότερα από ένα στάδια κάνει την διαδικασία πιο εύκολη και μειώνει τις απώλειες υλικού που παρατηρούνται κατά τη διεξαγωγή της βασικής μεθόδου. Η πρώτη βασική διαφοροποίηση της μεθόδου αποτελεί η χρήση tubes που έχουν συνδεδεμένη στρεπταβιδίνη στα τοιχώματα τους. Έτσι, τα βιοτινυλιωμένα μόρια cDNA που προκύπτουν από την PCR ενίσχυση με βιοτινυλιωμένους oligo-dT εκκινητές ακινητοποιούνται στα τοιχώματα των tubes, όπου και πραγματοποιείται η σύνθεση του cDNA μορίου. Τα μόρια αυτά δεν εγκαταλείπουν τα αρχικά tubes έως το στάδιο της απελευθέρωσης των ετικετών, το οποίο πραγματοποιείται μέσω πέψης με το ένζυμο περιορισμού BsmFIII. Μία δεύτερη διαφοροποίηση που αυξάνει την ποσότητα των παραγόμενων ετικετών πραγματοποιείται στο στάδιο της ενίσχυσης των ditags. Ενώ στη SAGE πραγματοποιούνται 25-28 κύκλοι PCR, στη συγκεκριμένη προσαρμογή πραγματοποιούνται 28 κύκλοι PCR που ακολουθούνται από 8-15 κύκλους re-PCR (Datson et al, 1999).

7. Super SAGE

Το πρωτόκολλο της super SAGE παρέχει ετικέτες μεγαλύτερου μήκους μέσω της χρήσης διαφορετικού ενζύμου περιορισμού για την απελευθέρωση τους από τα μαγνητικά σφαιρίδια. Οι ετικέτες έχουν μήκος 26bp και η απόκτηση τους αυξάνει την απόδοση και την εγκυρότητα της μεθόδου. Η super SAGE μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση οργανισμών χωρίς να απαιτείται πρότερη γνώση της αλληλουχίας του DNA τους. Η βασική διαφορά της superSAGE είναι η χρήση ενός διαφορετικού ενζύμου περιορισμού για την απελευθέρωση των ετικετών από τα μαγνητικά σφαιρίδια. Το ένζυμο BsmFI αντικαθίσταται από το ένζυμο περιορισμού EcoP15I, το οποίο αναγνωρίζει μία αλληλουχία έξι νουκλεοτιδίων και κόβει το DNA 25 νουκλεοτιδία καθοδικά της αλληλουχίας αναγνώρισης στη μία αλυσίδα και 27 νουκλεοτιδία στην άλλη. Κατά αυτόν τον τρόπο προκύπτει ένα προεξέχον 5' άκρο μήκους 2 βάσεων. Επίσης, τυφλά άκρα δημιουργούνται από τη δράση της KOD πολυμεράσης (απομονώνεται από το αρχαίο *Thermococcus kodakaraensis*) και ακολουθεί η σύνδεση των ετικετών για την παραγωγή των ditags. Επιπλέον, οι linkers που χρησιμοποιούνται είναι σημασμένοι με τη χρωστική FITC. Τα παραγόμενα τμήματα μήκους περίπου 69bp (linker 42bp, ετικέτες 27bp)

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ- SAGE

διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου και οπτικοποιούνται μέσω του φθορισμού που εκπέμπει η χρωστική μετά από έκθεση σε ακτινοβολία UV (Matsumura et al., 2003) (Εικόνα Ι).



Εικόνα Ι: Μεθοδολογία της super SAGE

8. long SAGE

Πρόκειται για μία ακόμη προσαρμογή της SAGE που προσφέρει ετικέτες μεγαλύτερου μήκους (17-21bp). Η τεχνική αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης ενός ιστού ή κυτταρικού τύπου, την ταυτοποίηση νέων γονιδίων και τον χαρακτηρισμό μεταγραφωμάτων. Επιπλέον, αποτελεί χρήσιμο εργαλείο για τη μελέτη της γονιδιακής έκφρασης σε δείγματα που βρίσκονται σε φυσιολογική ή νοσηρή κατάσταση ή σε διάφορα αναπτυξιακά στάδια και την μεταξύ τους σύγκριση. Οι μεγαλύτερες ετικέτες αυξάνουν την αξιοπιστία της μεθόδου, επιτρέπουν την κλωνοποίηση ολόκληρης της αλληλουχίας στόχου και τον σχεδιασμό αποτελεσματικότερων PCR εκκινητών και ανιχνευτών υβριδοποίησης για περαιτέρω εφαρμογές μετά την απομόνωση του γονιδίου. Το αρχικό δείγμα RNA συνδέεται σε oligo-dT μαγνητικά σφαιρίδια και απομονώνεται το mRNA. Στη συνέχεια, πάνω στα μαγνητικά σφαιρίδια συντίθεται το δίκλωνο cDNA με τη χρήση δύο ενζύμων, μίας αντίστροφης μεταγραφάσης και μίας DNA πολυμεράσης. Ενώ, οι δύο ενζυμικές αντιδράσεις γίνονται στο ίδιο tube, μειώνοντας τις πιθανές απώλειες υλικού. Στη συνέχεια, τα παραγόμενα μόρια cDNA πέπτονται με το ένζυμο περιορισμού NlaIII και χωρίζονται σε δύο μέρη. Κάθε μέρος υφίσταται μία αντίδραση σύνδεσης με δύο διαφορετικά μόρια προσαρμογείς (adaptors). Τα μόρια αυτά περιέχουν ένα προεξέχον άκρο τεσσάρων βάσεων συμπληρωματικό με τα άκρα των cDNA μορίων που προέκυψαν από την δράση του ενζύμου NlaIII, μία αλληλουχία αναγνώρισης για το ένζυμο περιορισμού τύπου III, MmeI στο 3' άκρο και θέσεις υπεύθυνες για την εκκίνηση της ενίσχυσης PCR. Η χρήση αυτού του ενζύμου αποτελεί την κύρια διαφοροποίηση από το βασικό πρωτόκολλο της SAGE. Το MmeI συνδέεται στη θέση αναγνώρισης και

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ- SAGE

κόβει το cDNA περίπου 21bp καθοδικά από το μόριο προσαρμογέα, απελευθερώνοντας μία ετικέτα μήκους περίπου 60bp με ένα προεξέχον άκρο 2bp. Η ετικέτα αποτελείται από την αλληλουχία μήκους 40bp του μορίου προσαρμογέα και μία μοναδική αλληλουχία μήκους περίπου 21bp που προέρχεται από ένα μετάγραφο. Έπειτα, τα δύο μέρη ενώνονται και προκύπτουν διπλές ετικέτες (ditags) μήκους περίπου 130bp. Οι ditags ενισχύονται με συμπληρωματικούς εκκινητές με ειδικές αλληλουχίες των μορίων προσαρμογέων και υφίστανται πέψη με το ένζυμο NlaIII, έτσι ώστε να απελευθερωθούν ditags μήκους 34bp. Τα συγκεκριμένα μόρια αποτελούνται εξ ολοκλήρου από αλληλουχίες που αντιπροσωπεύουν το mRNA του δείγματος και απομονώνονται από τα μόρια προσαρμογείς μέσω ηλεκτροφόρησης σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου. Ακολουθεί σύνδεση των ditags για να σχηματιστούν τα αλυσομερή μήκους 500-800bp, τα οποία κλωνοποιούνται σε κατάλληλο φορέα. Κάθε μετάγραφο ταυτοποιείται από την μοναδική αλληλουχία των 17bp και ποσοτικοποιείται με βάση τις φορές που απαντάται στον πληθυσμό των κλώνων. Τέλος, τα δεδομένα αναλύονται από ένα ειδικό λογισμικό, το οποίο απομονώνει τις ετικέτες από τα αλυσομερή, καταγράφει την εμφάνιση κάθε ετικέτας και δημιουργεί μία αναφορά για κάθε μία από αυτές και την αφθονία της (I-SAGE™ LongKit).

9. Πρωτόκολλο SAGE

9.1 Απομόνωση RNA (TRIZOL)

Ως αρχικό υλικό χρησιμοποιείται RNA το οποίο απομονώνεται από κεφάλια αρσενικών και θηλυκών εντόμων *Bactrocera oleae*. Χρησιμοποιήθηκαν έντομα από τον εργαστηριακό πληθυσμό, και από τον ανθεκτικό στο εντομοκτόνο spinosad. Το πρωτόκολλο περιγράφεται αναλυτικά στο κεφάλαιο «Υλικά και μέθοδοι».

9.2 Σύνδεση του mRNA σε μαγνητικά σφαιρίδια

Το mRNA απομονώνεται από το ολικό RNA μέσω της σύνδεσης σε μαγνητικά σφαιρίδια τα οποία στην επιφάνεια τους έχουν συνδεδεμένα oligo-d(T) νουκλεοτίδια. Η σύνδεση πραγματοποιείται μέσω της υβριδοποίησης των oligo-d(T) νουκλεοτιδίων με την πολυ(A) ουρά των mRNA.

9.2.1 Υλικά

- Magnetic stand
- Dynal Oligo(dT) Magnetic Beads: 5 mg/ml in PBS containing 0.02% sodium azide
- Wash Buffer A: 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.15 M LiCl, 1 mM EDTA, 0.1% lithium dodecyl sulfate, 10 µg/ml glycogen
- Wash Buffer B: 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM LiCl, 1 mM EDTA, 10 µg/ml glycogen
- Lysis/Binding Buffer: 100 mM Tris-HCl, pH 7.5, 500 mM LiCl, 10 mM EDTA, 1% lithium dodecyl sulfate 5 mM DTT
- 1x First Strand Buffer: 50 mM Tris-HCl, pH 8.3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 µg/ml mussel glycogen

9.2.2 Μέθοδος

- Σε eppendorf προστίθενται 100µl oligo d(T) μαγνητικά σφαιρίδια και τοποθετείται πάνω σε magnetic stand για 1-2 λεπτά.
- Το υπερκείμενο απορρίπτεται και ακολουθεί πλύση με 500µl Lysis/Binding Buffer. Πραγματοποιείται ανάδευση με το χέρι για να γίνει αναδιάλυση των μαγνητικών σφαιριδίων στο buffer.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ- SAGE

- Το eppendorf τοποθετείται πάνω στο magnetic stand για 1-2 λεπτά και απορρίπτεται το υπερκείμενο. Συνολικά, οι πλύσεις επαναλαμβάνονται 2-5 φορές.
- Μετά την τελευταία πλύση τα μαγνητικά σφαιρίδια επαναδιαλύονται σε 200μl Lysis/Binding Buffer.
- Στο RNA (27μl) προστίθενται 473μl Lysis/Binding Buffer ώστε V_{τελ}: 500μl και τοποθετείται στο διάλυμα των μαγνητικών σφαιριδίων. Γίνεται ανάδευση και το δείγμα παραμένει σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά.
- Το eppendorf τοποθετείται πάνω στο magnetic stand για 1-2 λεπτά και το υπερκείμενο απορρίπτεται. Αρχικά, ακολουθεί πλύση με 300μl Wash Buffer A, όπως περιγράφεται παραπάνω και στη συνέχεια πραγματοποιείται πλύση με 300μl Wash Buffer B.
- Τέλος, πραγματοποιούνται τέσσερις πλύσεις με 200μl 1x First Strand Buffer. Μετά την τελευταία πλύση το υπερκείμενο απορρίπτεται λίγο πριν την αντίδραση σύνθεσης της 1^{ης} αλυσίδας του cDNA.

9.3 Σύνθεση cDNA

Η σύνθεση των cDNA μορίων γίνεται με μήτρα τα mRNA που είναι συνδεδεμένα στα μαγνητικά σφαιρίδια. Η αντίδραση καταλύεται με το ένζυμο SuperScript™ II Reverse Transcriptase (RT).

9.3.1 Υλικά

- Υδατόλουτρο στους 16°C, 37°C ή 42°C, και 75°C
- Πάγος
- Platinum® *Taq* DNA Polymerase
- Magnetic stand
- 5x First Strand Buffer: 250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂
- dNTP Mix (2.5 each) (BIOLINE)
- Buffer λυγάσης(NEB)
- 1x First Strand Buffer: 50 mM Tris-HCl, pH 8.3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 μg/ml mussel glycogen
- RNaseOUT™: 40 U/μl in: 20 mM Tris-HCl, pH 8, 50 mM KCl, 0.5 mM EDTA, 8 mM DTT, 50% glycerol (w/v)
- SuperScript™ II Reverse Transcriptase (RT): 200 U/μl in: 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.01% Nonidet-40 (v/v), 50% glycerol (w/v)
- 1x Buffer 4: 20 mM Tris-acetate, pH 7.9, 10 mM magnesium acetate, 50 mM potassium acetate, 1 mM DTT, 200 μg/ml BSA
- *E. coli* DNA Ligase (10u/μl) New England Biolabs
- *E. coli* DNA Polymerase (10u/μl) Fermentas
- *E. coli* RNase H(3u/μl)-Fermentas
- KCl 2M
- Ammonium sulfate 1M
- 0.5M EDTA
- Wash Buffer C: 5 mM Tris, pH 7.5, 0.5 mM EDTA, 1 M NaCl, 1% sodium dodecyl sulfate (SDS), 10 μg/ml mussel glycogen
- Wash Buffer D: 5 mM Tris, pH 7.5, 0.5 mM EDTA, 1 M NaCl, 200 μg/ml BSA

9.3.2 Μέθοδος

Σύνθεση 1^{ης} αλυσίδας cDNA

Προετοιμάζεται το mix της αντίδρασης ως εξής:

5x First Strand Buffer	18 μl
RNaseOUT™	1 μl
DEPCWater	50μl
dNTPMix (2.5 mM each)	18 μl
Τελικόςόγκος	87 μl

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ- SAGE

- Γίνεται επαναδιάλυση των μαγνητικών σφαιριδίων στο mix της αντίδρασης και ακολουθεί ανάδευση με το χέρι και επώαση στους 37° C για 2 λεπτά.
- Προστίθενται 3μl SuperScript™ II Reverse Transcriptase, το δείγμα αναδεύεται και ακολουθεί επώαση στους 42° C για μία ώρα όπου κάθε 15 λεπτά γίνεται ανάδευση με το χέρι.
- Η αντίδραση σταματάει με επώαση για 1 λεπτό στον πάγο.

Σύνθεση της 2^{ns} αλυσίδας cDNA

Προετοιμάζεται το mix της αντίδρασης ως εξής:

DEPC Water	455,75 μl
Buffer της λιγάσης	75,00μl
KCl 2M	33,75μl
Ammonium sulfate 1M	7,5μl
dNTP Mix (2.5 mM each)	60,0μl
<i>E. coli</i> DNA Ligase	5,0μl
<i>E. coli</i> DNA Polymerase	20,0μl
<i>E. coli</i> Rnase H	3,0μl
Τελικός όγκος	660 μl

- Το mix προστίθεται στο περιεχόμενο της προηγούμενης αντίδρασης (90μl) και η αντίδραση επώάζεται για 2 ώρες στους 16°C. Παράλληλα, θερμαίνεται το Wash Buffer C στους 75° C.
- Η αντίδραση σταματά με επώαση στον πάγο και προσθήκη 45μl 0.5 M EDTA.
- Το erppendorf τοποθετείται πάνω στο magnetic stand για 1-2 λεπτά και το υπερκείμενο απορρίπτεται. Έπειτα, προστίθενται 750μl θερμό Wash Buffer C ώστε να απενεργοποιηθεί η πολυμεράση.
- Το δείγμα θερμαίνεται στους 75°C για 10-12 λεπτά, με τακτική ανάδευση.
- Το erppendorf τοποθετείται πάνω στο magnetic stand για 1-2 λεπτά και το υπερκείμενο απορρίπτεται. Στη συνέχεια, ακολουθεί μία πλύση με 750μl Wash Buffer C.
*Προσοχή: η διαδικασία πραγματοποιείται γρήγορα για να μην γίνει κατακρήμνιση του SDS, το οποίο μπορεί να παγιδεύσει τα σφαιρίδια
- Ακολουθούν 3 πλύσεις με 750μl Wash Buffer D και στο τέλος γίνεται σε επαναδιάλυση σε 750μl.
- Το erppendorf τοποθετείται πάνω στο magnetic stand για 1-2 λεπτά και το υπερκείμενο απορρίπτεται. Τα μαγνητικά σφαιρίδια επαναδιαλύονται σε 200μl 1x Buffer 4.
- Το περιεχόμενο του erppendorf μεταφέρεται σε νέο (για να αποφευχθεί πιθανή δράση εξωνουκλεάσης της DNA πολυμεράσης). Το παλιό erppendorf ξεπλένεται με 200μl 1x Buffer 4, τα οποία μεταφέρονται στη συνέχεια στο νέο erppendorf.
- Το erppendorf τοποθετείται πάνω στο magnetic stand για 1-2 λεπτά και απορρίπτεται το υπερκείμενο. Το περιεχόμενο επαναδιαλύεται σε 200μl 1x Buffer 4. Το δείγμα φυλάσσεται overnight (O/N) στους 4°C.

9.4 Πέψη του cDNA με το ένζυμο NlaIII

Έπειτα από την σύνθεση του cDNA, ακολουθεί η πέψη με το ένζυμο περιορισμού-αγκυροβόλησης (Anchoring enzyme) NlaIII. Το ένζυμο αυτό κόβει το DNA κάθε 250bp και αφήνει μονόκλωνα άκρα μήκους τεσσάρων

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ- SAGE

νουκλεοτιδίων (GTAC). Το NlaIII είναι πολύ ευαίσθητο στις υψηλές θερμοκρασίες και φυλάσσεται στους -80°C.

9.4.1 Υλικά

- Υδατόλουτρο 37°C
- Magnetic stand
- 10x Buffer 4 (NEB)
- Nla III (NEB)
- 100x BSA: 10 mg/ml BSA in: 20 mM potassium phosphate, pH 7, 50 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 5% glycerol (w/v)
- LoTE: 3 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.2 mM EDTA, pH 7.5
- Wash Buffer C: 5 mM Tris, pH 7.5, 0.5 mM EDTA, 1 M NaCl, 1% sodium dodecyl sulfate (SDS), 10 µg/ml mussel glycogen
- Wash Buffer D: 5 mM Tris, pH 7.5, 0.5 mM EDTA, 1 M NaCl, 200 µg/ml BSA

9.4.2 Μέθοδος

- Προετοιμάζεται το mix της αντίδρασης ως εξής:

LoTE	172 µl
100x BSA	2 µl
10x Buffer 4	20 µl
<u>Nla III</u>	<u>6 µl</u>
Τελικός όγκος	200 µl

- Το δείγμα τοποθετείται στο magnetic stand για 1-2 λεπτά και το υπερκείμενο απορρίπτεται. Έπειτα, προστίθεται το mix της αντίδρασης και το δείγμα επωάζεται στους 37° C για μία ώρα ενώ παράλληλα θερμαίνεται το Wash Buffer C στους 37° C.
- Το erpendorfτοποθετείται στο magnetic stand για 1-2 λεπτά και απορρίπτεται το υπερκείμενο. Ακολουθεί μια πλύση με 750µl Wash Buffer C για την απενεργοποίηση του ενζύμου.
- Στη συνέχεια ακολουθούν τρεις πλύσεις με 750 µl Wash Buffer D και τέλος το δείγμα επαναδιαλύεται σε 750 µl Wash Buffer D.

9.5 Σύνδεση των LS Adaptors

Στη συνέχεια, πραγματοποιείται σύνδεση των LS Adaptors στα μονόκλινα άκρα που προέκυψαν από την πέψη με το ένζυμο NlaIII. Οι LS Adaptors περιέχουν ένα μονόκλινο άκρο μήκους τεσσάρων νουκλεοτιδίων συμπληρωματικό με τα μονόκλινα άκρα των μορίων cDNA, θέσεις εκκίνησης για PCR ενίσχυση και μία θέση αναγνώρισης για το ένζυμο περιορισμού τύπου II MmeI (Tagging Enzyme), στο 3' άκρο τους. Η σύνδεση τους πραγματοποιείται μέσω της υβριδοποίησης των μονόκλωνων άκρων τους στα μονόκλινα άκρα των cDNA μορίων.

Η αλληλουχία των LS Adaptors είναι η εξής:

LS Adapter A

5' TTTGGATTTGCTGGTGCAGTACAACCTAGGCTTAATATCCGACATG 3'

3' amino(C7) CCTAAACGACCACGTCATGTTGATCCGAATTATAGGCT PO4 5'

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ- SAGE

LS Adapter B

5' TTTCTGCTCGAATTCAAGCTTCTAACGATGTACGTCCGACATG 3'

3' amino(C7) GACGAGCTTAAGTTCTGAAGATTGCTACATGCAGGCT PO4 5'

9.5.1 Υλικά

- Υδατόλουτρο στους 50°C, 37°C και 16°C
- Πάγος
- Magnetic stand
- 10x Ligase Buffer (Fermentas)
- 1x Ligase Buffer: 10x Ligase Buffer αραιώνεται σε συγκέντρωση 1x σε DEPC water
- T4 DNA Ligase (1u/μl) (Fermentas)
- LoTE: 3 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.2 mM EDTA, pH 7.5
- Wash Buffer D: 5 mM Tris, pH 7.5, 0.5 mM EDTA, 1 M NaCl, 200 μg/ml BSA
- LS Adapter A: 40 ng/μl double-strand DNA in LoTE
- LS Adapter B: 40 ng/μl double-strand DNA in LoTE

9.5.2 Μέθοδος

- Το erppendorf με το δείγμα τοποθετείται στο magnetic stand για 1-2 λεπτά και το υπερκείμενο απορρίπτεται. Στη συνέχεια ακολουθούν δύο πλύσεις με 150 μl 1x Ligase Buffer και τα σφαιρίδια επαναδιαλύονται σε 150 μl 1x Ligase Buffer.
- Το δείγμα μοιράζεται με προσοχή σε δύο νέα erppendorfs (A + B). Σε κάθε erppendorf γίνεται πλύση με 50μl 1x Ligase Buffer και τα σφαιρίδια επαναδιαλύονται με 50μl 1x Ligase Buffer.
- Τα erppendorfs τοποθετούνται στο magnetic stand για 1-2 λεπτά και το υπερκείμενο απορρίπτεται. Στη συνέχεια, τα δείγματα τοποθετούνται στον πάγο και σε κάθε ένα προστίθεται το mix της παρακάτω αντίδρασης σύνδεσης:

	Tube A	Tube B
LS Adapter A (40 ng/μl)	0.6 μl	—
LS Adapter B (40 ng/μl)	—	0.6 μl
LoTE	31.4 μl	31.4 μl
10x Ligase Buffer	4.0 μl	4.0 μl
Total Volume	36 μl	36 μl

- Τα δείγματα επωάζονται στο υδατόλουτρο για 1 λεπτό στους 50°C, ενώ διατηρούνται σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά και στη συνέχεια τοποθετούνται στον πάγο.
- Σε κάθε erppendorf προστίθενται 4μl T4 DNA ligase, ακολουθεί ανάδευση και το δείγμα επωάζεται για 2 ώρες στους 16 °C, με συχνή ανάδευση.
- Έπειτα, πραγματοποιούνται 3 πλύσεις με 500μl Wash Buffer D και τα σφαιρίδια επαναδιαλύονται σε 500μl Wash Buffer D.

9.6 Πέψη με το Tagging Enzyme

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ- SAGE

Το ένζυμο MmeI συνδέεται στη θέση αναγνώρισης που βρίσκεται στους LS Adaptors και κόβει τα cDNA μόρια περίπου 21bp καθοδικά της θέσης αναγνώρισης. Από την πέψη αυτή απελευθερώνονται μόρια ετικέτες (tags) με μήκος περίπου 60bp με ένα προεξέχον άκρο 2bp. Η ετικέτα αποτελείται από μία αλληλουχία περίπου 40bp του μορίου προσαρμογέα και μία αλληλουχία περίπου 21bp που αντιστοιχεί σε ένα τμήμα ενός mRNA μορίου.

9.6.1 Υλικά

- Υδατόλουτρο στους 37° C
- Πάγος
- LoTE: 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0,2 mM EDTA
- Αιθανόλη 100%, 70%
- SAM 32 mM S-adenosylmethionine
- DEPC- treated water
- 10x Buffer 4 (NEB)
- LoTE: 3 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.2 mM EDTA, pH 7.5
- *Mme I* (2u/μl) (NEB)

9.6.2 Μέθοδος

Παρασκευή διαλύματος 10X SAM:

SAM 32mM 1μl
DEPC water σε 80μl

Παρασκευή διαλύματος 1X Buffer 4/ 1X SAM:

SAM 32mM 1μl
1x Buffer 4 σε 800μl

- Τα erpendorfs τοποθετούνται στο magnetic stand για 1-2 λεπτά και το υπερκείμενο απορρίπτεται. Στη συνέχεια, πραγματοποιούνται 2 πλύσεις με 200μl 1x Buffer 4/ 1x SAM, σε κάθε tube. Το υπερκείμενο αφαιρείται προσεκτικά και τα δείγματα τοποθετούνται στον πάγο.
- Σε κάθε ένα erpendorf προστίθεται το mix της αντίδρασης:

LoTE	70μl
10x Buffer 4	10μl
10x SAM (400 μM)	10 μl
<i>Mme I</i>	10 μl
Τελικός όγκος	100 μl

- Η αντίδραση επωάζεται στους 37° C για 2.5 ώρες με τακτική ανάδευση, έπειτα το erpendorf τοποθετείται στο magnetic stand για 1-2 λεπτά και το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο tube.
- Στο υπερκείμενο περιέχονται οι ετικέτες (tags).

9.7 Δημιουργία ditags

Μετά από την πέψη με το ένζυμο MmeI ακολουθεί μία αντίδραση σύνδεσης των ετικετών για να σχηματιστούν διπλές ετικέτες (ditags) μήκους περίπου 130bp.

9.7.1 Υλικά

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ- SAGE

- Υδατόλουτρο στους 16°C και 37°C
- Πάγος
- Αιθανόλη 100% και 70%
- Φαινόλη/ Χλωροφόρμιο
- LoTE: 3 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0,2 mM EDTA
- DEPC- treated water
- 3mM Tris-HCl pH 7.5
- Mussel Glycogen 20 mg/ml in DEPC-treated water
- 10x Ligase Buffer (Fermentas)
- T4 DNA Ligase (1u/μl) (Fermentas)
- 7.5 M Ammonium Acetate in DEPC-treated water

9.7.2 Μέθοδος

- Το περιεχόμενο του erpendorf A μεταφέρεται στο erpendorf B (Vτελ=200μl) και στο erpendorf A πραγματοποιείται πλύση με 100μl LoTE, τα οποία μεταφέρονται στο erpendorf B.
- Στο δείγμα προστίθενται 150μl φαινόλη και 150μl χλωροφόρμιο και γίνεται ανάδευση με vortex. Έπειτα, ακολουθεί φυγοκέντριση για 5 λεπτά, στις μέγιστες στροφές.
- Η υδατική φάση (300μl) μεταφέρεται σε νέο erpendorf και αναδεύεται γρήγορα. Το δείγμα μοιράζεται σε δύο tubes, στο πρώτο μεταφέρονται τα 200μl και αποτελούν το δείγμα, ενώ στο δεύτερο προστίθενται τα υπόλοιπα 100μl μαζί με 100μl DEPC water και αποτελούν το αρνητικό δείγμα(negative control).
- Σε κάθε erpendorf προστίθενται 160 μl 7.5 M ammonium acetate, 3 μl mussel glycogen, και 1 ml 100% αιθανόλη. Το δείγμα αναδεύεται γρήγορα και γίνεται επώαση στους -20°C για 30 λεπτά ενώ στη συνέχεια ακολουθεί φυγοκέντριση σε full speed για 30 λεπτά. Τέλος, απορρίπτεται το υπερκείμενο από κάθε erpendorf.
- Στο ίζημα από κάθε erpendorf γίνεται πλύση 2 φορές με 1ml αιθανόλη 70%. Το υπερκείμενο απορρίπτεται προσεκτικά και το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει για 5-10 λεπτά. Έπειτα, το ίζημα επαναδιαλύεται σε 7 μl LoTE, ενώ το negative control σε 2μl.
- Στη συνέχεια πραγματοποιείται η αντίδραση σύνδεσης των tags σε ditags ως εξής:

	2x Ditag Reaction	2x Negative Control
3 mM Tris-HCl, pH 7.5	2.4 μl	2.25 μl
10x Ligase Buffer	1.4 μl	0.75 μl
DEPC Water	1.4 μl	0.75 μl
T4 DNA Ligase (1u/μl)	1.8 μl	—

- Στο erpendorf με το δείγμα προστίθενται 7μl του mix 2x Ditag Reaction και 2μl του mix 2x Negative Control στο erpendorf με το negative control. Ακολουθεί επώαση των δειγμάτων στους 16° C overnight.

9.8 PCR ενίσχυση των ditags και εκτίμηση του προϊόντος

Πραγματοποιείται PCR ενίσχυση των ditags για να γίνει προσδιορισμός της ποιότητας και της ποσότητας τους. Το αναμενόμενο προϊόν έχει μέγεθος περίπου 130bp. Έτσι, γίνεται ηλεκτροφόρηση και ενός δείγματος ως θετικό control. Για την συνέχιση της πειραματικής διαδικασίας απαιτούνται ditags σε ποσότητα 20-200μg.

9.8.1 Υλικά

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ- SAGE

- HOT START KAPPA *Taq* DNA Polymerase 5u/μl
- DEPC-treated water
- Πάγος
- LoTE: 3 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0,2 mM EDTA
- DEPC water
- dNTP Mix (2,5 mM each) (BIOLINE)
- 5x Buffer της HOT START KAPPA *Taq* DNA Polymerase
- DMSO
- LS Ditag Primer-1 (LS DTP-1) 175 ng/μl in DEPC-treated water
- LS Ditag Primer-2 (LS DTP-2) 175 ng/μl in DEPC-treated water
- Αγαρόζη
- TBE 5x Buffer
- Βρωμιούχο αιθίδιο (10mg/ml)
- 6x Loading buffer
- ΦX Ladder
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης

Η αλληλουχίες των εκκινητών είναι οι εξής:

LS DTP-1: 5'-GTGCTCGTGGGATTTGCTGGTGCAGTACA-3'

LS DTP-2: 5'-GAGCTCGTGCTGCTCGAATTCAGCTTCT-3'

9.8.2 Μέθοδος

- Στο negative control προστίθενται 10μl LoTE ώστε ο τελικός όγκος να φτάσει τον όγκο του δείγματος (14μl).
- Πραγματοποιούνται οι εξής αραιώσεις:
 - α) 1/40 δείγμα (1μl δείγμα + 39 νερό)
 - β) 1/100 δείγμα (1μl δείγμα + 99μl νερό)
 - γ) 1/20 negative control (1μl negative control + 10μl νερό)
- Mix της αντίδρασης PCR (x3):

5x Buffer <i>Taq</i> DNA Pol	10μl
DMSO	3μl
dNTP Mix (2,5 mM each)	4μl
LS DTP-1	1μl
LS DTP-2	1μl
DEPC Water	26,5μl
<i>Taq</i> DNA Pol	0,5μl
MgCl 25Mm	3μl
Τελικός όγκος	49μl

- 1μl από κάθε αραιώση προστίθεται σε κάθε ένα mix.

Συνθήκες της αντίδρασης		
Θερμοκρασία	Χρόνος	Κύκλοι
95°C	2 min	1
95°C	30 sec	27

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ- SAGE

55°C	1 min	
70°C	1 min	
70°C	5 min	1

- Παρασκευάζεται gel αγαρόζης 4% και γίνεται ηλεκτροφόρηση 5μl από κάθε δείγμα(+3μl loading dye) με 1 μl ΦX ladder στα 110V για 3 ώρες.

9.9 Scale-up PCR

Κατά το βήμα της scale-up PCR πραγματοποιούνται αντιδράσεις re-PCR των επιθυμητών προϊόντων του προηγούμενου σταδίου, έτσι ώστε να αποκτηθεί η κατάλληλη ποσότητα για τον σχηματισμό των αλυσομερών.

9.9.1 Υλικά

- Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System Kit - Promega
- HOT START KAPPA *Taq* DNA Polymerase 5u/μl
- DEPC-treated water
- Πάγος
- LoTE: 3 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0,2 mM EDTA
- DEPC water
- dNTP Mix (2.5 mM each) (BIOLINE)
- 5x Buffer της HOT START KAPPA *Taq* DNA Polymerase
- DMSO
- LS Ditag Primer-1 (LS DTP-1) 175 ng/μl in DEPC-treated water
- LS Ditag Primer-2 (LS DTP-2) 175 ng/μl in DEPC-treated water
- Αγαρόζη
- TBE 5x Buffer
- Βρωμιούχο αιθίδιο
- 6x loading buffer
- ΦX Ladder
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης

9.9.2 Μέθοδος

- Γίνεται ηλεκτροφόρηση για τα 45μl των δειγμάτων (1/40, 1/100) και για τα 20μl από το negative control σε gel αγαρόζης 4%, στα 110V.
- Χρησιμοποιείται το kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System Kit –Promega.
- Οι ζώνες του DNA μεγέθους 134bp αποκόπτονται με νυστέρι από το gel αγαρόζης, τοποθετούνται σε eppendorfs (1,5ml) και ζυγίζονται. Για κάθε 10ng πηκτώματος προστίθενται 10μl Membrane Binding Solution. Το δείγμα επωάζεται στους 65° C με ανάδευση ανά τακτά διαστήματα έως ότου γίνει εντελώς διαλυτό.
- Το διάλυμα τοποθετείται σε στήλη CSV Minicolumn η οποία έχει ήδη τοποθετηθεί σε σωλήνα συλλογής Collection tube. Ακολουθεί αναμονή για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου και ακολουθεί φυγοκέντριση σε μέγιστες στροφές (το υπερκείμενο ή το υγρό απορρίπτεται και επανατοποθετείται η στήλη στο tube συλλογής).
- Στη συνέχεια προστίθενται 700μl Membrane Wash Solution και πραγματοποιείται φυγοκέντριση για 5 λεπτά στις 16000g. Το ίδιο βήμα επαναλαμβάνεται με προσθήκη 500μl Membrane Wash Solution.
- Το περιεχόμενο του Collection tube απορρίπτεται και επαναλαμβάνεται η φυγοκέντριση για 1 λεπτό με ανοιχτό το καπάκι της φυγόκεντρον ώστε να απομακρυνθεί πλήρως η αιθανόλη.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ- SAGE

- Η Minicolumn μεταφέρεται σε νέο eppendorf και προστίθενται 50μl Nuclease-free water. Το δείγμα αφήνεται για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκεντρείται για ένα λεπτό στις 1600g έτσι ώστε να γίνει η έκλυση του DNA.
- Τα δείγματα DNA που απομονώθηκαν από το gel αγαρόζης ενισχύονται με re-PCR με το παρακάτω mix (x2):

5x Buffer <i>Taq</i> DNA Pol	10μl
DMSO	3μl
dNTP Mix (2,5 mM each)	5μl
LS DTP-1(350ng/μl)	1μl
LS DTP-2(350ng/μl)	1μl
DEPC Water	22,5μl
<i>Taq</i> DNA Pol	0,5μl
MgCl 3mM	6μl
Τελικός όγκος	49μl

- Σε κάθε mix προστίθεται 1μl από τις αραιώσεις του δείγματος (1/40, 1/100)

Συνθήκες της αντίδρασης		
Θερμοκρασία	Χρόνος	Κύκλοι
95°C	3 min	1
95°C	30 sec	27
55°C	1 min	
70°C	1 min	
70°C	5 min	1

- Τα προϊόντα της re-PCR ηλεκτροφορούνται σε gel αγαρόζης 4%, με προσθήκη 3μl χρωστικής και 1μl ΦX 174/184 ladder.
- Η re-PCR επαναλαμβάνεται σε 48 δείγματα από το gel extraction (24 δείγματα (1μl) από την αραιώση 1/40 και 24 δείγματα (1μl) από τη αραιώση 1/100), όπως περιγράφεται παραπάνω.

9.10 Καθαρισμός των ditags (~130bp)

Τα προϊόντα της PCR καθαρίζονται με ηλεκτροφόρηση σε gel πολυακρυλαμιδίου 12%, έτσι ώστε να διαχωριστούν οι ditags (~130bp) από τυχόν διμερή προϊόντα των primers (~100bp).

9.10.1 Υλικά

- Φαινόλη/χλωροφόρμιο
- CH₃COONa
- Ισοπροπανόλη
- Αιθανόλη 70%,100%
- Ακρυλαμίδιο
- Bis-ακρυλαμίδιο
- TAE 1x: 40 mM Tris, H 8.4, 20 mM acetic acid, 1 mM EDTA
- APS 10% w/v: 1 gr ammonium persulfate διαλύεται σε νερό μέχρι τελικού όγκου 10 ml.
- TEMED
- TBE 5x Buffer

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ- SAGE

- Βρωμιούχο αιθίδιο
- Elution Buffer: 0,5M ammonium acetate, 10mM magnesium acetate, 1mM EDTA, 0,1% SDS
- Υαλοβάμβακας
- Γλυκογόνο (20mg/ml)
- Ladder Pbr32 DNA/ BsuRI
- Χρωστική: 0,25% μπλε της βρωμοφαινόλης, 0,25% κυανό της ξυλόλης, 30% γλυκερόλη σε νερό
- LoTE: 3 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0,2 mM EDTA
- Αγαρόζη
- 6x loading dye
- Συσκευή κάθετης και οριζόντιας ηλεκτροφόρησης

9.10.2 Μέθοδος

- Τα προϊόντα της PCR ενώνονται σε 3 νέα eppendorfs των 2 ml και υπολογίζεται ο όγκος. Προστίθεται 1V φαινόλη/χλωροφόρμιο σε κάθε tube και πραγματοποιείται φυγοκέντριση για 10 min σε max speed.
- Η πάνω φάση από κάθε tube μεταφέρεται σε νέο tube και προστίθενται τα παρακάτω:

1° 760μl δείγμα + 76μl CH₃COONa + ισοπροπανόλη 760μl

2° 650μl δείγμα + 65μl CH₃COONa + ισοπροπανόλη 650μl

3° 800μl δείγμα + 80μl CH₃COONa + ισοπροπανόλη 800μl

- Στη συνέχεια, γίνεται πλύση με αιθανόλη 70% και τα ιζήματα που σχηματίζονται επαναδιαλύονται σε LoTE και ενώνονται σε ένα eppendorf ώστε V_{τελ}= 300μl
- Τα δείγματα ηλεκτροφορούνται σε πηκτή πολυακρυλαμίδιο 12%, 70ml.
- Η πηκτή παρασκευάζεται ως εξής:

Πολυακρυλαμίδιο 50%	17ml
TBE 5x	14ml
H ₂ O	39ml
TEMED	70ml
APS 10%	700μl

- Για την παρασκευή του πολυακρυλαμίδιο υπολογίζεται:

Τα 100ml διαλύματος περιέχουν 50gr ακρυλαμίδιο =>Τα 150ml διαλύματος περιέχουν 75gr ακρυλαμίδιο. Χρειάζονται 29 μέρη ακρυλαμίδιο και 1 μέρος Bis-ακρυλαμίδιο. Συνεπώς σε μία φιάλη προστίθενται 72,5gr ακρυλαμίδιο, 2,5gr Bis-ακρυλαμίδιο και 60ml νερό. Το διάλυμα αναδεύεται με θέρμανση, διηθείται και προστίθεται νερό μέχρι V_{τελ}=150ml.

- Στη συσκευή ηλεκτροφόρησης τοποθετούνται 2,5 λίτρα TBE 1x.
- Στο δείγμα προστίθενται 72μl χρωστικής και σε κάθε πηγαδάκι τοποθετούνται 30μl δείγματος και ακολουθεί ηλεκτροφόρηση στα 160V για 5 ώρες.
- Μόλις ολοκληρωθεί ο χρόνος της ηλεκτροφόρησης, ακολουθεί χρώση του πηκτώματος με διάλυμα βρωμιούχο αιθίδιο 1μg/μl, για 30 λεπτά με ανάδευση σε shaker.
- Ακολουθεί απομόνωση των ζωνών DNA μεγέθους ~130bp με νυστέρι και τοποθετούνται σε 2 νέα eppendorfs και έπειτα ζυγίζονται.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ- SAGE

- Με έμβολο ομογενοποιείται το gel και προστίθεται elution buffer περίπου δύο φορές τον αρχικό όγκο.
- Τα tubes καλύπτονται με parafilm και επωάζονται στους 37°C overnight. Στη συνέχεια φυγοκεντρώνται για 1 λεπτό και το υπερκείμενο μεταφέρεται σε 2 νέα tubes.
- Στα εναπομείναντα ιζήματα προστίθενται 500μl elution buffer, γίνεται ανάδευση με vortex και ακολουθεί φυγοκέντριση για 1 λεπτό και το υπερκείμενο ενώνεται με το υπερκείμενο από το προηγούμενο βήμα.
- Οι στήλες έκλυσης του DNA περιέχουν υαλοβάμβακα σε ένα erpendorf 500μl με μια οπή στον πάτο του και το οποίο εσωκλείεται σε ένα erpendorf 1,5 ml.
- Η στήλη γεμίζεται σταδιακά με 500μl του δείγματος και πραγματοποιείται φυγοκέντριση για μισό λεπτό σε χαμηλή ταχύτητα.
- Στο διάλυμα που συλλέγεται προστίθεται 0,5μl γλυκογόνου και 2,5V αιθανόλη 100% (σε κάθε tube). Τα δείγματα παραμένουν στους -20° C για 2 ώρες και ακολουθεί φυγοκέντριση για 25 λεπτά σε μέγιστες στροφές για να γίνει η κατακρήμνιση του DNA.
- Στη συνέχεια γίνεται μια πλύση με 200μl αιθανόλη 70% και τα δείγματα φυγοκεντρώνται για 5-7 λεπτά στις μέγιστες στροφές. Απορρίπτεται το υπερκείμενο και το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει στον απαγωγό για 5-10 λεπτά μέχρι να εξατμιστεί η αιθανόλη.
- Το ίζημα επαναδιαλύεται σε 50μl LoTE και ακολουθεί ηλεκτροφόρηση σε 2%gel αραρόζης 2μl του δείγματος και 1,5 μl του ladder Pbr32 DNA/ BsuR1.

9.11 Πέψη των ditags με το ένζυμο NlaIII

Η πέψη των ditags μεγέθους 130 bp με το ένζυμο NlaIII παράγει ditags 34 bp. Είναι σημαντικό να επιτευχθεί ποσοστό πέψης μεγαλύτερο από 80% έτσι ώστε να αποκτηθεί επαρκής ποσότητα ditags 34 bp.

9.11.1 Υλικά

- Υδατόλουτρο στους 37°C
- Πάγος
- Αιθανόλη 100%, 70%
- Φαινόλη/ Χλωροφόρμιο
- 10x Buffer 4 (New England Biolabs)
- Nla III (10u/μl) (New England Biolabs)
- 100x BSA: 10 mg/ml BSA in: 20 mM potassium phosphate, pH 7, 50 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 5% glycerol (w/v)
- DEPC water
- LoTE: 3 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.2 mM EDTA, pH 7.5
- CH₃COONH₄ 7.5M
- Γλυκογόνο
- Αγαρόζη
- TBE 5x Buffer
- Βρωμιούχο αιθίδιο
- 6x loading buffer
- Low Molecular DNA Ladder (New England Biolabs)
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης

9.11.2 Μέθοδος

- Η αντίδραση πέψης υπολογίζεται ως εξής:

10x Buffer 4	45μl
Nla III	15μl

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ- SAGE

100x BSA	2μl
DEPC water	86μl
Δείγμα Ditags	45μl
Τελικός όγκος	150μl

- Η αντίδραση επιάζεται για 2 ώρες στους 37° C και ο όγκος προσαρμόζεται στα 200μl με προσθήκη 50μl LoTE.
- Γίνεται ηλεκτροφόρηση σε 4% gel αγαρόζης 5μl του δείγματος και 1,5μl low molecular ladder.
- Στο υπόλοιπο δείγμα προστίθενται 100μl φαινόλη και 100μl χλωροφόρμιο, φυγοκεντρείται σε μέγιστες στροφές για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο eppendorf. Προστίθενται 96,5μl CH₃COONH₄ 7.5M, 3μl γλυκογόνο και 850μl αιθανόλη 100% και το δείγμα τοποθετείται για μία ώρα στους -80° C.
- Έπειτα, πραγματοποιείται φυγοκέντριση για 30 λεπτά σε max speed και έπειτα δύο πλύσεις με αιθανόλη 70%.
- Το ίζημα επαναδιαλύεται σε 32μl LoTE και αφήνεται στους 4° C overnight.

9.12 Απομόνωση και καθαρισμός των ditags (~34bp)

Τα ditags (~34bp) καθαρίζονται με ηλεκτροφόρηση σε gel πολυακρυλαμιδίου 12%.

9.12.1 Υλικά

- Ακρυλαμίδιο
- Bis-ακρυλαμίδιο
- TAE 1x: 40 mM Tris, H 8.4, 20 mM acetic acid, 1 mM EDTA
- APS 10% w/v: 1 gr ammonium persulfate διαλύεται σε νερό μέχρι τελικού όγκου 10 ml.
- TEMED
- TBE 5x Buffer
- Βρωμιούχο αιθίδιο
- Χρωστική
- Low Molecular ladder
- Συσκευή κάθετης ηλεκτροφόρησης
- LoTE: 3 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.2 mM EDTA, pH 7.5
- 10x ligase buffer (Fermentas)

9.12.2 Μέθοδος

- Τα δείγματα ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου μαζί με μια θέση άκοπο δείγμα (ditags) και 1,5μl ladder για 4,5 ώρες 160 βολτ.
- Από το gel απομονώνονται οι ζώνες μεγέθους περίπου 34bp και ακολουθεί gel extraction όπως περιγράφεται παραπάνω.
- Το ίζημα αναδιαλύεται σε 7,75μl LoTE και προστίθεται 1μl 10x ligase buffer. Ακολουθεί αμέσως το επόμενο βήμα.

9.13 Σχηματισμός αλυσομερών

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ- SAGE

Μετά την απομόνωση και τον καθαρισμό των ditags ακολουθεί η σύνδεση τους, έτσι ώστε να σχηματιστούν αλυσομερή ποικίλου μήκους. Τα προϊόντα της σύνδεσης ηλεκτροφορούνται σε πηκτική πολυακρυλαμίδιου και οι επιθυμητές μπάντες μήκους 500-800bp απομονώνονται και καθαρίζονται από το gel.

9.13.1 Υλικά

- T4 DNA Ligase (1u/μl) (Fermentas)

9.13.2 Μέθοδος

- Αντίδραση σύνδεσης (ligation):

34-bp DNA	8,75 μl
<u>T4 DNA Ligase</u>	<u>1,25μl</u>
Total Volume	10,00μl
- Η αντίδραση επωάζεται overnight στους 16°C, ακολουθεί κατακρήμνιση με αιθανόλη και αναδιάλυση του ιζήματος σε 15μl νερό.

9.14 Κλωνοποίηση αλυσομερών σε φορέα

Αρχικά δημιουργούνται τυφλά άκρα στα μόρια DNA (αλυσομερή) και έπειτα ακολουθεί αντίδραση σύνδεσης των αλυσομερών στον φορέα κλωνοποίησης pBS EcoRV CIAP (40ng/μl). Η ποσότητα του ενθέματος υπολογίζεται από τον τύπο:

$$\text{ng ενθέματος} = [(\text{ng φορέα} \times \text{ng ενθέματος}) / \text{Kb φορέα}] \times 3/1$$

9.14.1 Υλικά

- Φορέας κλωνοποίησης pBluescript II SK (40ng/μl)
- T4 DNA ligase (1u/μl) (Fermentas)
- 5x Buffer της T4 DNA polymerase
- dNTPs (2.5mM each)
- Buffer ligase 10x (Fermentas)
- Νερό
- T4 DNA polymerase

9.14.1 Μέθοδος

- Αντίδραση δημιουργίας τυφλών άκρων:

T4 DNA polymerase	0,2μl
5x Buffer T4 DNA polymerase	4,0μl
dNTPs (2.5mM each)	0,8μl
Δείγμα DNA	15,0μl
Τελικός όγκος	20,0μl

- Η αντίδραση επωάζεται για 20 λεπτά στους 11°C και έπειτα για 10 λεπτά στους 75°C (για την απενεργοποίηση του ενζύμου). Το δείγμα φυλάσσεται στους 4°C overnight.
- Στο δείγμα, στα αλυσομερή (20μl) προστίθενται 180μl νερό ώστε να έχουμε τελικό όγκο 200μl. Ακολουθεί κατακρήμνιση με αιθανόλη και αναδιάλυση του ιζήματος σε 6,75μl νερό.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ- SAGE

- Αντίδραση σύνδεσης:

Δείγμα (7ng)	6,75μl
Φορέας (50ng)	1,25μl
T4 DNA ligase (1u/μl)	1,00μl
Buffer ligase 10x	1,00μl
Τελικός όγκος	10,0μl

- Η αντίδραση επωάζεται για 2,5 ώρες στους 22° C.

9.15 Μετασηματισμός του βακτηρίου *E. coli*

Τα τοιχώματα των κυττάρων γίνονται διαπερατά σε μόρια DNA μέσω ηλεκτροδιάτρησης (electroporation) και μετασηματίζονται με την είσοδο του φορέα. Έπειτα ακολουθεί διαλογή των κυττάρων που έχουν λάβει τον φορέα με βάση την ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό αμικικιλίνη. Επιλέγονται οι αποικίες που έχουν λάβει τον φορέα με το ένθεμα με βάση την αδυναμία μεταβολισμού της ουσίας X-gal. Τα δεκτικά κύτταρα που παράχθηκαν στο προηγούμενο βήμα μετασηματίζονται με το ένθεμα (αλυσομερή) και επιλέγονται οι ανασυνδυασμένες αποικίες.

9.15.1 Υλικά

- Μικροβιολογικός κρίκος
- Τρυβλία, Falcon, κυψελίδες για electroporation, κυψελίδες για φωτομέτρηση, κωνικές φιάλες, σωλήνες
- SOC Medium
- LB άγαρ
- Αμικικιλίνη (100mg/l)
- Δεκτικά κύτταρα
- X-gal, IPTG
- Νερό

9.15.2 Μέθοδος

- Παρασκευάζονται 4 πιάτα με LB άγαρ με αμικικιλίνη.
- Το δείγμα αραιώνεται 1:10 και ακολουθεί electroporation
- Σε κάθε πιάτο LB άγαρ γίνεται επίστρωση 150μl δείγμα με 30μl X-gal και 3μl IPTG ενώ στη συνέχεια τα τρυβλία επωάζονται στους 37°C overnight.
- Γίνεται έλεγχος για μπλε/άσπρες αποικίες και επιλέγονται οι άσπρες αποικίες καθώς είναι αυτές φέρουν το ένθεμα.
- Παρασκευάζεται LB broth με αμικικιλίνη και προστίθενται 3ml θρεπτικού σε δοκιμαστικό σωλήνα και έπειτα σε κάθε σωλήνα προστίθεται μια επιλεγόμενη άσπρη αποικία. Τέλος, οι σωλήνες επωάζονται overnight, στους 37°C, στις 210rpm.

*Σημείωση: το περιβάλλον και οι συνθήκες της μεθόδου πρέπει να είναι αποστειρωμένες.

9.16 Mini Preps

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ- SAGE

Σε αυτό το στάδιο απομονώνεται το πλασμιδιακό DNA από τα μετασχηματισμένα βακτήρια και πραγματοποιείται πέψη με το ένζυμο PuVII 10u/μl, για να απελευθερωθούν τα αλυσομερή, τα οποία θα απομονωθούν και θα σταλούν για αλληλούχιση.

9.16.1 Υλικά

- Glucose 50mM
- Tris HCl 25mM
- EDTA 10Mm
- NaOH 0,5M
- 1%SDS
- Αιθανόλη 100%
- CH₃COOK solution
(5M οξικό κάλιο 60ml, 5M παγωμένο
οξικό οξύ 11,5ml, νερό 28,5ml)
- TE-Rnase Buffer (200μl/ml)
(Fermentas)
- PuVII 10u/μl (Fermentas)
- Buffer 10x (Fermentas)
- Νερό
- Φαινόλη/Χλωροφόρμιο
- 7.5 M Ammonium Acetatein DEPC-
treated water

9.16.2 Μέθοδος

- **Παρασκευή GET solution:** Glucose 50mM, Tris HCl 25mM, EDTA10mM και νερό. Το διάλυμα αποστειρώνεται για 15 λεπτά και έπειτα αφήνεται να έλθει σε θερμοκρασία δωματίου.
- **Παρασκευή alkali solution:** NaOH 0,5M και 1% SDS.
- **Παρασκευή CH₃COOK solution:** 5M οξικό κάλιο, 5M παγωμένο οξικό οξύ και νερό 28,5ml.
- Αρχικά, τοποθετούνται στον πάγο τα διαλύματα GET solution και CH₃COOK solution.
- Τα δείγματα από τους σωλήνες μεταφέρονται σε eppendorf 1,5 ml και φυγοκεντρώνονται για 1 λεπτό στις 12000g. Το υπερκείμενο απορρίπτεται.
- Στο ίζημα προστίθενται 100μl κρούς GET solution και γίνεται καλή ανάδευση με vortex.
- Έπειτα προστίθενται 200μl alkali solution και ακολουθεί ήπια ανάδευση 4-5 φορές με το χέρι. Προστίθενται 150μl CH₃COOK solution και στη συνέχεια αναδεύεται στο vortex.
- Τα δείγματα τοποθετούνται στον πάγο και στη συνέχεια φυγοκεντρώνονται για 5 λεπτά στις 1200g και συλλέγεται το υπερκείμενο.
- Στο υπερκείμενο προστίθενται 2V αιθανόλης 100% και το eppendorf επωάζεται στους -20°C για 15 λεπτά. Ακολουθεί φυγοκέντρωση για 7 λεπτά στις μέγιστες στροφές και το υπερκείμενο απορρίπτεται.
- Στο ίζημα προστίθενται 250μl αιθανόλη 100% και έπειτα φυγοκεντρείται για 5 λεπτά σε μέγιστες στροφές. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα αφήνεται στον απαγωγό μέχρι να εξατμιστεί η αιθανόλη.
- Τέλος, το ίζημα επαναδιαλύεται σε 50μl/tube TE-Rnase Buffer (200μl/ml).

9.17 Πέψη του πλασμιδιακού DNA

- Στη συνέχεια πραγματοποιείται αντίδραση πέψης του πλασμιδιακού DNA με το ένζυμο PuVII το οποίο είναι γνωστό ότι πέπτει σε συγκεκριμένες θέσεις κοντά στον πολυσυνδέτη τεμαχίζει τον φορέα σε δύο τμήματα. Το ένα κομμάτι είναι μεγέθους περίπου 500 bp και το δεύτερο 2500bp. Επομένως, όταν το ένθεμα έχει εισέλθει στον φορέα τότε θα πρέπει να ληφθούν τα δύο προαναφερόμενα τμήματα του φορέα με τη διαφορά ότι το κομμάτι με το ένθεμα είναι 500+ένθεμα bp.

- Αντίδραση πέψης με PuVII

PuVII 10u/μl	0,3μl
Buffer 10x	1,5μl
Νερό	10,7μl
Δείγμα	2,5μl
Τελικός όγκος	15,0μl

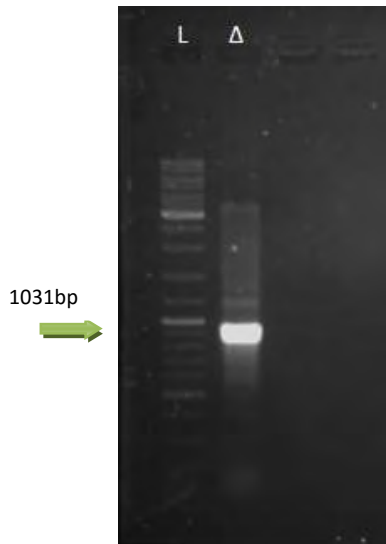
Η αντίδραση επωάζεται για 1 ώρα στους 37°C.

- Τα δείγματα ηλεκτροφορούνται σε 1% gel αγαρόζης και γίνεται ταυτοποίηση των DNA δειγμάτων που περιέχουν το ένθεμα.
- Στη συνέχεια τα δείγματα επιλέγονται και ακολουθεί “καθαρισμός” με εκχύλιση με φαινόλη/χλωροφόρμιο και κατακρήμιση με αιθανόλη 100%. Το ίζημα αναδιαλύεται σε 50μl νερό και ακολουθεί αλληλούχιση των δειγμάτων.

10. Αποτελέσματα

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ- SAGE

Πραγματοποιήθηκε το πρωτόκολλο της long SAGE με αρχικό υλικό 5μg ολικό RNA, το οποίο απομονώθηκε με βάση το πρωτόκολλο TRIZOL (Εικόνα 1).



Εικόνα 1: Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης 1%.

Στο πήκτωμα αгарόζης, ηλεκτροφορήθηκαν 3 μl δείγματος (10% του ολικού δείγματος) και η ποσοτικοποίηση έγινε σύμφωνα με τον Ladder 331-Fermentas. Η συγκέντρωση του ολικού RNA είναι ~500ng.

Έπειτα, ακολούθησε απομόνωση του mRNA και στη συνέχεια η σύνθεση του cDNA. Τα μόρια cDNA υπέστησαν πέψη με το ένζυμο περιορισμού NlaIII, έγινε η σύνδεση με κατάλληλα μόρια προσαρμογείς και τελικά συνδέθηκαν για να σχηματίσουν διπλές ετικέτες (ditags). Τα ditags ενισχύθηκαν με PCR και μέρος των προϊόντων της αντίδρασης ηλεκτροφορήθηκε σε πήκτωμα αгарόζης 4% όπου και επιβεβαιώθηκε το τελικό προϊόν, μεγέθους 134bp (Εικόνα 2).

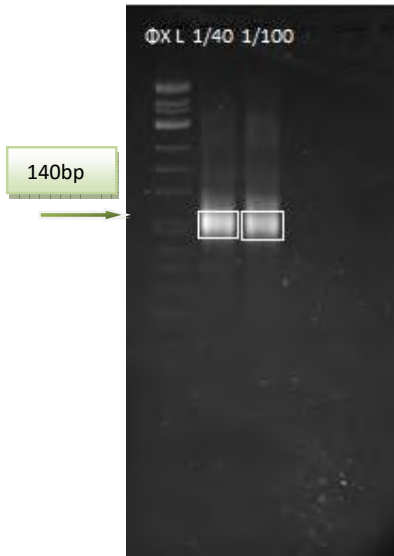


Εικόνα 2 Ηλεκτροφόρηση σε gel αгарόζης 4%.

Πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης 4% στα 110V για 3 ώρες. Σε κάθε πηγαδάκι απεικονίζονται 5μl από κάθε αραιώση των ditags με 1 μl ΦX ladder-. Οι επιθυμητές ζώνες εμφανίζονται με το περίγραμμα και έχουν μέγεθος περίπου 134bp ενώ στο κάτω μέρος του gel είναι τα διμερή προϊόντα των linkers.

Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε gel αгарόζης 4% για την υπόλοιπη ποσότητα των αραιώσεων των δειγμάτων (1/40 και 1/100) και οι επιθυμητές ζώνες (134bp) απομονώθηκαν και πραγματοποιήθηκε gel extraction. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε re-PCR στα δείγματα προκειμένου να αυξηθεί η συγκέντρωση των ditags (Εικόνα 3).

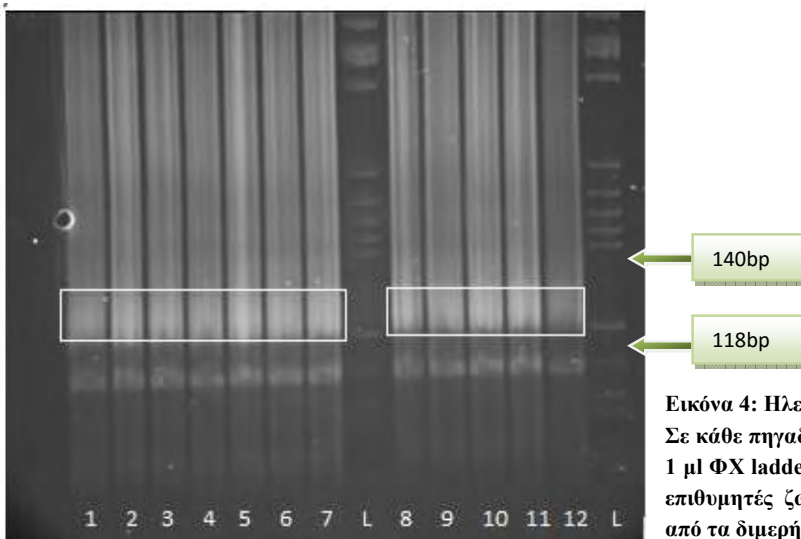
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ- SAGE



Εικόνα 3: Ηλεκτροφόρηση σε gel αραρόζης 4%, στα 110V.

Τα υπόλοιπα 45μl από τα αραιωμένα δείγματα και ο ΦX ladder ηλεκτροφορήθηκαν και επιλέχθηκαν οι επιθυμητές μπάντες (134bp) για gel extraction.

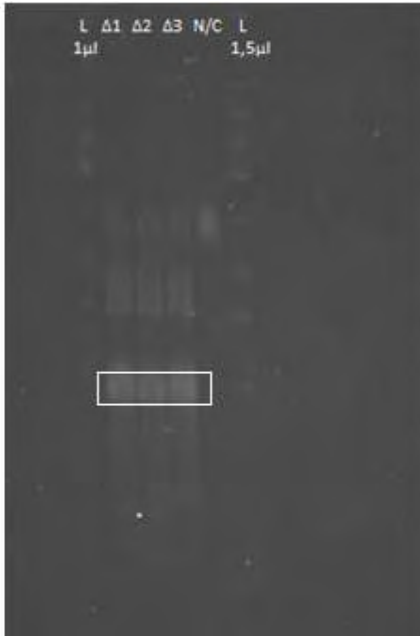
Τα προϊόντα που πρόεκυψαν από την αντίδραση re-PCR (ditags), ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου 12%, ώστε να επιτευχθεί καλύτερος διαχωρισμός τους από τα παραπροϊόντα (διμερή των linkers ~100bp) (Εικόνα 4).



Εικόνα 4: Ηλεκτροφόρηση σε gel πολυακρυλαμιδίου 12%. Σε κάθε πηγαδάκι ηλεκτροφορήθηκαν 30μl από το δείγμα με 1 μl ΦX ladder για 5 ώρες στα 160V. Όπως απεικονίζεται οι επιθυμητές ζώνες μεγέθους 134bp διαχωρίζονται εμφανώς από τα διμερή των linkers 100bp.

Οι ζώνες των ditags αποκόπηκαν από το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου και ακολούθησε απομόνωση τους και καθαρισμός με στήλη φυγοκέντρισης. Έπειτα, στα ditags πραγματοποιήθηκε αντίδραση πέψης με το ένζυμο περιορισμού NlaIII έτσι ώστε να προκύψουν μικρότερα ditags μεγέθους 34bp. Τα προϊόντα της πέψης ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 12% και έγινε απομόνωση των συγκεκριμένων ζωνών ditags μεγέθους 34bp (Εικόνα 5).

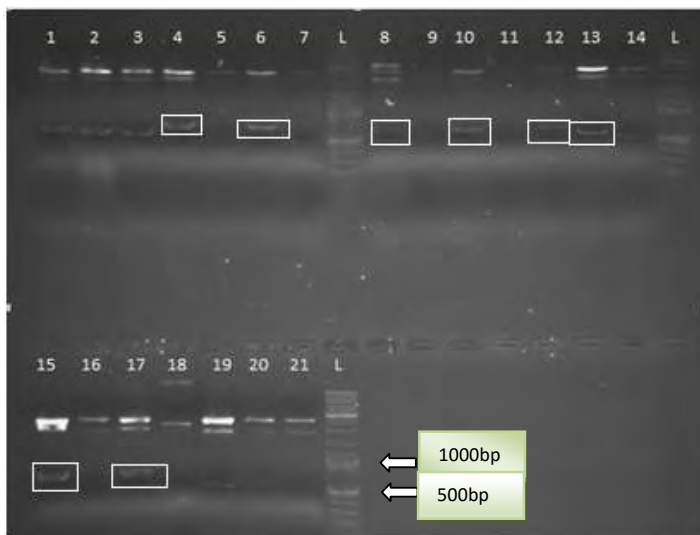
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ- SAGE



Εικόνα 5: Ηλεκτροφόρηση σε gel πολυακρυλαμιδίου 12%.

Το προϊόν της αντίδρασης πέψης ηλεκτροφορεύεται για 4,5 ώρες, στα 160V σε τρία πηγαδάκια ενώ παράλληλα σε τέταρτη θέση ηλεκτροφορεύεται ίση ποσότητα άπεπτου δείγματος (N/C) μαζί με 1,5μl Low Molecular Ladder. Παρατηρείται η επιτυχής πέψη των ditags και στη συνέχεια οι ζώνες με το επιθυμητό μέγεθος (34bp) απομονώνονται από το gel.

Στη συνέχεια, ακολούθησε αντίδραση σύνδεσης των ditags ώστε να γίνει ο σχηματισμός των αλυσομερών τα οποία απομονώθηκαν από πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου 12%. Το προϊόν από τα αλυσομερή κλωνοποιήθηκε κατάλληλο φορέα και ακολούθησε μετασχηματισμός βακτηρίων *E. coli* με τους φορείς. Για την απομόνωση των αλυσομερών από τους φορείς πραγματοποιήθηκαν mini preps και για την επιβεβαίωση της επιτυχούς κλωνοποίησης ακλούθησε αντίδραση πέψης με το ένζυμο περιορισμού PvuII. Στην εικόνα 6 παρουσιάζονται μερικά από τα δείγματα που ηλεκτροφορήθηκαν σε gel αγαρόζης 1% και για εκείνα που επιβεβαιώθηκε το επιθυμητό αποτέλεσμα ακολούθησε απομόνωση της ζώνης τους και gel extraction. Τέλος, τα συγκεκριμένα δείγματα αλληλουχήθηκαν (Εικόνα 6).

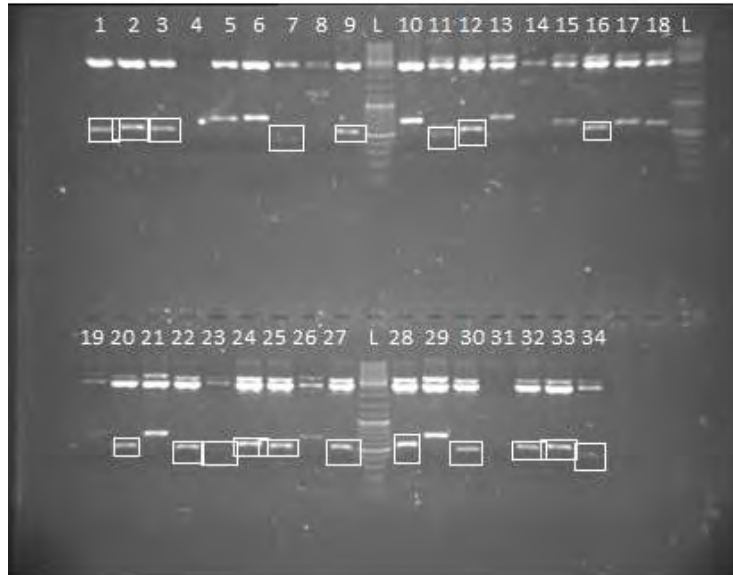


Εικόνα 6: Ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης 1%.

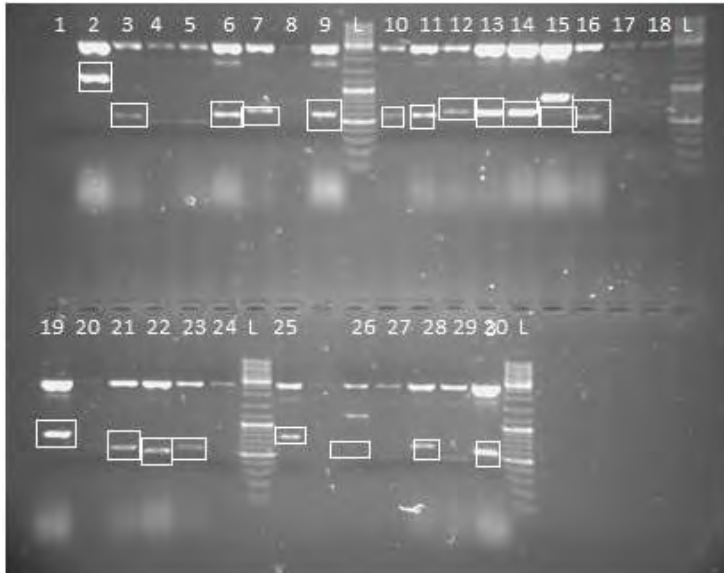
Τα προϊόντα (mini preps) μετά την αντίδραση πέψης με το ένζυμο PvuII ηλεκτροφορήθηκαν μαζί με τον Ladder 331. Οι ζώνες μεγέθους 3000bp αντιστοιχούν σε άπεπτο φορέα, στις 2500 bp και 500bp αντιστοιχούν σε τμήματα φορέα που έχει υποστεί πέψη, ενώ στις 800bp οι οποίες είναι και το επιθυμητό μέγεθος ζώνης αντιστοιχούν στο ένθεμα, δηλαδή τα αλυσομερή. Στην εικόνα, επιλέγονται να αλληλουχηθούν τα δείγματα μεγέθους 800bp που περιέχουν το ένθεμα (4, 6, 8, 10, 12, 13, 15, 17)

Η ίδια διαδικασία επαναλήφθηκε για όλα τα δείγματα και έγινε επιλογή εκείνων που περιείχαν το ένθεμα (αλυσομερή) με μέγεθος ~800bp ώστε να γίνει αλληλούχισή αυτών (Εικόνες 7, 8, 9).

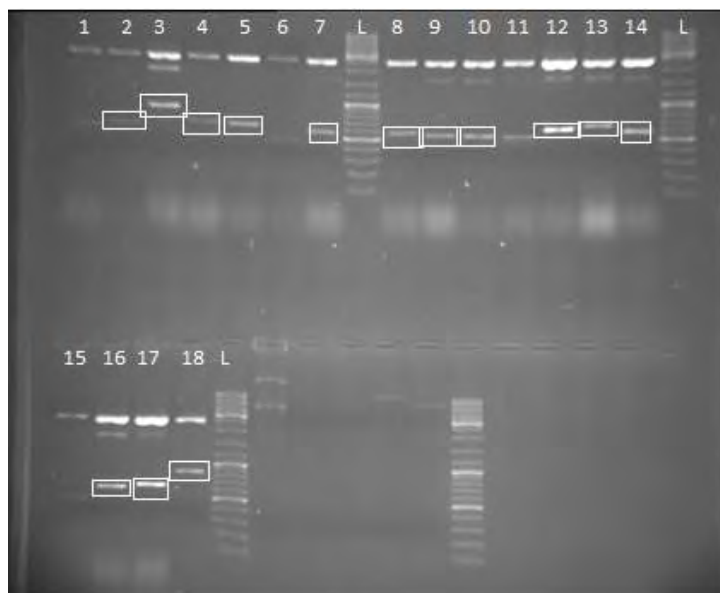
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ- SAGE



Εικόνα 7: Ηλεκτροφόρηση σε gel αραρόζης 1%. Επιλέχθηκαν να αλληλουχηθούν τα δείγματα 1, 2, 3, 7, 9, 11, 12, 16, 17, 20, 22, 23, 24, 25, 27, 28, 30, 32, 33, 34.



Εικόνα 8: Ομοίως επιλέχθηκαν για αλληλούχιση τα δείγματα 2,3,6,7,9,10,11,12,13,14,15,16,19,21,22,23,25,28, 29,30.



Εικόνα 9: Ομοίως επιλέχθηκαν για αλληλούχιση τα δείγματα 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 16, 17, 18.

11. Συμπεράσματα

Η μέθοδος SAGE εφαρμόστηκε με επιτυχία στο δάκο της ελιάς, για πρώτη φορά. Τα αλυσομερή που κλωνοποιήθηκαν, απομονώθηκαν και τελικά αλληλουχήθηκαν αποτέλεσαν πηγή σημαντικών πληροφοριών στο «παρθένο» γονιδίωμα του εντόμου. Ωστόσο, οι αλληλουχίες που προέκυψαν ήταν συγκεκριμένου μεγέθους και η επεξεργασία τους είναι περισσότερο περίπλοκη. Από την άλλη, μια νέα και πιο εξελιγμένη μέθοδος αρχίζει να εφαρμόζεται σιγά-σιγά σε οργανισμούς με ανεξερεύνητο γονιδίωμα. Πρόκειται για την RNA-seq, στην οποία και στραφήκαμε καθώς είναι πιο αξιόπιστη, είναι λιγότερο χρονοβόρα σε σχέση με τη SAGE και δεν χρειάζεται μεγάλη συγκέντρωση RNA για να λειτουργήσει. Σε αντίθεση με τη SAGE που το αρχικό RNA έπρεπε να είναι περισσότερο με αποτέλεσμα να χρειάζεται και μεγαλύτερος αριθμός εντόμων. Αυτό επίσης εμπεριέχει και πολλούς κινδύνους όπως μόλυνση του δείγματος από τους πολλούς χειρισμούς, περισσότερο αρχικό υλικό (έντομα), άρα και περισσότερος χρόνος εργασίας. Επίσης, κατά την ανάλυση RNA-seq μπορεί να γίνει παράλληλη σύγκριση στο ίδιο χρονικό διάστημα πολλών παραμέτρων (π.χ., ευαίσθητα έντομα-ανθεκτικά έντομα). Παράλληλα, τα εξερχόμενα δεδομένα, είναι σαφώς περισσότερα σε σύντομο χρονικό διάστημα. Σύμφωνα όλα όσα προαναφέρθηκαν, αν και τελικά καταφέραμε να δουλέψει η SAGE στο δάκο της ελιάς, μας κέρδισε η τεχνολογία της νέας γενιάς και ξεκινήσαμε το συγκλονιστικό ταξίδι του RNA-seq.



Detection and geographical distribution of the organophosphate resistance-associated $\Delta 3Q$ *ace* mutation in the olive fruit fly, *Bactrocera oleae* (Rossi)

Evdoxia G. Kakani,^{a,†} Efthymia Sagri,^a Michalis Omirou,^b Ioannis M. Ioannides^b and Kostas D. Mathiopoulos^{a*}

Abstract

BACKGROUND: The olive fruit fly, *Bactrocera oleae* (Rossi) (Diptera: Tephritidae), is the most important pest of olives. Its control is based mostly on organophosphate (OP) insecticides, a practice that has led to resistance development. OP resistance in *B. oleae* has been associated with three mutations in the acetylcholinesterase (AChE), the product of *ace* gene. The current study presents new diagnostic tests for the detection of the *ace* mutations and aims at monitoring the frequency of the $\Delta 3Q$ mutation, which appears associated with resistance at higher OP doses in natural olive fly populations.

RESULTS: An allele-specific polymerase chain reaction (PCR), a PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism) and a Taq-Man test were developed for the $\Delta 3Q$ mutation detection and a new duplex quantitative PCR assay was designed for the G488S and I214V mutations. Moreover, the frequency of $\Delta 3Q$ mutation was examined in ten populations of eight countries around the Mediterranean basin. The highest frequencies (10%) were found in Greece and Italy, whereas a gradual decrease of $\Delta 3Q$ frequency towards the western Mediterranean was noted.

CONCLUSION: Robust tests for insecticide resistance mutations at their incipient levels are essential tools to monitor the increase and geographical spread of such mutations. Three different tests were developed for AChE- $\Delta 3Q$ that indicated its association with OP applications across the Mediterranean.

© 2013 Society of Chemical Industry

Keywords: *Bactrocera oleae*; insecticide resistance; acetylcholinesterase; diagnostic test

1 INTRODUCTION

The primary approach used to control insect pests is the application of insecticides. Organophosphate (OP) insecticides have been extensively used throughout the world to control insect populations for the last 40 to 50 years. Inevitably, such extensive and continuous applications have caused the development and spread of insecticide resistance in natural insect populations. The target of OPs is acetylcholinesterase (AChE), which is responsible for the hydrolytic degradation of the neurotransmitter acetylcholine (ACh) at cholinergic synapses and consequently the termination of impulse transmission.^{1,2} OPs disrupt the impulse transmission and cause insect paralysis and death by irreversible phosphorylation and deactivation of AChE.^{1–3} An important mechanism of resistance to OPs is the alteration of their target in such a way that affect the binding of the OP insecticide into the active site and the efficiency of AChE phosphorylation.⁴ AChE insensitivity due to point mutations in or around the active site has been described in various insect species,⁷ such as *Drosophila melanogaster*,^{6,8} several mosquito species,^{10,11} in *Musca domestica*,^{12–15} *Bactrocera dorsalis*,¹⁶ *Ceratitis capitata*,¹⁷ *Aphis gossypii*^{18,19} and other hemipteran species.²⁰ Moreover, most mutations are identical in all these species,⁷ suggesting

that a low number of mutations can actually provide resistance. However, there are species, such as *Nephotettix cincticeps*,²¹ *Boophilus microplus*,²² and *Lucilia cuprina*,^{23,24} where the OP resistant phenotype is not associated with alterations in the *ace* gene. In such cases, resistance to OPs has been attributed to elevated levels of detoxifying esterases^{23,25} or glutathione-S-transferases (GSTs)^{26,27} that may bind and sequester these insecticides, preventing them from reaching their target, AChE.

The olive fruit fly, *Bactrocera oleae* (Rossi) (Diptera: Tephritidae), is the major pest of the olive fruit. The female fly leaves its eggs in the olive and the emerging larvae feed on the olive sap, thus destroying the fruit. For more than 40 years, olive fly

* Correspondence to: Kostas D. Mathiopoulos, Department of Biochemistry and Biotechnology, University of Thessaly, Greece. E-mail: kmathiopoulos@uoi.gr

† Current address: Harvard School of Public Health, Department of Immunology and Infectious Diseases, Boston, MA, USA

^a Department of Biochemistry and Biotechnology, University of Thessaly, Greece

^b Agricultural Research Institute, Department of Agrobiotechnology, Nicosia, Cyprus

populations have been mainly controlled by heavy use of OPs. Two non-synonymous point mutations and one short deletion in the *ace* gene have been reported to affect sensitivity to OP insecticides,^{28,29} while metabolic resistance did not seem to have a major role.³⁰ The two point mutations, which are found in the active site of AChE, result in substitution of isoleucine and glycine by valine and serine in position 214 (I214V) and 488 (G488S), respectively, and cause steric hindrance of the insecticides.²⁸ The mutation G488S is almost always accompanied by I241V in field populations and their combination confer higher resistance over each individual mutation.^{28,31–33} However, the third mutation is in striking contrast to the other two point mutations. The deletion of three glutamines ($\Delta 3Q$) is not located in the catalytic center of AChE but at the carboxyl terminal of the enzyme at position 642 and affects the glycoposphatidylinositol (GPI)-anchoring efficiency,²⁹ indicating a distinct OP-resistance mechanism. It has been hypothesized that the $\Delta 3Q$ improves GPI anchoring, thus increasing the amount of AChE that reaches the synaptic cleft for its normal role of ACh hydrolysis, allowing the insect to survive higher insecticide dosages.³⁴ The only additional documented report of a resistance-associated mutation outside the catalytic region of AChE is that of the Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata*,³⁵ in which resistance is hypothesized to be associated with a more generalized change of the secondary structure of the protein.

The I214V and G488S mutations are the first ones to be selected under the minimum OP pressure and have risen to high frequency. A clear correlation between extensive use of OPs and high frequency of 214 V and 488S alleles in the Mediterranean basin has been shown previously.^{31–33} Furthermore, the presence of both I214V and G488S mutations in homozygosity in the least resistant individuals,³³ advocates for their importance at a minimum level of resistance, but also is indicative of a low fitness cost of these two mutations. On the contrary, the $\Delta 3Q$ mutation appears associated with resistance at higher OP doses but always in combination with the two point mutations. This suggests an auxiliary and/or multiplicative role of this mutation, in addition to its inability to provide by itself a basal level of resistance. Moreover, $\Delta 3Q$ was always found in heterozygosity,²⁹ indicating a much higher fitness cost. Be that as it may, there is still little information on the geographic distribution and variability of $\Delta 3Q$ alleles in the development of OP resistance in olive fly.

The management of pesticide resistance requires rapid and efficient assays for the detection of mutants in a population. Several approaches have been proposed with polymerase chain reaction followed by fragment length polymorphism (PCR-RFLP) and allele-specific PCR being the most popular. Taq-Man chemistry and melting curve analysis have been previously used as a "closed tube" alternative to overcome PCR-RFLP disadvantages.³⁶ In addition, multiplex PCR assays can generate multiple sets of data in a single reaction increasing the analytical capabilities. Such assays require less biological material and are less expensive than single target assays.

In the present study, we report the development of different diagnostic tests for the detection of the $\Delta 3Q$ mutation and its use to genotype olive fly populations collected throughout the Mediterranean basin. In addition, we present a new duplex quantitative polymerase chain reaction (qPCR) assay for the detection of I214V and G488S mutations. As the threat of insecticide resistance continues to loom large, diagnostic assays for resistance-associated alleles in natural populations and monitoring

Table 1. Frequency of $\Delta 3Q$ mutation in Mediterranean basin

Location	F_R^a	R/N^b	HW χ^2
Greece (Crete)	0.125	8/32	c
Italy (Vasto)	0.1112	6/27	a
Israel (Jerusalem)	0.1	6/30	a
Israel (Gde Boker)	0.1	6/30	a
Cyprus	0.0645	4/31	c
France (Corsica)	0.0625	4/32	a
France (south coast)	0.0333	3/30	a
Spain (Cordoba)	0.0167	1/30	d
Portugal (Lisboa)	0	0/30	
Morocco	0.05	3/30	c

^a F_R is the frequency of the resistant allele calculated as the ratio $R/2N$.
^b N is the total number of individuals tested and R is the number of the resistant alleles found in the sample. For a diploid organism, the maximum value for R is $2N$.
^c Indicates the Hardy-Weinberg equilibrium based on χ^2 test. All populations were in Hardy-Weinberg equilibrium, apart from the population of Portugal that was monomorphic.

their distribution would be useful in selection and application of appropriate resistance management strategies.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 Insect

Olive fly samples were collected from olive fruits from ten different locations in the Mediterranean basin. The number of olive flies and locations of the sample sites are shown in Table 1. Genomic DNA was extracted from single flies as described by Ashburner.²⁷

2.2 Diagnostic tests

Primers and sequence-specific oligonucleotide probes used in diagnostic tests were designed from the known mRNA sequence of *Boace*.²⁸ The primers and the probe used in real-time PCR were designed using Oligo 6 software (TIB MOLBIOL, Germany).

2.3 Detection of $\Delta 3Q$ mutation

2.3.1 PCR-RFLP

PCR for the amplification of exon 10 (where the $\Delta 3Q$ mutation is located) was performed in 20 μ L reaction volume and ~10 ng genomic DNA was used as a template. The amplification reactions contained a final concentration of 1xTaq buffer, 0.2 mM of each dNTP, 1.5 mM $MgCl_2$, 10 pmoles of each primer (Boace10F: TGAAGTCAAACCATCATCCG and Boace10R: GACAGCGCCAACATGAACG) and 1 unit of Taq polymerase (GoTaq[®] Promega). The amplification reaction was performed as earlier at annealing temperature 51 °C and extension time 30 s. PCR products of exon 10 were incubated with 5 units *Mwo*I (New England Biolabs) for 2 h in a 40 μ L reaction volume. Digestion products were electrophoresed in a 2% Low Range Ultra Agarose gel (New England Biolabs).

2.3.2 Allele-specific PCR

About 10 ng genomic DNA was amplified in a 20 μ L reaction volume with primers Ex10wt3'F-IMP (CTTCTCCCTGCAACAATAG) and Boace10R (to test the presence of the wild type allele of exon 10) or with primers Ex10mut3'F-IMP (CTTCTCCCTGCAACAATAG)

Table 2. Sequences of PCR primers and hybridization probes (HybProbe) for melting curve analysis of I214V and G488S mutations

Name		5'-3' sequence
I214V	Forward	CTGATCATTGATACACAACGGAA
	Reverse	CCCACACGATATTGAAACGAA
	Sensor HybProbe	CTGCCACACTGGATATATACAATGC-Fluorescein
	Anchor HybProbe	LC640 ^a GACATTATGTGGCTGTGG GTAATGTCATT-Phosphate
G488S	Forward	GGATGAGGGCACTTCATTGC
	Reverse	GTCCTACTACTCTTACACACCG
	Sensor HybProbe	GCGCAGTGAGCGATCACT-Fluorescein
	Anchor HybProbe	LC640-CTCACTGCCGACTA ATGAGTATGCC-Phosphate

^a LC640, Light Cycler Red 640.

and Boace10R (to test the presence of the mutant $\Delta 3Q$ allele of exon 10). The amplification reaction contained a final concentration of 1xTaq buffer, 0.2 mM of each dNTP, 1.5 mM MgCl₂, 10 pmoles of each primer and 1 unit of Taq polymerase (GoTaq[®] Promega) and it was performed under the following conditions: initial denaturation at 94 °C for 4 min, followed by 30 cycles consisting of 94 °C for 30 s, 55 °C for 30 s and 72 °C for 30 s. This was followed by 7 min of final extension at 72 °C. PCR products were electrophoresed in a 1.5 % agarose gel (Biorad).

2.3.3 Taq-Mun assay

Real-time PCR was performed on a LightCycler 2 (Roche Applied Science) amplifying exon 10 in 20 μ L reaction volume. The amplification reactions contained 50 ng of genomic DNA as a template and a final concentration of 1x of Hot Start reaction mix for PCR on the LightCycler, 10 μ M of each primer (Del10-F GAAGTCAAACCATCATCGCTT and Del10-R CAGTGACAGCGCAACAT) and 4 μ M of TM-ins probe (FAM-TGCAACAACAGCAACAACACT-BBQ). The LightCycler program had an initial pre-incubation step for 10 min at 95 °C followed by 45 cycles that included a denaturation step at 95 °C for 10 s, an annealing step at 60 °C for 60 s and an extension step at 72 °C for 1 s. Finally, a cooling step at 40 °C for 30 s was included.

2.4 Detection of I214V and G488S mutations

2.4.1 Duplex qPCR analysis and melting curve analysis

A multicolor procedure was used for the detection of G488S and I214V mutations in a single PCR amplification reaction. The final volume of the duplex qPCR reaction was performed in a 20 μ L reaction and 50 ng of genomic DNA was used as a template. Each reaction contained 1x Master Mix HyProbe Plus for PCR on the LightCycler, 5 μ M of primers I214V-F, I214V-R and G488S-R, 2.5 μ M of primer G488S-F and 5 μ M of each probe (Table 2). Thermal cycling for the LightCycler 2.0 was performed under the following conditions: initial denaturation (pre-incubation) at 95 °C for 10 min, followed by 35 cycles of amplification at 95 °C for 15 s, 51 °C for 20 s and 72 °C for 30 s. A final melting curve cycle was performed by raising the temperature to 95 °C for 10 s followed by an annealing temperature at 45 °C for 20 s. Finally the temperature was raised to 85 °C with continuous fluorescent acquisition, followed by a cool down to 40 °C for 30 s.

The detection of G488S mutation was performed at 640 nm fluorescence channel whereas I214V mutation was monitored at 705 nm channel. The fluorescence signal (*F*) in real-time was plotted against temperature (*T*) to produce melting curves for each sample. Melting curve analysis was performed using the Tm calling feature of the Data Analysis software v.4.05 (Roche Applied Science).

2.5 Statistical analysis

$\Delta 3Q$ allele frequencies and Hardy-Weinberg equilibrium tests in ten natural olive fly populations were calculated using PopGene v. 1.31.³⁸

3 RESULTS

A small OP resistance-associated deletion in *B. oleae* *ACE* ($\Delta 3Q$) was previously identified and a direct PCR diagnostic test was presented for monitoring the mutant allele.²⁰ In this study, we set out to develop three additional diagnostic tests based on the sequence data of resistant allele in order to generate more convenient and robust assays to detect the presence of the $\Delta 3Q$ mutation in natural populations. In that respect, we also developed a new duplex qPCR assay for the detection of the I214V and G488S mutations. Cloned cDNAs containing either the wild type or the altered sequence of the $\Delta 3Q$ mutation from a previous work were used as control templates for the development of the assays in order to provide allele specific sequences.²⁰

3.1 Allele-specific PCR

The $\Delta 3Q$ mutation is located at the last exon of *Bactrocera oleae* *ace* (exon 10). To test for the presence or absence of the $\Delta 3Q$ mutation in individual flies two primers were designed: primer Ex10wt3F-IMP, specific for the wild type allele and primer Ex10mut3F-IMP, specific for the mutant allele. The two primers were identical except from the last 3' base that provides the specificity for one or the other allele. In addition, both primers contained an arbitrary mutation that was introduced in the third before the last nucleotide in order to increase the specificity of the primers (Intentional Mismatch).^{39,40} The nucleotide sequences of resulting diagnostic primers demonstrating allele-specific amplification are presented in Figure 1. These primers were used in conjunction with the downstream primer Boace10R. As shown in Figure 2, primer Boace10R with Ex10mut3F-IMP amplify a 67 bp fragment only in mutated individuals. However, primers Boace10R and Ex10wt3F-IMP amplify a 76 bp fragment in wild type and heterozygote individuals, whereas the homozygote mutants are not amplified.

3.2 PCR-RFLP

An alternative PCR-RFLP diagnostic assay was also developed in which a PCR product was generated by primers amplifying almost the entire exon 10 and consequently flanking the $\Delta 3Q$ mutation site. The presence or absence of the $\Delta 3Q$ mutation was diagnosed by incubation of the PCR amplification product with a restriction endonuclease where the $\Delta 3Q$ mutation affects its recognition sequence. An MwoI restriction site (GCNNNNNNGC) is present in the wild type nucleotide sequence. The 9 bp deletion of the $\Delta 3Q$ mutation deletes the last two GC residues of the MwoI site. Therefore, the MwoI site of exon 10 was used to determine the genotype of different olive fruit flies in a diagnostic PCR-RFLP test. Figure 1 shows the sequence of the primers, the amplified product of wild type and mutant allele, as well as the recognition



Figure 1. Diagrammatic representation of exon 10 of *electrocens oleaceae* that contains the $\Delta 3Q$ mutation. Arrows indicate the position of the primers on the sequence. Primer Ex10wt3'-IMP in combination with Boace10R amplifies the wild type allele. Primer Ex10mut3'-IMP in combination with Boace10R amplifies the mutant allele. The intentional mismatch for both target alleles is colored green (in the online version) and placed in a box, where the terminal bases are colored red for the wild type allele and blue for the mutated one (in the online version) and placed in circles. The shaded area includes the recognition site for *MwoI* that is used in the PCR-RFLP diagnostic test.

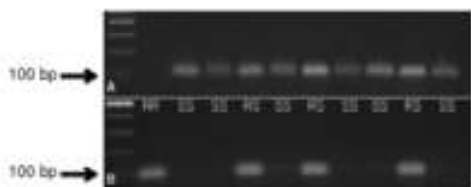


Figure 2. Allele-specific PCR test in 1.5% agarose gel. (A) Corresponds to PCR products obtained by primers Ex10wt3'-IMP and Boace10R. (B) Corresponds to PCR products obtained by primers Ex10mut3'-IMP and Boace10R. The RR lane is the amplification product of the cloned $\Delta 3Q$ allele in a plasmid vector and represents a hypothetical $\Delta 3Q$ homozygous genotype. The RS lanes are amplification products of field-collected flies of $\Delta 3Q$ heterozygous genotype, whereas the SS lane represents the null $\Delta 3Q$ genotype. The leftmost lane is the molecular weight marker.



Figure 3. PCR-RFLP analysis of the $\Delta 3Q$ mutation in a 2% low range agarose gel. The PCR product of the null $\Delta 3Q$ genotype (SS) is digested into a 59 bp and a 37 bp fragment, whereas the homozygous $\Delta 3Q$ genotype (RR) is not digested and presents a band at 87 bp, as the $\Delta 3Q$ mutation deletes the last two GC residues of the *MwoI* recognition site. The RR lane is the amplification product of the cloned $\Delta 3Q$ allele in a plasmid vector that is used as a control. The heterozygote individual (SR) presents all three bands, 86 bp, 59 bp and 37 bp. The rightmost lane, indicated L, is the molecular weight marker.

sequence of *MwoI*. The PCR of the wild type and mutant alleles with the primers Boace10F and Boace10R produces a 96 bp and 87 bp products, respectively. As shown in Figure 3, *MwoI* digestion of 96 bp PCR product results in two fragments of 59 bp and 37 bp, whereas the 87 bp PCR product containing the $\Delta 3Q$ mutation remains undigested, as indicated by the 87 bp band. However, individuals heterozygous for the $\Delta 3Q$ mutation present all three fragments (87 bp, 59 bp and 37 bp).

3.3 Taq-Man assay

A Taq-Man assay was also designed in order to discriminate the wild-type and mutant $\Delta 3Q$ allele. During the assay a probe that amplifies the wild type allele but not the homozygous mutant allele was used. As shown in Figure 4, no amplification indicates a homozygous (RR) individual mutant carrying the $\Delta 3Q$ deletion. Substantial increase in FAM fluorescence signal indicates a wild type individual and an intermediate increase indicates a heterozygote individual.

3.4 Duplex qPCR assay for G488S and I214V mutation detection

A new diagnostic test based on a single duplex qPCR reaction was developed for G488S and I214V mutations. The presence or

absence of the mutations was identified by a melting curve analysis as base changes cause a lowered melting temperature, which can read out in genotypes. As shown in Figure 5, a high melting point (66 °C) at 640 nm indicates the homozygote individuals (RR) for the G488S mutation, while the wild type homozygote SS is observed at a melting point of 60 °C in the same fluorescence channel. Heterozygous individuals are discriminated from RR and SS genotypes by a two-peak melting point (60 and 66 °C). However, the I214V mutation is detected at 705 nm with homozygote wild type individuals (SS) observed at a melting point of 66 °C and homozygote mutant (RR) at 60 °C. Heterozygous discriminated from RR and SS genotypes by a two-peak melting point (60 and 66 °C).

3.5 Frequency of $\Delta 3Q$ in Mediterranean populations

The distribution of $\Delta 3Q$ mutation in Mediterranean populations was monitored by the PCR-RFLP diagnostic test developed in this study. A total of ten populations (~30 individuals for each population) from different regions of eight countries (two from Israel and France and one from Cyprus, Greece, Italy, Spain, Portugal and Morocco) were analyzed for the presence of the resistant $\Delta 3Q$

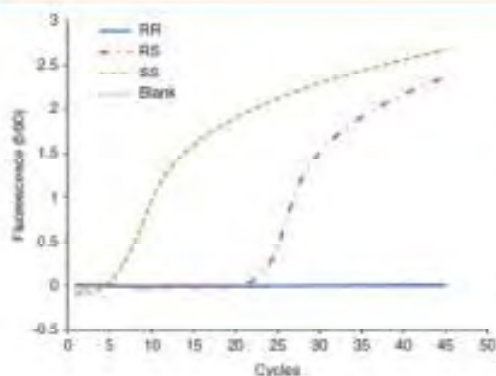


Figure 4. Cycling of FAM-labeled probe specific for the wild-type (SS) and the heterozygous (RS) alleles of $\Delta 3Q$ mutation using Taq-Man chemistry. No amplification indicates a homozygous (RR) individual mutant carrying the $\Delta 3Q$ deletion. Substantial increase in FAM fluorescence signal indicates a wild type individual and an intermediate increase indicates a heterozygote individual.

allele. The number of individuals and the frequencies of the $\Delta 3Q$ allele for each of the ten populations are given in Table 1. The $\Delta 3Q$ allele was found in nine out of the ten natural populations tested and frequencies ranged from 2 to 12.5%. The $\Delta 3Q$ allele was not detected in Portugal. The highest frequencies > 10% were found in Greece and Italy, whereas a gradual decrease of $\Delta 3Q$ frequency towards the western Mediterranean was also noted (Figure 6). Interestingly, homozygote individuals for the R allele were not found in any of the populations examined. Additionally, all populations were in Hardy–Weinberg equilibrium, apart from the population of Portugal that was monomorphic.

4 DISCUSSION

Since the first reported case of pesticide resistance by Melander in 1914,⁴¹ the incidence of resistance has proliferated exponentially, becoming a challenging problem for applied entomology. In olive fly, three mutations have been associated with resistance to OPs: two point mutations in the active site of the enzyme that are predominantly responsible for the resistance and a short deletion in the C terminal of the enzyme that appears associated with resistance at higher OP doses but always in combination with the two aforementioned mutations. While geographical distribution of the two point mutations has been analyzed in a number of studies,^{21–23} there is little information for the $\Delta 3Q$ mutation in that aspect. On that account, we developed three new diagnostic tests to detect the presence of $\Delta 3Q$ ace mutation in olive fly and used them to monitor its frequency in natural populations.

In a previous study, we had proposed a direct PCR method for $\Delta 3Q$ detection in which the 9 bp difference between the wild type and the mutant PCR product was visualized either in high-resolution > 3% agarose gel electrophoresis or in a 10% acrylamide gel electrophoresis.²⁸ However, high-resolution agarose or acrylamide gel electrophoresis increases the cost and the processing time. Thus, together with the fact that handling acrylamide requires special caution, we developed an allele-specific PCR and a PCR-RFLP diagnostic test, as well as a real-time Taq-Man assay in order to simplify the $\Delta 3Q$ detection. In addition, we developed a duplex qPCR assay for the detection

of the two point mutations. While all the tests are robust, simple to perform, easy to interpret and can be implemented in routine monitoring resistance plans, there are some factors that should be taken into consideration in test choice. On the basis of cost, the direct PCR developed previously and the allele-specific PCR are the front-runners. The direct PCR was based on regular primers, while the development of an allele-specific PCR necessitated the introduction of an internal mismatch (IMP; internal mismatch primer) in order to increase the specificity. Guo et al.³⁹ and Wilkins et al.⁴⁰ showed that an arbitrary mutation introduced in the third before the last nucleotide can increase the specificity and sensitivity of the primers. However, both of them were frequently problematic and unreliable. Concerning the specificity and sensitivity, the duplex qPCR approach shows excellent discrimination of the resistance alleles in two point mutations (G488S and I214V).

The Taq-Man assay is a PCR method using oligonucleotide probes that are labelled with a fluorescent reporter dye and a quencher molecule. In the current study the developed Taq-Man assay could unambiguously indicate the presence of the $\Delta 3Q$ deletion. However, whether an individual fly contains two (RR), one (RS) or zero (SS) copies of $\Delta 3Q$ is judged upon the time (cycle) of appearance of the fluorescence signal during the qPCR. This is confounded by other factors as well (e.g. DNA quantity and/or purity). Therefore, this reaction can only be used with caution and laboratory experience, or could only be used to indicate presence or absence of the mutation but not to decide the heterozygote state of an individual. Moreover, the running cost of Taq-Man method is higher comparable to the others. However, the PCR-RFLP and the allele-specific PCR assays for the $\Delta 3Q$ mutation are relatively cheap and provide acceptable sensitivity. Overall, where the cost is a deciding factor in diagnostic test choice, the PCR-RFLP tests are preferable based on cost, sensitivity and ease of use. However, the duplex qPCR assay for the two point mutations is the preferred method where cost is not a restriction and specificity, sensitivity and quick throughput are required.

The new PCR-RFLP method developed in this study for the $\Delta 3Q$ mutation was used to genotype ten olive fly populations that were collected from widely separated locations around the Mediterranean basin. It is important to monitor resistant alleles at regional scales, so that the resistance management strategies can be adjusted appropriately for the local conditions. The resistant allele was detected in nine out of ten populations, confirming that resistant genotypes associated with OP resistance are widespread in the Mediterranean region. Remarkably, the distribution of $\Delta 3Q$ follows the spread of the OP insecticides across the Mediterranean basin, showing that the strong selective pressure imposed by insecticide treatments has driven the spread of resistant alleles both in frequency and geographic range, as French Constant et al.⁴² demonstrated in 2004. The highest frequency was found in Greece and Italy, where the extensive and continuous use of OPs is an important selection factor.^{30,43} In Greece, dimethoate and fenitrothion have been used against olive fly for about four decades.²³ The lowest frequencies were found in western Mediterranean countries, where the use of OP insecticides is limited. In Spain, only one $\Delta 3Q$ allele was detected, whereas in Portugal $\Delta 3Q$ was not found. In 1996, in Portugal the total use of OP insecticides was just 225 tonnes in contrast to Greece, where the annual use was 1437 tonnes. A year later, Greece almost doubled this quantity (2275 tonnes) in contrast to Portugal that remained at similar levels.⁴⁴ This distribution of $\Delta 3Q$ mutation is also consistent with the Mediterranean pattern of the two other resistance associated

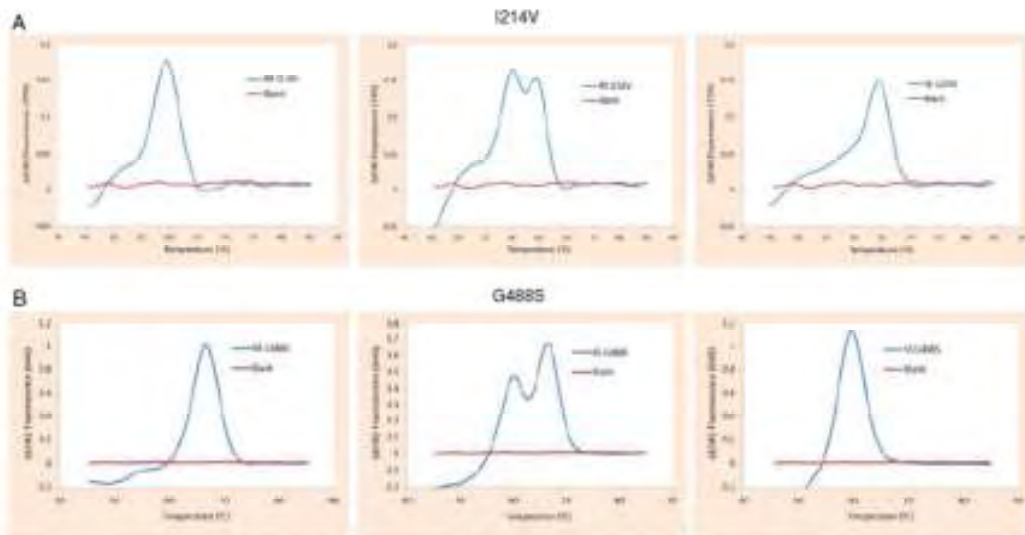


Figure 5. Melting curve profiles for determining the presence of I214V (A) and G488S (B) alleles in *Drosophera oleae* populations. The I214V mutation was detected at 705 nm with homozygote wild type flies (SS) observed at a melting point of 66 °C and homozygote mutants (RR) at 60 °C. Heterozygotes were discriminated from RR and SS genotypes by a two-peak melting point (60 and 66 °C). For G488S (B), the mutation was detected at 640 nm with homozygote mutants (RR) observed at a melting point of 66 °C and the wild type individuals (SS) at 60 °C. Heterozygous individuals were discriminated from RR and SS genotypes by a two-peak melting point (60 and 66 °C).



Figure 6. The spread of the $\Delta 3Q$ mutation around the Mediterranean basin. In pie charts, yellow color represents the frequency of null $\Delta 3Q$ allele while the orange color the frequency of R $\Delta 3Q$ allele.

point mutations I214V and G488S in olive fly, since similar results were reported in the studies of Hawkes et al.,³¹ Nardi et al.³² and Skouras et al.³³ The highest frequency of I214V and G488S was recorded in Greece and Italy, confirming that the spread of *ace* mutant alleles largely follows OP use. Interestingly, all populations were under Hardy–Weinberg equilibrium, indicating that OPs constitute integral and steady-state elements of the Mediterranean agricultural environment.

Finally, it is worthy of note that homozygous $\Delta 3Q$ individuals were not found in any of the populations examined, indicating a higher fitness cost of $\Delta 3Q$ compared to that of I214V and G488S mutations, as also suggested in our previous study.²⁹ A notable feature is that OP resistance is achieved with few mutations that are generally costly and the cost is variable among them.^{7,8} It is usually believed that the initial fitness cost would gradually decrease due to other mutations with a modifier effect.⁴⁵ Hawkes et al.³¹ proposed that the tight linkage between I214V and G488S arose because this combination of mutations confers insecticide

insensitivity whilst being less detrimental to the normal function of AChE than G488S alone. In such a context, the low frequency of the $\Delta 3Q$ mutation could be due to a competition with the I214V and G488S alleles, which confer resistance in a certain level of OPs and consequently it is only needed when higher OPs pressure is applied. Thus, if a fitness cost is associated with the $\Delta 3Q$ mutation, it could be due either to an excess of cholinergic activity leading to a deficit of ACh in the synapses or to another deleterious side effect of the mutation. This fitness cost may become higher when the $\Delta 3Q$ allele is found in homozygosity or alone (not in combination with the others) and it may explain this scarcity. AChE enzyme was shown to be involved in the development of the nervous system in vertebrates and invertebrates and any AChE mutation could impair a developmental process and generate high fitness cost.^{46,47} Be that as it may, the implications with regard to the fitness cost of $\Delta 3Q$ remain an open question.

As prevention is better than cure, one of the most critical keys in control programs still remains monitoring of insecticide resistance.

Knowledge of insecticide resistance status and changing trends of resistance are basic requirements to guide insecticide use in pest control programs. When the frequency of resistant phenotypes increases to a certain level in field populations, control efficacy with the concerned insecticide becomes economically unacceptable. It is therefore important to detect resistant alleles, especially highly resistant alleles such as the $\Delta 3Q$ allele, when they are at incipient levels and monitor their increase and geographical spread so that appropriate measures can be employed in time, in order to curtail their increase. For example, detection of the $\Delta 3Q$ mutation in a population could mean that resistance to OP insecticides is already at high levels, in comparison to detection of I214V and G488S mutations. In that sense, detection of I214V and G488S mutations could serve as an early warning of the impending problem of OP insecticide resistance and higher OP doses or change to a different OP could suffice. Instead, detection of $\Delta 3Q$ mutation would indicate the need of a switch to a new insecticide class, since insect populations would possess substantially high OP resistance levels.

Nonetheless, as mentioned in the beginning, heavy and continuous use of insecticides inevitably leads to the development and spread of resistance. Apparently, spinosad use against *Bactrocera oleae* is following a similar OP-resistance development pattern.⁴⁸ Clearly, novel integrated pest management approaches are needed. Among them, the Sterile Insect Technique (SIT) is receiving renewed interest for the olive fly due to the development of more efficient transgenic tools⁴⁹ that appear promising in overcoming problems associated with earlier SIT efforts for olive fly control.^{20,51}

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was partially financed by the Greece–Cyprus Joint Research and Technology Program (supported by the Greek Secretariat for R&T and the Cyprus Research Promotion Foundation), a Research Potential Support Program of the Greek Secretariat of R&T (PENED 2003) and the two postgraduate programs of the Department of Biochemistry and Biotechnology of the University of Thessaly ('Biotechnology – Nutrition and Environment' and 'Molecular Biology and Genetics applications').

REFERENCES

- Rosenberry TL. Acetylcholinesterase. *Adv Enzymol* **43**:103–218 (1975).
- Toutant J-P. Insect acetylcholinesterase: catalytic properties, tissue distribution and molecular forms. *Prog Neurobiol* **52**:423–446 (1989).
- Aldridge WN. Some properties of specific cholinesterase with particular reference to the mechanism of inhibition by diethyl p-nitrophenyl thiophosphate (E 605) and analogues. *J Biochem* **46**:451–460 (1950).
- Corbett JL. *The Biochemical Mode of Action of Pesticides*. Academic Press, London (1974).
- Matsumura F. *Toxicology of Insecticides*, 2nd edition. Plenum Press, New York (1985).
- Harel M, Kryger G, Rosenberry T, Mallender WD, Lewis T et al. Three dimensional structures of *Drosophila melanogaster* acetylcholinesterase and of its complexes with two potent inhibitors. *Protein Sci* **9**:1063–1072 (2000).
- Fournier D. Mutations of acetylcholinesterase which confer insecticide resistance in insect populations. *Chem-Biol Interact* **157**:158–257–261 (2005).
- Fournier D, Bride JM, Hoffman F, Karch F. Acetylcholinesterase: two types of modifications confer resistance to insecticides. *J Biol Chem* **267**:14270–14274 (1992).
- Mutero A, Palavario M, Bride JM, Fournier D. Resistance-associated point mutation in insecticide-insensitive acetylcholinesterase. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**:5922–5926 (1994).
- Nabeshima Y, Kozaki T, Tomita T, Kono Y. An amino acid substitution on the second acetylcholinesterase in the pirimicarb-resistant strains of the peach potato aphid, *Myzus persicae*. *Biochem Biophys Res Commun* **307**:15–22 (2003).
- Weill M, Malcolm C, Chandre F, Mogensen K, Berthomieu A et al. The unique mutation in ace-1 giving high insecticide resistance is easily detectable in mosquito vectors. *Insect Mol Biol* **13**:1–7 (2004).
- Williamson MS, Moores GD, Devonshire AL. Altered forms of acetylcholinesterase in insecticide-resistant houseflies (*Musca domestica*). In *Multidisciplinary Approaches to Cholinesterase Functions*. Plenum Press, New York, pp. 83–86 (1992).
- Feyerherren R. Molecular biology of insecticide resistance. *Toxicol Lett* **82/83**:83–90 (1995).
- Kozaki T, Shono T, Tomita T, Kono Y. Fenitrothion insensitive acetylcholinesterases of the housefly, *Musca domestica* associated with point mutations. *Insect Biochem Mol Biol* **31**:991–997 (2001).
- Walsh SB, Dolden TA, Moores GD, Kristensen M, Lewis T, et al. Identification and characterization of mutations in housefly (*Musca domestica*) acetylcholinesterase involved in insecticide resistance. *Biochem J* **359**:175–181 (2001).
- Hsu J-C, Hymer DS, Wu W-L, Feng H-T. Mutations in the acetylcholinesterase gene of *Bactrocera dorsalis* associated with resistance to organophosphorus insecticides. *Insect Biochem Mol Biol* **36**:396–402 (2006).
- Magana C, Hernandez-Crespo P, Ortega F, Castanera P. Resistance to malathion in field populations of *Ceratitis capitata*. *J Econ Entomol* **100**:1838–1843 (2008).
- Andrews MC, Callaghan A, Field LM, Williamson MS, Moores GD. Identification of mutations conferring insecticide-insensitive AChE in the cotton-melon aphid, *Aphis gossypii* Glover. *Insect Mol Biol* **13**:555–561 (2004).
- Toda S, Komazaki S, Tomita T, Kono Y. Two amino acid substitutions in acetylcholinesterase associated with pirimicarb and organophosphorus insecticide resistance in the cotton. *Insect Mol Biol* **13**:549–553 (2004).
- Javed N, Viner R, Williamson MS, Field LM, Devonshire AL, et al. Characterization of acetylcholinesterases and their genes, from the hemipteran species *Myzus persicae* (Sulzer), *Aphis gossypii* (Glover), *Bemisia tabaci* (Gennadius) and *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood). *Insect Mol Biol* **12**:613–620 (2003).
- Tomita T, Hdoh O, Yoshiaki K. Absence of protein polymorphism attributable to insecticide insensitivity of acetylcholinesterase in the green rice leafhopper, *Nephotettix cincticeps*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **30**:325–333 (2000).
- Baxter GD, Baker SC. Acetylcholinesterase cDNA of cattle tick, *Boophilus microplus*: characterization and role in organophosphate resistance. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **28**:581–589 (1998).
- Hughes PJ, Raftos DA. Genetics of an esterase associated with resistance to organophosphorus insecticides in the sheep blowfly, *Lucilia cuprina* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae). *Bull Entomol Res* **75**:535–544 (1985).
- Newcomb RD, Campbell PM, Russell RJ, Oakeshott JG. cDNA cloning, baculovirus-expression and kinetic properties of the esterase, E3, involved in organophosphorus resistance in *Lucilia cuprina*. *Insect Biochem Mol Biol* **27**:15–25 (1997).
- Vaughan A, Hawkes N, Hemingway J. Co-amplification explains linkage disequilibrium of two mosquito esterase genes in insecticide-resistant *Culex quinquefasciatus*. *Biochem J* **325**:359–365 (1997).
- Wang J, McCommas S, Syrwan M. Molecular cloning of a glutathione S-transferase overproduced in an insecticide-resistant strain of the housefly (*Musca domestica*). *Mol Gen Genet* **227**:260–266 (1991).
- Huang HS, Hu NT, Yao YE, Wu CY, Chiang SW, et al. Molecular cloning and heterologous expression of a glutathione S-transferase involved in insecticide resistance from the diamondback moth, *Plutella yllastella*. *Insect Biochem Mol Biol* **28**:651–658 (1998).
- Vorrtas JG, Hejazi MJ, Hawkes NJ, Cosmidis N, Loukas M, et al. Resistance-associated point mutations of organophosphate insensitive acetylcholinesterase, in the olive fruit fly *Bactrocera oleae*. *Insect Mol Biol* **11**:329–336 (2002).
- Kakani EG, Ioannides IM, Margaritopoulos JF, Seraphides NA, Skouras PJ, et al. A small deletion in the olive fly acetylcholinesterase gene associated with high levels of organophosphate resistance. *Insect Biochem Mol Biol* **38**:781–787 (2008).
- Vorrtas J, Cosmidis N, Loukas M, Tsikas S, Hejazi MJ, et al. Altered acetylcholinesterase confers organophosphate resistance in the

- olive fruit fly *Bactrocera oleae*. *Pestic Biochem Physiol* **71**:124–132 (2001).
- 31 Hawkes NJ, James RW, Hemingway J, Vontas J. Detection of resistance-associated point mutations of organophosphate-insensitive acetylcholinesterase in the olive fruit fly, *Bactrocera oleae* (Gmelin). *Pestic Biochem Physiol* **81**:154–163 (2005).
 - 32 Nardi F, Carapelli A, Dallai R, Ioddenck GR, Frati F. Population structure and colonization history of the olive fly, *Bactrocera oleae* (Diptera, Tephritidae). *Molecular Ecology* **14**:2729–2738 (2005).
 - 33 Skouras PJ, Margaritopoulos JT, Seraphides NA, Ioannides IM, Kakani EG, et al. Organophosphate resistance in olive fruit fly, *Bactrocera oleae*, populations in Greece and Cyprus. *Pest Manag Sci* **63**:42–48 (2007).
 - 34 Kakani EG, Bon S, Massoulé J, Mathiopoulos KD. Altered GPI modification of insect AChE improves tolerance to organophosphate insecticides. *Insect Biochem Mol Biol* **41**:150–158 (2011).
 - 35 Zhu KY, Lee SH, Clark M. A point mutation of acetylcholinesterase associated with azinphosmethyl resistance and reduced fitness in Colorado potato beetle. *Pestic Biochem Physiol* **55**:100–108 (1996).
 - 36 Bass C, Nikou D, Vontas J, Williamson MS, Field LM. Development of high-throughput real time PCR assays for the identification of insensitive acetylcholinesterase (*ace-1R*) in *Anopheles gambiae*. *Pest Biochem Phys* **96**:80–85 (2010).
 - 37 Ashburner M. *Drosophila: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York (1989).
 - 38 Yeh FC, Yang R, Boyle TJ, Ye Z, Xiyun JM. *POPGENE 32*. Microsoft Window-based Freeware for Population Genetic Analysis, Version 1.32. Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Edmonton (2000).
 - 39 Guo Z, Liu Q, Smith LM. Enhanced discrimination of single nucleotide polymorphisms by artificial mismatch hybridization. *Nat Biotechnol* **15**:331–335 (1997).
 - 40 Wilkins EE, Howell PL, Benedict MQ. IMP-PCR primers detect single nucleotide polymorphisms for *Anopheles gambiae* species identification, Mopti and Savanna rDNA types, and resistance to dieldrin in *Anopheles arabiensis*. *Malar J* **5**:125 (2006).
 - 41 Melander AL. Can insects become resistant to sprays? *Journal of Economic Entomology* **7**:167–173 (1914).
 - 42 French Constant HR, Daborn JP, Le Gall G. The genetics and genomics of insecticide resistance. *Trends Genet* **20**:163–170 (2004).
 - 43 Haniotakis GE. Olive pest control: present status and prospects. In *Proceedings of the IOBC/WPRS Conference on Integrated Protection of Olive Crops*. Chania, Crete (2003).
 - 44 FAOSTAT. Agricultural Resources. Available: <http://faostat.fao.org/site/405/default.aspx>
 - 45 Raymond M, Berticat C, Weill M, Pasteur N, Chevillon C. Insecticide resistance in the mosquito *Culex pipiens*: what have we learned about adaptation? *Genetica* **112–113**:287–296 (2001).
 - 46 Cousin X, Strahle U, Chatonnet A. Are there non-catalytic functions of acetylcholinesterases? Lessons from mutant animal models. *Bioessays* **27**:189–200 (2005).
 - 47 Grissau D, Stenfeld M, Eldor A, Glick D, Soreq H. Structural roles of acetylcholinesterase variants in biology and pathology. *Eur J Biochem* **264**:672–686 (1999).
 - 48 Kakani EG, Zygouridis NE, Tsoumari KT, Seraphides N, Zalom FG, Mathiopoulos KD, Spirosiad resistance development in wild olive fruit fly *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae) populations in California. *Pest Manag Sci* **66**:447–453 (2010).
 - 49 Arit T, Koukidou M, Rempoulakis P, Gong H-F, Economopoulos A, et al. Control of the olive fruit fly using genetics-enhanced sterile insect technique. *BMC Biology* **10**:51 (2012).
 - 50 Economopoulos AP, Avtzis N, Zervas G, Tsitsipis J, Haniotakis G, et al. Control of the olive fly, *Dacus oleae* (Gmelin), by the combined effects of insecticides and release of gamma sterilized insects. *J Appl Entomol* **83**:201–215 (1977).
 - 51 Zervas GA, Economopoulos AP. Mating frequency in caged populations of wild and artificially reared (normal or gamma-sterilized) olive fruit flies, *Dacus oleae* (Gmelin) (Diptera: Tephritidae). *Environ Entomol* **11**:17–20 (1982).

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Olive fly transcriptomics analysis implicates energy metabolism genes in spinosad resistance

Efthymia Sagri¹, Martin Reczko², Maria-Eleni Gregoriou¹, Konstantina T Tsoumani¹, Nikolaos E Zygouridis¹, Klelia D Salpea², Franik G Zalom³, Jannis Ragoussis^{2,4} and Kostas D Mathiopoulos^{1*}

Abstract

Background: The olive fly, *Bactrocera oleae*, is the most devastating pest of cultivated olives. Its control has been traditionally based on insecticides, mainly organophosphates and pyrethroids. In recent years, the naturalyte spinosad is used against the olive fly. As with other insecticides, spinosad is subject to selection pressures that have led to resistance development. Mutations in the $\alpha 6$ subunit of the nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) have been implicated in spinosad resistance in several species (e.g., *Drosophila melanogaster*) but excluded in others (e.g., *Musca domestica*). Yet, additional mechanisms involving enhanced metabolism of detoxification enzymes (such as P450 monooxygenases or mixed function oxidases) have also been reported. In order to clarify the spinosad resistance mechanisms in the olive fly, we searched for mutations in the $\alpha 6$ -subunit of the nAChR and for up-regulated genes in the entire transcriptome of spinosad resistant olive flies.

Results: The olive fly $\alpha 6$ -subunit of the nAChR was cloned from the laboratory sensitive strain and a spinosad selected resistant line. The differences reflected silent nucleotide substitutions or conserved amino acid changes. Additionally, whole transcriptome analysis was performed in the two strains in order to reveal any underlying resistance mechanisms. Comparison of over 13,000 genes showed that in spinosad resistant flies nine genes were significantly over-expressed, whereas 40 were under-expressed. Further functional analyses of the nine over-expressed and eleven under-expressed loci were performed. Four of these loci (Yolk protein 2, ATP Synthase FO subunit 6, Low affinity cationic amino acid transporter 2 and Serine protease 6) showed consistently higher expression both in the spinosad resistant strain and in wild flies from a resistant California population. On the other side, two storage protein genes (HexL1 and Lsp1) and two heat-shock protein genes (Hsp70 and Hsp23) were unfailingly under-expressed in resistant flies.

Conclusion: The observed nucleotide differences in the nAChR- $\alpha 6$ subunit between the sensitive and spinosad resistant olive fly strains did not advocate for the involvement of receptor mutations in spinosad resistance. Instead, the transcriptome comparison between the two strains indicated that several immune system loci as well as elevated energy requirements of the resistant flies might be necessary to lever the detoxification process.

Keywords: Insecticide tolerance, Spinosyns, Next generation sequencing, Expression analysis

Background

The olive fruit fly, *Bactrocera oleae* (Rossi) (Diptera, Tephritidae) is the most important pest of cultivated olives. The female insect deposits its eggs in the olive fruit mesocarp where the developing larvae feed and grow. Furthermore, oviposition provides entry points for bacteria and fungi, increasing the consequences of damage. As a result olives either drop before maturity and become inedible or

oil quality is affected [1]. More than 30% annual olive crop losses are attributed to the olive fly [2], which accounts to an economic impact of more than 800 million dollars [3].

During the last fifty years, the control of the fly has been traditionally based on chemical insecticides, mainly organophosphates (OPs) and, more recently, pyrethroids. Apart from the harmful effects of pesticides in the environment, insecticide exposure has led to the selection of resistant alleles in natural populations and the development of widespread insecticide resistance, mainly to organophosphates [4] but also to pyrethroids [5]. The mechanism of resistance to OPs has been extensively studied and has

* Correspondence: kmathi@pbio.uthgr
¹Department of Biochemistry and Biotechnology, University of Thessaly, Phoureas 26, Larissa, Greece
Full list of author information is available at the end of the article



© 2014 Sagri et al.; licensee BioMed Central Ltd. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly credited. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

been attributed to target site mutations in the acetylcholinesterase (AChE). Two of these are point mutations that reside in the catalytic gorge of the enzyme [6] and a third one is a small deletion located in the carboxyl-terminal of the enzyme [7,8].

Replacement of organophosphates with other environmentally friendlier products such as spinosad, has been a trend in recent years. Spinosad belongs to the naturalyte class [9] and has demonstrated particular efficiency against the Tephritid family of insects [10]. It is derived from the bacterium *Saccharopolyspora spinosa*, and is composed of a mixture of two macrocyclic lactones, spinosyn A (50-95%) and spinosyn D (5-50%) [9]. This insecticide acts by two main routes. Firstly, by activating the nicotinic acetylcholine receptor, but at a different site from that used by nicotine and imidacloprid [11], and secondarily through the GABA receptor, but at a distinct site from that used by abamectin [12,13]. Spinosad may enter the organism by contact or through ingestion. The symptoms are limp paralysis, tremors and finally insect death [14].

Despite the relatively short history of spinosad in the marketplace, spinosad-associated resistance has been reported in many insects [15]. The first reports of spinosad resistance in the field were for the beet armyworm, *Spodoptera exigua* [16,17]. Spinosad resistance has also been reported in several other species, such as the melon fly, *Bactrocera cucurbitae* [18], the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* [19], the housefly, *Musca domestica* [20] and the tobacco budworm, *Heliothis virescens* [21]. The molecular mechanism of resistance to spinosad has not been fully clarified. There is evidence that resistance is a result of either enhanced metabolism of detoxification enzymes or a consequence of changes in a target site. The most noticeable target site of spinosad resistance is the nicotinic acetylcholine receptor (nAChR). In the case of *Drosophila melanogaster*, mutations in the $\alpha 6$ subunit of the nAChR (Daf6) confer high-fold resistance to spinosad, clearly implicating the Daf6 subunit in resistance [22,23]. The $\alpha 6$ subunit of nAChR has been associated in spinosad resistance in other insects as well. For example, mis-spliced or truncated nAChR- $\alpha 6$ transcripts in the diamondback moth, *Plutella xylostella* [24,25], truncated *Bda6* transcripts of *Bactrocera dorsalis* [26], or a point mutation (G275E) in the transmembrane domain of the nAChR- $\alpha 6$ subunit in the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis* [27], all confer high levels of resistance to spinosad. In contrast, spinosad resistance in *Musca domestica* does not seem to be related with the $\alpha 6$ subunit of nAChR. Instead, it correlates with a recessive factor on chromosome I [20], rather than the three nicotinic acetylcholine subunits ($\alpha 5$, $\alpha 6$, $\beta 3$) that reside on the same chromosome [28].

In other cases, however, enhanced metabolism of detoxification enzymes have been implicated in spinosad resistance. For example, the microsomal-O-demethylase as well as monooxygenases were shown to be involved in resistance in *Spodoptera exigua* from China [29], an increase in cytochrome P450 monooxygenase was associated in cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* [30], while enhanced activity of detoxifying mixed function oxidases were connected with resistance in the Chilean populations of *Tuta absoluta* [31].

Until now, the most frequently used approach for isolating genes from an organism with few genetic and molecular tools was through PCR amplification with heterologous primers of the respective genes of closely related species. This approach, however, is greatly biased and excludes the possibility of identifying either genes that do not have homology in other organisms, or loci responsible for mechanisms that have not been studied in relative species. A transcriptomics approach, instead, may assess the differences of all expressed genes at the same time between sensitive and resistant individuals, without any pre-conceived ideas about specific genes, and thus reveal novel mechanisms that might be involved in resistance.

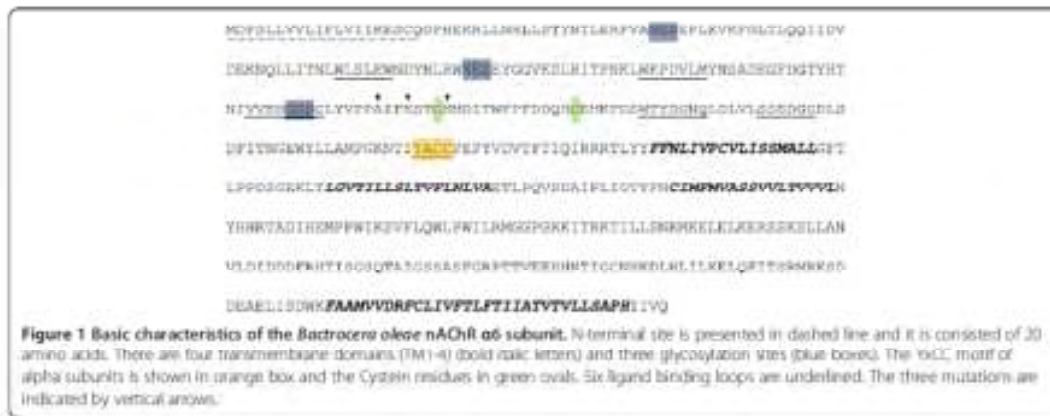
In the present study, we determined the sequence of the $\alpha 6$ subunit of nAChR of both a sensitive and a spinosad resistant olive fly strain, in order to explore possible presence of resistance mutations. In addition, we compared the entire transcriptomes of these two strains, in search of unknown loci that might be involved in spinosad resistance. Differential expression observed in several genes was validated both in laboratory colonies and field collected flies.

Results

Cloning of the *B. oleae* nAChR subunit $\alpha 6$ gene

A total of 2,367 bp of the *Bactrocera oleae* nAChR $\alpha 6$ subunit (Boa6) cDNA sequence was obtained from a susceptible laboratory (LAB) and a spinosad-selected (SPIN) strain. Initially, the *B. dorsalis*-based primers Bda6F and Bda6R amplified a partial ~1,800 bp coding fragment and subsequent 5' - and 3' -RACE reactions unraveled a 5' -UTR region of 300 bp upstream the start codon and a 3' -UTR of 600 bp that ended in a poly-A tail.

The beginning of the coding sequence was determined by the presence of a methionine residue at the expected place, as compared with known sequences from *Drosophila melanogaster* and *Bactrocera dorsalis*. Upstream of that residue there was no significant ORF. The next downstream Met residue was after 467 bp that would result in a substantially truncated product. An open reading frame of 1,467 bp encodes a putative 489 amino acid protein. The putative protein has 97% identity to the reciprocal *B. dorsalis* (AFN88980.1) protein. The Boa6 has all typical nAChR α subunit characteristics (Figure 1). The mature



protein has a calculated molecular weight of 55.57 kDa and an isoelectric point of 4.49. It has all the characteristics of neurotransmitter-gated ion channels, with a signature of two cysteines separated by 13 amino acids [32] and four hydrophobic transmembrane domains (TM1-4) of conserved nAChR [33]. The Bou6 protein also possesses six loops and the alpha subunit character of YxCC motif [34].

Alignment of the two cDNA sequences obtained from the LAB and SPIN strains showed 13 point mutations (Additional file 1: Table S1). Ten of them were silent substitutions, while the remaining three led to homologous missense alterations: an Alanine (A) to Glycine (G) substitution at position 142 and two Lysine (K) to Arginine (R) substitutions at positions 145 and 149. The mutations are located in the N-terminal site and cause no changes on chain polarity or charge. In fact, the protein structure prediction server [35] indicated that the molecular structure of the receptor between the sensitive and the resistant strains remained unaffected. It is also known that nAChR $\alpha 6$ transcript undergoes RNA editing [36-38], although this process has not thus far been related to spinosad resistance. None of the 13 point mutations of Bou6 coincided with the recognized RNA editing sites of *Drosophila melanogaster* or *Bombyx mori*.

Solid ABI sequencing and reads assembly

In order to explore possible mechanisms and pathways involved in spinosad resistance in *Bactrocera oleae*, the entire transcriptomes of the LAB and SPIN strains were compared. For transcriptome assembly, four libraries were sequenced and used. The sample names for the libraries are LAB, SPIN, MALE and FEMALE. Each library was sequenced with paired-end sequences, where each sequence pair consists of a 35 nt and a 50 nt fragment with a variable length insert between these fragments. Sequencing obtained a total of 122,623,894 read pairs. The reads of the libraries were

pooled to construct a reference transcriptome assembly of 69,359 contigs using the SOAPdenovo assembler [39] (Table 1).

Sequence annotation

Annotation of the assembled sequences was obtained by aligning the 69,359 assembled *B. oleae* sequences against the NCBI non-redundant (Nr) protein database using blastx and collecting the annotations with the BLAST2GO tool [40]. Using an E-value threshold of $\leq 1e^{-6}$,

Table 1 Sequencing and assembly statistics

Sequencing and assembly summary		
Total number of paired-end reads		122,623,894
Total number of bases		1,9425,030,990
LAB sample	number of paired-end reads	26,713,286
	number of bases	2,270,629,310
SPIN sample	number of paired-end reads	36,252,803
	number of bases	3,081,480,255
FEMALE sample	number of paired-end reads	46,963,061
	number of bases	3,941,775,185
MALE sample	number of paired-end reads	22,695,744
	number of bases	1,970,158,240
Large contigs (≥ 500 bp)		
Number of contigs		1,573
Number of bases		1,035,345
Average contig size		658
N50 ^a		633
Largest contig size		2,381
All contigs (≥ 100 bp)		
Number of contigs		69,359
Number of bases		12,709,410

^aContig length, where all contigs of that length or longer sum up to at least half of the total of the lengths of all contigs.

20207 (29.13%) of the contigs were aligned. The top 19 species in these alignments are diptera. Of the 69,359 contigs, 23,042 (33.22%) have almost exact hits in the *B. oleae* transcriptome of Pavlidi et al. [41] (E-value $\leq 1e^{-4}$).

Only synonymous SNPs in detox genes

The presence of significant SNPs or truncations in known detoxification loci was assayed in the SPIN transcriptome. One hundred and fifty five genes involved in detoxification were analyzed. SNP calling was performed with the mpileup tool [42]. There are 9 SNPs in the sensitive strain (LAB) that are not in the resistant strain (SPIN), of which only 2 have more than 10 reads and were found to be synonymous. There are 19 SNPs in SPIN that are not in the LAB, of which only 2 have more than 10 reads and were found to be synonymous.

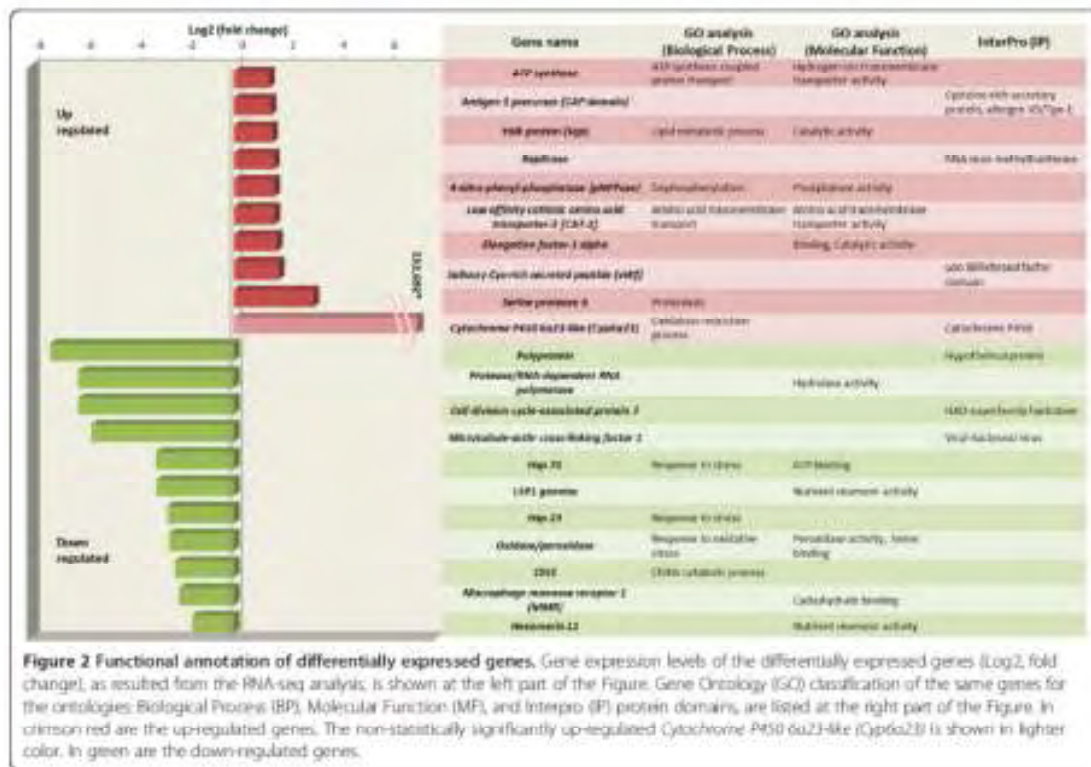
Differentially expressed genes

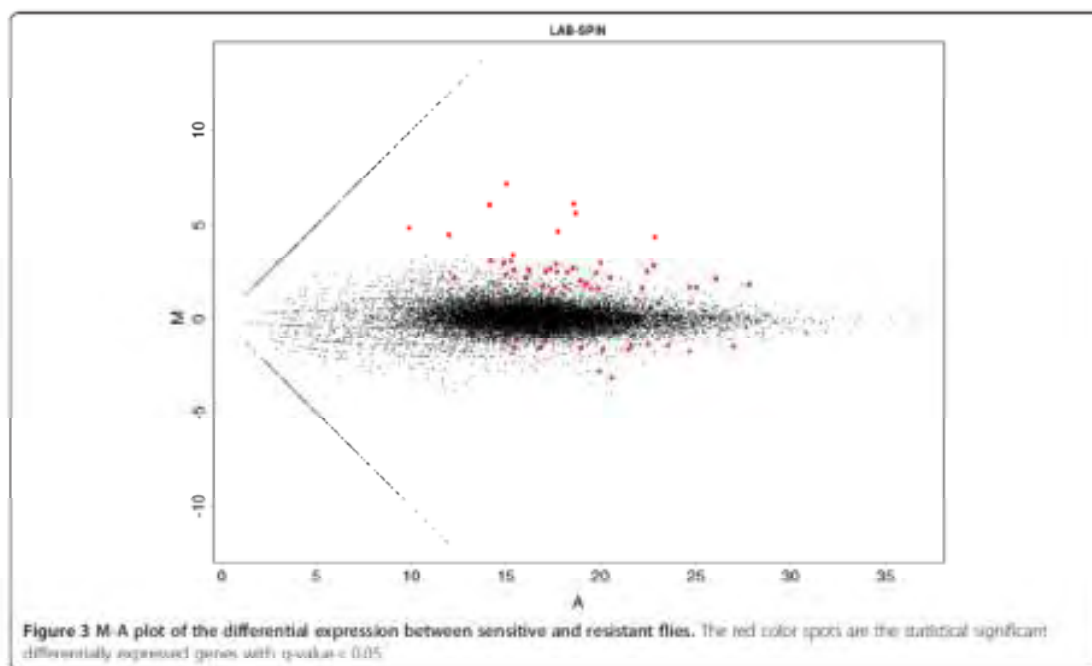
The Cuffdiff [43] tool was used in order to reveal the differentially expressed genes between the spinosad resistant and the laboratory flies, a stringent cutoff (p value adjusted for multiple testing, called q value <0.05) was used. This resulted in 46 differentially expressed transcripts in the LAB vs. SPIN strain comparison.

Twelve of these transcripts were up-regulated in SPIN resistant *B. oleae* flies than in sensitive (LAB) strain. More careful analysis revealed that three of these transcripts coincided with others and, therefore, nine distinct genes of the initial set of twelve were chosen for further functional analysis by quantitative real time PCR. These genes are listed in Figure 2 and Additional file 1: Table S2. Additionally, Cytochrome *P450 6a23-like* gene, a gene belonging in a group of known detoxification genes often involved in insecticide resistance, was considered. This gene was highly over-expressed, albeit not statistically significantly, falling below the stated criteria (p value = 0.000388, q value = 0.11).

An M-A plot was also constructed for comparison of the genes for resistant vs sensitive strain with q value < 0.05. In Figure 3 the 12 up-regulated and 40 down-regulated genes in the resistant strain are depicted in red.

Finally, functional annotation was made for the assembled sequences of the significantly differential up- and down-regulated genes mentioned in Additional file 1: Table S2, based on gene ontology (GO) categorization obtained using BLAST2GO. The GO analysis performed for two main categories, molecular function and biological process, is shown in Figure 2.





Functional analysis of genes that are putatively involved in spinosad resistance

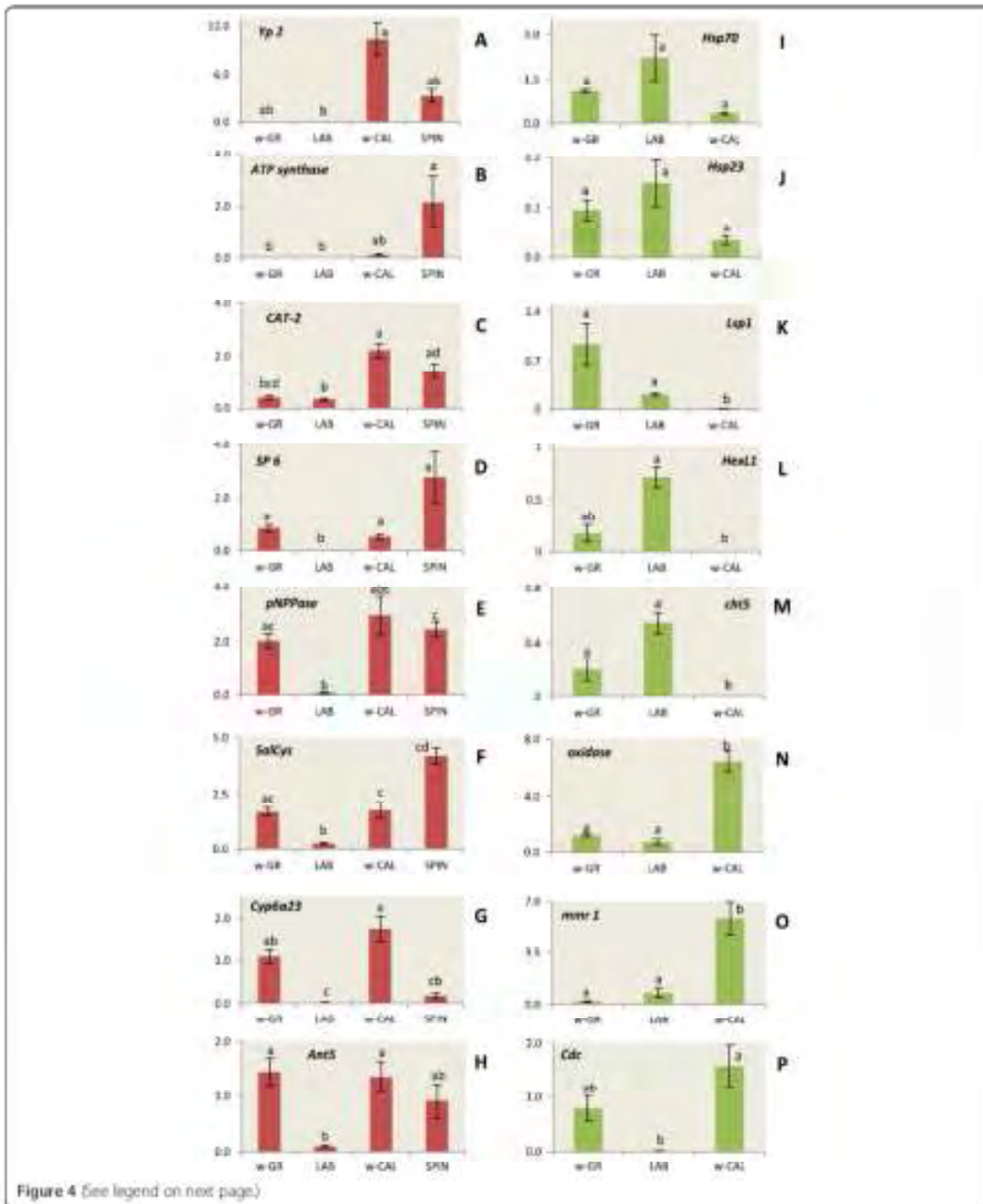
In order to find the most suitable reference gene for the functional analyses of gene expression in the *B. oleae* head tissue, nine candidate genes were tested with NormFinder [44] and Bestkeeper [45] analysis. The nine genes were: *RPL19* (ribosomal protein L19), *tbp* (TATA-binding protein), *ubx* (ultrabithorax), *GAPDH* (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase), α -*TUB* (α -tubulin), β -*TUB* (β -tubulin), *14-3-3zeta*, *RPE* (RNA polymerase II) and *actin3*. Normfinder analysis showed that the best housekeeping gene is the *14-3-3 zeta* with stability value 0.027 and the best combination of two genes is *tbp* and *14-3-3 zeta* with a stability value 0.031. From most stable (lowest stability value) to least stable (highest stability value) the candidate reference genes are ranged as: *14-3-3 zeta* < *ubx* < *tbp* < β -*TUB* < *GAPDH* < *actin3* < *RPE* < *RPL19* < α -*TUB*. These results were also confirmed by the Bestkeeper software since standard deviation and coefficient of variance values of *14-3-3 zeta* and *tbp* fell within the accepted range.

Functional analysis of all significantly over- or under-expressed aforementioned genetic loci was performed in conjunction with the best combination of the two housekeeping genes (*tbp* and *14-3-3 zeta*). Separately, the expression of all the target genes was calculated by normalization with *tbp* and *14-3-3 zeta*. The final expression value for each target gene was calculated as the

geometric mean of its relative expression to the two housekeeping genes. Geometric mean values, range and standard error of expression are shown in Additional file 1: Table S3. More specifically.

Up-regulated genes

Yolk protein 2 gene (Yp2) showed no relative expression in the sensitive flies (LAB, w-GR), while the expression in the resistant flies varied between 0.0075-5.656 and 3.265-17.178 fold for the SPIN and the w-CAL, respectively. As expected, the higher expression of spinosad resistance is observed only in female individuals, as *Yp2* is not expressed in males (Figures 4A and 5). Likewise, the relative expression of *ATP synthase F₀ subunit 6* in the sensitive flies of LAB and w-GR is approximately at the same range, nearby zero. The expression values in the two resistant groups (w-CAL, SPIN) were higher (Figure 4B), while a single male individual of the SPIN strain presented a remarkably high expression value (12.124-fold). Expression of *Low affinity cationic amino acid transporter 2* was 0.399-fold and 0.328-fold in w-GR and LAB, respectively, while expression in the resistant group was significantly elevated, 2.222-fold and 1.428-fold for w-CAL and SPIN (Figure 4C). *Serine Protease 6 (SP6)* was also significantly over-expressed in SPIN (2.763-fold) compared to the LAB (0.016-fold), while the expression of the wild flies was relatively low (0.838-fold for w-GR and 0.519-fold for w-CAL) (Figure 4D). The expression of *4-nitrophenylphosphatase*

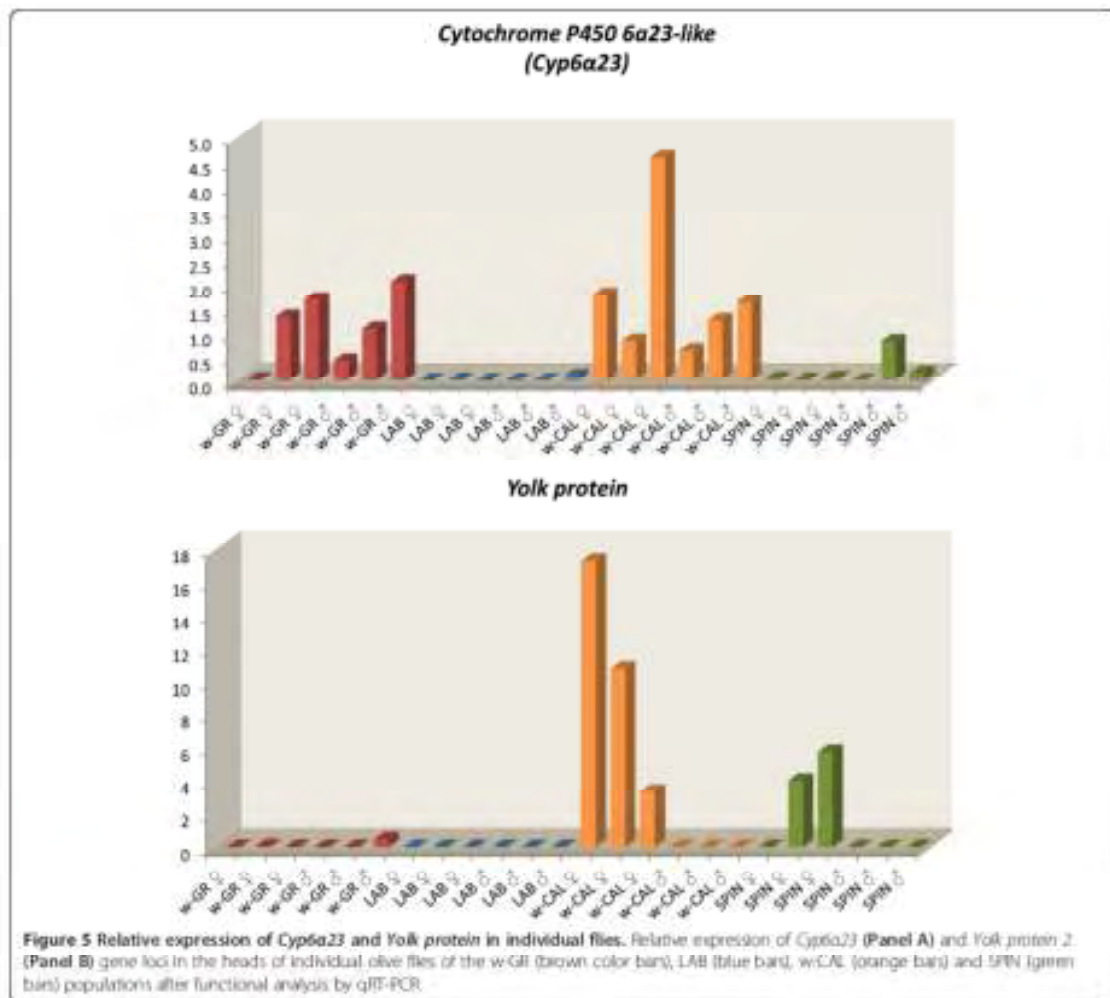


(See figure on previous page.)

Figure 4 Relative expression profiles of genes potentially associated with spinosad resistance. The red color bars represent the up-regulated genes, *Yolk protein 2* (Yp2, Panel A), *ATP synthase F₀ subunit 6* (ATP synthase, Panel B), *low affinity cationic amino acid transporter 2* (LCAT2, Panel C), *Serine protease 6* (SP6, Panel D), *4-nitrophenylphosphatase* (pNPPase, Panel E), *Salivary Cys-rich secreted peptide-VWF* (SalCys, Panel F), *Cytochrome P450 6a23-like* (Cyp6a23, Panel G) and *Antigen 5 precursor* (Ant5, Panel H), for the mean of three male and three female individual flies, after functional analysis by qRT-PCR. Only for the *Yolk protein 2* evaluation was based on female expression, since males show zero expression values. The green color bars represent the down-regulated genes *Heat-shock protein 70* (Hsp70, Panel I), *Heat-shock protein 23* (Hsp23, Panel J), *Larval serum protein 1* (LSP1, Panel K), *Heatshock 11* (Hs11, Panel L), *CNthase 5* (Cht5, Panel M), *Oxidation/peroxidase oxidase* (Panel N), *Macrophage mannose receptor 1* (*mmr1*, Panel O), *Cell division cycle-associated protein 7* (Cdc7, Panel P), for the mean of three male and three female individual flies, after functional analysis by qRT-PCR. The flavivirus RNA viral genes are not included. Standard error is also depicted in the bars. Small letters next to the error bars indicate significantly different mean values estimated by pairwise comparisons (either Tukey's or Kruskal-Wallis tests). All comparisons were performed on Ln transformed data except for *macrophage mannose receptor 1*.

(pNPPase) was significantly higher in w-CAL as compared to LAB (2.937 vs 0.064), while that of w-GR was intermediate (2.016) but not significantly different from w-CAL (Figure 4E). The same pattern holds true for *Salivary Cys-rich secreted peptide* (vWF domain) and *antigen 5*

precursor (Figures 4F and 4H). Finally, for *cytochrome P450 6a23-like* (Cyp6a23) while the expression of SPIN was higher than LAB (0.179 vs 0.019) and w-CAL was higher than w-GR (1.762 vs 1.083), the differences were not statistically significant (Figure 4G).



Down-regulated genes

Functional analysis for the down-regulated genes was performed for LAB, w-GR and w-CAL populations since our SPIN colony was no longer available. Relative expression of both *Hsp* genes was not significantly different in the various groups of flies. *Hsp70* expression was 1.082-, 2.236- and 0.337-fold for w-GR, LAB and w-CAL, respectively, while *Hsp23* expression was 0.095-, 0.149- and 0.034-fold (Figure 4I and 4J). *Larval serum protein 1 (Lsp1)*, on the other hand, was significantly under-expressed in w-CAL flies as compared to both w-GR and LAB (0.012 vs 0.937 and 0.203) (Figure 4K). Similarly, *Hexamerin LI* showed higher expression in the sensitive flies (LAB: 0.713, w-GR: 0.17), while for the resistant w-CAL the expression range was 0.001 (Figure 4L). Under-expression was even more pronounced in the *chitinase 5* locus of the resistant w-CAL (0.002) compared to both w-GR (0.197) and LAB (0.545) (Figure 4M). The expression pattern of *oxidase/oxidase* did not confirm the RNA-seq results, since expression of the resistant w-CAL was higher than that observed in the sensitive w-GR and LAB (6.148 vs 1.129 and 0.685) (Figure 4N). The same reverse pattern was observed for *Macrophage mannose receptor 1 (MMR)* (5.856 vs 0.196 and 0.776) and *cell division cycle associated protein7 (Cdc)* (1.585 vs 0.784 and 0.0102) (Figures 4O and P).

Discussion

Spinosad is a relatively new and very promising insecticide used against a variety of insect pests. As is the case with any other chemical, resistance has already developed in several natural and greenhouse populations of insects. In several cases of resistance, mutations in the $\alpha 6$ subunit of the nAChR were shown to be responsible, while in others this locus was shown to not be involved. Yet, general detoxifying systems have also been implicated. In order to understand the mechanism of spinosad resistance in the olive fly, we both looked for mutations in the *Boat6* nAChR as well as searched the entire transcriptome for potential new loci involved in resistance.

Firstly, the *Boat6* cDNA from the olive fly *Bactrocera oleae* was identified and characterized. The deduced amino acid sequence presented very high similarity with $\alpha 6$ subunits of other diptera and retained typical subunit characteristics with the nAChR homologs. Comparison of the *Boat6* between the laboratory sensitive (LAB) and spinosad-resistant (SPIN) strains yielded three homologous amino acid substitutions. This fact most likely excludes the involvement of *Boat6* nAChR in resistance, at least under the conditions of the experiment. Indeed, it should be pointed out that all published reports that implicate $\alpha 6$ nAChR subunit in spinosad resistance, the resistance level of the organism is considerably

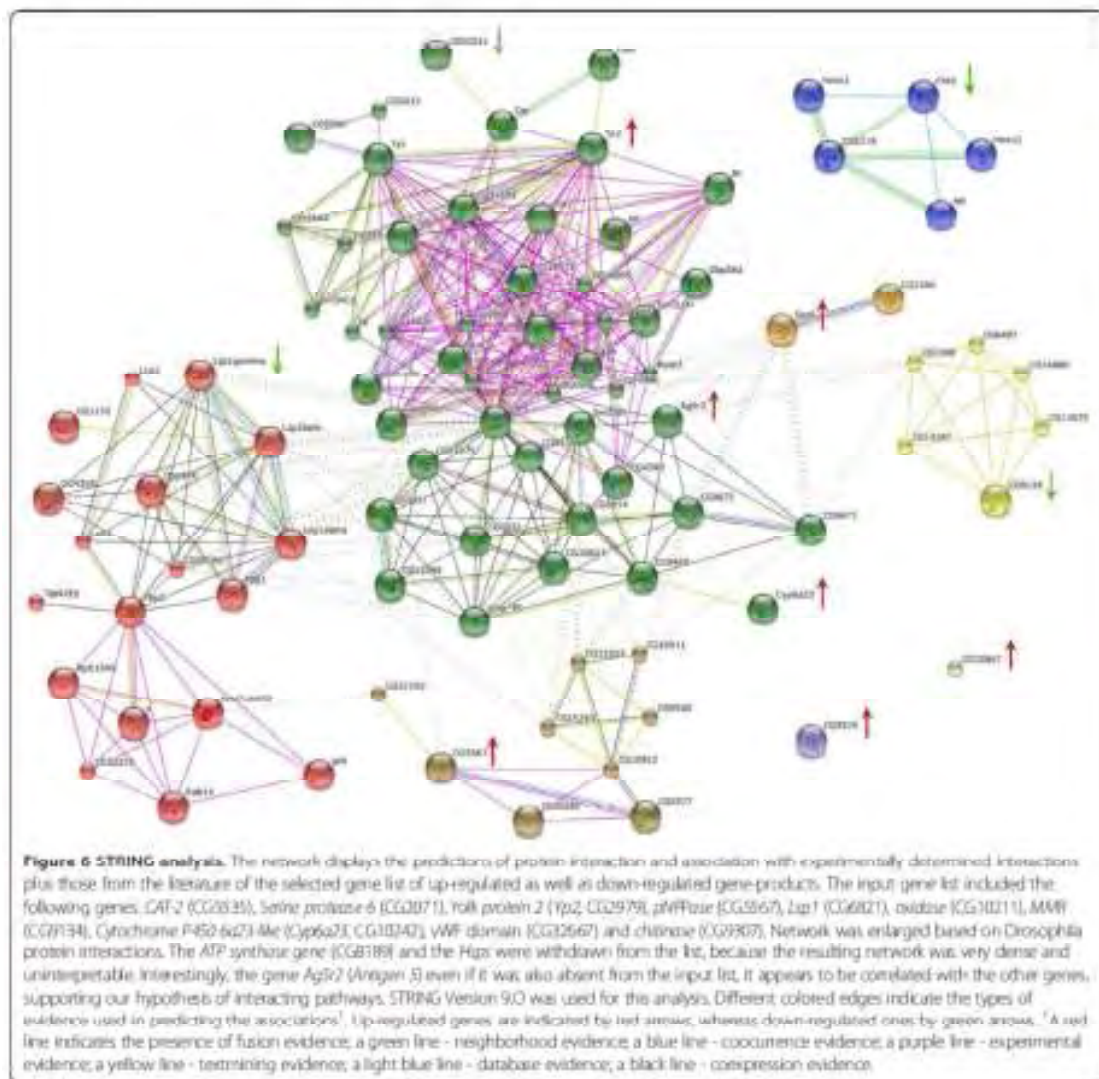
high: ~1200-fold in *D. melanogaster* [22], >2000-fold in *B. dorsalis* [26], >350,000-fold in *F. occidentalis* [27], 1070-fold in *H. virescens* [21], 18,600-fold in *P. xylostella* [24,25]. On the contrary, lower levels of resistance are associated with mechanisms that do not involve target site resistance but, rather, more generalized detoxification systems. This is the case, for example, of *M. domestica* (~150-fold; [20]), *H. armigera* (20-fold; [30]), *S. exigua* (~350-fold; [29]), *T. absoluta* (1.8 to 4.6-fold; [31]) and *B. oleae* (~35-fold; this study).

Secondly, in our efforts to shed light on other possible mechanisms of resistance, we compared the entire transcriptomes of a laboratory sensitive (LAB) and a spinosad resistant (SPIN) strain through RNAseq. During the course of our study, Pavlidi and co-workers produced a basic transcriptome dataset for *B. oleae* using 454 pyrosequencing [41]. Due to the different sequencing technology used in the present study, our reference transcriptome has fewer long contigs but a significantly higher number of total contigs and contigs with alignments (Table 1), which is more relevant for the purpose of detecting differentially expressed genes. Our comparative LAB vs SPIN analysis yielded several over- and under-expressed loci that are discussed below. Two caveats should be added at this point. Firstly, since LAB and SPIN transcriptomes were sequenced only once, we ought to validate the observed differences through qRT-PCR in multiple samples. In order to ascertain that the observed differences reflected differences that would hold true not only under laboratory but also under natural conditions, we decided to extend our validation experiments in natural spinosad-sensitive and spinosad-resistant populations. As such, wild flies were collected from a presumably untreated orchard in the surroundings of the city of Volos (Greece) (w-GR), where there is no documented use of spinosad and from a site in Sonoma County in California (w-CAL) with the highest documented naturally observed spinosad-resistance ratio (see Methods). However, resistance bioassays showed that while the resistance ratio (RR) of the SPIN strain was ~35, w-CAL and w-GR had RRs 12.96 and 3.14, respectively. Therefore, w-GR cannot be considered as a source of truly spinosad sensitive flies. Indeed, the expression of various genes was shown to be intermediate between LAB and SPIN values. Secondly, the presence of different resistance mechanisms in the laboratory or naturally selected flies cannot be excluded. While this is plausible, we doubt it for three main reasons: One, the genetic background of the SPIN strain and the w-CAL is similar since the SPIN strain was enriched by w-CAL; two, the selective force used in the laboratory was the same as the one used in California (i.e., spinosad); and, three, the difference between w-CAL RR and SPIN RR (~13 vs ~35) is not that large to indicate the presence of a different mechanism. As stated earlier, usually high

RR levels are associated with target-site resistance while lower RR levels are associated with more generalized detox mechanisms. Be that as it may, and even if more resistance mechanisms are at play, our analysis should point towards their underlying common ground. And since spinosad selection is common between SPIN and w-CAL flies, any transcriptome differences with LAB (and partly w-GR) should indicate events involved in spinosad resistance.

Potential interactions between the up- and down-regulated genes were examined through STRING (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes). STRING makes available pre-computed results in predicted functional linkages

among proteins by comparative genomics and text-mining [46]. STRING analysis using the MCL clustering algorithm yielded several links between the examined differentially expressed genes (Figure 6). The generated network supports the hypothesis of non-randomness in the results and rather reflects a regulation feature by both activator genes (the up-regulated expression) and maybe also repressor genes (down-regulated expression). However, for the characterization of the transcriptional regulatory network and the understanding of these genes dynamic association and their possible involvement in insecticide resistance, we should first consider their function and their well-documented role.



Increased energy and metabolism demands

ATP synthase is an important enzyme that provides energy for the cell to use through the synthesis of ATP. Located within the mitochondria, ATP synthase consists of 2 regions: the F_0 portion is embedded in the mitochondrial membrane and functions as a proton pore; and the F_1 portion is inside the matrix of the mitochondria and is associated with the ATP synthase activity. Through differential proteome analysis and enzyme activity assays, increased expression of ATP synthase was found in the midgut of pyrethroid resistant populations of *Helicoverpa armigera* [47]. Since more energy related proteins (such as vacuolar-type ATPase A/B and arginine kinase) were up-regulated, the authors suggested that increased energy metabolism may be a general prerequisite for compensating the costs of energy-consuming detoxification processes. As a matter of fact, inhibitors of mitochondrial ATP synthase, such as Diafenthion, are known insecticides for aphids, whiteflies and hoppers [48]. Significantly elevated levels of ATP synthase F_0 subunit 6 were observed in SPIN flies as compared with LAB and w-GR, while w-CAL levels were intermediate (Figure 4B). This constitutes an indication of elevated energy requirements of the resistant flies so as to lever the detoxification process.

The Low affinity cationic amino acid transporter-2 (CAT-2) belongs to a large group of solute carrier proteins, a group of over 300 membrane transport proteins organized into 52 families [49]. These transporters utilize the energy of ATP hydrolysis to transport various substrates across cellular membranes. Several functions are controlled such as protein synthesis, hormone metabolism, catalytic functions, nerve transmission, regulation of cell growth, production of metabolic energy, synthesis of purines and pyrimidines, nitrogen metabolism and biosynthesis of urea. In addition, in the mammalian cells, the uptake of amino acids is mediated by energy-dependent and passive transporters with overlapping substrate specificities. Most energy-dependent transporters are grouped either to the co-transport of Na^+ or Cl^- or to the counter-transport of K^+ . As reported for system γ^+ , the CAT proteins catalyze the Na^+ -independent uptake of arginine, lysine and ornithine and the Na^+ -dependent uptake of some neutral amino acids [50]. Both SPIN and w-CAL olive flies showed significantly higher CAT-2 levels compared to LAB and w-GR (Figure 4C). While there are no data in the literature suggesting that CAT-2 may be involved in transport or extrusion of spinosad from the cell, we think that the up-regulation of this locus is related with the up-regulation of ATP synthase and reflects the increased energy and metabolic needs of the resistant flies.

Egg and larval development proteins

Vitellogenins (Vgs) are precursors of the major egg storage protein, vitellin, in many oviparous animals. In

higher Diptera, Vgs are called Yolk proteins (Yps) and are produced by both the fat body and the ovary in the majority of the species. Three main factors regulate vitellogenesis in *D. melanogaster*: a brain factor, an ovarian factor that stimulates fat bodies Yp synthesis (further recognized as ecdysone) and a thoracic factor (Juvenile Hormone, JH) involved in the Yp uptake by ovaries. JH regulates the Yp synthesis and uptake, while ecdysone is involved only in Yp synthesis [51,52]. In *Culex* mosquitoes the head factor is released 4–8 minutes after the beginning of feeding [53]. The vitellogenic phase is initiated after feeding on non-autogenous species or after the adult emergence of autogenous species, when the *corpora cardiaca* stimulating factor (CCSF) is released from the ovary [54,55]. Insect Vgs are synthesized in the fat body in a process that involves substantial structural modifications (e.g., glycosylation, lipidation, phosphorylation, de-phosphorylation, proteolytic cleavage, etc.) of the nascent protein prior to its secretion and transport to the ovaries (for a review see [56,57]). 4-nitro-phenyl-phosphatase (pNPPase) catalyzes the hydrolysis of nitrophenyl phosphates to nitrophenols. At acid pH it is probably acid phosphatase; at alkaline pH it is probably alkaline phosphatase. In the kissing bug *Rhodnius prolixus*, acid phosphatase activation follows oocyte fertilization and pNPPase seems to be involved in vitellin dephosphorylation [58]. Taken together, pNPPase should follow elevated levels in Yp expression since it is involved in its modification during transport to the ovaries (Figure 4E). In the case of spinosad resistant flies, the elevated levels of Yp2 and, to a lesser extent of pNPPase, observed in the resistant flies is most likely related to events taking place in the fat body surrounding the heads of the insects rather than their brain and probably associated with feeding rather than processes associated to egg development. Furthermore, it has been reported that there is a physiological link between vitellogenin activity, oxidative damage and mortality, suggesting an antioxidant role of vitellogenin. RNAi experiments in bees demonstrated that vitellogenin expression was linked to the bees' level of resistance to oxidative stress [59]. In the same study, excess mortality of vg^+ bees was shown to be linked to cellular damage that included a severe oxidative insult to the fat body, after exposure to paraquat. This elevated expression of Yp2 gene in spinosad-resistant flies is somewhat analogous to the observance of persistent production of a vitellogenin-like protein in insecticide-resistant mosquitofish *Gambusia affinis*. Normally, in the mosquitofish Vg is produced during reproductive season. However, insecticide-resistant mosquitofish produce a vitellogenin-like protein year around [60]. The authors suggest that xenobiotics may induce the formation of a vitellogenin-like protein in order to bind and transport insecticides. Finally, we questioned whether the observed up-regulation is female-specific only.

In fact, as expected, functional analysis in three female and three male flies of SPIN, w-CAL, LAB and w-GR showed elevated *Yp* expression in female SPIN and w-CAL heads only (Figure 5). Interestingly, the within population variability was very high. While values for w-GR and LAB were close to zero (0.0016-0.0548 and 0.00036-0.00079, respectively), values for w-CAL ranged from 3.265 to 17.178 and for SPIN 0.0075 to 5.656. Considering that all SPIN flies fed on constant spinosad diet, the low *Yp* expression observed in a SPIN female (0.0075) suggests that high *Yp2* expression may be protective but not necessary for spinosad resistance in female flies.

By contrast, two storage proteins, *hexamerin larval protein 1 (HexL1)* and *larval serum protein 1 (Lsp1)*, showed a tendency of down-regulation. In holometabolous insects, which go through distinct stages, essential nutrients obtained in one stage but required in another are sequestered in storage proteins and carried across stages until they are utilized. In that sense, if an insect does not feed or restricts its diet during a specialized stage, its activities should be supported by nutrient intake during a previous feeding stage. Egg development in mosquitoes, for example, heavily depends on a protein-rich blood feed. Nectar feeders, on the other hand, should obtain most protein destined for eggs during the larval stage and stored until synthesis of yolk proteins. This storage takes place through various structurally similar hexamerins (for a review, see [61-63]). Storage proteins are not only produced during larval development. Adult females of the diamondback moth, *Plutella xylostella*, synthesize hexamerins within hours post eclosion to re-sequester amino acids that have been utilized until then [64]. Hexamerins are also implicated in JH regulation. In termites, hexamerins are involved in nutrient storage and nutritional signaling and are also known to bind JH [65]. It is thought that by binding to it hexamerins sequester JH, thus preventing it from eliciting downstream effects on developmental gene expression [66]. Indeed, RNAi based hexamerin silencing affected 15 out of 17 morphogenesis-associated genes that are members of a JH-responsive genomic network [67].

So, why are storage protein transcripts down-regulated in spinosad resistant flies? It is plausible that the resistant w-CAL flies (and to a lesser extent the less resistant w-GR flies) have developed the ability to store sufficient amounts of the necessary amino acids for their adult lives during their larval stages and to not require additional replenishments during adulthood. Such nutrient availability may be necessary for overcoming the elevated demands in energy and metabolism in the 'toxic' environment of the resistant flies. Instead, under 'normal' conditions, when the flies have the luxury of acquiring and store amino acids later in their adult lives, they can activate their storage proteins after a meal. In order to

prove this claim, however, further detailed experiments should be performed to assess the expression of storage and related genes during the larval, pupal and adult stages, under different nutritional conditions.

Immunity, detoxification and stress related loci

Six genes that fall in this category have raised our interest.

Serine protease 6 (SP6). While the role of other detoxification enzymes in insecticide resistance is well understood, the involvement of proteases/serine proteases is not. Proteases are involved in protein digestion outside the cells and also in the expression and regulation of cellular proteins [68]. Cellular proteases function to create biologically active molecules or destroy biologically active proteins and peptides [69,70]. Additionally, the signalling transduction system/pathways that are controlled by G protein coupled receptors (GPCRs), protein kinase/phosphatases and proteases are involved in the regulation of *P450s* genes [71]. Very interestingly, elevated levels of all cytoplasmic and lysosomal proteases were detected in spinosad-resistant *M. domestica* flies 48 hours after exposure to spinosad at LD₅₀ dose level [72], indicating involvement of proteases in the development of spinosad resistance to the housefly. Two serine protease genes (*trypsin* and *chymotrypsin*) were also shown to have threefold higher expression in deltamethrin-resistant *Culex pipiens pallens* mosquitoes [73]. These two enzymes were further shown to hydrolyze deltamethrin [74]. Moreover, up-regulation of serine proteases was also documented in permethrin resistant *Culex quinquefasciatus* mosquitoes [75]. Finally, in the mosquito *Aedes aegypti*, serine proteases are also expressed in the salivary glands and thought to have a defense role against bacterial growth ingested with saliva during sugar meals [76,77]. In the olive fly, the level of serine protease 6 in the resistant SPIN and w-CAL flies strain is significantly elevated compared to LAB (Figure 4D), while w-GR has also considerable expression. Apparently, serine proteases are required not only for the digestion of more complex nutrients of the wild flies, compared to the standardized laboratory diet, but may also participate in the defense against bacterial pathogens during feeding.

An oxidase/peroxidase family protein was found down-regulated in the transcriptome of the SPIN strain. However, further comparisons between LAB, w-GR and w-CAL reversed the trend and showed higher level of expression in w-CAL flies. While such proteins present protein-protein binding properties and are known to be involved in defense mechanisms (such as intracellular phagocytosis of apoptotic cells or foreign material) [78], the gene was not further evaluated.

A macrophage mannose receptor (MMR) was also found to be down-regulated in the SPIN strain. The MMR is a C-type lectin receptor, a family of surface carbohydrate-

binding receptors that require calcium for binding. In humans they are known to recognize microbial carbohydrate moieties, also sense products from dying cells and transduce inflammatory signals that modulate the immune system [79]. In crustaceans, on the other hand, they are thought to be involved in the regulation of the exoskeleton calcification [80]. Its expression displayed molt cycle-related differential profile. In the same study, members of the serine protease superfamily also varied their expression during different molting stages. In insects, secretory C-type lectins are thought to play roles in cellular interactions during development [81]. In addition, they are considered important in the immune system, including the detection and neutralization of pathogenic and non-self materials in several insect species [82]. In the mosquito *Aedes aegypti* and the flesh fly *Sarcophaga peregrina*, C-type lectins are expressed in the salivary gland and are considered to control bacterial pathogens from ingested meals [76,77,83,84]. In the olive fly transcriptome a macrophage mannose receptor was found to be down-regulated in the SPIN strain but the trend was reversed in the functional analysis of the LAB, w-GR and w-CAL strains and, therefore, cannot be evaluated before further analyses are performed.

A von Willebrand factor domain within a Salivary cysteine-rich peptide was also up-regulated. The majority of vWF-containing proteins are extracellular. The oldest ones in eukaryotes, however, are parts of intracellular proteins involved in transcription, DNA repair, ribosomal and membrane transport and the proteasome. vWF tends to bind to other proteins and thus it appears to be involved in multiprotein complexes. In insects, huge vWF-containing proteins, such as hemolectin in *D. melanogaster* and hemocytin in *B. mori*, are thought to function in the hemolymph coagulation or hemocyte aggregation processes, such as nodule formation [85,86]. Such processes are fundamental responses of insect innate immunity in order to clear microorganisms from the hemocoel. A similar role might be envisaged in SPIN flies of *B. oleae*. This up-regulation is concordant with the up-regulation of the previously described defense loci. Functional analyses on LAB, w-GR and w-CAL flies confirmed a significant under-expression in the LAB strain (Figure 4F).

Cytochrome P450 6a23-like (*Cyp6a23*)

This gene belongs to a superfamily of monooxygenases that catalyze the oxidation of organic substances. They are involved in drug metabolism and bioactivation of about 75% of all the different metabolic reactions [87]. P450s have been implicated in insecticide resistance against various substances (for reviews see [88-90]). Their role in spinosad detoxification has been hypothesized at least in *Helicoverpa armigera* [91], *Musca domestica* [92] and *Bombus huntii* [93], whereas it has been disputed in *Drosophila melanogaster* [94]. *Cyp6a23* was highly over-

expressed in the RNAseq of the olive fly SPIN strain (232,692-fold), albeit not statistically significantly, falling below the stated criteria (p value = 0.0003877, q value = 0.109514). Functional analysis in three female and three male flies of SPIN, LAB, w-CAL and w-GR showed, on average, elevated levels of expression in SPIN and w-CAL compared to LAB (Figure 5). However, w-GR had intermediate levels of expression. Two things should be mentioned at this point. Firstly, the large variability of *Cyp6a23* levels. In some SPIN individuals the *Cyp6a23* level was lower than that of some LAB individuals. However, since the RNA for the RNAseq was obtained from a pool of 40 female and 40 male flies, the RNAseq result should reflect the average expression in the population. In addition, P450s expression levels vary throughout the life cycle of the insect [93] and the observed variability in *Cyp6a23* expression in olive fly individuals may reflect the asynchrony of their life stage. Secondly, w-GR flies had, on average, intermediate levels of *Cyp6a23* expression. As mentioned in the Methods section, even though these flies were obtained from a presumably untreated orchard in Greece, their resistance ratio was three times higher than that of the LAB flies and, therefore, w-GR cannot be considered as a source of truly spinosad sensitive flies.

Heat shock proteins

Two heat shock proteins, Hsp70 and Hsp23, were found to be down-regulated in the SPIN transcriptome, a fact that was not confirmed after functional analyses. Hsp70 proteins are very conserved and ubiquitously expressed in virtually all living organisms, being very important in folding and unfolding of proteins, detoxification of pesticides and heavy metals. Hsp23 belongs to a lens alpha crystalline-related superfamily, also found in the salivary gland cells of *D. melanogaster* [95]. In all reported cases of stress and detoxification where Hsp were involved, their transcripts were strongly up-regulated. In order to clarify their role in spinosad resistance in the olive fly, further experiments should be performed.

Antigen 5 precursor (*Ant5*)

This gene product shows similarity to *Drosophila's* Antigen 5-related 2 gene (*Agr2*). *Agr2* proteins belong to the CAP family of proteins, which include the mammalian Cysteine-rich secretory proteins, wasp venom Antigen 5 proteins, and plant group 1 Pathogenesis-related proteins. The gene product of the *Drosophila melanogaster* ortholog *Agr2* is suggested to function either as a novel type of protease inhibitor or as an antimicrobial protein [96]. In our study, *Ant5* was over-expressed in the SPIN transcriptome. However, further functional analysis showed over-expression in both the w-GR and w-CAL populations (Figure 4H).

Chitinase 5 (Cht5)

In insects, chitin is known as a scaffold material, providing both exo- and endo-support to the cuticles of the epidermis and trachea as well as the peritrophic matrices lining the gut epithelium [97]. The midgut *chitinases* seem to be involved in the formation, perforation and degradation of the midgut peritrophic matrix, which protects the gut epithelium from damaging factors, toxins and pathogens [98-100]. *Chitinases* have also been proposed as biopesticides, as transgenic plants expressing chitinolytic enzymes potentiate the efficacy of other biological toxins (e.g. D1 or fungal toxins) [101,102]. In the olive fly, *Cht5* was under-expressed in the SPIN transcriptome and was found down-regulated in the w-CAL populations (Figures 2 and 4M). Given the aforementioned role of *chitinases*, we can hypothesize that by under-expressing *chitinase* genes the resistant flies decrease spinosad penetrance, thus increasing resistance.

Cell division cycle-associated protein 7 (Cdc1)

This gene belongs to the HAD-superfamily hydrolase, according to Interpro [103]. RNAseq analysis showed that *Cdc1* was under-expressed in the SPIN transcriptome. However, after functional analysis the RNAseq result was not confirmed, since both the resistant w-CAL population and the sensitive w-GR were up-regulated compared to the sensitive LAB flies (Figure 4P). Therefore, further analysis is required in order to clarify *Cdc1*'s role in spinosad resistance.

RNA viral genes

Five more genetic loci were of curious origin. Two of them were up-regulated: a *replicase-like protein* was identified as having considerable similarity with a dimethyl transferase domain of an RNA virus; and an elongation factor had similarity with a viral helicase domain. Three of them were down-regulated (*hypothetical B. oleae polyprotein*, *RNA-dependent RNA polymerase*, *microtubule-actin cross-linking factor 1*), but they are also implicated with viral functions as homology searches matched sacbrood virus sequences. Finding similarities with viral sequences is not surprising. In fact, the presence of viral sequences has been reported in previous both smaller and larger transcriptome sequencing efforts [41,104,105]. Obviously, such genes reflect the presence of RNA virus infections in different laboratory or wild populations. The impact of such infections has not been studied and cannot be assessed at this point whether this might have been among the causes of our SPIN colony collapse.

Conclusion

Adaptation and survival of the flies in the altered environment caused by insecticide stress appears to be a

consequence of changes in multiple genes' expression, affecting both biological and physiological pathways. Our perception about the development of insecticide resistance in insects, traditionally attributed to either a target site alteration or the up-regulation of various detoxification genes (such as *P450s*, *esterases* and *GSTs*), is recently changing due to our ability to address such questions in a more holistic way through transcriptomic analysis. This gives us the opportunity to consider diverse regulatory networks of interacting genes via complex mechanisms. In the present study, we conducted whole transcriptome comparative analyses between spinosad resistant and susceptible olive flies, in order to investigate and identify genetic loci and molecular mechanisms that are most likely to be involved in spinosad resistance. The observed changes at the RNA level as well as the functional analyses and bioassays, point towards a multi-level impact of the insecticide to the insect's physiology. Our results indicate that the organism's response to this novel environmental stressor mainly affects energy metabolism pathways, immunity defense pathways and detoxification. The oxidative, xenobiotic, and innate immune stress response pathways appear to be co-ordinated, leading to the regulation of numerous cellular and biological/physiological processes. Further studies are required to determine the molecular mechanisms and significance of this cross-regulation.

Methods

Ethics statement

The study was carried out on laboratory reared olive flies and wild olive flies collected from the area around the city of Volos, Greece, and the Sonoma County in California. No specific permissions are required for these experiments or collections, since these studies did not involve endangered or protected species.

Fly culture and stocks

Laboratory strain

The laboratory strain of the olive fly (LAB) is part from the original stock from the Department of Biology, Demokritos' Nuclear Research Centre, Athens, Greece, and has been reared in our laboratory for over 15 years. The flies are reared at 25°C with a 12 h light/12 h dark photoperiod in 30 × 30 × 30cm³ cages, as described by [106-108].

Development of a spinosad-resistance colony

A spinosad resistant strain (SPIN) was also developed in our laboratory. Starting material for this colony was the aforementioned LAB colony that was supplemented with ~1000 wild flies from Argalasti (Pelion, Greece). Increasing amounts of spinosad were gradually introduced into the colony's feeding water that reached 0.04 g/ml after 10 generations. The colony was maintained for about 22 generations (~2 years) under constant 0.04 g/ml

spinosad selection. This amount of spinosad corresponds to approximately 2× the recommended amount for field applications that would result in 100% mortality. It also corresponds to 125× the LC50 of the susceptible LAB strain. In order to increase the resistance to spinosad, the colony was refreshed a second time with wild flies from Sonoma County (CA, USA), since this area was shown to have the highest spinosad resistance level [109]. Six months later the colony practically crashed and was recovered by a single female, under no selection. Progeny of that female were put under gradually increasing amounts of spinosad. The colony recovered previous levels of resistance (0.04 g/ml) after only 4 generations. After a total of 46 generations, a more precise estimation of the resistance ratio (RR) was obtained by ingestion bioassays, as described in Kakani et al. [109], showing that resistance level had reached 35×. This is the stage from where all spinosad resistant laboratory flies (referred to as SPIN throughout the text) were collected, both for the isolation of the nAChR and the RNAseq analysis. Finally, during the fall of 2012, entirely unexpectedly and without any obvious changes in the insectary environment, the spinosad resistant colony crashed. Initially it was noted that females did not oviposit in the offered waxed cone, while both male and female adult numbers started to decline. During that time, new wild material arrived from California, which was intended to enrich the laboratory colony with new alleles. Nonetheless, after about 3 months of continuous efforts the last adult flies died and no progeny emerged.

Field-collected flies

Wild flies were collected from two geographical locations, one from an untreated orchard in Greece [Agria, Pelion (w-GR)] and another from a different site in Sonoma County [CA, USA (w-CAL)] that was the source of flies used to refresh the SPIN strain, but where flies had also shown highest levels of spinosad resistance in the Kakani et al. study [109]. Contact bioassays were performed on these flies according to Kakani et al. [109], using seven doses of spinosad ranging between 1/2× to 1/128×, plus a blank control of acetone. LD₅₀ values and 95% confidence intervals were calculated by probit analysis using SPSS v.13 (SPSS Inc, Chicago, IL). The calculated resistance ratio (RR) of the w-CAL was 12.96 (11.62-14.28) whereas that of the w-GR was 3.14 (2.25-4.2). Infected olives were brought into the laboratory and emerged flies were put in 30 × 30 × 30cm³ cages and fed on the standard yeast hydrolysate diet [107]. Female flies were allowed to oviposit in fresh olives, since wild olive flies do not oviposit on artificial substrates. Flies from this F1 generation were used for the functional analysis experiments described in the Results.

Extraction of RNA, cDNA synthesis, cloning of nAChR *Boa6* and sequencing

Total RNA was isolated from pools of four heads of adult flies from the LAB and SPIN strains with the use of TRIzol[®] Reagent (Ambion-Invitrogen). One to five micrograms of total RNA was used for first strand synthesis of poly(A) of cDNA using the MMLV high performance Reverse Transcriptase (GeneOn) and random primers (GeneOn) according to the manufacturer's instructions.

Partial cDNA of the LAB acetylcholine nicotinic receptor *a6* gene of *B. oleae* was amplified by PCR using primers B*a6*-F (ACATGGTCCCATTGATGACC) and B*a6*-R (GCGACCATGAACATGATGCAATT) designed on conserved regions of the published nAChR*a6* cDNA sequence of *Bactrocera dorsalis* (B*a6*-JN560169.1) [26]. The PCR amplification reaction consisted of 2 μl of the first strand cDNA reaction mix as a template, 0.7 μl of 10 mM primers, 0.2 mM dNTPs, 1.5 mM MgCl₂ and 1 unit Taq DNA Polymerase (GeneOn) in a 20 μl reaction. Cycling conditions were 95°C for 5 min, followed by 30 cycles of 95°C for 30s, 49°C for 2 min and 72°C for 1.5 min and a final extension at 72°C for 10 min in a thermal cycler (M) Mini Biorad). The amplified PCR product was then separated in a 1% agarose gel, stained with ethidium bromide. The amplified PCR product was isolated by the GF-1 Gel recovery kit (Vivantis) and subcloned into the pBluescriptII SK(+) plasmid vector and sequenced. Based on the obtained sequence, four gene specific primers were designed to amplify the full-length cDNA: two reverse primers for 5'-RACE PCR (5GSP1: 5'-GTCCTTAGAT TTCAGCTACC-3' for the first round reaction and 5GSP2: 5'-GGGCGGGTGGGTATAAGTAT 3' for the nested reaction) and two forward primers for 3'-RACE PCR (3GSP1: 5'-CACAAACGGTGGAGGAGCATC-3' for the first round reaction and 3GSP2: 5'-GGGCGGGTGGG TATAAGTAT-3' for the nested reaction). A poly-A tail was added to the 3'-end of the resulting strand of 5'-RACE by terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT, Biolabs). Thermal cycling conditions for the 5'- and 3'-RACE were: pre-denaturation 5 min at 94°C, 30 cycles of 94°C for 30 sec, 49/52°C (first/second round) for 45 sec and 72°C for 2 min (according to the size of the expected fragment) with a final extension of 15 min at 72°C. The resulting PCR products of 5'-RACE and 3'-RACE were subcloned into pBluescriptII SK (+) vector and sequenced. Each time plasmids were sequenced, three different isolates were used and no variation was observed.

Sequence comparison between sensitive and resistant *Bactrocera oleae* nAChR*a6* subunits

For comparison of the *Boa6* transcripts, total RNA was extracted from a pool of 4 adult heads from the two strains (LAB and SPIN), as described above. The specific primer pair B*a6*-F (5'-AGATTAGTGACAGCATAACC

G-3') and *Boa6*-R (5'-TCTATCCACAAACCATTGCCG C-3') was used for the amplification of the full-length open reading frame of *BoAChR-u6* gene. The PCR products were sequenced directly with the use of *Boa6*-F, *Boa6*-R and two more internal primers (*Boa6*F1: 5'-AT GAATCGGAATATGGAG-3' and *Boa6*R1: 5'-AACGGA TTAAATCCAAGG-3'). No multiple peaks were observed in the obtained sequences, indicating the absence of sequence polymorphism in the pools.

Nucleotide sequence similarity searches were performed using BLAST [110]. Multiple sequence alignments [111] with other insect nAChR subunits were performed with ClustalW2 [112]. The calculated molecular weight and isoelectric point of the putative protein encoded by *Boa6* were predicted by Compute pI/Mw tool in ExPASy Server [113]. Phosphorylation sites and N-linked glycosylation sites were identified by the PROSITE database [114].

RNA isolation for library preparation and functional analysis

Total RNA was isolated from fly heads with the use of TRIzol[®] Reagent (Ambion-Invitrogen) following the instructions of the manufacturer with minor modifications. More specifically, RNA was extracted from forty male and forty female heads from the laboratory colony (LAB) and from an equal number of spinosad resistant fly heads (SPIN). For more complete sequence assembly, two more libraries were constructed and sequenced: a FEMALE library made of female accessory glands and spermathecae of ~300 female flies and a MALE library made of testes of ~150 male flies [115]. RNA extraction was followed by an additional DNA removal using the TURBO DNA-free Kit (Ambion-Invitrogen), according to manufacturer's instructions. The integrity of RNA was assessed by 1% agarose gel electrophoresis and the purity of all RNA samples was evaluated at Fleming Institute (Greece) with the use of (Agilent 2100 Bioanalyzer) and NanoDrop (2000).

For functional analysis, RNA was extracted as described above from three different individual male and female heads from the LAB strain, the SPIN resistant strain, the Sonoma County wild population (w-CAL) and the Aegria (w-GR) wild population.

Whole transcriptome library preparation for next-generation sequencing with the SOLiD 4 Sequencing System

RNA transcripts expressed in the head of the spinosad-sensitive (LAB) and spinosad-resistant (SPIN) olive fly strains were used to construct cDNA library for high throughput sequencing analysis on the SOLiD 4 Sequencing System. More specifically, polyadenylated RNA (polyA-RNA) was isolated from 5 µg of total RNA using the

Dynabeads Oligo(dT) kit (Ambion, Life Technologies Corporation). The isolated polyA-RNA was randomly fragmented by chemical hydrolysis at 94°C for 5 minutes and was then treated with antarctic phosphatase to remove phosphate groups from the fragments' ends, followed by treatment with T4 polynucleotide kinase to add a Pi at the 5' end of each fragment. The resulting RNA fragments were hybridized and ligated to the P1 and P2 adaptor sequences specifically designed for sequencing with the SOLiD system (SOLiD Total RNA-Seq Kit, Life Technologies Corporation). The RNA produced was reverse transcribed to cDNA which was then amplified in a 15-cycle PCR. At this step, the use of different barcoded 3' PCR primers from the selection included in the SOLiD barcoding kit allowed the preparation of cDNA libraries for multiplex sequencing. From the cDNA produced, only fragments of average size 200–300 bp were selected with two rounds of magnetic bead purification (Agencourt AMPure XP Reagent, Beckman Coulter).

The quality and size of the purified cDNA library was assessed on the Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies Inc.) and with quantitative PCR using the Library Quant Kit ABI Solid (KAPA Biosystems). A multiplex library mix (500pM) was used to prepare a full-slide for analysis on the SOLiD 4 Sequencing System (Applied Biosystems) with 35 + 50 bp PE -chemistry.

Bioinformatics analysis

The reads of the libraries were assembled to construct the reference transcriptome using the SOAPdenovo assembler [39] with a word size of 25 nt and using all paired and unpaired reads. Annotation of the assembled sequences was obtained by aligning against the NCBI non-redundant (Nr) protein database using blastx [116] and collecting the annotations with the BLAST2GO tool [40]. TopHat [117] was used to generate a spliced alignment to the reference transcriptome. Transcripts were assembled using Cufflinks and Cuffdiff [43] was used in order to reveal differentially expressed genes. SNP calling was performed with the mpileup tool and converted to the vcf format using the vcfutils, both from the SAMTOOLS package [42]. The SNP loci were intersected with the gene coordinates using the intersectBed tools from the BEDtools suite [118].

Expression stability of candidate reference genes in *B. oleae* head

In order to find the most suitable reference gene for gene expression analyses in *B. oleae* head tissue, nine different housekeeping genes commonly used in other dipteran species were analyzed. The nine genes were: *RPL19* (ribosome protein L19), *tbp* (TATA-binding protein), *ubx* (ultrabithorax), *GAPDH* (glyceraldehyde 3-

Availability of supporting data

All data have been deposited at the Sequence Read Archive (SRA) of NCBI. All reads for each sample are summarized at the BioProject page: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA231981>.

Additional file

Additional file 1: Table S1. Polymorphic sites in the rACHR α6-subunit sequences in the olive fly LAF and SRN strains. **Table S2.** Up- and down-regulated genes in spinosad resistant olive fly heads. **Table S3.** Basic statistics of relative expression of the up- and down-regulated genes. **Table S4.** Primer sequences used for q-PCR. **Table S5.** Normfinder and BestKeeper analysis results.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

ES maintained the laboratory strains, participated in the construction of the transcriptome libraries, performed the functional and statistical analyses and part of the bioinformatics analysis; MG cloned and analysed the B066 rACHR; MR performed most of the bioinformatic analysis of the transcriptome; KT performed the network analysis and part of the bioinformatic analysis; NZ reared the spinosad resistant strain; KS constructed the transcriptome libraries and analysed the sequencing data; FGZ participated in the design of the study and organized the California samples; JR directed the bioinformatics analysis; KDM designed and coordinated the study. All authors participated in drafting the manuscript and read and approved the final document.

Acknowledgements

This research has been co-financed by the European Union (ESF) and Greek national funds through the Operational Program "Education and Lifelong Learning" of the National Strategic Reference Framework - Research Funding Program: Heracleus II, Investing in knowledge society through the European Social Fund; State of California Specialty Crops Block Grant Program award SC110039, and the two postgraduate programs of the Department of Biochemistry and Biotechnology of the University of Thessaly ("Biotechnology - Nutrition and Environment" and "Molecular Biology and Genetics applications"). We would also like to thank Dr Eudoxia Kakani for her support with valuable suggestions and ideas and the two anonymous reviewers for their useful criticisms that helped to clarify many points in this final version of the manuscript.

Author details

¹Department of Biochemistry and Biotechnology, University of Thessaly, Ploutonos 26, Larissa, Greece. ²Institute of Molecular Biology and Genetics, Biomedical Sciences Research Centre "Alexander Fleming", Athens, Greece. ³Department of Entomology, University of California, Davis, CA, USA. ⁴Present address: Department of Human Genetics, McGill University, Montreal, QC, Canada.

Received: 11 May 2014 Accepted: 31 July 2014

Published: 25 August 2014

References

1. Michailidis SE, Nauenmacher F: Estimates of the crop losses caused by *Dacus oleae* (Gmelé) (Diptera, Tephritidae) in Crete. In *Fruit Flies of Economic Importance*. Edited by Cavallo R, Rottstein J, Netherlands: AA Balkema Publishers; 1983:603-611.
2. Antoninis BE: Estimates of the crop losses caused by *Dacus oleae* (Gmelé) (Diptera, Tephritidae) in Crete. In *Fruit Flies of Economic Importance*. Edited by Robinson AS, Hooper G. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V.; 1981:169-177.
3. Suono AM, Jones O: Alternative methods for controlling the olive fly, *Bactrocera oleae*, involving semiochemicals. *IOBC Jeps Biol* 2002, 25:47-55.

4. Skouras PI, Margaritopoulos JT, Seraphides NA, Ioannides IM, Kakani EG, Mathiopoulos KD, Totsipis JA: Organophosphate resistance in olive fruit fly, *Bactrocera oleae*, populations in Greece and Cyprus. *Entomol Sci* 2007, 6:342-48.
5. Margaritopoulos JT, Skouras P, Kalojiannis N, Nikou D, Morou E, Skouras PI, Totsipis JA, Vontas J: Efficacy of the pyrethroid alpha-cypermethrin against *Bactrocera oleae* populations from Greece, and improved diagnostic for an rAChE mutation. *Entomol Sci* 2008, 6:400-408.
6. Vontas JG, Hejazi MJ, Hawkes NJ, Cosmides N, Loukas M, Herrington J, Janes RW: Resistance-associated point mutations of organophosphate insensitive acetylcholinesterase, in the olive fruit fly *Bactrocera oleae*. *Insect Mol Biol* 2002, 11:329-336.
7. Kakani EG, Mathiopoulos KD: Organophosphorus resistance-related mutations in the acetylcholinesterase gene of Tephritidae. *J Appl Entomol* 2008, 132:762-771.
8. Kakani EG, Ben S, Masouki J, Mathiopoulos KD: Altered GPI modification of insect AChE improves tolerance to organophosphate insecticides. *Insect Biochem Mol Biol* 2011, 41:150-158.
9. Sparks T, Thompson GO, Larson LL, Kist HA, Jantz Q, Warden TV, Herben MB, Busacca JD: Biological characteristics of the spinosyns: a new and naturally derived insect control agent. In *Proceedings of the 1995 Beltwide Cotton Conference*. San Antonio, Texas: National Cotton Council of America, Memphis, Tennessee; 1995:903-907.
10. Tomlin C, Tomlin C, Tomlin C (Eds): *The e-Pesticide Manual*. 13th edition. Harps, UK: BCPC Publ Alton; 2004.
11. Salgado VL: The modes of action of spinosad and other insect control products. *Down to Earth* 1997, 52:35-43.
12. Thompson GO, Duron R, Sparks TC: Spinosad - a case study: an example from a natural products discovery programme. *Entomol Sci* 2006, 5:666-700.
13. Wietson G: Actions of insecticidal spinosyns on ϵ -aminobutyric acid responses from small-diameter cockroach neurons. *Neurochem Physiol* 2001, 71:20.
14. Thompson GO, Busacca JD, Jantz QK, Kist HA, Larson LL, Sparks TC: Spinosyns: an overview of new natural insect management systems. In *Proc Beltwide Cot Conf Natl Cot Counc*. San Antonio, TX; 1995:1039-1043.
15. Wolstenholme AJ, Kaplan RM: Resistance to macrocyclic lactones. *Curr Pharm Biotechnol* 2012, 13:823-887.
16. Moulton JK, Popper DA, Denny TJ: Studies of Resistance of Beet Armyworm (*Spodoptera exigua*) to Spinosad in Field Populations from the Southern USA and Southeast Asia. In *Proc Beltwide Cot Conf*, Volume 2. Orlando, Florida, USA; 1998:884-887.
17. Moulton JK, Popper DA, Denny TJ: Beet armyworm (*Spodoptera exigua*) resistance to spinosad. *Entomol Sci* 2003, 2:484-494.
18. Hsu JC, Haymer DS, Chou M-Y, Feng H-T, Chen H-H, Huang Y-B, Mau RF-L: Monitoring resistance to spinosad in the melon fly (*Bactrocera cucurbitae*) in Hawaii and Taiwan. *Scientific World J* 2012, 2012:250576.
19. Moto-Sanchez C, Hollingsworth RM, Grafius EJ, Moyer DD: Resistance and cross-resistance to neonicotinoid insecticides and spinosad in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Coleoptera: Chrysomelidae). *Entomol Sci* 2006, 6:230-27.
20. Shono T, Scott JG: Spinosad resistance in the housefly, *Musca domestica*, is due to a recessive factor on autosome 1. *Neurochem Physiol* 2003, 75:1-7.
21. Young HF, Bailey WO, Roe RM: Spinosad selection of a laboratory strain of the tobacco budworm, *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae), and characterization of resistance. *Crop Prot* 2003, 22:266-273.
22. Pery T, Mülkenle JA, Batterham P: A *Dolphin* knock-out strain of *Drosophila melanogaster* confers a high level of resistance to spinosad. *Insect Biochem Mol Biol* 2007, 37:184-188.
23. Watson GB, Choukairi DW, Cook KB, Geny C, Gilford JM, Gustafson GO, Hedges JM, Lammua IM, Letherer TJ, Mitchell JC, Pak WL, Salgado VL, Sparks TC, Stillwell GE: A spinosyn-resistant *Drosophila melanogaster* nicotinic acetylcholine receptor identified through chemically induced target site resistance, resistance gene identification, and heterologous expression. *Insect Biochem Mol Biol* 2010, 40:276-284.
24. Baxter SW, Chen M, Dawson A, Zhao J-Z, Vogel H, Shelton AM, Heckel DG, Jiggins CD: Mis-spliced transcripts of nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 6 \delta$ are associated with field evolved spinosad resistance in *Plutella xylostella* (L.). *PLoS Genet* 2010, 6:e1000802.

25. Brinkwich FD, Chari M, Shelton AM, Scott JG: Transcripts of the nicotinic acetylcholine receptor subunit gene *Pxyl6b* with premature stop codons are associated with spinosad resistance in diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Invert Neurosci* 2010, **10**:25–33.
26. Hsu J-C, Feng H-T, Wu W-J, Geb SM, Mao C, Vontas J: Truncated transcripts of nicotinic acetylcholine subunit gene *Bd6a* are associated with spinosad resistance in *Bactrocera dorsalis*. *Insect Biochem Mol Biol* 2012, **42**:896–915.
27. Ruane AM, Linsdell SJ, Collins T, Biebra P, Miller NS: A nicotinic acetylcholine receptor transmembrane point mutation (G275E) associated with resistance to spinosad in *Frankliniella occidentalis*. *J Neurochem* 2013, **124**:590–601.
28. Scott JG: Unravelling the mystery of spinosad resistance in insects. *J Pestic Sci* 2008, **33**:221–227.
29. Wang W, Mo J, Cheng J, Zhuang P, Tang Z: Selection and characterization of spinosad resistance in *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). *Pestic Biochem Physiol* 2009, **84**:180–187.
30. Wang D, Qiu X, Ren X, Xu T, Wang K: Resistance selection and biochemical characterization of spinosad resistance in *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). *Pestic Biochem Physiol* 2009, **95**:90–94.
31. Reyes M, Rocha R, Alarín L, Siegemund M, Sauphanor B: Metabolic mechanisms involved in the resistance of field populations of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) to spinosad. *Pestic Biochem Physiol* 2011, **102**:45–50.
32. Korf A: Emerging structure of the nicotinic acetylcholine receptors. *Mol Biol Neurosci* 2008, **21**:102–114.
33. Le Novère N, Changais J-P: Molecular evolution of the nicotinic acetylcholine receptor: an example of multigene family in excitable cells. *J Mol Evol* 1995, **40**:155–172.
34. Kao PH, Dwork AJ, Kalyani SR, Silver M, Wideman J, Tsai N, Karlin A: Identification of the alpha subunit half-cystine specifically labeled by an affinity reagent for the acetylcholine receptor binding site. *J Biol Chem* 1984, **259**:11662–11665.
35. Molecular Bioinformatics Center: (PS2-v2) Protein Structure Prediction Server (<http://pov2.bioinformatics.org/>)
36. Grauso M, Piretti PB, Galeto E, Santillo DB: Novel putative nicotinic acetylcholine receptor subunit genes, *Dalpa5a*, *Dalpa5b* and *Dalpa7*, in *Drosophila melanogaster* identify a new and highly conserved target of adenosine deaminase acting on RNA-mediated A-to-I pre-mRNA editing. *Genetics* 2002, **160**:1519–1533.
37. An Y, Tian N, Cao J, Liang J, Yang Z, Lu J: RNA editing and alternative splicing of the insect nAChR subunit alpha6 transcript: evolutionary conservation, divergence and regulation. *BMC Evol Biol* 2007, **7**:96.
38. Brinkwich FD, Scott JG: Reduction of dADAR activity affects the sensitivity of *Drosophila melanogaster* to spinosad and imidacloprid. *Pestic Biochem Physiol* 2012, **104**:163–169.
39. Li R, Zhu H, Yuan J, Qian W, Fang X, Shi Z, Li Y, Li S, Shan G, Kristiansen K, Li S, Yang H, Wang J, Wang J: De novo assembly of human genomes with massively parallel short read sequencing. *Genome Res* 2010, **20**:265–272.
40. Goto T, Garcia-Gómez JM, Tated J, Williams TD, Nagataj SH, Nanda M, Robles M, Talón M, Dopazo J, Conesa A: High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite. *Nucleic Acids Res* 2008, **36**:3420–3435.
41. Pivildi N, Demmauw W, Bombauts S, Christaers A, Van Leeuwen T, Vontas J: Analysis of the Olive Fruit Fly *Bactrocera oleae* Transcriptome and Phylogenetic Classification of the Major Detoxification Gene Families. *PLoS One* 2013, **8**:e66533.
42. Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, Marth G, Abecasis G, Durbin R, and 1000 Genome Project Data Processing Subgroup: The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* 2009, **25**:2078–2079.
43. Trapnell C, Williams BA, Pertea G, Mortazavi A, Kwan G, van Baren MJ, Salzberg SL, Wold BJ, Pachter L: Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nat Biotechnol* 2010, **28**:511–515.
44. Anderson CL, Jensen JL, Dhriti TP: Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res* 2004, **64**:5245–5250.
45. Pfaffl MW, Tichauer A, Probstlirer C, Neuwirth TP: Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper-Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biochem Lett* 2004, **26**:509–515.
46. von Mering C, Huynen M, Jorgji D, Schmidt S, Bord P, Snel B: STRING: a database of predicted functional associations between proteins. *Nucleic Acids Res* 2003, **31**:258–261.
47. Karim M, Koy C, Mikut S, Krutler M, Zimmermann R, Isani M, Glocker MO: Molecular adaptations of *Helicoverpa armigera* midgut tissue under pyrethroid insecticide stress characterized by differential proteome analysis and enzyme activity assays. *Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics* 2013, **8**:152–162.
48. IRAC International MoA Working Group: IRAC MoA Classification Scheme 2011:1–25.
49. Hediger MA, Romero MF, Peng JB, Rols A, Takanaga T, Bruford EA: The ABCs of solute carriers: physiological, pathological and therapeutic implications of human membrane transport proteins. *Physgen Arch* 2004, **447**:605–608.
50. White MF: The transport of cationic amino acids across the plasma membrane of mammalian cells. *Biochim Biophys Acta* 1985, **822**:355–374.
51. Handler AM, Postlethwait JH: Endocrine control of vitellogenesis in *Drosophila melanogaster*: effects of the brain and corpus allatum. *J Exp Zool* 1977, **202**:389–402.
52. Postlethwait JH, Handler A: The roles of juvenile hormone and 20-hydroxy-ecdysone during vitellogenesis in isolated abdomens of *Drosophila melanogaster*. *J Insect Physiol* 1979, **25**:485–490.
53. Babinette GD, Feynman B: Ecdysteroid titer and oocyte growth in the northern house mosquito, *Culex pipiens* L. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol* 1986, **83**:325–329.
54. Borovsky D: Release of egg development neurosecretory hormone in *Aedes aegypti* and *Aedes taeniorhynchus* induced by an ovarian factor. *J Insect Physiol* 1982, **28**:311–316.
55. Lee AO, Van Handel E: A neurosecretory hormone-releasing factor from ovaries of mosquitoes fed blood. *J Insect Physiol* 1982, **28**:503–508.
56. Hagström H, Kunkel J: Vitellogenin and Vitellin in insects. *Annu Rev Entomol* 1979, **24**:75–90.
57. Tufail M, Takada M: Molecular characteristics of insect vitellogenins. *J Insect Physiol* 2008, **54**:1447–1458.
58. Falho E, Silveira AB, Masuda H, Silva-Neto MA: Oocyte fertilization triggers acid phosphatase activity during *Rhodnius prolixus* embryogenesis. *Insect Biochem Mol Biol* 2002, **32**:871–880.
59. Soehiaz SC, Norberg K, Girsa U, Kresting T, Ardam G: Reproductive protein protects functionally sterile honey bee workers from oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, **103**:962–967.
60. Denison MS, Chambers JE, Yarbrough JD: Persistent vitellogenin-like protein and binding of DDT in the serum of insecticide-resistant mosquitofish (*Gambusia affinis*). *Comp Biochem Physiol C* 1981, **69C**:109–112.
61. Teller WH, Kunkel JG: The function and evolution of insect storage hexamers. *Annu Rev Entomol* 1991, **36**:205–238.
62. Kishoz M, Kawaguchi J, Lee J, Ryan R, Van Heusden M, Ziegler R: Insect hemolymph proteins. *Adv Insect Physiol* 1990, **22**:299–336.
63. Haunerland NH: Insect storage proteins: gene families and receptors. *Insect Biochem Mol Biol* 1996, **26**:755–765.
64. Wheeler DE, Tschirpakova E, Buck NA, Tabashnik BE: Hexameric storage proteins during metamorphosis and egg production in the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera). *J Insect Physiol* 2000, **46**:951–958.
65. Tawfik A, Kellner R, Hoffmann JH, Lorenz MR: Purification, characterisation and titre of the hemolymph juvenile hormone binding proteins from *Schistocerca gregaria* and *Gryllus bimaculatus*. *J Insect Physiol* 2006, **52**:255–268.
66. Zhou X, Qi FM, Schaff ME: Social exploitation of hexamerin: RNAi reveals a major caste-regulatory factor in termites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, **103**:4399–4404.
67. Zhou X, Tarver MR, Schaff ME: Hexamerin-based regulation of juvenile hormone-dependent gene expression underlies phenotypic plasticity in a social insect. *Development* 2007, **134**:601–610.
68. Wilkins RM, Ahmed S, Mantle D: Intracellular proteases: their role, insecticide toxicity and resistance mechanisms. The 1998 Brighton Conference *Proc 8th Diptera* 1998, **51**:3–536.
69. Birst JJ, Butler PE: Intracellular proteases. *Annu Rev Biochem* 1982, **56**:333–364.

70. Bivitt AJ. Intracellular protein degradation. *Essays Biochem* 1990, 25:39-81.
71. Li M, Reid WR, Zhang L, Scott AG, Gao X, Kristensen M, Liu N. A whole transcriptome linkage analysis of gene co-regulation in insecticide resistant house flies, *Musca domestica*. *BMC Genomics* 2013, 14:803.
72. Saleem MA, Ashfaq M, Shakoon AR. In vivo Effect of Spinosad on Proteases of Insecticide-Resistant and Susceptible Strains of *Musca domestica*. *Pakistan J Zool* 2009, 41:455-462.
73. Gong M, Shen B, Gu Y, Tian H, Ma L, Li X, Yang M, Hu Y, Sun Y, Hu X, Li J, Zhu C. Serine protease over-expression in relation to deltamethrin resistance in *Culex pipiens pallens*. *Arch Biochem Biophys* 2008, 438:51-61.
74. Yang Q, Zhou Q, Sun L, Zhang D, Qian J, Kong C, Sun Y, Ma L, Zhu C. Expression and characterization of two pesticide resistance-associated serine protease genes (NYD-11 and NYD-11c) from *Culex pipiens pallens* for metabolism of deltamethrin. *Parasitol Res* 2008, 103:507-516.
75. Liu N, Reid WR, Zhang L. A whole transcriptome approach to investigate the genes involved in permethrin resistance in the southern house mosquito *Culex quinquefasciatus*. *J Proteomics Bioinform* 2012, 5:65.
76. Marinotti O, James AA, Ribeiro JMC. Diet and salivation in female *Aedes aegypti* mosquito. *J Insect Physiol* 1990, 36:545-548.
77. Valero-Cabré JG, Pham VM, Garfield MK, Francischetti IM, Ribeiro JM. Toward a description of the salivome of the adult female mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol* 2002, 32:1101-1122.
78. Soudi M, Zamodiy M, Jakschitsch C, Furrmüller PS, Obinger C. Molecular evolution, structure, and function of prooxidants. *Chem Biol* 2012, 20:1776-1793.
79. Cambi A, Nigam SK. Necrosis: C-type lectins sense cell death. *Curr Biol* 2009, 19:R375-R376.
80. Kuzalla AV, Eisen A. Differential expression profiling of components associated with exoskeletal hardening in crustaceans. *BMC Genomics* 2008, 9:575.
81. Kawaguchi N, Komano H, Natori E. Involvement of *Sarcophaga lectin* in the development of imaginal discs of *Sarcophaga peregrina* in an autocrine manner. *Dev Biol* 1991, 144:86-93.
82. Natori S. Insect Lectins and Innate Immunity. In *Phylogenetic Respect: Vertebrate Immune Syst*, Volume 484, Edited by Resh G, Sugumaran M, Cooper H. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers; 2001:773-776.
83. Grossman GL, James AA. The salivary glands of the vector mosquito, *Aedes aegypti*, express a novel member of the amylose gene family. *Insect Mol Biol* 1995, 1:223-232.
84. Yamamoto-Kihara M, Kotani E. Isolation and characterization of a C-type lectin cDNA specifically expressed in the tip of mouthparts of the flesh fly *Sarcophaga peregrina*. *Insect Mol Biol* 2004, 13:133-140.
85. Lesch C, Goto A, Lindgren M, Bida G, Dushay MS, Theopold U. A role for Hemolymph in coagulation and immunity in *Drosophila melanogaster*. *Dev Comp Immunol* 2007, 31:1255-1263.
86. Arai I, Ohta M, Suzuki A, Tanaka S, Yoshizawa Y, Sato R. Immunohistochemical analysis of the role of hemocytin in nodule formation in the larvae of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Sci* 2013, 13:1-12.
87. Gutzgerrich FP. Cytochrome p450 and chemical toxicology. *Chem Res Toxicol* 2008, 21:70-83.
88. Feyereisen R. Insect P450 enzymes. *Annu Rev Entomol* 1994, 44:507-533.
89. Sun JG. Cytochromes P450 and insecticide resistance. *Insect Biochem Mol Biol* 1999, 29:757-777.
90. Li X, Schuler MA, Benenbaum MR. Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. *Annu Rev Entomol* 2007, 52:201-223.
91. Wang D, Qiu X, Ren X, Zhang W, Wang K. Effects of spinosad on *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) from China: tolerance status, synergism and enzymatic responses. *Pest Manag Sci* 2009, 65:1040-1046.
92. Markusen MDK, Kristensen M. Spinosad resistance in female *Musca domestica* L. from a field-derived population. *Pest Manag Sci* 2012, 68:75-82.
93. Xu J, Stronge JF, Weller DL, James RR. Detoxification and stress response genes expressed in a western North American bumble bee, *Bombus huntii* (Hymenoptera: Apidae). *BMC Genomics* 2013, 14:2074.
94. Wilkoughly L, Chung H, Lamb C, Robles C, Berberham P, DeJong TH. A comparison of *Drosophila melanogaster* detoxification gene induction responses for six insecticides, caffeine and phenobarbital. *Insect Biochem Mol Biol* 2006, 36:934-942.
95. Arrigo AP, Ahmad-Zadeh C. Immunofluorescence localization of a small heat shock protein (hsp 23) in salivary gland cells of *Drosophila melanogaster*. *Mol Gen Genet* 1981, 184:73-79.
96. Weyraw T, Kaufman TC, Kovachik GE. Sequence and expression of *Drosophila* Antigen S-related 2, a new member of the CAP gene family. *Gene* 1996, 222:197-204.
97. Marzendorfer H, Zinnich L. Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. *J Exp Biol* 2003, 206(Pt 24):4293-4412.
98. Petri W. Pentitrophic Membranes. In *Zoophysiology*, Volume 30, Edited by Resh G, Weyraw T, Heiler HC, Ma S, Lange H, Konwiler G, Rindal DL. Berlin: Springer; 1992:3-238.
99. Shen J, Jacoby-Lorenz M. Characterization of a novel gut-specific chitinase gene from the human malaria vector *Anopheles gambiae*. *J Biol Chem* 1997, 272:2895-2899.
100. Elho BPO, Leites FJA, Szczepaniak-NFC, Pádua V, Pereira ST, Pimenta RPP. Presence of chitinase and beta-N-acetylglucosaminidase in the *Aedes aegypti*: a chitinolytic system involving pentitrophic matrix formation and degradation. *Insect Biochem Mol Biol* 2002, 32:1723-1729.
101. Kramer KJ, Muthukrishnan S. Insect chitinases: molecular biology and potential use as biopesticides. *Insect Biochem Mol Biol* 1997, 27:887-900.
102. Heredia-España A, Chet I. Chitinases in biological control. *Ecol* 1999, 87:171-184.
103. InterPro: protein sequence analysis & classification. <http://www.ebi.ac.uk/interpro/>
104. Gornulski LM, Dimopoulos G, Xi Z, Sorensen MB, Bonaldo MF, Malabola AB, Caspari G. Gene discovery in an invasive tephritid model pest species, the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*. *BMC Genomics* 2008, 9:243.
105. Tapuriani RT, Augustinos AA, Kakani EG, Drosopoulou E, Mavragani-Tapudou P, Mathiopoulos KD. Isolation, annotation and applications of expressed sequence tags from the olive fly, *Bactrocera oleae*. *BMC Genomics* 2011, 12:833-845.
106. Tzaniakaki ME, Economopoulos A, Tzetsipi J. The importance of conditions during the adult stage in evaluating an artificial food for larvae of *Dacus oleae* (Gmel.) (Diptera, Tephritidae). *J Agric Entomol* 1962, 59:127-130.
107. Tzetsipi J. Development of a caging and eggng system for mass rearing the olive fruit fly, *Dacus oleae* (Gmel.) (Diptera, Tephritidae). *Ann Zool Ecol Anim* 1977, 9:133-139.
108. Tzetsipi JA, Kontos A. Improved solid adult diet for the olive fruit fly *Dacus oleae*. *Entomol Res* 1983, 12:4-29.
109. Kakani EG, Zygourelis NE, Tsiamani KT, Seraphides N, Zakariou G, Mathiopoulos KD. Spinosad resistance development in wild olive fruit fly *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae) populations in California. *Pest Manag Sci* 2010, 66:447-453.
110. BLAST. <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
111. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 1994, 22:4673-4680.
112. ClustalW2. <http://www.ebi.ac.uk/Tools/mus/clustalw2/>
113. ExPASy Bioinformatics Resource Portal: Compute pI/Mw tool. http://webtools.expasy.org/compute_pi/
114. Falquet L, Pagni M, Bucher P, Hulo N, Sigrist CJ, Hofmann B, Bairoch A, Nuber G, Batsch P, Aubry B. The PROSITE database, its status in 2002. *Nucleic Acids Res* 2002, 30:235-238.
115. Sagri E, Riecho M, Tsakumani KT, Gregoriou ME, Mavridou A-M, Tzetsigkou S, Athanasiadis K, Ragnusztik J, Mathiopoulos KD. The molecular biology of the olive fly comes of age. 2014.
116. Camacho C, Coulouris G, Avagyan V, Ma N, Papadopoulos J, Bealer K, Madden TL. BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics* 2009, 10:421.
117. Trapnell L, Pachter L, Salzberg SL. TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. *Bioinformatics* 2009, 25:1105-1111.
118. Quinlan AR, Hall IM. BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics* 2010, 26:q641-642.
119. Normfinder. <http://www.cbi.cgu.se/normfinder-software/>
120. Cheng E, Shi S, Liu J, Cheng T, Xie L, Yang X, Yang W, Lan Q, Jiang Z. Selection of reference genes for quantitative gene expression studies in

- Platyedus orientalis* (Cupressaceae) Using real-time PCR. *PLoS One* 2012, **7**:e33278.
121. **Primer-BLAST**, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>.
122. Livak KJ, Schmittgen TD: **Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method.** *Methods* 2001, **25**:402-408.
123. **GraphPad Software, Inc.** <http://www.graphpad.com>.

doi:10.1186/1471-2164-15-714
Cite this article as: Sagri et al.: Olive fly transcriptomics analysis implicates energy metabolism genes in spinosad resistance. *BMC Genomics* 2014 **15**:714.

RESEARCH

Open Access

The molecular biology of the olive fly comes of age

Efthymia Sagri¹, Martin Reczko², Konstantina T Tsoumani¹, Maria-Eleni Gregoriou¹, Vaggelis Harokopos², Anna-Maria Mavridou¹, Spyros Tastsoglou¹, Konstantinos Athanasiadis¹, Jiannis Ragoussis^{2†}, Kostas D Methiopoulos^{1*}

Abstract

Background: Olive cultivation blends with the history of the Mediterranean countries since ancient times. Even today, activities around the olive tree constitute major engagements of several people in the countryside of both sides of the Mediterranean basin. The olive fly is, beyond doubt, the most destructive pest of cultivated olives. The female fly leaves its eggs in the olive fruit. Upon emergence, the larvae feed on the olive sap, thus destroying the fruit. If untreated, practically all olives get infected. The use of chemical insecticides constitutes the principal olive fly control approach. The Sterile Insect Technique (SIT), an environmentally friendly alternative control method, had been tried in pilot field applications in the 1970's, albeit with no practical success. This was mainly attributed to the low, non-antagonistic quality of the mixed-sex released insects. Many years of experience from successful SIT applications in related species, primarily the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*, demonstrated that efficient SIT protocols require the availability of fundamental genetic and molecular information.

Results: Among the primary systems whose understanding can contribute towards novel SIT approaches (or its recently developed alternative RIDL: Release of Insects carrying a Dominant Lethal) is the reproductive, since the ability to manipulate the reproductive system would directly affect the insect's fertility. In addition, the analysis of early embryonic promoters and apoptotic genes would provide tools that confer dominant early-embryonic lethality during mass-rearing. Here we report the identification of several genes involved in these systems through whole transcriptome analysis of female accessory glands (FAGs) and spermathecae, as well as male testes. Indeed, analysis of differentially expressed genes in these tissues revealed higher metabolic activity in testes than in FAGs/spermathecae. Furthermore, at least five olfactory-related genes were shown to be differentially expressed in the female and male reproductive systems analyzed. Finally, the expression profile of the embryonic *serendipity-4* locus and the pre-apoptotic *head involution defective* gene were analyzed during embryonic developmental stages.

Conclusions: Several years of molecular studies on the olive fly can now be combined with new information from whole transcriptome analyses and lead to a deep understanding of the biology of this notorious insect pest. This is a prerequisite for the development of novel embryonic lethality female sexing strains for successful SIT efforts which, combined with improved mass-reared conditions, give new hope for efficient SIT applications for the olive fly.

Background

When Athena, the goddess of peace and wisdom, offered an olive tree to the people of Attica to sway them into choosing her name for their city - and not that of her brother's Poseidon - neither she nor the people of Attica

were aware of the 'worm' that could destroy the precious fruit of that tree. That was described much later in the 3rd century AD, by the botanist Theophrastus who, in his works *"Enquiry into Plants"* and *"Causes of Plants"* [1], talked about the 'worm underneath the skin of the olive that destroys the fruit'. Indeed, the female olive fly (*Bactrocera oleae*, Rossi) lays her eggs in an olive fruit and the resulting larva feeds on the olive sap, opening channels inside it, thus destroying it. In this way, a female fly can damage more than 300 olives in her lifetime. Given the

* Correspondence: kmethiopoulos@upatf.gr

† Contributed equally

¹Department of Biochemistry and Biotechnology, University of Thessaly, Larissa, Greece

Full list of author information is available at the end of the article



fact that during the summer and fall months about five generations of these flies are born, one can imagine the cumulative damage that can take place in an olive orchard. If untreated, practically every single olive will get infested. It is estimated that due to olive fly infestation olive oil production is reduced by more than 30% annually [2].

Control of these flies is traditionally based on cover or bait sprays with chemical insecticides. During the last 40-50 years, organophosphate insecticides have been extensively used against the olive fly, mainly dimethoate and fenthion. More recently, pyrethroids as well as the naturalyte spinosad have been added in the arsenal against the olive fly. The use of chemical pesticides, however, entails many known hazards. Among these are ecological disturbances, the development and spread of insecticide resistance, harmful toxicological effects on human health [3]. Many of these risks are apparent not only to scientists but also to growers and consumers who require a cleaner and safer environment as well as products of high quality. Alternative, environmentally friendly control methods against insect pests, such as the Sterile Insect Technique (SIT) have been experimented in the past with considerable success [4]. The SIT involves the mass production, sterilization and subsequent release of the sterilized insects [5]. The sterilized males will mate with wild females, whose unfertilized eggs will never hatch, thus reducing the numbers of the following generation. In theory, if continued releases are performed over several consecutive generations, the population will progressively be reduced and, eventually, a total eradication could occur.

Given the substantial economic burden of the olive fly in olive producing countries and the concerns raised about the heavy use of insecticides to control the flies, the SIT was proposed [6] and implemented in two pilot efforts. In the early 1970s, about 150,000 laboratory-reared male and female flies were sterilized by gamma-irradiation and subsequently released in the environment [7]. Although initially the releases seemed to contribute to low infestation levels, by the end of the season olives were as highly infested as in the two nearby control plantations. The sterilized flies were proven ineffective to reduce infestation. Similar results were obtained in a second pilot SIT effort that took place in the late '70s in a small Greek island. These unsuccessful pilot experiments led to funding suspension and the eventual abandonment of the program [8-10]. Apart from the high cost and labor-intensive rearing of the olive fly, extensive research that followed these first pilot efforts revealed several key issues of olive fly biology that should have been sorted out before a successful SIT could be implemented. The first issue regarded assortative mating of the released and wild populations. Laboratory-reared flies mated several hours before

scotophase whereas wild flies mated at the end of the photophase [11]. Apparently, mass-laboratory rearing caused substantial alterations in the genetic makeup of the flies due to selective pressures in the artificial laboratory environment [12,13]. The second issue regarded the quality of the radiation-sterilized mass-reared flies. Radiation did not leave the vigor of the flies unaffected [14]. Another factor that probably exacerbated the low fitness of the laboratory reared flies was the use of antibiotics in the flies' diet that destroyed the endosymbiotic bacteria that are now known to play a very important role in the organism's fitness [15-19]. Finally, but equally importantly, extensive stinging of the olive fruits from the released females led to further fungal infestation [7].

Since those early years, several molecular and genetic studies have changed *B. oleae*'s research landscape. First, the development of microsatellite markers [20] and the analysis of the mitochondrial genome [21] have offered tools for a fairly detailed analysis of population structure and dynamics in the Mediterranean basin [22-26]. Second, cytogenetic analysis, including *in situ* hybridization of several molecular markers, established the details of the chromosomal complement [27-31]. Third, isolation and characterization of various genes has shed light on important processes such as insecticide resistance [32-35], female germline differentiation and morphogenesis of epidermal cells [36], enzyme catalytic mechanisms [37], sex-determining cascades [38,39]. Fourth, an initial assessment of the genome of the olive fly was gained by an accurate estimate of its size [40] and the characterization and analysis of centromeric repeats [41] and several EST loci [42]. This was followed by a whole transcriptome analysis with 454 pyrosequencing [43]. Fifth, *B. oleae* was successfully transformed with the use of a *Minos*-based transposon [44]. Transformation efforts recently led to the development of *piggyBac*-based conditional female-lethal olive fly strains that provide highly penetrant female specific lethality, dominant fluorescent marking and genetic sterility [45]. Sixth, *B. oleae* was recently trans-infected with a cherry fly *Wolbachia* strain and shown to induce complete cytoplasmic incompatibility in the fly [46]. Finally, the experience gained during the first two pilot SIT efforts and the relevant research that followed, underlined a few key requirements for the maintenance of high quality and well-fit mass-reared olive flies (reviewed in [47]). Among them were changes in larval and adult diets (eg removal of antibiotics) that would preserve the endosymbiotic flora (that is now known to improve fitness) and occasional enrichments of the long-term laboratory colonies with wild individuals (that provide natural vigor). These achievements have renewed the interest in using SIT for olive fly control. In fact, there is a large international effort led by the Joint Division of the Food and Agricultural Organization and the International Atomic Energy Agency

(FAO/IAEA) to develop a vigorous laboratory olive fly strain that could be used in such new SIT efforts.

Further scientific and technological developments, in addition to successful SIT applications in other insects, point to the direction olive fly research could go. Indeed, SIT has proven particularly effective in the medfly, the prototype Tephritid species where most genetic and molecular tools have been developed. One of the most active medfly research areas in recent years has been the development of the RIDL technology. RIDL (Release of Insects carrying a Dominant Lethal; [48,49]) is a variant of the conventional SIT, in which sterilization of the released insects is induced not by irradiation but by homozygosity for a dominant lethal gene. Mating with wild individuals results in offspring that are heterozygous for the lethal gene leading to the death of all progeny [50,51]. This dominant lethal gene can be placed under the control of an inducible early embryonic female promoter [51,52] that could achieve genetic sexing at a very early developmental stage. In this way, both genetic sexing and sterilization can be accomplished by the same construct. One other active research area regards the analysis of biological systems with relevance to SIT. Of particular interest are those that regard reproduction and olfaction. The first one is involved in successful mating and egg development, while the second in food and mate localization. A possible manipulation of either or both of these systems would severely affect the destructive ability of the flies. In that sense, transgenic flies could be developed in which genes regulating food and mate recognition or fertility are knocked-down, over-expressed or mis-expressed (depending on the case). Such flies would be safer and more efficient to be released in control programs in an SIT context.

The falling prices of next generation sequencing make it now possible to sequence the entire transcriptome of non-model organisms under different settings and identify differentially expressed genes relevant to the chosen conditions. Subsequently, these genes can be manipulated *in vitro* and re-introduced into the genome of the organism through well-established transgenic technologies. In a first attempt to explore the relevant-to-SIT transcriptome of the olive fly, we present differences observed in female and male reproductive systems and we examine the differential expression of olfactory genes in the same tissues. Finally, we assess the developmental expression of two of the most commonly used early embryonic genes.

Results and discussion

1. Sequencing and annotation

1.1. Solid ABI sequencing and reads assembly

In order to explore differentially expressed genes in the transcriptome of reproductive organs of the olive fly that could be useful in SIT development, the entire

transcriptomes from female accessory glands and spermathecae were compared to male testes. For transcriptome assembly, the sequences from these two libraries (FEMALE and MALE) were combined with two more obtained from heads of spinosad-sensitive (LAB) and spinosad-resistant (SPIN) olive flies [53]. Paired-end sequencing with 35nt and 50nt read sizes was performed for each library and a total of 122,623,894 read pairs was obtained. All reads of the libraries were pooled to obtain a reference transcriptome assembly using SOAPdenovo assembler [54].

1.2. Sequence annotation

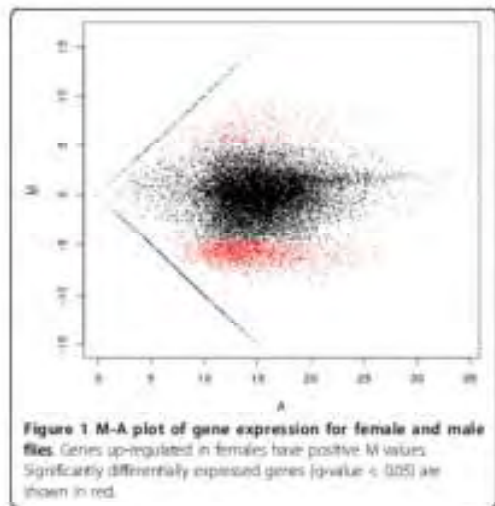
Annotation of the assembled sequences was obtained by aligning the 69,359 assembled *B. oleae* sequences against the NCBI non-redundant (Nr) protein database using blastx and collecting the annotations with the BLAST2GO tool [55]. Using an E-value threshold of $\leq 1e^{-6}$, 20,207 (29.13 %) of the contigs were aligned. Of the 69,359 contigs, 23,042 (33.22%) have almost exact hits in the *B. oleae* transcriptome of Pavlidis et al [43] (E-value $\leq 1e^{-4}$).

2. Female vs male differential expression

The Cuffdiff [56] tool was used in order to reveal the differentially expressed genes between the reproductive systems of female and male flies, a stringent cutoff (p value adjusted for multiple testing, called q value < 0.05) was used. This resulted in 1568 differentially expressed transcripts in the FEMALE vs. MALE comparison. Three hundred and thirty of these transcripts were up-regulated in FEMALE, while 1238 were up-regulated in MALE *B. oleae* flies. The top 40 up-regulated genes in each category are listed in Table S1. The entire lists of all significantly ($q < 0.05$) up-regulated genes in FEMALE and MALE are given in Tables S3 and S4, respectively.

An M-A plot was constructed for comparison of the genes for FEMALE vs MALE flies with q value < 0.05 . In Figure 1 the de-regulated genes are depicted in red.

Functional annotation was made for the assembled sequences of the significantly differentially expressed female- and male- specific genes mentioned in Table S1, based on gene ontology (GO) categorization obtained using BLAST2GO. The FEMALE and MALE GO analysis performed for biological process of the top 40 female and male expressed genes is shown in Figure 2. In general, more GO terms appear in female tissues than in male (16 vs 12), a point that holds even in deeper GO-term analysis. This can be attributed to the fact that the FEMALE library was comprised of both FAGs and spermathecae, while the MALE from testes only. Furthermore, there were more male- than female-specific genes involved in metabolism and development, a fact that can be attributed to sperm activity in the MALE tissue. Finally, the presence of three immune system process genes in the female list should be noted. In fact, increased



levels of immune response genes have been found in transcriptome analyses of insect female reproductive systems, particularly after mating [57,58]. Upregulation of these genes may assist females to combat pathogens introduced during copulation. Alternatively, it could be a result of female's perception of sperm as non-self molecules.

A more direct comparison between FEMALE-only and MALE-only GO-term distribution is shown in Figure 3. Interestingly, numbers of GO-terms for biological process appear different in the two datasets, suggesting a different complexity of the studied female and male reproductive tissues. In most terms, there are more male- than female-specific transcripts that are differentially expressed. Many of these terms (cell cycle, intracellular organelle part, primary metabolic process, organic substance metabolic process, macromolecule metabolic process, cellular metabolic process, multicellular organismal development) refer to higher metabolic processes. This could be attributed to higher metabolic and cellular activity that takes place in the testes before mating.

3. Genes that might be implicated in sexual differentiation in *B. oleae*

In order to validate the differential expression of various genes observed after the RNAseq analysis of reproductive tissues of female and male olive flies, further functional analysis was performed for twelve genes that were differentially expressed in female accessory glands and spermathecae, on one hand, and male testes, on the other (Figure 4). These genes were selected on the basis of known involvement in sexual differentiation in other insects. Seven of them were selected from the 1238 significantly up-regulated in MALE (Table S4): *k12* (male fertility factor *k12*), *k13* (male fertility factor *k13*), *k15*

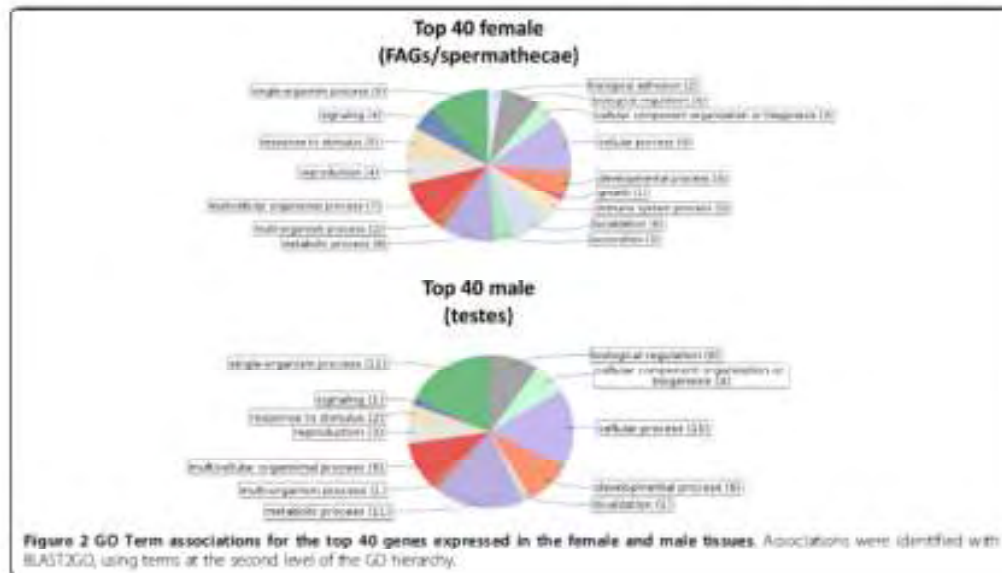
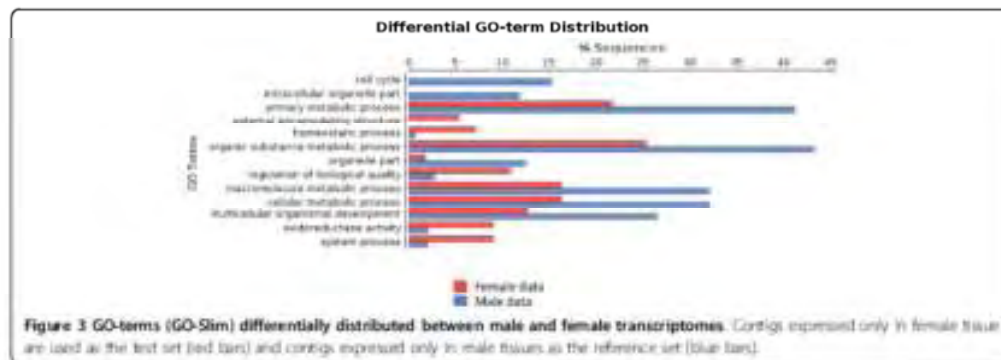


Figure 2 GO Term associations for the top 40 genes expressed in the female and male tissues. Associations were identified with BLAST2GO, using terms at the second level of the GO hierarchy.



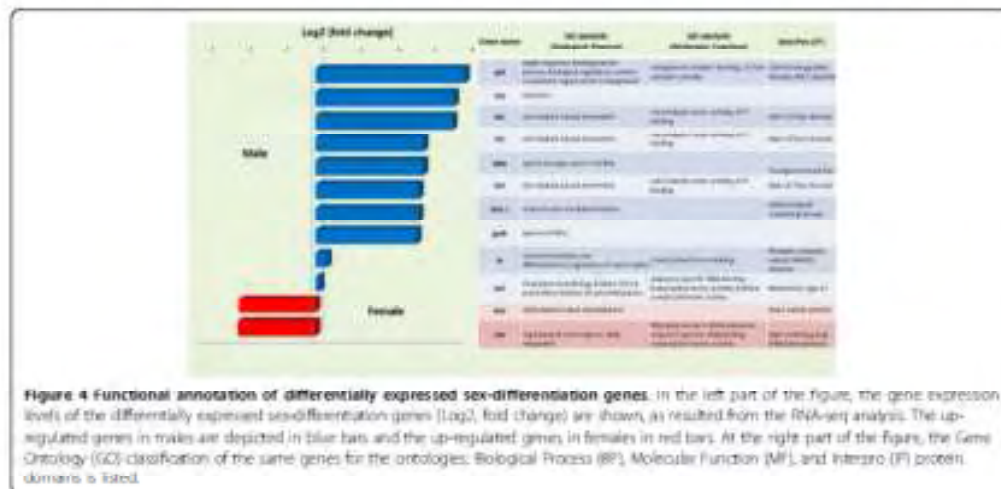
(male fertility factor *kf5*), *ory* (occludin-related Y protein), *fem-1* (sex-determining protein fem-1), *gas8* (growth arrest specific protein 8) and *laho* (last hairs). Three more genes that were up-regulated in MALE [*ix* (*interses*), *pbl* (*pebble*) and *hcf* (*host cell factor C1*)] and two that were up-regulated in FEMALE [*sax* and *pcp* (*pupal cuticle protein 78E*)], albeit with lower statistical power (i.e., $q > 0.05$) were also selected for further validation.

3.1. Drosophila Y-linked genes *kf3*, *kf5* and *ory*

Quantitative RT-PCR confirmed the elevated expression of *kf2*, *kf3*, *kf5* and *ory* in male testes of the olive fly (Figure 5). In *Drosophila melanogaster*, *kf3* and *kf5* (along with *kf2*) are known Y-linked fertility factors. The lack of *kf3* or *kf5* causes the loss of the outer arm of the sperm tail axoneme [59], a structure known to contain the molecular motor protein dynein in other organisms [60].

Indeed, Goldstein et al. showed in 1982 that sperm from mutant *kf3* and *kf5* males lack three discrete high molecular weight proteins with mobility similar to dynein heavy chains of *Chlamydomonas reinhardtii* and proposed that these fertility factors are the structural genes of three different dynein heavy chain proteins [61]. In 1993, Gepner and Hays sequenced part of *kf5* and showed that it encodes an axonemal β -dynein heavy chain that is expressed in the testes [62].

ory is also Y-linked in *D. melanogaster*, although details on this gene are scarce. *kf3*, *kf5* and *ory* are Y-linked in 12 different sequenced *Drosophila* genomes [63]. In *Drosophila*, the closest paralogs of *kf2*, *kf3*, and *kf5* are autosomal and not X-linked, suggesting that the evolution of the *Drosophila* Y chromosome has been driven by an accumulation of male-related genes arising *de novo* from the autosomes [64]. While the most likely function of the



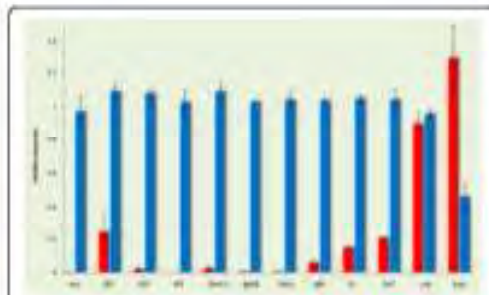


Figure 3 Validation profiles of differentially expressed sex-differentiation genes. Differentially expressed sex-differentiation genes of Figure 4 were further validated by qRT-PCR. Expression in male testes is depicted in blue color columns and expression in female accessory glands and spermathecae in red. Standard error of the mean of the two biological replicates is shown in bars in all genes, except fox and pop, expression in FEMALE and MALL was significantly different, as determined by t-test ($p < 0.05$).

three genes in the olive fly might be similar to that of *Drosophila*, we have no indication with regard to their chromosomal localization in the olive fly. Such information could shed some light to the evolutionary origin of the olive fly's Y chromosome.

3.2. Spermatogenesis and sperm motility genes

One spermatogenesis and two sperm motility genes were shown to be differentially over-expressed in male olive fly tissues both in the transcriptome analysis and after q-RT-PCR (Figure 4 and 5). The first locus, *sex-determining protein fem-1 (fem-1)*, encodes an essential spermatogenesis product in *Caenorhabditis elegans*. Three *fem* genes, *fem-1*, *fem-2*, and *fem-3*, have been shown to be essential for male development [65]. Loss-of-function mutations in any one of the *fem* genes prevent all aspects of male development and transform the animals that are genetically males into females [66,67]. The predicted product of the *fem-1* gene is an intracellular protein that contains ankyrin repeats, which in many other proteins mediate specific protein-protein interaction [67]. In *D. melanogaster*, a *fem-1* homolog with similar structure has been found [68]. The second locus, *growth arrest-specific protein 8 (Gas8)* is a microtubule-binding protein localized to regions of dynein regulation in mammalian cells. In mouse, Gas8 is predominantly a testicular protein, whose expression is developmentally regulated during puberty and spermatogenesis. In humans, it is absent in infertile males who lack the ability to generate gametes [69]. Gas8 has not been studied in insects. Finally, *fast boys (fubn)*, has been shown to affect sperm entry movement into the female seminal receptacle and does not affect sperm exit movement from the seminal vesicle of *D. melanogaster*

[70]. Given a similar function of these two loci in the olive fly, over-expression in male testes is expected.

3.3. Sex determination genes

In *D. melanogaster*, *intersex (ix)* controls somatic sexual differentiation only in females, acting near the end of the sex determination hierarchy. Its product does not have a known DNA-binding domain and, therefore, it is thought to act as a transcriptional co-factor for the female variant of Doublesex protein (DSX^f), a key gene of the sexual determination cascade in *D. melanogaster* [71]. Minimal differences were observed in *ix* expression between the two sexes of the olive flies.

Transcriptome analysis also showed a four-fold over-expression of *sox* in female tissues, a result that was not confirmed after validation. The *sox* gene family is a group of related transcription factors that play critical roles in embryonic development. This family was originally identified in mammals based on sequence similarity to SRY, the sex-determining region Y chromosome [72]. In the honeybee, as SOX proteins play key roles in gonad differentiation, the SoxE group orthologues were up-regulated in the drone testes [73]. In *Drosophila* SoxN is a new group B Sex gene expressed in the developing CNS and is one of the earliest transcription factors to be expressed in a pan-neuroectodermal manner [74].

3.4. Other genes

The *Pebble (pbl)* gene belongs to a family of GTP exchange factors that are essential for the construction of a contractile ring and the initiation of cytokinesis during the embryonic division cycles of the somatic cells in *D. melanogaster* [75,76]. Its role in spermatogenesis has not been elucidated yet. Expression of *pbl* in *D. melanogaster* testes is low [68]. On the other hand, expression in olive fly testes was found elevated in comparison to its expression in female accessory glands/spermathecae (Figure 4 and 5).

Host cell factor C1 (Hcf) is involved in a wide variety of cellular functions, including regulation of transcription, cytokinesis, cell cycle progression and chromatin remodeling [77]. The protein is essential for cellular viability and demonstrates similar activity among a broad range of species. A single *hcf* homolog is also present in *Drosophila* (called dHCF) and is expressed in all tissues, although at relatively low levels [68]. The transcriptome analysis in the olive fly tissues showed a ~0.2-fold higher expression in the male tissues. This result was confirmed after qRT-PCR in the same tissues, where higher levels of expression in testes were observed in comparison with female accessory glands/spermathecae (Figure 4 and 5).

Quantitation by RT-PCR confirmed the over-expression of *pupal cuticle protein (pup)* in female accessory glands/spermathecae as compared to male testes. Cuticle proteins, along with chitin, are the two components of insect cuticle. The cuticular proteins seem to be specific

to the type of cuticle that occurs at stages of the insect development. Flexible proteins are found in the flexible cuticle of larva and pupa, but can also be found in the soft endocuticle of adult insects [78].

Female insects require the steroid hormone 20-hydroxyecdysone (20E) in order to activate vitellogenesis, a process required for egg development. In *Anopheles gambiae* mosquitoes, large amounts of 20E are produced and stored in male accessory glands and subsequently delivered to female mosquitoes during mating [79]. Pupal cuticle proteins, on the other hand, are known to accumulate in response to a pulse of 20E [80]. However, given that FAGs/spermathecae collected were from unmated females, we cannot offer a plausible explanation for the over-expression of *peps*.

4. Validation of olfactory gene differential expression

Insects possess very sensitive chemosensory systems that can detect and discriminate among a diverse array of odors. These systems play a crucial role in insect survival and reproductive success, mediating responses to food detection, mating and oviposition. Odor recognition is a coordinated process requiring the combined specificities contributed by odorant-binding proteins (OBPs) and chemosensory proteins (CSPs) as well as odorant receptors (ORs) (Reviewed in [81]). Insect odorant-binding proteins (OBPs) are soluble proteins surrounding the extracellular lymph of olfactory neurons [82]. OBPs are capable of binding and solubilizing small hydrophobic molecules from the environment and therefore transport them to the underlying ORs, which are expressed on peripheral olfactory receptor neurons. Insect ORs are either ionotropic receptors (IRs) or seven-transmembrane proteins (ORs) with an inverse topology compared to GPCRs, that form heterodimers of a ligand-binding OR and an ubiquitous highly conserved co-receptor named Orco [83]. These complexes are suggested to constitute ligand-gated nonselective cation channels triggering the olfactory signaling [81].

While OR expression in olfactory tissues is obvious and well-established, the distribution of ORs beyond the olfactory system has also been documented in different mammalian species [84-86], suggesting that ORs may play an important role in the ectopic expression of non-chemosensory tissues. Interestingly, OR expression has been documented in human and mouse germ cells [87-91] and recently in mosquitoes [92]. Similarly, other non-olfactory functions have been reported for OBP-like proteins including the B proteins of *Tenebrio molitor* accessory glands [93], the male specific serum proteins of *Ceratix capitata* [94], and the heme-binding protein of *Rhodnius prolixus* [95]. These demonstrate that OBPs are not restricted to olfaction and are likely to be involved in broader physiological functions, suggesting that their

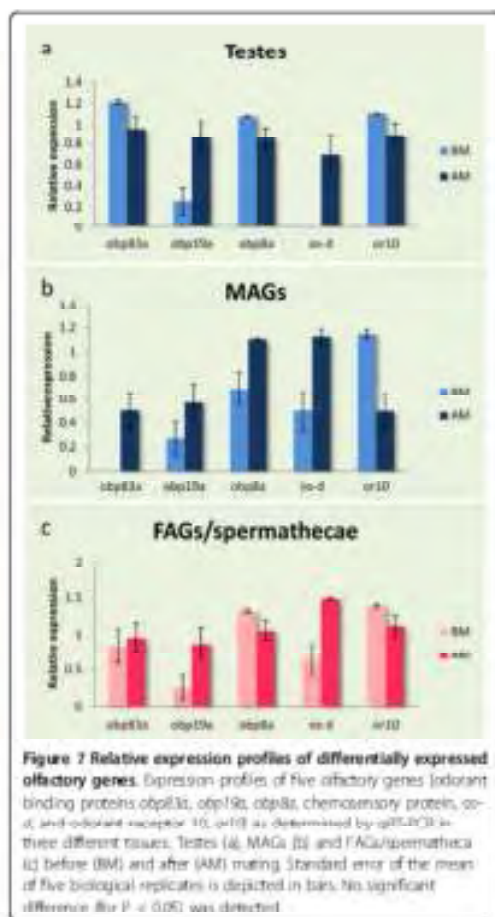
roles may be restricted to general carrier capabilities with broad specificity for lipophilic compounds [96].

With that in mind, we opted to explore the expression of various olfactory-related genes in the reproductive systems under investigation. Twelve olfactory-related genes were present in the annotated list that resulted from the transcriptome assembly of the FEMALE and MALE olive fly tissues (Figure 6), nine of which presented various levels of over-expression in MALE, whereas the remaining three in FEMALE. In order to get a deeper insight, the relative expression of five of these genes was further analyzed in female FAGs/spermathecae, male testes and male accessory glands (MAGs), before and after mating.

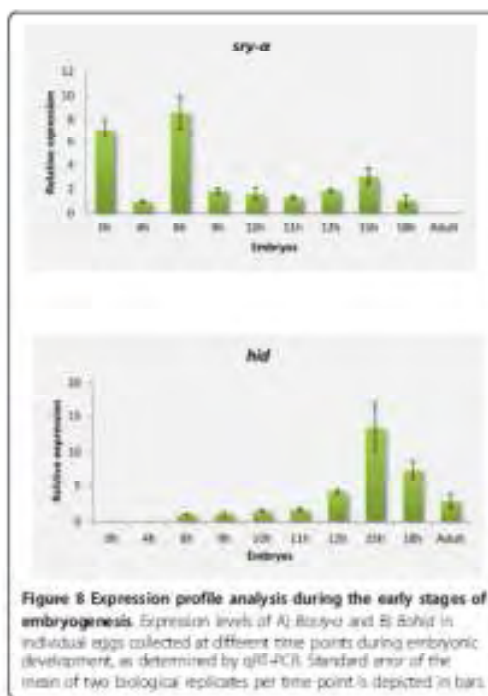
obp83a, *obp83b* and *obp19a* genes are over-expressed in MALE tissue (Figure 6). qRT-PCR revealed that these genes share the same expression pattern in MAGs. *obp83a* and *obp83b* are over-expressed before mating in testes while *obp83a* and *obp19a* are over-expressed after mating in FAGs/spermathecae (Figure 7). All three genes are characterized by a GOBP (general odorant binding protein) domain that is also found in their orthologues in *Drosophila melanogaster*. This structural domain is found in pheromone binding proteins, which exist in extracellular fluid surrounding odorant receptors [97]. The presence of these OBPs in the reproductive tissues implicates their interaction with other substrates except the olfactory system as transporters in the post-mating events in the male reproductive system. In fact, *D. melanogaster's obp83a* shows the highest levels of expression in male accessory glands [98,99] and has been associated with non-olfactory functions such as RNA transcription [100].

os-d is over-expressed in MALE tissue (Figure 6) while qRT-PCR showed similar expression patterns in mature FAGs/spermathecae, MAGs and testes, but no expression in MAGs before mating (Figure 7). Os-D is a chemosensory protein (CSP) that encodes the antennal protein 10 in *D. melanogaster*. CSPs are secreted in the sensillum lymph of insect chemosensory sensilla and some OS-D-like proteins bind short to medium chain length fatty acid derivatives with low specificity [101,102]. Their specific function remains uncertain [103], suggesting a more general physiological function relating to the transport/solubility of hydrophobic ligands in various tissues.

or10 showed expression in male tissues (Figure 6) while qRT-PCR detected same transcriptional profiles in all three tissues before and after mating (Figure 7). *or10* encodes an olfactory receptor protein and has a G-protein coupled receptor activity. The expression of ORs in testes has been reported for a number of species [90,104]. ORs' function in mammalian sperm is thought to regulate motility in response to exogenous signals derived from the existence of sperm-egg chemotaxis in invertebrates. The small peptides, speract and resact, are secreted by sea urchin eggs and attract spermatozoa in a species-specific



amounts of the transcripts among all time points examined were detected in 8h embryos. This suggests the presence of maternal mature transcripts which in turn are eliminated probably in the first event of maternal-to-zygotic transition (MZT). The subsequent wave of 'zygotic' activity requires zygotically synthesized transcripts [116]. In *D. melanogaster* as well as in *C. capitata*, *sry-α* is expressed only in the zygote [117]. However the retrieved *B. oleae* transcript shared greater amino acid similarity to the *D. melanogaster* CG8247 gene than to *sry-α*, as was also reported for the *Cary-α like* gene [118]. The orthologous CG8247 in *D. melanogaster* is characterized as a *sry-α*-like gene being also involved in cellular blastoderm formation. However, it is maternally inherited in contrast to *sry-α*, demonstrating a different mechanism of molecular control of transcription. In our case *Dorsy-α like* gene



seems to be maternally supplied in the embryos as mature transcripts. Previous studies have designated that the cellular blastoderm formation in *C. capitata* occurs within 9 h and 11 h after oviposition [115]. In accordance with *C. capitata*, a relative Tephritid species, we suggest that the cellularization process in *B. oleae* during embryogenesis also occurs at 8h, since the *sry-α* transcripts were detected at higher levels during this time.

6. Apoptotic gene expression

At the same time, *head involution defective* (*hid*), known to have a central role in apoptosis pathway, was also selected for further study. Apoptosis is a genetically controlled mechanism of cytological events that results in programmed cell death. During development, programmed cell death plays a key role by eliminating unwanted cells from a variety of tissues, such as, for example, larval tissues during insect metamorphosis (Reviewed in [119]). A series of caspases, a family of cysteine proteases, play a central role during apoptosis. Once activated, caspases can cleave more than 100 different cell target proteins, bringing about ultimately the cell death [120]. Regulators of caspase activation may either promote apoptosis (pro-apoptotic) or inhibit

apoptosis (anti-apoptotic), *Drosophila hid* belongs to a family of pro-apoptotic proteins which act as antagonists of IAPs (Inhibitor of Apoptosis Proteins), thus resulting in caspase activation and apoptosis [119,121,122]. Such pro-apoptotic genes have been used in transgenic control systems for pest insects. In tetracycline-suppressible systems for female-specific lethality and conditional embryonic expression of a *Drosophila hid*-containing transgene, for example, 100% lethality was observed in *Drosophila* [123], as well as in the Tephritid flies *Ceratitis capitata* [117] and *Anastrepha suspensa* [124].

The developmental regulation of *Bohid* was explored by determining the transcript levels during embryogenesis. A qRT-PCR approach with species-specific primers was used to evaluate the expression pattern of *hid* in embryos at 0 h, 4 h, 8 h, 9 h, 10 h, 11 h, 12 h, 15 h, 18 h after oviposition. Based on *D. melanogaster hid* expression pattern, no expression was expected in embryos prior to formation of the syncytial blastoderm [125]. Indeed, until 8h no transcripts were detected. *hid* expression was first detected at 12h and peaked during 15h (Figure 8, panel B).

It is noteworthy that most developmental programmed cell death occurs during the gastrulation process of *D. melanogaster* embryonic development [126], suggesting that the onset of this period in *B. oleae* could be defined approximately at 12h, occurring mainly within 15-18h.

However, further examination of the pro-apoptotic function of *hid* gene is required in order to explore its ability of inducing apoptosis in *B. oleae* cells. Specific lethal embryonic phenotypes need to be obtained to characterize its role in the cell-death pathway. Ongoing analysis for the isolation of the complete gene will provide the essential tools for the generation of an endogenous effective lethal effector system.

Conclusions

In serious agricultural pests (like the olive fly) which are not model experimental organisms (unlike the medfly), the major focus of most scientific research is, in the end, directed towards control of the pest. Old and new environmental concerns and sensibilities, that regard mostly insecticide use, drive science to the quest of alternative, environmentally friendlier methods of pest control. Time and again it has been shown that such methods go through thorough understanding of the biology and ecology of the target organism. Since the initial unsuccessful SIT efforts, molecular and genetic studies in the olive fly have focused on genetic analyses of natural populations, cytogenetics, isolation and characterization of genes that control important biological processes, as well as the identification and mapping of several microsatellite loci. Just a few years ago, *B. oleae* was successfully transformed, an

achievement that gave new perspective towards the efficient use of the SIT. Lately, this is being coupled with genomics studies and transcriptomics analyses of various important systems, as well as efforts in advancing olive fly mass-rearing, that are setting the ground for the application of modern control approaches through the genetic manipulation of the insect.

Methods

Ethics statement

The study was carried out on laboratory reared olive flies. No specific permissions are required for these experiments, since these studies did not involve endangered or protected species.

Fly culture and stocks

Laboratory strain

The laboratory strain of the olive fly (LAB) is part from the original stock from the Department of Biology, 'Demokritos' Nuclear Research Centre, Athens, Greece, and has been reared in our laboratory for over 15 years. The flies are reared at 25°C with a 12h light/12h dark photoperiod in 30x30x30cm³ cages, as described by [127-129].

Egg collection

For embryo analysis, eggs were collected from 10-day old mated females maintained in our laboratory, which were fed with artificial adult diet to ensure high oviposition rates and embryo viability. Adults were exposed to paraffin oviposition domes for 10 minutes and the eggs were obtained with a 0.3% propionic acid solution, assigning this as the start time point. Eggs were maintained in an incubator according to the standard rearing conditions.

RNA isolation for library preparation and functional analysis

Total RNA was isolated from female accessory glands (FAGs) and spermathecae of ~300 female flies and from testes of ~150 male flies. Four-day old sexually immature unmated insects were used. For RNA isolation, the TRIzol[®] Reagent (Ambion-Invitrogen) was used, following the instructions of the manufacturer with minor modifications. RNA extraction was followed by an additional DNA removal using the TURBO DNA-free Kit (Ambion-Invitrogen), according to manufacturer's instructions. The integrity of RNA was assessed by 1% agarose gel electrophoresis and the purity of all RNA samples was evaluated at Fleming Institute (Greece) with the use of (Agilent 2100 Bioanalyzer) and NanoDrop (2000).

Whole transcriptome library preparation for next-generation sequencing with the SOLID 4 Sequencing System

RNA transcripts from olive fly FAGs/spermathecae (FEMALE) and testes (MALE) were used to construct

two cDNA libraries for sequencing analysis on the SOLiD 4 Sequencing System. More specifically, polyadenylated RNA (polyA-RNA) was isolated from 5 µg of total RNA using the Dynabeads Oligo(dT) kit (Ambion, Life Technologies Corporation). The isolated polyA-RNA was randomly fragmented by chemical hydrolysis at 94°C for 5 minutes and was then treated with antarctic phosphatase to remove phosphate groups from the fragments' ends, followed by treatment with T4 polynucleotide kinase to add a Pi at the 5' end of each fragment. The resulting RNA fragments were hybridized and ligated to the P1 and P2 adaptor sequences specifically designed for sequencing with the SOLiD system (SOLiD Total RNA-Seq Kit, Life Technologies Corporation). The RNA produced was reverse transcribed to cDNA which was then amplified in a 15-cycle PCR. At this step, the use of different barcoded 3' PCR primers from the selection included in the SOLiD barcoding kit allowed the preparation of cDNA libraries for multiplex sequencing. From the cDNA produced, only fragments of average size 200-300 bp were selected with two rounds of magnetic bead purification (Agencourt AMPure XP Reagent, Beckman Coulter).

The quality and size of the purified cDNA library was assessed on the Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies Inc.) and with quantitative PCR using the Library Quant Kit ABI Solid (KAPA Biosystems). A multiplex library mix (500pM) was used to prepare a full-slide for analysis on the SOLiD 4 Sequencing System (Applied Biosystems) with 35+50 bp PE-chemistry.

RNA isolation and expression analysis of selected genes

RNA extraction for expression analysis of sexually differentially expressed genes. For the validation of the differential expression of sexually differentially expressed genes, RNA was extracted from two pools of 40 pairs of spermathecae/FAGs and 40 pairs of testes (two biological pool replicates), dissected from an equivalent number of female and male adult laboratory flies, respectively.

RNA extraction for expression analysis of olfactory and early embryonic developmental genes. For the validation of the olfactory genes expression, RNA was extracted from five female and five male individual insects (five biological replicates, respectively) before and after mating of the aforementioned laboratory strain. Two groups of insects were considered. Firstly, unmated insects, i.e., sexually mature 7-day old unmated insects (before mating, BM). Secondly, mated insects, i.e., sexually mature 7-day old insects that were allowed to mate on the seventh day and were dissected 12 hours after mating (after mating, AM). For the validation of the sexually differentially expressed genes, the RNA isolated for the construction of the two libraries was used. RNA was extracted using TriZol reagent according to manufacturer's protocol.

For the validation of the early embryonic genes, eggs were removed from the incubator at different time intervals throughout embryonic development and total RNA was extracted from each egg using TriZol reagent according to the manufacturer's protocol. Two individual eggs (two biological replicates) from the various time points during the embryonic developmental stages were used for the extractions.

Following extraction, the RNA was treated with 1.0 unit of DNase I (Invitrogen) according to manufacturer's instructions. In all of the above cases, the total amount of DNA-free RNA obtained from each tissue (between 400 to 700 ng) was converted into cDNA using 300ng Random hexamer primers (equimolar mix of N₂A, N₂G, N₂C and N₂T), 200 units MMLV Reverse Transcriptase (Geneon), 5X reaction buffer, 40mM dNTP mix and 40 units RNase Inhibitor (GeneOn) according to the manufacturer's instructions. Reverse transcription was conducted at 42°C for 50 min and 70°C for 15 min. The resulting cDNA was used in the subsequent qPCR reactions.

Specific primers for the amplification of selected differentially expressed genes revealed by the transcriptome analysis were designed by Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>) (Table S2). To identify sequences with homology to the genes *ory-α* and *hid*, the orthologous genes of *C. capitata* and *An. stepensi* were used as queries to search for *B. olerae* transcripts using BLASTX in the TSA Database. Species-specific Blast hits for each of the query sequences were retrieved (Genbank: GAKB01005111.1, GAKB01003654.1) and used to design primers (Table S2) for the subsequent amplification of gene-specific sequences by quantitative real-time PCR (qRT-PCR).

Relative quantitation was used to analyze changes in expression levels of the selected genes using a Real-time PCR approach. Expression values were calculated relatively to the housekeeping *rpl19* gene. *Rpl19* and *14-3-3ε* genes were used as reference in MAGs and testes while *actin3* and *α-tubulin* in FAGs/spermathecae. The qRT-PCR conditions were: polymerase activation and DNA denaturation step at 95 °C for 4 min, followed by 40 cycles of denaturation at 95 °C for 30 s, annealing/extension and plate read at 56 °C for 30 s and finally, a step of melting curve analysis at a gradual increase of temperature over the range 55 °C → 95 °C. In this step, the detection of one gene specific peak and the absence of primer dimer peaks was assured. Each reaction was performed in a total volume of 15 µl, containing 5 µl from a dilution 1:10 of the cDNA template, 1X iTaq Universal SYBR Green Supermix (Biorad, Gaithersburg, MD) and 400nM of each primer. The reactions were carried out on Bio-Rad Real-Time thermal cycler CFX96 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) and data analysed using the CFX Manager™ software. All qRT-PCRs were performed in triplicate (i.e., three technical replicates).

Bioinformatics analysis

All paired and unpaired reads of the libraries were assembled to construct the reference transcriptome using the SOAPdenovo assembler [54] with a word size of 25 nt. Annotation of the assembled sequences was obtained by comparing to the NCBI non-redundant (Nr) protein database (May 7th, 2014 version) using blasts [130] and collecting the annotations with the BLAST2GO tool [55]. TopHat [131] was used to generate a spliced alignment to the reference transcriptome. Transcripts were assembled using Cufflinks and differentially expressed genes were identified using Cuffdiff [56]. GO-term enrichment between male and female transcriptomes was analyzed using the GOSSIP [132] application embedded in BLAST2GO.

Availability of supporting data

The data sets supporting the results of this article are included within the article and its additional files. Additional File 1, Additional File 2, Additional File 3 and Additional File 4

Additional material

Additional File 1:

Additional File 1:

Additional File 1:

Additional File 1:

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

ES was involved in the transcriptome library construction and performed the analysis of the sex-determination genes. MK performed the bioinformatics analysis of the transcriptome. VV constructed the transcriptome libraries and analyzed the sequencing data. KTT and ANM analyzed the embryonic and apoptotic genes. NGS, ST and KA analyzed the olfactory genes. IR directed the bioinformatics analysis. KDM designed and coordinated the study. All authors participated in drafting the manuscript and read and approved the final document.

Acknowledgements

This research has been co-financed by the Action "Research II and "ARISTEA" (NSRF - SRF) of the "Operational programme Education and Life-Long Learning", co-funded by the European Social Fund and Greek National Resources, and the two postgraduate programs of the Department of Biochemistry and Biotechnology of the University of Thessaly ("Biotechnology - Nutrition and Environment" and "Molecular Biology and Genetics applications"). Special acknowledgements should also go to the Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture for their support in the organization of a Coordinated Research Project on "Development and evaluation of imported strains of insect pests for SIT. This article has been published as part of *BMC Genetics* Volume 15 Supplement 2, 2014: Development and evaluation of imported strains of insect pests for SIT. The full contents of the supplement are available online at <http://www.biomedcentral.com/bmcgenet/supplements/S52>. Publication of this supplement was funded by the International Atomic Energy Agency. The peer review process for articles published in this supplement was overseen by the Supplement Editors in accordance with

BioMed Central's peer review guidelines for supplements. The Supplement Editors declare that they have no competing interests.

Authors' details

¹Department of Biochemistry and Biotechnology, University of Thessaly, Larissa, Greece; ²Institute of Molecular Biology and Genetics, Biomedical Sciences Research Centre "Alexander Fleming", Greece

Published: 1 December 2014

References

1. Theophrastus: Enquiry into plants (History of plants HPL I & E HORR, A. F., translator). London: Cambridge & Massachusetts: 1916. In ancient Greek with English translation.
2. Diare KM, Johnson MW: Olive fruit fly: managing an ancient pest in modern times. *Ann Rev Entomol* 2010, **55**:51-69.
3. Pimentel D: Ecological Effects of Pesticides on Non-target Species. Washington, DC: Executive Office of the President, Office of Science and Technology; 1971, 220.
4. Baumhoer A, Gubert A, Bittor B, Hopper D, New W, Durbuyard T, Kuhlhard C: Screwworm control through release of sterilized flies. *J Econ Entomol* 1995, **48**:42-46.
5. Angling E: Possibilities of insect control or eradication through the use of sexually sterile males. *J Econ Entomol* 1965, **49**:442.
6. Greek Ministry of Agriculture: Description of research organization for the control of the olive fruit fly. 1961, 31. In Greek.
7. Economopoulos A, Arani N, Zervas G, Tzavali J, Haniotaki G, Tzavali G, Manoukio A: Control of the olive fly, *Dacus oleae* (Gmelin), by the combined effects of insecticides and release of gamma sterilized insects. *J Appl Entomol* 1970, **20**:215.
8. Economopoulos AP, Haniotaki GE, Mathioudis J, Mani N, Angling P: Long-distance flight of wild and artificially-reared *Dacus oleae* (Diptera: Tephritidae). *Z Angew Entomol* 1970, **10**:1-10.
9. Economopoulos A, Zervas G: The quality problem in olive flies produced for SIT experiments. *MSR* 57:918 1982.
10. Economopoulos A: The olive fruit fly, *Bactrocera* (*Dacus*) *oleae* (Gmelin) (Diptera: Tephritidae): its importance and control: previous SIT research and pilot testing. In: *IT* Energy Agency, Vienna, Austria 2002.
11. Zervas GA, Economopoulos AP: Mating frequency in caged populations of wild and artificially reared (normal or systemized) olive fruit flies. *Environ Entomol* 1982, **11**:20.
12. Likier M, Economopoulos AP, Zervas G, Vergil Y: Genetic changes in artificially reared colonies of the olive fruit fly. *Ann Ent Soc Amer* 1985, **109**:186.
13. Economopoulos A, Likier M: ADH allele frequency changes in olive fruit flies (Hymenoptera: Diptera) from olives to artificial larval food and vice versa: effect of temperature. *Entomol Exp Appl* 1986, **215**:221.
14. Economopoulos A: Sexual competitiveness of gamma-ray sterilized males of *Dacus oleae*. Mating frequency of artificially reared and wild females. *Entomol* 1973, **410**:497.
15. Caputo C, Berao G, Muzzon L, Squarini A, Girotto V: "Candidatus *Erwinia dacicola*", a convolved symbiotic bacterium of the olive fly *Bactrocera oleae* (Gmelin). *Int J Syst Evol Microbiol* 2006, **55**(Pt 4):1641-7.
16. Sacchetti P, Grancharov A, Landini E, Witt C, Giovannetti L, Benati A: Relationships between the olive fly and bacteria. *J Appl Entomol* 2004, **132**(6):889.
17. Eides AM, Hiram DL, Branstetter JL, Plerson DA: The olive fly endosymbiont, "Candidatus *Erwinia dacicola*," switches from an intracellular existence to an extracellular existence during host insect development. *Appl Environ Microbiol* 2008, **75**:2099-106.
18. Ben-Israel M, Alonim Y, Julevitch E, Fuzat D: Give us the tools and we will do the job: symbiotic bacteria affect olive fly fitness in a diet-dependent fashion. *Proc Biol Sci* 2010, **277**:145-51.
19. Kourtellos I, Crato T, Sapountzis P, Saitis I, Razi A, Chousalis B, Bardi C, Alimi A, Delfinoche D, Mavragani-Tsagrou P, Bourtis K: *Acetobacter tropicalis* is a major symbiont of the olive fruit fly (*Bactrocera oleae*). *Appl Environ Microbiol* 2009, **75**:2281-6.
20. Acylopinos JA, Stratikopoulos EE, Zachariopoulou A, Vlachopoulos KD: Polymorphic microsatellite markers in the olive fly, *Bactrocera oleae*. *Mol Ecol Notes* 2002, **2**:276-280.
21. Nardi F, Caporali A, Della R, Trati T: The mitochondrial genome of the olive fly *Bactrocera oleae*: two haplotypes from distant geographical locations. *PLoS ONE* 2008, **3**:2825-31.

32. Augustinos AA, Marmas Z, Stratiopoulos ET, D'Amerio S, Zachariopoulos A, Mithopoulos KD: **Microsatellite analysis of olive fly populations in the Mediterranean indicates a westward expansion of the species.** *Genetics* 2005, **125**:331-41.
33. Nardi F, Catagosti A, Dalla R, Radenich G, Fusi F: **Population structure and colonization history of the olive fly *Bactrocera oleae* (Diptera, Tephritidae).** *Mol Biol Evol* 2005, **14**:3779-88.
34. Nardi F, Catagosti A, Bocce B, Radenich G, Dalla R, Fusi F: **Domestication of olive fly through a multi-regional host shift to cultivated olives: comparative dating using complete mitochondrial genomes.** *Mol Phylogenet Evol* 2010, **57**:678-86.
35. Zygouridis NE, Augustinos AA, Zalon FG, Mithopoulos KD: **Analysis of olive fly invasion in California based on microsatellite markers.** *Hereditas (Göteborg)* 2008, **132**:423-32.
36. Dogan E, Radenich G, Taktik V: **The genetic polymorphisms and colonization process of olive fly population in Turkey.** *PLoS One* 2013, **8**:e64867.
37. Mavragani-Tsipidou P: **Genetic and cytogenetic analysis of the olive fruit fly *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae).** *Genetics* 2002, **160**:45-57.
38. Mavragani-Tsipidou P, Karantakidou S, Zachariopoulos A, Kofani S, Kaitiraki C: **Mitotic and polytene chromosome analysis in *Dacus oleae* (Diptera: Tephritidae).** *Genome* 1992, **35**:371-8.
39. Zamvontas A, Karamous N, Mavragani-Tsipidou P: **Cytogenetic analysis of Malpighian tubule and salivary gland polytene chromosomes of *Bactrocera oleae* (Dacus oleae) (Diptera: Tephritidae).** *Genome* 1995, **38**:1070-81.
40. Drosopoulou E, Christopoulou A, Nikita N, Mavragani-Tsipidou P: **The heat shock 70 genes of the olive pest *Bactrocera oleae*: genomic organization and molecular characterization of a transcription unit and its proximal promoter region.** *Genome* 2008, **52**:710-4.
41. Drosopoulou E, Nikita N, Sotiriou J, Kallabouki S, Marmas Z, Mavragani-Tsipidou P: **Sex chromosomes and associated rDNA form a heterochromatic network in the polytene nuclei of *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae).** *Genetics* 2012, **140**:169-81.
42. Vontas JG, Hapali M, Havelis N, Corradi R, Louka M, Heringway J, Jones JW: **Resistance-associated point mutations of organophosphate insensitive acetylcholinesterase in the olive fruit fly *Bactrocera oleae*.** *Insect Mol Biol Evol* 2002, **15**:329-336. April.
43. Vontas J, Iliou C, Koutas AC, Danel JP, Kallabouki FC, Louka C, Heringway J, Christopoulou G, Raman H: **Gene expression in insecticide resistant and susceptible *Anopheles gambiae* strains constitutively or after insecticide exposure.** *Insect Mol Biol Evol* 2005, **14**:509-21.
44. Kalkan EG, Mithopoulos KD: **Organophosphorus resistance-related mutations in the acetylcholinesterase gene of Tephritidae.** *J Appl Entomol* 2008, **132**:762-771.
45. Kalkan EG, Sun S, Maboouli J, Mithopoulos KD: **Altered GPR modification of insect AChE improves tolerance to organophosphate insecticides.** *Insect Biochem Mol Biol* 2011, **41**:520-8.
46. Khila A, El Hadidi A, Vincent A, Payne R, Souda B: **The dual function of overabundance in geminiviruses and epidermal differentiation is conserved between *Drosophila melanogaster* and the olive fruit fly *Bactrocera oleae*.** *Insect Biochem Mol Biol* 2011, **33**:97-9.
47. Berra P, Tzavara N, Brogna S, Thaler G, Savino C: **Acquisition of a potential marker for insect transformation: isolation of a novel alcohol dehydrogenase gene from *Bactrocera oleae* by functional complementation in yeast.** *Mol Gen Genet* 2000, **263**:95-5.
48. Legn J, Ruiz MP, Sánchez I, Nontopoulos K: **Isolation and characterization of the *Bactrocera oleae* genes orthologous to the sex determining Sex-lethal and doublesex genes of *Drosophila melanogaster*.** *Genet* 2005, **348**:111-21.
49. Lagos D, Kallabouki M, Savino C, Nontopoulos K: **The transformer gene in *Bactrocera oleae*: the genetic switch that determines its sex fate.** *Insect Mol Biol Evol* 2007, **16**:221-30.
40. Tzavara N, Mithopoulos KD: **Genome size estimation with quantitative real time PCR in two Tephritidae species: *Cañadilla capitata* and *Bactrocera oleae*.** *J Appl Entomol* 2012, **136**:293-301.
41. Tzavara N, Drosopoulou E, Mavragani-Tsipidou P, Mithopoulos KD: **Molecular characterization and chromosomal distribution of a species-specific transcribed centromeric satellite repeat from the olive fruit fly *Bactrocera oleae*.** *PLoS One* 2013, **8**:70393.
42. Tzavara N, Augustinos AA, Kalkan EG, Drosopoulou E, Mavragani-Tsipidou P, Mithopoulos KD: **Isolation, annotation and applications of expressed sequence tags from the olive fly, *Bactrocera oleae*.** *Mol Genet Genomics* 2011, **285**:33-45.
43. Pavlid N, Diemane W, Borbachi S, Christopoulou A, Van Lanouen T, Vontas J: **Analysis of the Olive Fruit Fly *Bactrocera oleae* Transcriptome and Phylogenetic Classification of the Major Detoxification Gene Families.** *PLoS One* 2013, **8**:69533.
44. Kallabouki M, Kalkan A, Kallabouki C, Zygouridis N, Tzavara N, Drosopoulou E, Savino C: **Gene line transformation of the olive fly *Bactrocera oleae* using a versatile transposon marker.** *Insect Mol Biol Evol* 2006, **15**:95-100.
45. Ann T, Kallabouki M, Remouziou P, Gong H, Drosopoulou A, Vontas J, Alfrey L: **Control of the olive fruit fly using genetics-enhanced sterile insect technique.** *BMC Biol* 2012, **10**:57.
46. Apostolaki A, Drosopoulou E, Tsatsaki A, Christopoulou A, Savino C, Bouras S: **Transfection of the olive fruit fly *Bactrocera oleae* with Wolbachia: towards a symbiont-based population control strategy.** *J Appl Entomol* 2011, **135**:546-553.
47. Eides AM, Hearn DJ, Burtak H, Remouziou P, Pearson GA: **Prevalence of *Candidatus Erwinia dacicola* in wild and laboratory olive fruit fly populations and across developmental stages.** *Insect Molecular Biol Evol* 2012, **41**:265-74.
48. Alfrey L, Anderson M: **Dominant lethality and insect population control.** *Mol Biotechnol Patents* 2002, **12**:173-8.
49. Alfrey L, Reed C, Ben, Mingsley R, Crowe M, Chant A, Conti C, Eggerton P, Gorbias C, Hemingway J, Jaldin-Lima M, James AA, Kallabouki FC, Malawa LD, Paton M, Powell JI, Schneider W, Scott TW, Siva B, Sinden R, Sinks S, Spielman A, Tounsi V, Collins FH: **Maleia control with genetically manipulated insect vectors.** *Science* 2000, **288**:119-21.
50. Heringway J, Scott M: **A recessible female-specific lethal genetic system for making transgenic insect strains suitable for a sterile release program.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2000, **97**:8205-12.
51. Thomas DJ, Donnelly CA, Wood RJ, Alfrey LS: **Insect population control using a dominant, recessible, lethal genetic system.** *Science* 2001, **292**:474-6.
52. Gong P, Brien AG, Fu Q, Smith E, Hickey A, Gordon HC, Gordon GC, Morrison N, Kelly DW, Dalishta T, Coleman RG, Alfrey L: **A dominant lethal genetic system for autocidal control of the Mediterranean fruit fly.** *Nat Biotechnol* 2005, **23**:452-6.
53. Sagri E, Reckl M, Gergoris ME, Tzavara N, Zygouridis NE, Sages KD, Zalon FG, Rapanos J, Mithopoulos KD: **Olive fly transcriptomic analysis implicates energy metabolism genes in spinous resistance.** *BMC Genomics* 2014, **15**:714.
54. Li J, Zhu H, Ruan J, Qin W, Tang X, Shi Z, Li Y, Li S, Shan J, Kristiansen K, Li S, Yang H, Wang J, Wang J: **De novo assembly of human genomes with massively parallel short read sequencing.** *Genome Res* 2010, **20**:265-72.
55. Goto S, Garcia-Gomez JM, Terzi J, Williams TD, Nagayama M, Nucle H, Rothel M, Tatin M, Dogruoğlu I, Conesa A: **High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite.** *Nucleic Acid Res* 2008, **36**:3485-92.
56. Trapnell C, Williams BA, Steirer G, Mortazavi A, Wang L, van Benne ML, Salzberg SL, Wold BJ, Pachter L: **Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation.** *Nat Biotechnol* 2010, **28**:511-5.
57. Domaritskaya E V, Liu H, Chen S, Adali E: **The hydroxyproline motif of male sex peptide elicits the innate immune response in *Drosophila* females.** *PLoS J Biol* 2007, **2745**:659-68.
58. McQuinn LA, Clark AG, Wolfner MF: **Postmating gene expression profiles of female *Drosophila melanogaster* in response to time and to four male accessory gland proteins.** *Genetics* 2008, **179**:1385-408.
59. Harty RW, Tokuyasu KT, Lindley DL: **Analysis of spermatogenesis in *Drosophila melanogaster* bearing deletions for Y-chromosome fertility genes.** *Chromosoma* 1983, **83**:593-607.
60. Wilson JB: **Oocyte family of vector proteins: present status and future questions.** *Cell Mol Cell Biophys* 1995, **32**:136-44.
61. Goldstein LS, Harty RW, Lindley DL: **Structural genes on the Y chromosome of *Drosophila melanogaster*.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1982, **79**:7485-9.

62. Geppert J, Hagi TS: A fertility region on the Y chromosome of *Drosophila melanogaster* encodes a dynein microtubule motor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993, **90**:11133-6.
63. Koerich LB, Wang X, Cullis AG, Cavalli AB: Low conservation of gene content in the *Drosophila* Y chromosome. *Nature* 2008, **455**:49-51.
64. Cavalli AB, Lazzaro BF, Cullis AG: Y chromosomal fertility factors M-2 and M-3 of *Drosophila melanogaster* encode dynein heavy chain polypeptides. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003, **100**:13239-44.
65. Kimble J, Edgar L, Hall D: Specification of male development in *Caenorhabditis elegans*: the *fen* genes. *Dev Biol* 1994, **165**:234-9.
66. Donath T, Hodgkin J: A sex-determining gene, *fen-1*, required for both male and hermaphrodite development in *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* 1994, **166**:219-35.
67. Spruce AM, Coulson A, Hodgkin J: The product of *fen-1*, a nematode sex-determining gene, contains a motif found in cell cycle control proteins and receptors for cell-cell interactions. *Cell* 1993, **60**:931-40.
68. flybase. [http://www.flybase.org]
69. Yeh SQ, Chen Y, Chang AC, Ray R, She BS, Luo WS, Chang HS, Cohen SH, Lin Chai S: Isolation and properties of *Ga8b*, a growth arrest-specific gene regulated during male gametogenesis to produce a protein associated with the sperm motility apparatus. *J Biol Chem* 2002, **277**:6311-7.
70. Yang Y, Cochran DA, Gargano MC, King J, Senhat NC, Burger BP, Schreiner KE, Hsu Y, Awata J, Pany DAD, Marfat WF, Wilson GB, Lu X: Regulation of flagellar motility by the conserved flagellar protein CG34010/Cod3/STAP50. *Mol Biol Cell* 2011, **22**:575-67.
71. Garrett-Engle CA, Singh AE, Marati D, Williams BC, Li H, Baker BS: *Intersex*, a gene required for female sexual development in *Drosophila*, is expressed in both sexes and functions together with *doublesex* to regulate terminal differentiation. *Development* 2002, **129**:4667-75.
72. Gubbay L, Collipson J, Koopman P, Capel B, Economou A, Minarybeg A, Wylie N, Goodfellow P, Lovell-Badge R: A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. *Nature* 1991, **349**:246-50.
73. Wilson MI, Dearden PE: Evolution of the insect *Sex* genes. *BMC Evol Biol* 2008, **8**:120.
74. Coimbra P, Rapp R, Grand P: Sex neurons, a new *Drosophila* *Sex* gene expressed in the developing central nervous system. *Mech Dev* 2000, **93**:215-8.
75. Prokopchuk SA, Brumby A, Chavakis L, Pitor J, He Y, Samt S, Berlin H: A putative exchange factor for RhoG GTPase is required for initiation of cytokinesis in *Drosophila*. *Genes Dev* 1999, **13**:2301-14.
76. Ohnishi I, Somers WG, Harley A, Sara R: The pebble GTP exchange factor and the control of cytokinesis. *Cell Struct Funct* 2001, **26**:19-26.
77. Khurana R, Kishi T: A protein sequestering system reveals control of cellular programs by the transcriptional coactivator HCF-1. *J Biol Chem* 2004, **279**:13675-83.
78. Talbo G, Hagiup P, Ruffek Nelson H, Andersen SQ, Stepputat H: Determination of the covalent structure of an N- and C-terminally blocked glycoprotein from endocytosis of *Lucania migratoria*. Combined use of plasma desorption mass spectrometry and Edman degradation to study post-translationally modified proteins. *Eur J Biochem* 1991, **195**:485-504.
79. Pondroule E, Naria A, Jacques JC, Beaugoux C, Dauphin-Villmann C: *Arthropus gambiae* males produce and transfer the vitellogenic steroid hormone 20-hydroxyecdysone to females during mating. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006, **103**:19611-6.
80. Doobri J, Fratzson D, Trizovic JN: The pupal cuticle of *Drosophila*: biphasic synthesis of pupal cuticle proteins in vivo and in vitro in response to 20-hydroxyecdysone. *J Cell Biol* 1985, **107**:189-200.
81. Liu WS: Odorant receptor in insects: roles of receptors, binding proteins, and degrading enzymes. *Annu Rev Physiol* 2013, **58**:173-91.
82. Pelosi P, Maida R: Odorant-binding proteins in insects. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 1995, **113**:503-14.
83. Vagstad LB, Hansson BS: A unified nomenclature system for the insect olfactory co-receptor. *Chem Senses* 2011, **36**:497-8.
84. Vanderhaeghen P, Schumacher T, Vassart R, Ramstein M: Olfactory receptors are displayed on dog mature sperm cells. *J Cell Biol* 1993, **123**(6 Pt 2):1441-52.
85. Vanderhaeghen P, Schumacher S, Vassart R, Ramstein M: Specific repertoire of olfactory receptor genes in the male germ cells of several mammalian species. *Genomics* 1997, **39**:219-46.
86. Kang H, Kim J: Olfactory receptors in two chemosensory tissues. *BMB Rep* 2013, **45**:612-22.
87. Spehr M, Guzman-G, Replawski A, Bittel JA, Vagstad LB, Zinner BK, Hart H: Identification of a testicular odorant receptor mediating human sperm chemotaxis. *Science* 2001, **290**:2054-8.
88. Spehr M, Schwane K, Heilmann E, Gohlmann G, Hummel T, Hart H: Dual capacity of a human olfactory receptor. *Chem Biol* 2004, **14**:R82-5.
89. Spehr M, Schwane K, Bittel JA, Zinner BK, Hart H: Odorant receptors and olfactory-like signaling mechanisms in mammalian sperm. *Mol Cell Endocrinol* 2006, **250**:125-36.
90. Fukuda N, Yamaguchi K, Ohida M, Tsubasa K: Functional characterization of a mouse testicular olfactory receptor and its role in chemotaxis and in regulation of sperm motility. *J Cell Sci* 2004, **117**(Pt 24):5825-40.
91. Welteig T, Bittel JB, Welteig S, Naccamento JM, Tiller A, Chandrasekharaswamy C, Schwane K, Germs A, Wunder F, Bertsch MW, Neuhoff DW, Zinner BK, Spehr M, Hart H: Chemosensory Ca²⁺ dynamics correlate with diverse behavioral phenotypes in human sperm. *J Biol Chem* 2011, **286**:17311-25.
92. Pitts RL, Liu C, Zhou X, Marzetta JC, Zwickel LJ: Odorant receptor-mediated sperm activation in disease vector mosquitoes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004, **101**:2566-71.
93. Parani GC, Hagg GM: The B proteins secreted by the tubular accessory sex glands of the male mealworm beetle, *Tenebrio molitor*, have sequence similarity to moth pheromone-binding proteins. *Insect Biochem Mol Biol* 1996, **25**:401-8.
94. Thymianou S, Navechts A, Kokolaki G, Korthopoulou G, Zacharopoulou A, Minkin AC: Cloning and characterization of a cDNA encoding a male-specific protein of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*, with sequence similarity to odorant-binding proteins. *Insect Mol Biol* 1998, **7**:345-51.
95. Pava Gilva GO, Goggin MH, Benediti CE, Manogian E, Almeida IC, Machado EA, Datta-Premdas M, Neto-Palencia G, Law JH, Oliveira PL, Maccato H: On the biosynthesis of *Rhodnius prolixus* hemebinding protein. *Insect Biochem Mol Biol* 2002, **32**:153-61.
96. Furrer T, Muesel R: Function and evolution of a gene family encoding odorant binding-like proteins in a social insect, the honey bee (*Apis mellifera*). *Genome Res* 2006, **16**:1434-43.
97. Vogt RG, Pineda JG, Lemm AM: Odorant-binding protein subfamilies associate with distinct classes of olfactory receptor neurons in insects. *J Neurobiol* 1991, **22**:74-84.
98. Aya GH, Vetter AJ, Wang P, Magwire AM, Nelson H, Mackay TF, Arnold AP: Natural variation, functional pleiotropy and transcriptional context of odorant binding protein genes in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 2010, **186**:1475-85.
99. Zhou S, Stone JA, Mackay TF, Arnold AP: Plasticity of the chemoreceptor repertoire in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Genet* 2009, **5**:e1000661.
100. Hoch D, Filippov VA, Schral F, Filippov NA: Serotonergic an insect neurohormonal factor affecting RNA transcription. *Neuroendocrinol J Zool* 1995.
101. Nagrain-Le Mellour P, Cahn AH, Jacquin-Joly E, François MC, Renardaudon S, Maizé R, Steinbrecht RA: Chemosensory proteins from the proboscis of *Manisota brasiliensis*. *Chem Senses* 2000, **25**:541-51.
102. Jacquin-Joly E, Vogt RG, François MC, Nagrain-Le Mellour P: Functional and expression pattern analysis of chemosensory proteins expressed in antennae and pheromonal gland of *Manisota brasiliensis*. *Chem Senses* 2001, **26**:333-44.
103. Warner KW, Wells JG, Theilmann DA, Issan MB, Feng G, Pickett D: Analysis of the insect co-receptor gene family. *J Chem Ecol* 2004, **30**:629-41.
104. Watersly JD, Rust M, Bacon RE, Backshaw S, Bennett G.V, Snyder SH: Two novel odorant receptor families expressed in spermatids undergo 3'-splicing. *J Biol Chem* 1998, **273**:8378-83.
105. Suzuki N, Gohmori T: Stimulation of sperm respiration rates by sperm and insect at alkaline extracellular pH. *Biol Reprod* 1984, **30**:1167-74.
106. Ramstein M, Lopez F, Schumacher S, Schiffrino S, Lopez A, Eggenschlo J, Lopez C, Mollema C, Giesel C, Perez J, et al: Expression of members of the putative olfactory receptor gene family in mammalian germ cells. *Nature* 1992, **355**:613-5.
107. Ogasawara CE, Schellig ME, Wimmer EA: Transgenic sexing system for *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) based on female-specific embryonic lethality. *Insect Biochem Mol Biol* 2013, **43**:1-8.
108. Hostler G: Embryonic development of the olive fruit fly, *Bactrocera oleae* Rossi (Diptera: Tephritidae), in vivo. *Turk J Zool* 2014.

109. Schwengler F, Lepoint JA, Vincent A: The serendipity alpha gene encodes a membrane-associated protein required for the cellularization of the *Drosophila* embryo. *Genes Dev* 1990, **4**:102-11.
110. Bristow S, Schwengler F, de Billy G, Vincent A: Relationship between expression of serendipity alpha and cellularization of the *Drosophila* embryo is revealed by interspecific transformation. *Development* 1993, **119**:471-80.
111. Schindl RJ, Tautz G: A screen for fast evolving genes from *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997, **94**:9749-50.
112. Holt RA, Subramanian GM, Hapelen A, Sutton GG, Charab R, Nuzden GR, Winkler P, Clark AG, Ribeiro JM, Wiles R, Salzberg SL, Lohus B, Yandell M, Majumder WH, Rush DB, Li Z, Klafki CL, Abuli F, Anthouard V, Arensburg P, Atkinson PM, Baden H, de Barandino V, Bédaride D, Bonet V, Borden J, Blau C, Bolanos R, Bostic D, Branstetter M, et al: The genome sequence of the malarial mosquito *Anopheles gambiae*. *Science* 2002, **298**:129-43.
113. Jiu Z, Lopez DJ, Kanost MF, Evans JD, Sang H: Comparative analysis of serine protease-related genes in the honey bee genome: possible involvement in embryonic development and innate immunity. *Insect Mol Biol* 2006, **15**:823-34.
114. Haugan M, Flannery E, Torshansky M, Mot A, Behnia SK, Severson DW, Durkin-Schell M: *Semaphorin-1a* is required for *Aedes aegypti* embryonic nerve cord development. *PLoS One* 2011, **6**:e21694.
115. Schwaiblmair MF, Horn C, Handler AM, Wimmer EA: Development of an Embryonic Lethality System in Mediterranean Fruit Fly *Ceratitis capitata*. In *Area-Wide Control Insect Pest Mgt* Weyers AS, Robinson J, Hendrichs J, 2007, 85-93.
116. Tachibana W, Lipshitz HD: The maternal-to-zygotic transition: a play in two acts. *Development* 2009, **136**:3033-42.
117. Schwaiblmair MF, Cáceres C, Zacharopoulou A, Franz G, Wimmer EA: Conditional embryonic lethality to improve the sterile insect technique in *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *BMC Biol* 2008, **7**:4.
118. Gabriel P, Gornalski LM, Bonomi A, Scobbio P, Scoble F, Franz G, Stroup A, Malacrida MR, Gasperi G: Interchromosomal duplications on the *Bactrocera oleae* Y chromosome imply a distinct evolutionary origin of the sex chromosomes compared to *Drosophila*. *PLoS One* 2011, **6**:e17247.
119. Bialek A, Su TT: Regulation of *Drosophila melanogaster* pro-apoptotic gene *hid*. *Apoptosis* 2001, **14**:943-9.
120. Nimpitch-T, White K: Apoptosis in *Drosophila*: neither fish nor fowl (hor man, nor worm). *J Cell Sci* 2005, **118**(Pt 9):1779-87.
121. Hay BA, Guo M: Caspase-dependent cell death in *Drosophila*. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2006, **22**:673-93.
122. Steller H: Regulation of apoptosis in *Drosophila*. *Cell Death Differ* 2006, **15**:132-8.
123. Horn C, Wimmer EA: A transgene-based, embryo-specific lethality system for insect pest management. *Int J Biocontrol* 2003, **25**:54-70.
124. Schwaiblmair MF, Nimpitch A, Handler AM: Pro-apoptotic cell death genes, *hid* and *reaper*, from the tephritid pest species, *Anastrepha suspensa*. *Apoptosis* 2011, **16**:759-68.
125. Grether ME, Abrams JM, Apatow J, White K, Steller H: The head involution defective gene of *Drosophila melanogaster* functions in programmed cell death. *Genes Dev* 1995, **9**:1694-103.
126. Abrams JM, White K, Finkbeiner S, Steller H: Programmed cell death during *Drosophila* embryogenesis. *Development* 1993, **117**:29-42.
127. ME Economopoulos A, Tsiolipi J: The importance of conditions during the adult stage in evaluating an artificial food for larvae of *Dacus oleae* (Gmel.) (Diptera, Tephritidae). *J Appl Entomol* 1957, **59**:127-130.
128. Tsiolipi J: Development of a caging and eggng system for mass rearing the olive fruit fly, *Dacus oleae* (Gmel.) (Diptera, Tephritidae). *Ann Zool Entomol* 1977, **9**:133-139.
129. Tsiolipi JA, Kostas A: Improved solid adult diet for the olive fruit fly *Dacus oleae*. *Entomol Hell* 1993, **1**:24-29.
130. Camacho C, Coullouris G, Avagyan V, Ma N, Papadopoulos J, Soller K, Mjølner T: BLAST: architecture and applications. *BMC Bioinformatics* 2009, **10**:421.
131. Trapnell C, Pachter L, Salzberg SL: Tophat: discovering splice junctions with RNA-Seq. *Bioinformatics* 2009, **25**:105-13.
132. Sultang N, Bond K, Capone B, Swat M, Herzel H, Seiler D: Biological profiling of gene groups utilizing Gene Ontology. *Genome Inform* 2005, **16**:106-15.

doi:10.1186/1471-2156-15-S2-S8

Cite this article as: Sagri et al.: The molecular biology of the olive fly comes of age. *BMC Genetics* 2014, **15**(Suppl 2):S8.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit

