



Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας  
Σχολή Επιστημών Υγείας  
Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας

Λειτουργική ανάλυση οσφρητικών  
γονιδίων με πιθανή συμμετοχή στην  
αναγνώριση φερομονών στο δάκο της  
ελιάς



**ΔΙΑΚΟΡΩΝΑ ΑΡΧΟΝΤΙΑ**

**Λάρισα, Οκτώβριος 2015**

## **Θέμα Διπλωματικής Εργασίας:**

Λειτουργική ανάλυση οσφρητικών γονιδίων με πιθανή συμμετοχή στην αναγνώριση φερομονών στο δάκο της ελιάς

Functional analysis of olfactory genes possibly implicated in the pheromone recognition of the olive fruit fly

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας & Γονιδιωματικής του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, το διάστημα Φεβρουαρίου 2015 - Σεπτεμβρίου 2015 υπό την επίβλεψη του κυρίου Ματθιόπουλου Κ., Καθηγητή Μοριακής Βιολογίας και της κυρίας Τσουμάνη Κ..

### **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

**Μαθιόπουλος Κωνσταντίνος:** Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας

**Τσουμάνη Κωνσταντίνα:** Δρ Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστημιακή υπότροφος ανάθεσης διδακτικού έργου

**Καρπούζας Δημήτριος:** Αναπληρωτής Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

---

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Κωνσταντίνο Ματθιόπουλο, που μου έδωσε την ευκαιρία να εκπονήσω τη διπλωματική μου εργασία στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας & Γονιδιωματικής του τμήματός μας. Με την παρουσία του ενθάρρυνε το έργο μας και συνέβαλε στην οργάνωση της ομάδας και στην επίλυση τυχόν προβλημάτων. Πάντα καλοδιάθετος και πρόθυμος να μεταδώσει, όχι μόνο σε μένα αλλά σε όλα τα άτομα του εργαστηρίου, τις γνώσεις του επί του αντικειμένου εργασίας.

Ένα τεράστιο ευχαριστώ στη δρ. Κωνσταντίνα Τσουμάνη, η οποία ήταν υπεύθυνη της πτυχιακής μου εργασίας. Με την αποφασιστικότητα και την ετοιμότητα που την διακατέχουν συνέβαλλε τα μέγιστα στην ομαλή διεξαγωγή της πειραματικής διαδικασίας της διπλωματικής μου. Ευφυής, ετοιμόλογη και δραστήρια, με βοήθησε να απομυζήσω γνώσεις από την ίδια και να διευρύνω τους πνευματικούς μου ορίζοντες και τον τρόπο σκέψης μου. Ήταν καθημερινά παρούσα και οργάνωνε τη δουλειά μου, ενώ αυτό για το οποίο την ευχαριστώ ιδιαίτερα είναι το γεγονός ότι με εμπιστεύτηκε από την πρώτη κιόλας στιγμή, κυρίως στο πειραματικό μέρος όσο και στην ενεργό συμμετοχή μου στα του εργαστηρίου.

Πολύ μεγάλο ευχαριστώ θέλω να πω και στον Μπελαβίλα Αλέξανδρο, μεταπτυχιακό φοιτητή στο εργαστήριο. Από την πρώτη στιγμή με βοήθησε απίστευτα πολύ, όχι μόνο να εξοικειωθώ με το χώρο αλλά και να κατανοήσω τις μεθόδους εργασίας. Μου μετέδωσε το δικό του τρόπο σκέψης και αντίληψης των πραγμάτων και με την παρουσία του ενθάρρυνε το έργο μου. Χωρίς εκείνον τα πράγματα θα ήταν διαφορετικά!

Τέλος ευχαριστώ όλα τα παιδιά του εργαστηρίου, που με υποδέχτηκαν εξ' αρχής θερμά στο χώρο εργασίας τους, πάντα μου έλυναν τις απορίες και με έμαθαν πώς να είμαι συνεργατική και να σέβομαι τους συναδέλφους μου.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

---

Ο δάκος της ελιάς, *Bactrocera oleae*, λόγω της παρασιτικής του δράσης στα προϊόντα των ελαιοκαλλιεργειών συγκαταλέγεται στα έντομα μεγάλης οικονομικής σημασίας. Η αντιμετώπισή του βασίζεται σχεδόν αποκλειστικά στη χρήση χημικών εντομοκτόνων, καθιστώντας πλέον αναγκαίο το σχεδιασμό νέων εναλλακτικών, φιλικών προς το περιβάλλον μεθόδων βιολογικού ελέγχου. Η αποτελεσματικότητα τέτοιων μέσων καταπολέμησης μπορεί να βελτιωθεί καθοριστικά εστιάζοντας σε νέους μοριακούς στόχους που οδηγούν στην αποτροπή της σύζευξης και συνεπώς στη διακοπή της αναπαραγωγικής διαδικασίας του εντόμου. Η μελέτη του οσφρητικού συστήματος μπορεί να συνεισφέρει στην ανάδειξη τέτοιων στόχων εφόσον τόσο η επιβίωση (εντοπισμός τροφής), όσο και η αναπαραγωγή του (αναγνώριση συντρόφου και ωοαπόθεση) εξαρτώνται από οσφρητικά ερεθίσματα. Επομένως, κατανοώντας και ελέγχοντας την οσφρητική ικανότητα του εντόμου θα μπορούμε να ελέγξουμε και τη συμπεριφορά του, αποσκοπώντας στη μείωση των πληθυσμών του.

Στην παρούσα μελέτη εξετάζονται τα γονίδια *SNMPI* και *PBP5*, τα οποία ταυτοποιήθηκαν μέσω RNAseq και εμπλέκονται είτε άμεσα, είτε έμμεσα στις διαδικασίες της προσυζευκτικής επικοινωνίας και της αναπαραγωγικής συμπεριφοράς του δάκου. Τα επίπεδα έκφρασης των επιλεγμένων γονιδίων καθορίστηκαν με ποσοτική Real-Time PCR σε κεφάλια αρσενικών και θηλυκών ατόμων, όπου εντοπίζονται τα κύρια οσφρητικά όργανα, σε συγκεκριμένες χρονικές στιγμές και καταστάσεις κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης. Τα αποτελέσματα των λειτουργικών αναλύσεων κατέδειξαν διαφορική έκφραση στα δύο φύλα και στις συνθήκες που διερευνήθηκαν, υποδεικνύοντας την πολυπλοκότητα των εμπλεκόμενων γονιδίων αλλά επιτρέποντας ωστόσο μια πρώτη εκτίμηση του ρόλου τους. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις παροδικής αποσιώπησης των επιλεγμένων γονιδίων με απευθείας έγχυση δίκλωνων μορίων RNA (dsRNA) στην αιμολέμφο και περαιτέρω έλεγχος της παρεμπόδισης έκφρασης με ποσοτική Real-Time PCR, ώστε να καθοριστούν οι συνθήκες για την περαιτέρω ανάλυση των φαινοτύπων κατά την προσυζευκτική συμπεριφορά των εντόμων και άρα την αποσαφήνιση των ρόλων τους. Η παρούσα μελέτη συνεισφέρει στον καθορισμό των μορίων-κλειδιών κατά τη διάρκεια των οσφρητικών απαντήσεων του δάκου, στο πλαίσιο της πρώτης ολιστικής προσέγγισης για τη διερεύνηση της μοριακής βάσης του οσφρητικού του συστήματος.

## ABSTRACT

---

The olive fruit fly, *Bactrocera oleae*, due to the damages it causes in olive cultivation, is an insect of high economic importance. Its management is mainly based on the use of chemical insecticides, making the design of new alternative, environmentally friendly methods of control a necessity. The effectiveness of such means could be undoubtedly ameliorated, by focusing on new molecular targets that will lead to mating disruption, thus interrupting the insect's reproductive development. The study of the olfactory system could contribute towards this aim, since both survival (food detection) and reproduction (mate recognition and oviposition) rely on chemosensory cues. Understanding and controlling the insect's olfactory capacity could enable its behavior regulation, aiming at the end to its population suppression.

The genes *SNMP1* and *PBP5* analyzed in this study were identified through RNAseq to be either directly or indirectly implicated to the premating communication and reproductive behavior. The expression levels of the selected genes were evaluated by quantitative Real-time PCR at different time points and conditions, in male and female adult heads, where the main olfactory organs are localized. These functional analyses resulted in differential expression between the two sexes and the conditions tested, shedding light on their role and the diverse parameters that influence their expression. In addition, transient silencing experiments were performed, by injecting dsRNA of the selected genes directly into the hemolymph, and further evaluation of the expression inhibition with quantitative Real-Time PCR, in order to define the conditions for the further analysis of phenotypes during the premating insect behavior and thus to clarify their roles. The present study contributes towards the determination of key molecules during the olfactory responses of the olive fruit fly, as a part of the first holistic approach aiming to investigate the molecular interactions of key components of the *B. oleae* olfactory system.

## Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή .....	13
1.1 Δάκος της ελιάς .....	13
1.1.1 Κύκλος ζωής του δάκου της ελιάς .....	13
1.1.2 Καταστροφή του καρπού της ελιάς .....	14
1.1.3 Καταπολέμηση του δάκου της ελιάς .....	14
1.2 Οσφρητικό σύστημα στο δάκο της ελιάς .....	15
1.2.1 Οσφρητικά Όργανα .....	16
1.2.2 Μοριακή Βάση του οσφρητικού συστήματος .....	17
1.2.2.1 Υποδοχείς (ORs).....	17
1.2.2.2 Οσμοδεσμευτικές πρωτεΐνες (OBPs) .....	18
1.2.2.3 Sensory Neuron Membrane Proteins (SNMPs) .....	20
1.2.2.4 Ιονοτροπικοί Υποδοχείς(Ionotropic Receptors, IRs) .....	21
1.2.2.5 Ένζυμα αποικοδόμησης των οσμών(Odorant Degrading Enzymes, ODEs) .....	21
2. Σκοπός .....	23
3. Υλικά και Μέθοδοι.....	24
3.1 Εργαστηριακές συνθήκες πειράματος .....	24
3.2 Απομόνωση RNA (RNA extraction) .....	25
3.3 Επεξεργασία με DNase .....	25
3.4 Σύνθεση cDNA με αντίστροφη μεταγραφή .....	26
3.5 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα(gel) αγαρόζης .....	26
3.6 Απομόνωση μορίων DNA από πήκτωμα αγαρόζης (gel extaction).....	27
3.7 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR).....	27
3.8 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real Time PCR) .....	29
3.9 Δημιουργία δίκλωνου RNA (dsRNA).....	30
3.10 Παροδική Αποσιώπηση γονιδίων (RNA silencing).....	31
4. Αποτελέσματα.....	33
4.1 Μελέτη έκφρασης γονιδίων <i>PBP5</i> και <i>SNMP1</i> .....	33
4.1.1 Έκφραση γονιδίου <i>PBP5</i> .....	34
4.1.2 Έκφραση γονιδίου <i>SNMP1</i> .....	34
4.2 Παροδική σίγηση γονιδίων <i>PBP5</i> και <i>SNMP1</i> .....	35
4.2.1 Αποσιώπηση γονιδίου <i>PBP5</i> σε αρσενικά έντομα <i>B. oleae</i> .....	36
4.2.2 Αποσιώπηση γονιδίου <i>PBP5</i> σε θηλυκά έντομα <i>B. oleae</i> .....	36
4.2.3 Αποσιώπηση γονιδίου <i>SNMP1</i> σε αρσενικά έντομα <i>B. oleae</i> .....	37
4.2.4 Αποσιώπηση γονιδίου <i>SNMP1</i> σε θηλυκά έντομα <i>B. oleae</i> .....	37

5. Συζήτηση .....	38
Μελλοντικές προοπτικές .....	41
6. Παράρτημα .....	42
6.1 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR) .....	42
6.2 Δημιουργία δίκλωνου RNA (dsRNA) .....	42
6.3 Μέθοδος σύγκρισης των $C_T$ ( $\Delta\Delta C_T$ ).....	42
6.4 Efficiencies .....	42
6.5 Αλληλουχίες.....	43
7. Βιβλιογραφία .....	45



# 1. Εισαγωγή

## 1.1 Δάκος της ελιάς

Ο δάκος της ελιάς, *Bactrocera oleae*, είναι ένα είδος φρουτόμυγας που ανήκει στην οικογένεια των Tephritidae της τάξης των διπτέρων. Είναι ευρέως γνωστό λόγω της παρασιτικής του δράσης στους καρπούς της ελιάς, τους οποίους χρησιμοποιεί ως ξενιστή, γεγονός που καθιστά το έντομο αυτό το σημαντικότερο παράσιτο της ελιάς παγκοσμίως. Πλήττει κυρίως τις χώρες της Μεσογείου, προκαλώντας τόσο ποσοτικές όσο και ποιοτικές απώλειες στα προϊόντα των ελαιοκαλλιιεργειών. Για το λόγο αυτό λοιπόν, συγκαταλέγεται στα έντομα μεγάλης οικονομικής σημασίας (Daane and Johnson, 2009).

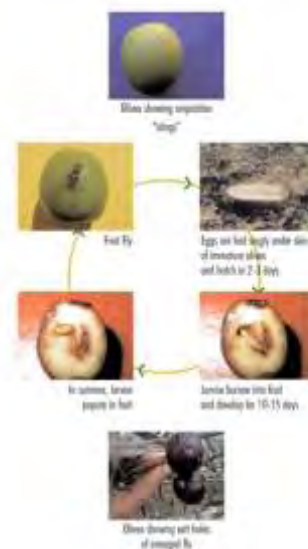


### 1.1.1 Κύκλος ζωής του δάκου της ελιάς

Η διαδικασία του ζευγαρώματος (mating) ξεκινά κατά την έναρξη της σκοτόφασης (Benelli, 2013) ή κατά το σούρουπο, φανερώνοντας ότι υπάρχει ένας ημερήσιος ρυθμός στις σεξουαλικές δραστηριότητες (Mazomenos, 1989). Μεταξύ των Tephritidae, η αλληλουχία των γεγονότων ερωτοτροπίας που οδηγούν σε σύζευξη συνήθως χωρίζονται σε τρεις βασικές φάσεις:

1. ένα αρσενικό υπερασπίζεται μία μικρή περιοχή έναντι των άλλων αρσενικών και παράγει οσφρητικά (π.χ. φερομόνες φύλου), ακουστικά (π.χ. δονήσεις των φτερών) και οπτικά σήματα για να προσελκύσει τα θηλυκά
2. ένα θηλυκό πετά κοντά στο αρσενικό, προσγειώνεται και κάνει βόλτες γύρω από το αρσενικό
3. το αρσενικό αντιλαμβάνεται το θηλυκό και επιχειρεί μια ή περισσότερες προσπάθειες σύζευξης (Benelli, 2014).

Το θηλυκό έντομο αφού συζευχθεί, γεννά τα αυγά του αποκλειστικά στον καρπό της ελιάς, με τη βοήθεια του ωοαποθέτη. Από κάθε αυγό εκκολάπτεται μια προνύμφη (larvae), η οποία, τρεφόμενη από το εσωτερικό του ελαιόκαρπου, αναπτύσσεται σε νύμφη (pupa) και εν συνεχεία προκύπτει το ενήλικο έντομο (adult). Τα ενήλικα έντομα μπορούν να ζήσουν από δύο έως έξι μήνες ανάλογα με τη θερμοκρασία περιβάλλοντος και τη διαθεσιμότητα τροφής. Ο δάκος έχει από τρεις έως και έξι γενεές ανά έτος, ανάλογα με τις τοπικές συνθήκες, ενώ μπορεί να αποθέσει από 50 έως 400 αυγά, συνήθως ένα ανά καρπό. Ανεξαρτήτως φύλου, τα έντομα θεωρούνται ώριμα από την έβδομη μέρα ζωής τους (Benelli *et al.*, 2013). Τα θηλυκά άτομα μπορούν να συζευχθούν μόνο μια φορά στη ζωή τους, ενώ τα αρσενικά απεριόριστες.



Εικόνα 1.1: Κύκλος ζωής του Δάκου της ελιάς.

### 1.1.2 Καταστροφή του καρπού της ελιάς

Η ζημιά στην ελιά προκαλείται τόσο από την ωοαπόθεση των ενήλικων θηλυκών εντόμων, όσο και από την ανάπτυξη της προνύμφης. Η προνύμφη δημιουργεί στοές εντός του καρπού καθώς τρέφεται από το εσωτερικό του, καταστρέφοντάς τον τελικά, ενώ στο νύγμα ωοαπόθεσης ευνοείται η ανάπτυξη βακτηρίων και μυκήτων. Η ανάπτυξη των μικροοργανισμών προκαλεί το σάπισμα του καρπού και μειώνει σημαντικά την ποιότητα του ελαιόλαδου, λόγω της σημαντικής αύξησης των επιπέδων των ελεύθερων λιπαρών οξέων που οδηγούν τελικά σε δυσάρεστη αύξηση της οξύτητας του (Paul Vossen *et al*, 2005).



**Εικόνα 1.2:** Στάδιο της προνύμφης, η οποία τρέφεται από το εσωτερικό του καρπού καταστρέφοντάς το.

### 1.1.3 Καταπολέμηση του δάκου της ελιάς

Η αντιμετώπισή του δάκου βασίζεται σχεδόν αποκλειστικά στη χρήση χημικών εντομοκτόνων καθώς και στη χρήση παγίδων. Πιο συγκεκριμένα η ανακάλυψη και εργαστηριακή σύνθεση των φερομονών (οσμές) αναβάθμισε σημαντικά τις τεχνικές ελέγχου και καταπολέμησης του εντόμου, μέσω της χρήσης τους σε συνδυασμό με άλλα δολώματα. Οι φερομόνες ή άλλες προσελκυστικές οσμές λοιπόν, χρησιμοποιούνται σε παγίδες, με σκοπό την μαζική παγίδευση των εντόμων αυτών (mass trapping) ή τον έλεγχο των πληθυσμών (monitor).

Οι σημαντικότεροι και πιο γνωστοί τύποι παγίδων είναι οι εξής: McPhail Traps, Olipe Traps, Yellow Sticky Traps, Attract and Kill Traps (Paul Vossen *et al*, 2005).



**Εικόνα 1.3:** Οι τέσσερις κύριοι τύποι παγίδων του δάκου. Από αριστερά προς τα δεξιά: i) McPhail, ii) Yellow sticky panel, iii) OLIFE, iv) Attract and kill device.

Ωστόσο η χρήση των χημικών στρατηγικών είναι προβληματική και εξαιρετικά αναποτελεσματική σε θέματα όπως η μόλυνση του περιβάλλοντος, οι επιδράσεις σε οργανισμούς μη-στόχους και η εμφάνιση ανθεκτικότητας, γεγονότα που παρεμποδίζουν την αποτελεσματικότητα των στρατηγικών αυτών (Wilke, 2009).

Πέραν από τις χημικές μεθόδους καταπολέμησης του δάκου της ελιάς αναπτύχθηκαν και βιοτεχνολογικές μέθοδοι, όπως η μέθοδος στείρων εντόμων (SIT) και η μέθοδος απελευθέρωσης εντόμων που φέρουν επικρατές θνησιγόνο γονίδιο (RIDL) (Wilke *et al.*, 2009). Παρ' όλα αυτά αφενός η μέθοδος SIT, λόγω της χρήσης ακτινοβολίας  $\gamma$ , εμφανίζει παρενέργειες επιβλαβείς (Lance *et al.*, 2005) για τα έντομα και αφετέρου η μέθοδος RIDL, αν και αποτελεσματική, εμφανίζει δυσκολίες ως προς την εφαρμογή της σε φυσικές συνθήκες στον αγρό ακόμη και σε μικρό διασκορπισμένο πληθυσμό, διότι παρουσιάζει υψηλό κόστος εφαρμογής (Wilke, 2009).

Έτσι καθίσταται πλέον αναγκαίος ο σχεδιασμός νέων εναλλακτικών, φιλικών προς το περιβάλλον μεθόδων βιολογικού ελέγχου. Η αποτελεσματικότητα τέτοιων μέσων

καταπολέμησης μπορεί να βελτιωθεί καθοριστικά εστιάζοντας σε νέους μοριακούς στόχους που οδηγούν στην αποτροπή της σύζευξης και συνεπώς στη διακοπή της αναπαραγωγικής διαδικασίας του εντόμου. Η μελέτη του οσφρητικού συστήματος μπορεί να συνεισφέρει στην ανάδειξη τέτοιων στόχων εφόσον τόσο η επιβίωση, όσο και η αναπαραγωγή του εξαρτώνται από οσφρητικά ερεθίσματα. Επομένως, κατανοώντας και ελέγχοντας την οσφρητική ικανότητα του εντόμου θα μπορούμε να ελέγξουμε και τη συμπεριφορά του, αποσκοπώντας στη μείωση των πληθυσμών του.

Ένα πολλά υποσχόμενο εργαλείο στον αγροτικό τομέα και κυρίως στη διαχείριση των εντόμων-ζιζανίων είναι η μέθοδος RNAi, όντας μία περιβαλλοντικά φιλική μέθοδος. Είναι εύκολο να εφαρμοστεί καθώς και πολύ αποδοτική, γι' αυτό χρησιμοποιείται ευρέως στον επιστημονικό κλάδο (Price *et al.*, 2008). Ήδη η μέθοδος αυτή έχει εφαρμογή στο *Bactrocera dorsalis* (Li *et al.*, 2011).

## 1.2 Οσφρητικό σύστημα στο δάκο της ελιάς

Η όσφρηση αποτελεί μία από τις βασικότερες αισθήσεις των εντόμων και παίζει πρωτεύοντα ρόλο στην επιβίωση και στην αναπαραγωγή τους. Διαμέσου αυτής τα έντομα είναι σε θέση να εντοπίσουν την τροφή τους, να αναγνωρίσουν το σύντροφό τους και να συζευχθούν, να ωοαποθέσουν και να αναγνωρίζουν επικίνδυνες γι' αυτά καταστάσεις. Μέσω του οσφρητικού συστήματος ο δάκος αντιλαμβάνεται πληθώρα οσμών, κάθε μία από τις οποίες οδηγεί και σε μία εξειδικευμένη διέγερση στον εγκέφαλο. Οι οσμές χωρίζονται σε δύο κατηγορίες:

A) **Τις γενικές οσμές:** Πτητικές ενώσεις, μικρού μοριακού βάρους, που προέρχονται από τις τροφές ή το περιβάλλον και σηματοδοτούν την ύπαρξη τροφής, περιβαλλοντικούς κινδύνους κ.ά.

B) **Τις φερομόνες:** Χημικές ενώσεις που απελευθερώνονται από άτομα του ίδιου είδους και αποτελούν κοινωνικά ή σεξουαλικά σήματα. Πιο συγκεκριμένα υπάρχουν φερομόνες κινδύνου, εντοπισμού τροφής, συνάθροισης και σεξουαλικές φερομόνες. Παίζουν λοιπόν ρόλο στην επικοινωνία των εντόμων, επάγοντας συγκεκριμένες αποκρίσεις όσον αφορά στη σεξουαλική έλξη, τη συμπεριφορά κατά το ζευγάρωμα και την επιλογή των θέσεων ωοαπόθεσης στους ξενιστές (Siciliano *et al.*, 2014).

Στο δάκο της ελιάς η έκλυση σεξουαλικών φερομονών για σύζευξη γίνεται από τα θηλυκά, σε αντίθεση με την πλειοψηφία των Tephritidae, όπου η έκλυση γίνεται από τα αρσενικά όπως και στη μεσογειακή μύγα *Ceratitis capitata* (Siciliano *et al.*, 2014). Πιο συγκεκριμένα τα θηλυκά προσελκύουν τα αρσενικά με την παραγωγή 1,7-διοξασπειρο [5.5] ενδεκανίου (Olean), το κύριο συστατικό της σεξουαλικής φερομόνης, που εκκρίνεται από τους ορθικούς αδένες. Είναι γνωστό ότι η Olean, που παράγεται από νεαρά αρσενικά έντομα, δεν προσελκύει τα θηλυκά, ωστόσο έχει αναφερθεί να προσελκύσει ώριμα αρσενικά (Mazomenos, 1989). Πρόσφατα, απέδειξαν ότι και τα δύο φύλα του δάκου αρχίζουν να παράγουν την Olean από την πρώτη ημέρα μετά την έκδυση (eclosion). Στα θηλυκά, η παραγωγή ήταν μεγαλύτερη από ό,τι στα αρσενικά και ήταν ανιχνεύσιμη τουλάχιστον μέχρι την 45η ημέρα της ζωής των θηλυκών. Για τα αρσενικά, το ποσό της Olean έφτασε το μέγιστο όριο, όταν η ωρίμανση των γονάδων ήταν πλήρης (δηλαδή στη σεξουαλική ωριμότητα, 5-8 ημερών), στη συνέχεια μειώνεται στο μηδέν από την 11η ημέρα της ζωής (Canale *et al.*, 2012). Και στα δύο φύλα, η έναρξη παραγωγής της Olean δεν συμπίπτει με τη σεξουαλική ωρίμανση και δεν είχε σχέση με το ζευγάρωμα, όπως συνέβη μόνο όταν τα αρσενικά και τα θηλυκά ήταν 7 ημερών (Canale *et al.*, 2012).

Έχει αποδειχθεί πρόσφατα ότι τα αρσενικά έντομα *B. oleae* είναι σε θέση να παράγουν (Z) -9-τρικοζένη (muscalure) σε ορθικούς αδένες, μια ένωση που επιλεκτικά προσελκύει θηλυκά (Canale, 2013). Η (Z) -9-τρικοζένη είναι μια σεξουαλική φερομόνη που παράγεται από τις θηλυκές μύγες *Musca domestica* για να προσελκύσουν τα αρσενικά. Ως εντομοκτόνο, η (Z) -9-τρικοζένη χρησιμοποιείται σε παγίδες για να προσελκύσει αρσενικές μύγες, να τις παγιδέψει, και να τις αποτρέψει από το να αναπαραχθούν (Thom *et al.*, 2007).



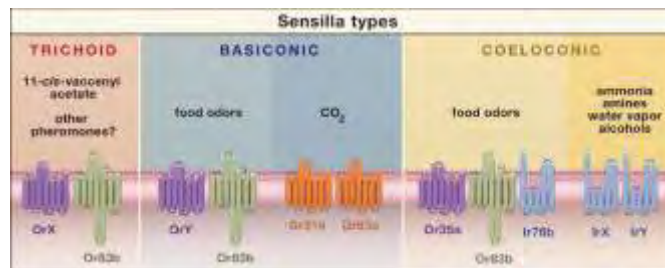
## 1.2.1 Οσφρητικά Όργανα

Η πρόσληψη των οσμών από το δάκο πραγματοποιείται αποκλειστικά στο κεφάλι, εκεί όπου εντοπίζονται τα δύο κύρια οσφρητικά του όργανα:

**Εικόνα 2.1:** Τα κύρια αισθητήρια οσφρητικά όργανα στη *Drosophila*. Με το επάνω βέλος υποδεικνύεται η κεραία, ενώ με το κάτω βέλος οι γναθικές προσαρκτίδες.

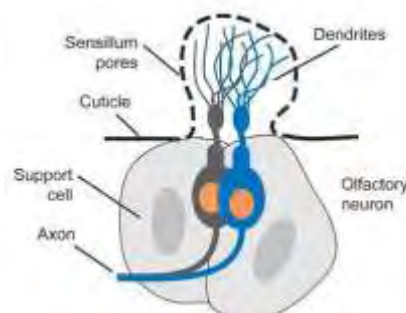
1. Οι κεραίες (antennae)
2. Οι γναθικές προσαρκτίδες (maxillary palps)

Τα δύο οσφρητικά όργανα περιβάλλονται από ένα πολύ μεγάλο αριθμό αισθητικών τριχιδίων (sensilla), των οποίων ο ρόλος είναι να στεγάζουν και να προστατεύουν τους οσφρητικούς νευρώνες (OSNs, Odorant Sensory Neurons). Τα αισθητικά τριχίδια διακρίνονται σε τρία κύρια είδη: i) τα τριχοειδή (trichoid), ii) τα βασικονικά (basiconic), και iii) τα κοιλοκωνικά (coelonic). Τα τρία αυτά είδη εμφανίζουν σημαντικές διαφορές ως προς το μέγεθος, τη μορφολογία, τους τύπους των ενώσεων που αναγνωρίζουν οι νευρώνες τους καθώς και την κατανομή τους στην κεραία (Εικόνα 2.2). Έχει αποδειχθεί πως τα τριχοειδή αισθητικά τριχίδια έχουν μεγαλύτερη ειδίκευση στην αναγνώριση φερομονών, ενώ τα αντίστοιχα βασικονικά στην αναγνώριση των τροφών (Jefferis *et al*, 2007).



**Εικόνα 2.2:** Συνοπτική παρουσίαση των διαφορών, ως προς την ειδίκευση των ORs, στους διαφορετικούς τύπους αισθητικών τριχιδίων (Spletter & Luo, 2009).

Οι OSNs προσδιορίζουν τις οσμές και μεταφέρουν το μήνυμα στον εγκέφαλο, ενώ εδράζονται στο τρίτο τμήμα της κάθε κεραίας και στις γναθικές προσαρκτίδες. Παρά τη σημαντική ποικιλομορφία στη μορφολογία των οργάνων αυτών, μεταξύ των ειδών, η δομή των οσφρητικών αισθητικών τριχιδίων παραμένει υψηλά συντηρημένη και αποτελείται από ένα επιδερμικό τοίχωμα, το οποίο περιλαμβάνει πολλαπλούς πόρους μέσα από τους οποίους εισέρχονται οι οσμές.

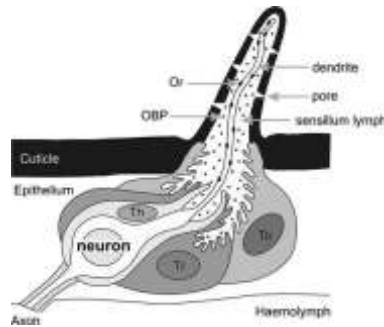


**Εικόνα 2.3:** Η δομή ενός τυπικού οσφρητικού τριχιδίου, στο οποίο εδράζονται δύο OSNs (διακρίνονται με γκρι και μπλε χρώματα) (Vosshall & Stocker, 2007).

## 1.2.2 Μοριακή Βάση του οσφρητικού συστήματος

Τα μόρια τα οποία συμμετέχουν στη διαδικασία πρόσληψης και μεταγωγής σήματος των οσμών στον εγκέφαλο είναι τα εξής:

- ✓ **Υποδοχείς** (Odorant Receptors, ORs)
- ✓ **Οσμοδεσμευτικές πρωτεΐνες** (Odorant binding proteins, OBPs)
- ✓ **Sensory Neuron Membrane Proteins** (SNMPs)
- ✓ **Ιονοτροπικοί Υποδοχείς** (Ionotropic Receptors, IRs)
- ✓ **Ένζυμα αποικοδόμησης των οσμών** (Odorant Degrading Enzymes, ODEs)



**Εικόνα 2.4:** Γενική οργάνωση του οσφρητικού τριχιδίου ενός εντόμου. Διακρίνονται οι θέσεις των ORs και OBPs, στην επιφάνεια του νευρώνα και τη λέμφο, αντίστοιχα (Jacquin-Joly & Merlin, 2004).

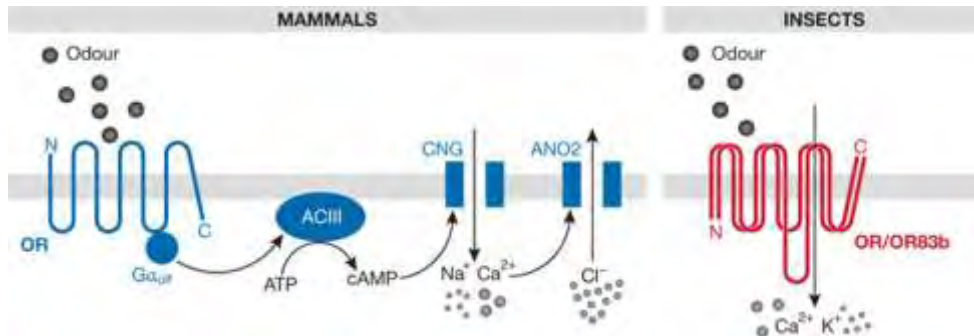
### 1.2.2.1 Υποδοχείς (ORs)

#### Ρόλος

Εδράζονται στην επιφάνεια των οσφρητικών νευρώνων στις κεραίες και τις γναθικές προσακτριίδες. Κατά την πρόσληψη της οσμής εκτελούν ένα διττό ρόλο. Αφενός επιτρέπουν τη διάκριση μεταξύ των οσμών, έτσι ώστε να μπορούν να ανταποκριθούν κατάλληλα μόνο κύτταρα που εκφράζουν τον ιδανικό τύπο υποδοχέα. Αφετέρου μεταφέρουν το χημικό μήνυμα από τον εξωκυττάριο στον ενδοκυττάριο χώρο της μεμβράνης κατά τη σύνδεση τους με τον προσδέτη. Η σύνδεση αυτή οδηγεί στην ενεργοποίηση του νευρώνα και στη μεταφορά του μηνύματος στον εγκέφαλο για να πραγματοποιηθεί και η αντίστοιχη απόκριση.

#### Δομή

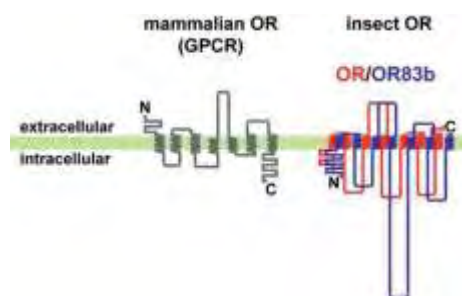
Οι οσφρητικοί υποδοχείς των εντόμων αποτελούνται από επτά διαμεμβρανικές περιοχές, ωστόσο δεν έχουν καμία ομολογία με GPCR υποδοχείς. Πειραματικά δεδομένα αποκαλύπτουν ότι οι οσφρητικοί υποδοχείς των εντόμων αντιπροσωπεύουν μια διαφορετική κατηγορία GPCRs από αυτούς των θηλαστικών (Εικόνα 2.5) (Silbering *et al.*, 2010). Η τοπολογία των πρωτεϊνών στη μεμβράνη είναι αντεστραμμένη σε σχέση με την αντίστοιχη των GPCR υποδοχέων, με το αμινικό άκρο να έχει κατεύθυνση στο κυτταρόπλασμα αντί για τον εξωκυττάριο χώρο (Benton, 2009, Smart *et al.*, 2008).



**Εικόνα 2.5:** Μηχανισμοί σηματοδότησης μέσω υποδοχέων θηλαστικών και εντόμων. Σχηματική αναπαράσταση της μοριακής βάσης της μεταγωγής σήματος στο οσφρητικό σύστημα ποντικού και φρουτόμυγας (Kleene, 2008).

Οι υποδοχείς αυτοί φαίνεται, τελικά, πως δρουν και ως προσδετο-εξαρτώμενοι διάλυτοι ιόντων (ligand-gated ion channels). Συντίθενται από ετερομερή σύμπλοκα, αγνώστου στοιχειομετρίας, με δύο υπομονάδες, από τις οποίες η μία είναι πολύ συντηρημένη στα έντομα και βρίσκεται σε όλα τα σύμπλοκα OR, ενώ η άλλη είναι πολύ αποκλίνουσα (divergent) και μεταβλητή (Suh, 2014). Η πρώτη από τις υπομονάδες είναι γνωστή ως OR-συνυποδοχέας (Orco).

**Ο συνυποδοχέας OR83b (Orco):** Κομβικό ρόλο στην μοναδικότητα των οσφρητικών υποδοχέων στα έντομα έχει ο συνυποδοχέας OR83b, λόγω ορισμένων αξιοσημείωτων ιδιοτήτων που διαθέτει. Αρχικά, το γονίδιο του αποτελεί το μοναδικό υψηλά συντηρημένο γονίδιο της υπεροικογένειας των ORs, μεταξύ των διαφορετικών ειδών εντόμων (Krieger *et al.*, 2003, Jones *et al.*, 2005). Δεύτερον, η πρωτεΐνη που κωδικοποιεί διαθέτει ιδιαίτερα διαφορετική δομή σε σχέση με τις υπόλοιπες. Τρίτον, εκφράζεται στο ~70% των οσφρητικών νευρώνων της κεραίας και σε όλους τους OSNs των γναθικών προσακτριδών. Τέταρτον, η πρωτεΐνη του, από μόνη της, δεν προσδίδει ευαισθησία σε κάποια οσμή. Ο OR83b αποδείχτηκε πως αποτελεί έναν υποχρεωτικό συνυποδοχέα για όλους τους κοινούς οσφρητικούς υποδοχείς, με τους οποίους σχηματίζει ετεροδιμερές σύμπλοκο στην επιφάνεια των νευρώνων OSN (Larsson *et al.*, 2004). Η ύπαρξη του OR83b αποτελεί ικανή και αναγκαία συνθήκη για την στόχευση και τη λειτουργική έκφραση των ORs σε όλους τους νευρώνες (Benton *et al.* 2006).



**Εικόνα 2.6:** Η διακριτή δομή των ORs στα θηλαστικά και τα έντομα (Benton, 2006).

### 1.2.2.2 Οσμοδεσμευτικές πρωτεΐνες (OBPs)

#### Ρόλος

Οι OBPs είναι μικρού μοριακού βάρους, υδατοδιαλυτές, εξωκυττάρειες πρωτεΐνες που εδράζονται στο λεμφικό υγρό που περιβάλλει τους αισθητήριους δενδρίτες. Εξαιτίας του υδροφοβικού χαρακτήρα των οσμών και της ανικανότητας να ταξιδεύουν στη λέμφο, το ρόλο

αυτό αναλαμβάνουν οι οσμοδευμεντικές πρωτεΐνες (Suh, 2014), οι οποίες πιστεύεται ότι δρουν ως πρωτεΐνες μεταφορείς για να μεταφέρουν τις οσμές στους οσφρητικούς υποδοχείς (Shao-Hua Gu *et al.*, 2014). Επιπλέον εκτελούν και άλλες λειτουργίες, όπως την αποτροπή της αποικοδόμησης του προσδέτη προτού ενεργοποιήσει τον οσφρητικό υποδοχέα, δράση συμπαράγοντα για την ενεργοποίηση της μεταγωγής του σήματος και την αποικοδόμηση οσμών μετά την ενεργοποίηση, και την απομάκρυνση τους από την λέμφο (Steinbrecht, 1998).

### Δομή

Οι οσμοδευμεντικές πρωτεΐνες (OBPs) είναι σφαιρικές, υδατοδιαλυτές πρωτεΐνες μεγέθους 14–20 kDa (Suh, 2014). Η πλειοψηφία των OBPs μοιράζονται ένα κοινό βρόγχο με έξι α-έλικες συνδεδεμένες με θηλιές που συγκρατούνται από τρεις δισουλφιδικούς δεσμούς. Επιπλέον, σχεδόν όλοι οι OBPs διατηρούν ένα μοτίβο έξι υψηλά συντηρημένων κυστεϊνών, το οποίο αποτελεί και την "υπογραφή" τους και είναι της μορφής (C1-X20-35-C2-X3-C3-X20-30-C4-X8-12-C5-X8-C6). Ο αριθμός των αμινοξέων που διαμεσολαβεί ανάμεσα στη δεύτερη και την τρίτη κυστεΐνη είναι πάντα τρία, και ο αντίστοιχος μεταξύ της πέμπτης και της έκτης είναι πάντα οκτώ (Pelosi *et al.*, 2006). Άλλα χαρακτηριστικά των OBPs είναι: το μέγεθος τους που κυμαίνεται μεταξύ 15-20 kDa, η σφαιρική υδατοδιαλυτή φύση τους και η παρουσία ενός πεπτιδικού σινιάλου αρχή της αλληλουχίας τους. Επιπλέον, οι OBPs των εντόμων, έχοντας πολύ έντονες αποκλίσεις στα χαρακτηριστικά τους, κατηγοριοποιούνται σε 5 υποοικογένειες: 1) Τους κλασσικούς OBPs, που διατηρούν τα παραπάνω γνωρίσματα, 2) τους διμερείς OBPs, που φέρουν δύο μοτίβα έξι-κυστεϊνών, 3) τους plus-C OBPs, οι οποίοι φέρουν δύο επιπλέον συντηρημένα κατάλοιπα κυστεΐνης, καθώς και ένα προλίνης, 4) τους minus-C OBPs, που έχουν δύο λιγότερες συντηρημένες κυστεΐνες και 5) τους ατυπικούς OBPs, που φέρουν 9-10 κυστεΐνες και ένα εκτεταμένο C- τελικό άκρο (Liu R. *et al.*, 2010).

### Κατηγορίες

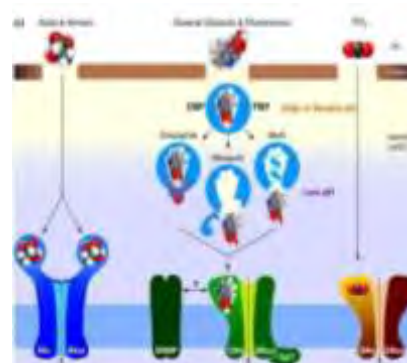
Στα έντομα οι OBPs χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες ανάλογα με το είδος της δράσης τους: α) pheromone binding proteins (PBPs), β) general odor binding proteins (GOBPs), γ) antennal specific proteins (ASPs).

- **PBPs**

Είναι υψηλά συντηρημένες ανάμεσα στα είδη, αλλά η ομολογία στις αμινοξικές ακολουθίες ανάμεσα σ' αυτές και τις GOBPs είναι μόλις 30% (Steinbrecht *et al.*, 1994). Οι PBPs συμβάλλουν στην πρόσληψη φερομονών και στη μεταφορά τους στους υποδοχείς. Στα Λεπιδόπτερα οι PBPs είναι άφθονες και βρίσκονται στη λέμφο, που περιβάλλει τους δενδρίτες των υποδοχέων στους νευρώνες του οσφρητικού. Είναι αρρενο-ειδικές και συνδέονται με φερομονο-ευαίσθητους νευρώνες και GOBPs.

#### **PBP5 (PBPRP5)**

Η PBP5 ανήκει στην οικογένεια των οσμοδευμεντικών πρωτεϊνών, γι' αυτό και το έτερο όνομα αυτής είναι οσμοδευμεντική πρωτεΐνη 28a (OBP28a). Στη *D. melanogaster* PBPRP5 εκφράζεται στα οσφρητικά όργανα προνυμφών και ενηλίκων, υποδηλώνοντας ότι παίζει ρόλο στην κοινή όσφρηση και στα δύο στάδια ανάπτυξης. Στα ενήλικα άτομα, η έκφραση της PBPRP5 περιορίζεται στην αισθητήρια λέμφο που καλύπτει τους οσφρητικούς δενδρίτες σε



**Εικόνα 2.7:** Διακριτές κατηγορίες οσμών, που ενεργοποιούν συγκεκριμένες ομάδες χημειούποδοχέων με διαφορετικά μηχανιστικά μοντέλα: η *D. melanogaster* μπορεί να χρησιμοποιήσει το δεσμευμένο OBP για να ενεργοποιήσει τους υποδοχείς. Φερομονο-δευμεντικές πρωτεΐνες (PBPs) στους σκώρους εξάγουν τα οσφρητικά φορτία τους μέσω μιας pH-επαγόμενης αλλαγής. Οσμοδευμεντικές πρωτεΐνες (OBPs) στο κουνούπι εξάγουν επίσης τους προσδέτες τους μέσω μιας pH-επαγόμενης μεταβολής στη διαμόρφωση (Suh, 2014).

ένα υποσύνολο των οσφρητικών τριχοειδών, τα βασικωνικά αισθητικά τριχίδια. Από τη στιγμή που αυτά διαφέρουν ως προς την οσφρητική ειδικότητα, η PBPRP5 μπορεί να είναι σε θέση να συνδέεται και να μεσολαβεί σε οσφρητική απάντηση μεγάλης ποικιλίας οσμών (Park *et al.*, 2000).

- **GOBPs**

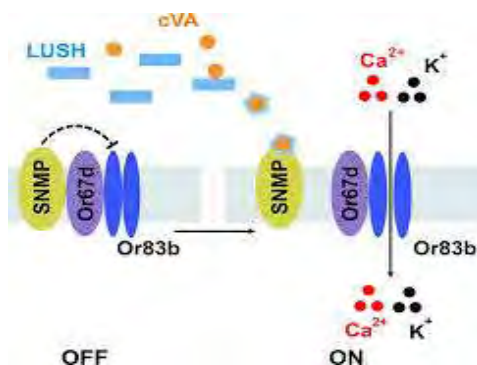
Εντοπίζονται στις κεραίες και είναι υπεύθυνες για την πρόσληψη των πτητικών γενικών οσμών, όπως είναι οι οσμές που εκλύουν τα φυτά. Σε σύγκριση με τις PBPs δεν είναι φυλο-ειδικές.

- **ASPs**

Αποτελούν πρωτεΐνες που εκφράζονται σε πολύ υψηλές τιμές στις κεραίες των εντόμων, χωρίς ωστόσο να έχει προσδιοριστεί ο ακριβής τους ρόλος.

### 1.2.2.3 Sensory Neuron Membrane Proteins (SNMPs)

Πρόκειται για πρωτεΐνες που εκφράζονται στην επιφάνεια των αισθητήριων οσφρητικών νευρώνων, εμπλέκονται στην ανίχνευση φερομονών και εντοπίζονται μαζί με ORs στους αισθητήριους δενδρίτες (Benton, 2009). Έχουν προταθεί πιθανοί ρόλοι: α) η δράση τους ως ORs στα λεπιδόπτερα, β) η αλληλεπίδραση και καθοδήγηση του συμπλέγματος OBP-προσδέτη, γ) η αλληλεπίδραση με άλλες πρωτεΐνες των δενδριτικών κυττάρων, όπως οι ORs, και ο σχηματισμός ετεροδιμερών συμπλεγμάτων. Πιο συγκεκριμένα στη *D. melanogaster* έχει αποδειχτεί πως το SNMP δρα ως συνυποδοχέας της φερομόνης cVA (Jin *et al.*, 2008), ένα πτητικό αρρενο-ειδικό λιπαρό οξύ που δρα ως φερομόνη και ρυθμίζει τη σεξουαλική και κοινωνική συμπεριφορά (Benton *et al.*, 2007).



**Εικόνα 2.8: Μοντέλο ανίχνευσης φερομονών στη *Drosophila*.** Ο εξωκυττάριος υποδοχέας LUSH δεσμεύει τη φερομόνη cVA και υφίσταται μια ενεργοποιημένη διαμορφωτική μετατόπιση. Η ενεργοποιημένη LUSH δεσμεύει το SNMP και ανατρέπει την SNMP-μεσολαβούμενη αναστολή του συμπλέγματος Or67d / Or83b υποδοχέα, επιτρέποντας κατιόντα να εισαχθούν στους νευρώνες (Tal Soo Han, 2009).

Δύο υποοικογένειες (SNMP1 και SNMP2) έχουν βρεθεί και στα Δίπτερα (Suh, 2014). SNMP1 της *D. melanogaster* μοιράζεται τόσο σημαντική ομοιότητα αλληλουχίας όσο και πέντε από τις έξι θέσεις ένθεσης ιντρονίου με την SNMP1 του *Bombyx mori* (λεπιδόπτερα) (Zachary *et al.*, 2008). Στο σκώρο *Agrotis ipsilon*, μετά από qRT-PCR μετρήσεις, απέδειξαν ότι τα γονίδια SNMP1 και SNMP2 είχαν μεγαλύτερα επίπεδα έκφρασης στις κεραίες από ότι σε άλλους ιστούς και στα δύο φύλλα. Αυτό έρχεται σε αντίθεση με προηγούμενες έρευνες που κατέδειξαν ότι το SNMP1 εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα σε φερομονο-εξαρτώμενους υποδοχείς νευρώνων του οσφρητικού, ενώ το SNMP2 εκφράζεται σε υποστηρικτικά κύτταρα. Επιπλέον η διαδικασία ζευγαρώματος στην ίδια έρευνα δεν έδειξε να έχει επίδραση στην έκφραση των γονιδίων (Gu SH *et al.*, 2013).

Μία επιπλέον έρευνα πραγματοποιήθηκε στο λεπιδόπτερο *Sesamia inferens*, μελετώντας τη διαφορική έκφραση των γονιδίων SNMP1 και SNMP2. Σύμφωνα με



αυτήν το SNMP1 είχε μεγαλύτερη έκφραση στις κεραίες από το SNMP2 που εκφραζόταν σε υψηλά επίπεδα σε άλλους μη-χημειοαισθητήριους ιστούς. Συμπερασματικά τα δύο γονίδια επιδεικνύουν πολύ διαφορετικά προφίλ έκφρασης, γεγονός που συνηγορεί στην πιθανή συμμετοχή του SNMP1 στη χημειο-αίσθηση (chemosensory), ενώ το SNMP2 να έχει και άλλες λειτουργίες πέραν από την χημειο-αίσθηση (Ya-Nan Zhang *et al.*, 2013).

#### 1.2.2.4 Ιονοτροπικοί Υποδοχείς(Ionotropic Receptors, IRs)

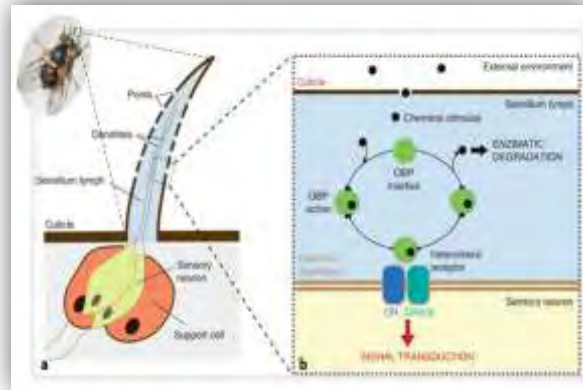
Οι ιονοτροπικοί υποδοχείς (IRs), η αρχαιότερη οικογένεια χημειοϋποδοχέων, που περιγράφηκαν για πρώτη φορά στην *D. melanogaster*, εξελικτικά προέρχονται από τους ιονοτροπικούς υποδοχείς του γλουταμινικού (iGluRs) και κατά συνέπεια πιστεύεται ότι δρουν ως προσδετο-εξαρτώμενα κανάλια ιόντων (Suh, 2014). Στη *D. melanogaster* εδράζονται στα κοιλοκωνικά τριχίδια της κεραίας, τα οποία δεν εκφράζουν ORs (πλην του OR35a). Εμφανίζουν σημαντικές διαφορές ως προς την έκφραση και τη λειτουργία τους σε σχέση με τους ORs, με σημαντικότερη πως προσδέτες των IRs αναγνωρίζονται πολύ ασθενώς ή καθόλου από τους ORs, ενώ οι ισχυροί προσδέτες των ORs δεν προκαλούν διέγερση στους IRs. Οι IRs, σε αντίθεση με τους ORs, δεν εντοπίζονται μόνο στα έντομα, αλλά η ύπαρξη τους έχει διαπιστωθεί σε όλα τα είδη που έχουν εξεταστεί και ανήκουν στην κατηγορία των πρωτοστόμιων (Rytz *et al.*, 2013). Για πολλούς IRs της *D.melanogaster*, δεν έχουν βρεθεί ορθόλογα γονίδια σε άλλα είδη εντόμων, όπως κουνούπια (Liu *et al.*, 2010), μέλισσες (Croset *et al*, 2010) και σκόρους (Bengtsson *et al.*, 2012).

#### 1.2.2.5 Ένζυμα αποικοδόμησης των οσμών(Odorant Degrading Enzymes, ODEs)

Πρόκειται για ένζυμα τα οποία βρίσκονται είτε στη διαλυτή τους μορφή εξωκυτταρικά, είτε ενδοκυτταρικά δεσμευμένα στη μεμβράνη ή στο κυτταρόπλασμα. Ο ρόλος τους έγκειται στην αποικοδόμηση του προσδέτη μετά από την αλληλεπίδραση του με τον υποδοχέα (Vogt, 2003). Στα ένζυμα αποικοδόμησης των οσμών περιλαμβάνονται συγκεκριμένες εστεράσες, κυτοχρώματα P450, τρανσφεράσες της S-γλουταθειόνης (GSTs), UDP-γλυκοσυλτρανσφεράσες (UGTs), αλδεϋδικές οξειδάσες και αλκοολικές δεϋδρογονάσες, οι οποίες δείχνουν μεγάλη εξειδίκευση για οσμές και εμφανίζονται σε σημαντικούς χημειοαισθητήριους ιστούς όπως κοιλότητες αισθητηρίων οργάνων και κεραίες (Younus, 2014).

#### Σύνοψη του μηχανισμού μεταγωγής σήματος των οσμών

Οι οσμές πιστεύεται ότι διαχέονται μέσω πολυάριθμων πόρων, που βρίσκονται επί της επιφανείας αισθητηρίων οργάνων, μέσα από τους οποίους εισέρχονται σε μία υδάτινη λέμφο. Εκεί πρέπει να μεταφερθούν προκειμένου να φθάσουν σε ένα ευρύ φάσμα μοριακών υποδοχέων, που ενυπάρχουν επί των δενδριτών στους νευρώνες των οσφρητικών υποδοχέων (ORNs). Επειδή οι αρωματικές ουσίες είναι συνήθως υδρόφοβες, απαιτούν διαλυτοποίηση προκειμένου να διασχίσουν την υδάτινη λέμφο. Ο ρόλος αυτός θεωρείται ότι διενεργείται από τις οσμοδεσμευτικές πρωτεΐνες (OBPs). Η ενεργοποίηση ενός συνόλου διαφορετικών χημειοαισθητήριων υποδοχέων από τις οσμές, παρέχει ένα φάσμα τόσο διεγερτικών όσο και ανασταλτικών σημάτων για την παραγωγή δυναμικών δράσης.



**Εικόνα 2.9:** (Α) Χημειοαισθητήρια όργανα εντόμου και μοριακό μοντέλο μεταγωγής σήματος (Suh, 2014).

## 2. Σκοπός

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η μελέτη γονιδίων που εμπλέκονται στο οσφρητικό σύστημα του δάκου της ελιάς, *Bactrocera oleae* και κωδικοποιούν αντίστοιχα την πρωτεΐνη SNMP1 που εκφράζεται στην επιφάνεια αισθητήριων νευρώνων, καθώς και την φερομονο-οσμοδεσμευτική πρωτεΐνη PBP5.

Προς αυτήν την κατεύθυνση τα δυο γονίδια-στόχοι ταυτοποιήθηκαν μέσω RNAseq και τα επίπεδα έκφρασής τους καθορίστηκαν με ποσοτική Real-Time PCR υπό συγκεκριμένες συνθήκες. Επιπλέον πραγματοποιήθηκε παροδική αποσιώπηση των γονιδίων (RNAi) και περαιτέρω μελέτη των επιπέδων έκφρασης με qRT-PCR, με σκοπό την αποσαφήνιση του ρόλου τους τόσο στα αναπτυξιακά στάδια του εντόμου όσο και στην αναπαραγωγική διαδικασία και κατ' επέκταση στην επιβίωσή τους.

Η μελέτη των προαναφερθέντων γονιδίων πραγματοποιείται στα πλαίσια μίας ευρύτερης προσπάθειας για τη μελέτη του οσφρητικού συστήματος του δάκου της ελιάς. Αυτά τα γονίδια-στόχοι θα μπορούσαν να συνεισφέρουν στην ανάπτυξη κατάλληλων εργαλείων για τη γενετική διαχείριση του εντόμου και κατ' επέκταση την καταπολέμησή του.

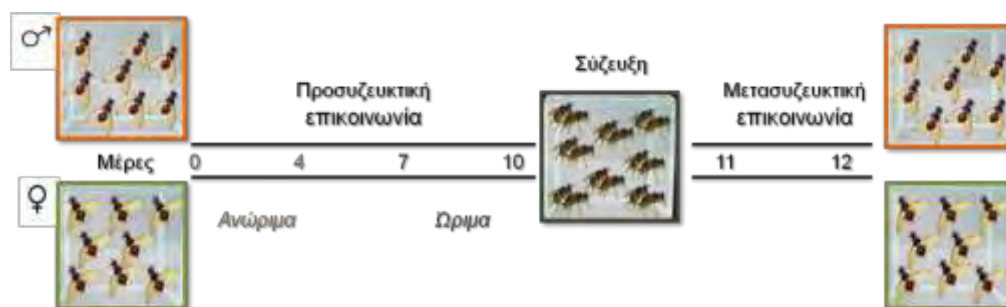
### 3. Υλικά και Μέθοδοι

#### 3.1 Εργαστηριακές συνθήκες πειράματος

Ο υπό μελέτη πληθυσμός δάκου της ελιάς που χρησιμοποιήθηκε για τη διεξαγωγή των πειραμάτων είναι εργαστηριακός. Στο εντομοτροφείο τα έντομα διαβίωναν σε περιβαλλοντική θερμοκρασία 25°C και υγρασία περίπου 58%.

Για τη διερεύνηση των επιπέδων έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων κατά τη διάρκεια της σεξουαλικής ωρίμανσης των εντόμων, ο πειραματικός σχεδιασμός έπρεπε να εξασφαλίζει τις εξής παραμέτρους:

Την πρώτη μέρα μεταμόρφωσης της νύμφης σε ενήλικο έντομο πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός αρσενικών και θηλυκών εντόμων και διατήρησή τους σε ξεχωριστά κλουβιά, έτσι ώστε να αποφευχθεί η προσυζευκτική επικοινωνία. Η μέρα αυτή για τα πειραματικά δεδομένα θεωρείτο η μέρα μηδέν (0), όπου τα έντομα ήταν ακόμα σεξουαλικά ανώριμα. Αυτήν την ημέρα συλλέχθηκαν οκτώ (8) αρσενικά και οκτώ (8) θηλυκά έντομα και απομονώθηκαν οι κεραίες για την περαιτέρω λειτουργική ανάλυση των υπό μελέτη γονιδίων. Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και για την τέταρτη (4) ημέρα, όπου τα έντομα εξακολουθούσαν να είναι ανώριμα σεξουαλικά. Επιπλέον απομονώθηκαν οι κεραίες από τον ίδιο αριθμό εντόμων την έβδομη (7) και δέκατη (10) ημέρα, κατά τις οποίες τα έντομα θεωρούνταν σεξουαλικά ώριμα. Επιπρόσθετα τη δέκατη (10) ημέρα άλλα οκτώ (8) αρσενικά και οκτώ (8) θηλυκά έντομα ήρθαν σε επαφή έτσι ώστε να συζευχθούν (mating) και ύστερα από 12 ώρες συλλέχθηκαν και πάλι οι κεραίες. Ατή η ημέρα εθεωρείτο ως ενδέκατη (11) ημέρα. Πλέον τα έντομα είχαν μετασυζευκτική επικοινωνία. Τέλος συλλέχθηκαν έντομα τη δωδέκατη (12) ημέρα, δηλαδή δύο μέρες μετά τη σύζευξη, αφού βέβαια τα έντομα είχαν διαχωριστεί σε διαφορετικά κλουβιά, ώστε να αποφευχθεί πιθανή άλλη σύζευξη. Οι συνθήκες διεξαγωγής του πειράματος απεικονίζονται παρακάτω (Εικ. 3.1).



Εικόνα 3.1: Σχηματική αναπαράσταση των συνθηκών χειρισμού των εντόμων στο εντομοτροφείο κατά τη διεξαγωγή της πειραματικής διαδικασίας.

### 3.2 Απομόνωση RNA (RNA extraction)

Η διαδικασία απομόνωσης RNA στοχεύει στην απομόνωση ολικού RNA από τις κεραίες αρσενικών και θηλυκών εντόμων σε συγκεκριμένες χρονικές στιγμές και καταστάσεις (Εικ. 3.1).

#### Μεθοδολογία

Αρχικά τα δείγματα με τις κεραίες των εντόμων διατηρήθηκαν σε θερμοκρασία  $-80^{\circ}\text{C}$  σε 20  $\mu\text{l}$  Trisure. Αφού ξεπάγωσαν και μετά από μία σύντομη φυγοκέντρηση (spin-down) ακολούθησε η εξής διαδικασία:

1. Προσθήκη δειγμάτων σε υγρό άζωτο και λιοτρίβιση με έμβολα (pestles)
2. Επιπλέον λιοτρίβιση με έμβολα (pestles) χωρίς RNAση με σταδιακή προσθήκη Trisure έως ότου ομογενοποιηθούν οι ιστοί
3. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου (RT) για πέντε (5) λεπτά
4. Σύντομη ανάδευση (Vortex) και επώαση για άλλα πέντε (5) λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (RT)
5. Φυγοκέντρηση στους  $4^{\circ}\text{C}$ , στα 12.000 rpm για δέκα (10) λεπτά
6. Μεταφορά υπερκείμενου σε νέο αποστειρωμένο σωληνάκι erpendorf 1,5ml
7. Προσθήκη 20  $\mu\text{l}$  BCP και συνεχές ανακάτεμα (όχι Vortex) για δεκαπέντε (15) λεπτά
8. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου (RT) για δύο-τρία (2-3) λεπτά
9. Φυγοκέντρηση στους  $4^{\circ}\text{C}$ , στα 12.000 rcf για δεκαοκτώ (18) λεπτά
10. Ιδιαίτερα προσεκτική μεταφορά της υδατικής φάσης σε καθαρό σωληνάκι erpendorf 1,5ml και διατήρηση στον πάγο
11. Προσθήκη 100 $\mu\text{l}$  παγωμένης ισοπροπανόλης και 0,5 $\mu\text{l}$  γλυκογόνου
12. Καλή ανάδευση (Vortex) και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου (RT) για μία (1) ώρα
13. Φυγοκέντρηση στους  $4^{\circ}\text{C}$ , στα 12.000 rcf για τριάντα (30) λεπτά
14. Αφαίρεση υπερκείμενου και πλύση του ιζήματος με 130  $\mu\text{l}$  παγωμένης αιθανόλης 75%
15. Φυγοκέντρηση στους  $4^{\circ}\text{C}$ , στα 7.500 rcf για πέντε (5) λεπτά
16. Αφαίρεση της αιθανόλης και πλύση του ιζήματος με 130  $\mu\text{l}$  παγωμένης αιθανόλης 75%
17. Φυγοκέντρηση στους  $4^{\circ}\text{C}$ , στα 12.000 rcf για πέντε (5) λεπτά. Επανάληψη αυτού του βήματος άλλες δύο φορές
18. Αφαίρεση της αιθανόλης και στέγνωμα του ιζήματος (pellet) σε στείρες συνθήκες
19. Αναδιάλυση του ιζήματος με 8 $\mu\text{l}$  καθαρό νερό και καλό Vortex

### 3.3 Επεξεργασία με DNase

#### Μεθοδολογία

1. Σε PCR σωληνάκι προστίθεται το RNA, που έχει προκύψει από RNA extraction, μαζί με νερό, ρυθμιστικό διάλυμα (Buffer) και το ένζυμο DNase σύμφωνα στις συγκεντρώσεις που αναγράφονται στον πίνακα
2. Επώαση της αντίδρασης στους  $37^{\circ}\text{C}$  για εικοσιπέντε (25) λεπτά στο θερμοκυκλοποιητή

Αντιδραστήρια	Συγκέντρωση
RNA	8 $\mu\text{l}$
Buffer	1 $\mu\text{l}$ (1X)
Dnase	0,2 $\mu\text{l}$ (0.4 units)
Αναστολέας DNase	1 $\mu\text{l}$ (0.1V)
ddH <sub>2</sub> O	Συμπληρώνει τον όγκο
Τελικός Όγκος (V)	10 $\mu\text{l}$

3. Προσθήκη διαλύματος απενεργοποίησης DNase(inactivation buffer) και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου (RT) για πέντε (5) λεπτά
4. Φυγοκέντρηση στα 11.000g για δύο (2) λεπτά
5. Μεταφορά υπερκείμενου σε καθαρό PCR σωληνάκι

### 3.4 Σύνθεση cDNA με αντίστροφη μεταγραφή

Αντίστροφη μεταγραφή είναι η διαδικασία μετατροπής του μονόκλωνου RNA, που έχει απομονωθεί, σε δίκλωνο μόριο μέσω σύνθεσης μιας συμπληρωματικής αλυσίδας. Το ένζυμο που καταλύει την αντίδραση είναι η αντίστροφη μεταγραφάση. Η διαδικασία αυτή επιλέγεται αφενός για την καλύτερη προστασία του γενετικού υλικού, αφού το μονόκλωνο RNA είναι αρκετά ασταθές και αφετέρου για την ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης.

#### Μεθοδολογία

Η διαδικασία πραγματοποιείται εντός θερμοκλωπιητή. Ο ρόλος των τυχαίων εκκινητών είναι, χάριν της μικρής εξειδίκευσής τους, να προσδένονται τυχαία στο μόριο του RNA έτσι ώστε να υβριδοποιηθούν και να συντεθεί η συμπληρωματική αλυσίδα κατά μήκος του μορίου και όχι μόνο σε κάποιο τμήμα του.

1. Προσθέτουμε το RNA σε αποστειρωμένο PCR σωληνάκι μαζί τους τυχαίους εκκινητές (random primers). Επώαση σε θερμοκρασία 70°C για δέκα (10) λεπτά στο θερμοκυκλοποιητή
2. Τοποθέτηση των δειγμάτων στον πάγο για πέντε (5) λεπτά και προσθήκη των υπόλοιπων αντιδραστηρίων, σύμφωνα με τον πίνακα
3. Επώαση στους 42°C για εξήντα (60) λεπτά και τέλος στους 80°C για δέκα (10) λεπτά.

Αντιδραστήρια	Συγκέντρωση
Τυχαίοι εκκινητές	1,5μl(400 ng)
dNTPs	2μl(40mM)
Buffer	4μl(1X)
RNase inhibitor	1,2μl(40units)
Αντίστροφη Μεταγραφάση	1,2μl(200 units)
ddH <sub>2</sub> O	Συμπληρώνει τον όγκο
Τελικός Όγκος (V)	40μl

### 3.5 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα(gel) αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση είναι το φαινόμενο της κίνησης χημικών ενώσεων (κυρίως πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων) ενσωματωμένων μέσα σε ένα πήκτωμα (gel) με την επίδραση ηλεκτρικού ρεύματος. Κατά τη διοχέτευση ηλεκτρικού ρεύματος μέσω ηλεκτροδίων στο μέσο, τα φορτισμένα σωματίδια κινούνται προς τα ηλεκτρόδια με ταχύτητες διαφορετικές ανάλογα με το φορτίο τους και αντιστρόφως ανάλογα με το μέγεθός τους. Έτσι τα περισσότερο φορτισμένα και μικρότερα μόρια απομακρύνονται περισσότερο από το αρχικό σημείο, ενώ τα μεγαλύτερα και λιγότερο φορτισμένα λιγότερο, οπότε επέρχεται διαχωρισμός. Μετά τη λήξη εφαρμογής του ηλεκτρικού πεδίου οι ενώσεις, που προηγουμένως κινούνταν σε αυτό, σταματούν την κίνηση τους και συσσωρεύονται σε μεγάλες συγκεντρώσεις σε ευδιάκριτες ζώνες (μπάντες).

Η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης παρακολουθείται είτε με γυμνό μάτι, παρακολουθώντας τα δύο συστατικά του διαλύματος φόρτωσης (μπλε βρωμοφαινόλης και κυανό ξυλόλης), ή με έκθεση του πηκτώματος σε υπεριώδη ακτινοβολία.

#### Μεθοδολογία

Για την παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης 1%, 0,5x TBE ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία:

1. Ζύγιση 1,6gr αγαρόζης και προσθήκη σε κωνική φιάλη
2. Αραίωση του TBE 5x σε TBE 0,5x
3. Προσθήκη 160ml TBE 0,5x στην ίδια κωνική φιάλη με την αγαρόζη
4. Θέρμανση του διαλύματος για λίγα λεπτά, με ανάδευση ανά τακτά χρονικά διαστήματα, έως ότου διαλυθεί πλήρως η αγαρόζη
5. Ψύξη της κωνικής φιάλης σε τρεχούμενο νερό με συνεχή ανάδευση, προσέχοντας να μην πήξει το πηκτώμα
6. Προσθήκη βωμιούχου αιθιδίου και ανακίνηση
7. Μεταφορά του πηκτώματος σε καλούπια και δημιουργία μικρών πηγαδιών στο πηκτώμα
8. Αναμονή μέχρι τη στερεοποίηση του πηκτώματος
9. Τοποθέτηση του πηκτώματος στη συσκευή ηλεκτροφόρησης
10. Φόρτωση δειγμάτων ύστερα από την προσθήκη διαλύματος φόρτωσης σε κάθε δείγμα καθώς και του μάρτυρα μοριακού βάρους 1kb/1000bp και συγκέντρωση 0.1 μg/μl.

### **3.6 Απομόνωση μορίων DNA από πηκτώμα αγαρόζης (gel extraction)**

Η ανάκτηση από πηκτώμα (gel extraction) είναι μία τεχνική που χρησιμοποιείται για την απομόνωση ενός επιθυμητού τμήματος DNA από ένα πηκτώμα αγαρόζης μετά από ηλεκτροφόρηση.

Αφού τα δείγματα του DNA ηλεκτροφορεθούν στο πηκτώμα αγαρόζης, η ανάκτηση περιλαμβάνει τέσσερα βασικά βήματα: τον προσδιορισμό των τμημάτων που μας ενδιαφέρουν, την απομόνωση των αντίστοιχων ζωνών, την απομόνωση του DNA από αυτά τα κομμάτια και την απομάκρυνση των συνοδευτικών αλάτων και προσμίξεων.

#### *Μεθοδολογία*

Εκθέτουμε το πηκτώμα αγαρόζης σε UV ακτινοβολία ώστε να ανιχνεύσουμε τις ζώνες DNA και με ένα κοπίδι κόβουμε τις επιθυμητές ζώνες (η έκθεση του πηκτώματος πρέπει να είναι η ελάχιστη δυνατή προκειμένου να αποτραπεί πιθανή μεταλλαξιγένεση του DNA)

1. Τα τμήματα του πηκτώματος με το DNA τοποθετούνται σε καθαρά σωληνάκια erpendorf 1,5ml και ζυγίζονται
2. Προστίθεται ίσος όγκος Buffer GB με του τμήματος στο erpendorf
3. Τα erpendorf τοποθετούνται στο υδατόλουτρο στους 55°C μέχρις ότου διαλυτοποιηθεί το gel
4. Ακολουθεί ανάδευση στο Vortex και επιστροφή στο υδατόλουτρο
5. Μεταφορά του περιεχομένου των erpendorf στα ειδικά column tubes
6. Το έκλουσμα απομακρύνεται
7. Προσθήκη 750ml Wash Buffer, φυγοκέντρωση στα 10.000g για ένα (1) λεπτό και απομακρύνεται το έκλουσμα
8. Το επάνω μέρος του column tube μεταφέρεται σε νέο αποστειρωμένο erpendorf
9. Προσθήκη 25ml Elution Buffer και αναμονή για δύο (2) λεπτά
10. Φυγοκέντρωση στα 10.000g για ένα (1) λεπτό.

### **3.7 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)**

Η Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR) είναι από τις πιο δημοφιλείς βιοχημικές μεθόδους και χρησιμοποιείται για τον ενζυμικό πολλαπλασιασμό ενός ή λίγων αντιγράφων μιας στοχευμένης νουκλεοτιδικής αλληλουχίας, παράγοντας χιλιάδες έως εκατομμύρια αντίγραφα αυτού του κομματιού.

Η PCR βασίζεται σε θερμικούς κύκλους, οι οποίοι περιλαμβάνουν μία σειρά επαναλαμβανόμενων εναλλαγών θερμοκρασίας. Αρχικά με αύξηση της θερμοκρασίας

επιτυγχάνεται η αποδιάταξη του δίκλωνου DNA. Στη συνέχεια με μείωση της θερμοκρασίας ο κάθε κλώνος χρησιμοποιείται ως εκμαγείο για την DNA πολυμεράση, η οποία πολλαπλασιάζει το DNA στόχο. Αυτό επιτυγχάνεται με τη χρήση εκκινητών (primers), συμπληρωματικών προς την αλληλουχία DNA. Με τους επαναλαμβανόμενους κύκλους λοιπόν, η αλληλουχία στόχος πολλαπλασιάζεται με εκθετικό ρυθμό.

Στάδια PCR: 1. Στάδιο εκκίνησης (initialization step)

Εφαρμογή υψηλής θερμοκρασίας (94-95°C) με σκοπό την ενεργοποίηση της DNA πολυμεράσης.

2. Στάδιο αποδιάταξης (denaturation step)

Σε αυτό το στάδιο ξεκινά ο πρώτος κύκλος της αντίδρασης με θέρμανση στους 94-95°C για 20-30 δευτερόλεπτα. Το DNA αποδιατάσσεται με το σπάσιμο των δεσμών υδρογόνου μεταξύ των συμπληρωματικών βάσεων παρέχοντας μονόκλινα μόρια.

3. Στάδιο υβριδοποίησης (annealing step)

Μείωση της θερμοκρασίας της αντίδρασης στους 50-65°C για 20-40 δευτερόλεπτα, ώστε να επιτραπεί η υβριδοποίηση των εκκινητών στα μονόκλινα μόρια. Η θερμοκρασία αυτή ονομάζεται  $T_{an}$  και είναι ειδική για κάθε ζεύγος εκκινητών (3-5 βαθμοί χαμηλότερη από το  $T_m$  των εκκινητών που χρησιμοποιούνται).

4. Στάδιο επιμήκυνσης (extension/elongation step)

Η θερμοκρασία σε αυτό το στάδιο εξαρτάται από τη DNA πολυμεράση που χρησιμοποιείται. Συνήθως κυμαίνεται από 72-74°C. Αυτό είναι το στάδιο που η DNA πολυμεράση συνθέτει τον συμπληρωματικό κλώνο για κάθε μονόκλινο κομμάτι προσθέτοντας το κατάλληλο νουκλεοτίδιο κάθε φορά. Εδώ τελειώνει και ο πρώτος κύκλος της αντίδρασης.

5. Στάδιο τελικής επιμήκυνσης (final elongation)

Μετά τον τελευταίο κύκλο η αντίδραση παραμένει στους 70-74°C για 4-15 λεπτά, ώστε όλα τα μονόκλινα κομμάτια να προλάβουν να γίνουν δίκλινα.

6. Στάδιο διατήρησης (final hold)

Ψύξη στους 4°C επ' αόριστον για διατήρηση μικρής χρονικής περιόδου.

### Μεθοδολογία

Σε σωληνάκια PCR προστίθενται τα αντιδραστήρια που αναγράφονται στον πίνακα και στη συνέχεια εισάγονται στο θερμοκυκλοποιητή, όπου προσδιορίζεται ο όγκος της αντίδρασης καθώς και οι συνθήκες (Παράρτημα 6.1).

Αντιδραστήρια	Συγκέντρωση		
DNA	1μl	94°C	5min
Buffer	2μl(1X)	94°C	30sec
dNTPs	0,4μl(0,8mM)	$T_{an}$	30sec
Εκκινητής F	0,7μl(0,4-0,6μM)	72°C	1kb/sec
Εκκινητής R	0,7μl(0,4-0,6μM)	72°C	4min
Taq Πολυμεράση	0,2μl(1unit)	4°C	∞
ddH <sub>2</sub> O	Συμπληρώνει τον όγκο		
Τελικός Όγκος (V)	20μl		

} 29 κύκλοι

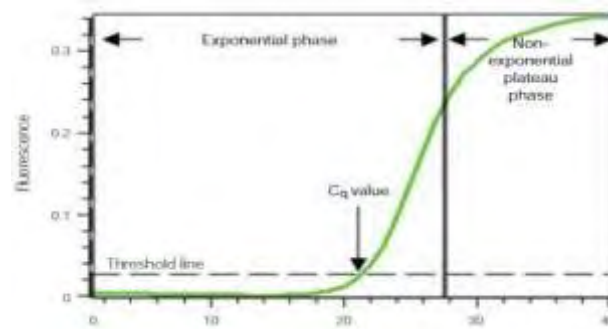


### 3.8 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real Time PCR)

Η ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (qPCR), γνωστή και ως αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-Time PCR, RT-PCR) είναι μία τεχνική μοριακής βιολογίας που βασίζεται στις αρχές της μεθόδου PCR. Χρησιμοποιείται για την ενίσχυση και ταυτόχρονα την ποσοτικοποίηση μίας ή περισσότερων ειδικών αλληλουχιών σε ένα δείγμα DNA. Η Real-Time PCR χρησιμεύει στον ακριβή προσδιορισμό της ποσότητας DNA ή RNA που βρίσκεται αρχικά σε ένα δείγμα, καθώς και στη σύγκριση των ποσοτικών τιμών της ίδιας αλληλουχίας μεταξύ διαφορετικών δειγμάτων. Η ποσότητα αυτή μπορεί να είναι είτε ένας απόλυτος αριθμός των αντιγράφων ή μία σχετική ποσότητα μετά από κανονικοποίηση.

Η πιο κοινή μέθοδος για την ανίχνευση των προϊόντων με ποσοτική PCR βασίζεται στη χρήση μη ειδικών φθορίζουσων χρωστικών, όπως το SYBR Green, που παρεμβάλλονται σε οποιοδήποτε δίκλωνο DNA που συντίθεται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης, παράγοντας φθορισμό. Τις περισσότερες φορές προτιμάται, ωστόσο παρουσιάζει ένα σημαντικό μειονέκτημα. Εφόσον η χρωστική αυτή ενσωματώνεται μη ειδικά σε οποιοδήποτε δίκλωνο DNA παράγεται, θα δεσμεύεται και σε τμήματα DNA εκτός του μορίου στόχου, συμπεριλαμβανομένων και των διμερών των εκκινητών ή των μη ειδικών προϊόντων που πιθανόν να ενισχύονται, γεγονός που οδηγεί τελικά σε αύξηση του συνολικού φθορισμού. Το SYBR Green, διεγείρεται με τη χρήση μπλε ακτινοβολίας ( $\lambda=488\text{nm}$ ) και εκπέμπει πράσινο φως ( $\lambda=522\text{nm}$ ).

Κατά τη διάρκεια των πρώτων κύκλων της Real-Time PCR, ο φθορισμός είναι ασθενής. Καθώς περνάμε στους επόμενους, το DNA πολλαπλασιάζεται και η αντίδραση περνά στην εκθετική φάση, αφού μετά από κάθε κύκλο το προϊόν θεωρητικά διπλασιάζεται. Όταν το προϊόν είναι αρκετά ενισχυμένο ώστε να δώσει σήμα φθορισμού, τότε ο κύκλος στον οποίο συμβαίνει αυτό ονομάζεται κύκλος ποσοτικοποίησης (quantification cycle,  $C_q$ ) και το όριο ανίχνευσης φθορισμού ονομάζεται threshold ή threshold cycle ( $C_T$ ). Κατά τους τελευταίους κύκλους, σημειώνεται μία γραμμική φάση όπου πλέον περιορίζεται η συγκέντρωση των αντιδρώντων και το ένζυμο έχει ελαττωμένη δραστηριότητα, μέχρι τελικά να φθάσουμε σε ένα plateau, όπου η αντίδραση φθάνει σε κορεσμό και σταματάει (Εικ. 3.2).



Εικόνα 3.2: Σχηματική απεικόνιση καμπύλης φθορισμού Real-Time PCR.

Επιπλέον, για να εξασφαλιστεί η ακρίβεια όσον αφορά στην ποσοτικοποίηση, είναι συνήθως απαραίτητο ένα σταθερώς εκφραζόμενο γονίδιο (house keeping gene, hkg). Τα hkg χρησιμοποιούνται ευρέως ως εσωτερικοί μάρτυρες (controls) για την κανονικοποίηση της έκφρασης του γονιδίου στόχου σε μεθόδους όπως η RT-PCR και αποτελεί το γονίδιο αναφοράς. Επίσης, πιστεύεται ότι εκφράζονται σε όλα τα κύτταρα του οργανισμού σε παρόμοια επίπεδα, διότι υποτίθεται ότι αυτά τα γονίδια απαιτούνται για τη διατήρηση της βασικής κυτταρικής λειτουργίας ως συστατικά γονίδια. Παρ' όλα αυτά, πειράματα RT-PCR αποκαλύπτουν ότι η έκφραση των hkg ποικίλει ανάλογα με το αναπτυξιακό επίπεδο, τον τύπο του ιστού, τις πειραματικές συνθήκες κ.ά (Lin *et al.*, 2012).

Τέλος, το προϊόν που παράγεται στην αντίδραση Real-Time PCR, πρέπει να είναι από 80-120bp, ώστε να εξασφαλιστεί η ειδικότητα και η υψηλή απόδοση της ενίσχυσης. Συγκεκριμένα, η ειδικότητα της ενίσχυσης μπορεί να διαπιστωθεί μέσω της καμπύλης αποδιάταξης (melting curve analysis) μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης. Με την ανάλυση αυτή προσδιορίζεται η θερμοκρασία τήξης ( $T_m$ ) των προϊόντων της αντίδρασης. Έτσι διαπιστώνεται τελικά ο τυχόν σχηματισμός διμερών των εκκινητών ή μη ειδικών προϊόντων, που λόγω μικρότερου μεγέθους παρουσιάζουν χαμηλότερη θερμοκρασία τήξης.

Στην παρούσα διαδικασία η ανάλυση όλων των δεδομένων της Real-Time PCR έγινε με χρήση του προγράμματος CFX Manager Software (Bio-Rad CFX96). Τέλος η σχετική ποσοτικοποίηση πραγματοποιείται με τη μέθοδο σύγκρισης των  $C_T$  ( $\Delta\Delta C_T$  Method Using a Reference Gene) (Παράρτημα 6.3).

### Μεθοδολογία

#### Αντιδραστήρια

- cDNA
- Εκκινητές(Forward,Reverse)
- iTaq Universal SYBR Green Supermix(Mix διάλυμα, το οποίο περιέχει hot start iTaq DNA Polymerase, dNTPs,  $MgCl_2$ , SYBR<sup>®</sup> Green I dye)

Αρχικά πραγματοποιείται υπολογισμός των ποσοτήτων που θα χρειαστούν σε τελικό όγκο αντίδρασης 15μl. Τα αντιδραστήρια τοποθετούνται σε ειδικά PCR tube strip και εν συνεχεία στον θερμοκυκλοποιητή. Σε αυτό το σημείο αξίζει να σημειωθεί πως για κάθε δείγμα, εκτός από την ενίσχυση με το εκάστοτε ζεύγος εκκινητή, πραγματοποιείται και μία αντίδραση με τους εκκινητές του γονιδίου αναφοράς, house keeping gene. Ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήσαμε την *Actin3*.

Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος	Κύκλος
Αρχική αποδιάταξη	95°C	4min	1
Αποδιάταξη	95°C	20sec	39
Υβριδισμός	$T_a$	30sec	
Απαλοιφή Θορύβου	95°C-55°C	Ανά 5sec μείωση T κατά 0,5°C	1

### 3.9 Δημιουργία δίκλωνου RNA (dsRNA)

Αρχικά σχεδιάστηκαν εκκινητές για κάθε γονίδιο-στόχο (Παράρτημα 6.5), των οποίων οι αλληλουχίες προέκυψαν από το E-RNAi (Εικ 6.1). Για τη δημιουργία των δίκλωνων τμημάτων RNA χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα η θέση εκκινητή T7, ανοδικά της μεταγραφόμενης αλληλουχίας των γονιδίων-στόχων, ώστε να είναι σε θέση η T7 Polymerase να ξεκινήσει τη διαδικασία μεταγραφής. Εν συνεχεία πραγματοποιήθηκε PCR για τα γονίδια στόχους (Εικ. 4.2), από την οποία εκτιμήθηκε η συγκέντρωσή τους και εξακριβώθηκε ότι τα προϊόντα είναι μοναδικά, χωρίς προσμίξεις. Η μετατροπή των προϊόντων PCR σε δίκλωνο RNA πραγματοποιήθηκε με βάση το πρωτόκολλο του MEGAscript<sup>®</sup> Kits της Ambion.

## Αντιδραστήρια

- 10X Reaction Buffer
- 4 ριβονουκλεοτίδια (ATP, CTP, GTP, UTP)
- RNA Polymerase Enzyme Mix
- Nuclease-free Water
- TURBO DNase
- Διάλυμα οξικού αμμωνίου
- Φαινόλη, χλωροφόρμιο
- Ισοπροπανόλη

## Μεθοδολογία (Παράρτημα 6.2)

1. Ξεπαγώνουμε τα αντιδραστήρια, προσέχοντας τα διαλύματα των ριβονουκλεοτιδίων να είναι τοποθετημένα στον πάγο, αλλά το 10X Reaction Buffer να είναι στον πάγκο σε θερμοκρασία δωματίου
2. Προσθήκη του νερού, κατόπιν των ριβονουκλεοτιδίων και τέλος του Buffer σε tube σε θερμοκρασία δωματίου, έτσι ώστε να μην καθιζάνει το DNA.

Αντιδραστήρια	Συγκέντρωση
Nuclease-free Water	Συμπληρώνει τον όγκο
4 ribonucleotide solutions	8μl(2μl από το καθένα)
10X Reaction Buffer	2μl
DNA	Εξαρτάται από τη συγκέντρωση
RNA Polymerase Enzyme Mix	2μl
Τελικός Όγκος (V)	

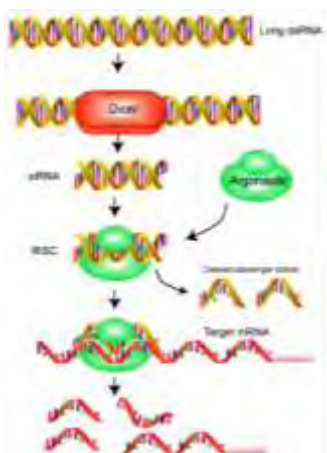
3. Καλή ανάμειξη με πιπέτα
4. Επώαση στους 37° C για δεκαέξι (16) ώρες
5. Προσθήκη TURBO DNase και επώαση στους 37° C για δεκαπέντε (15) λεπτά
6. Προσθήκη 115 μl Nuclease-free Water και 15 μl διαλύματος οξικού αμμωνίου και καλή ανάμειξη.
7. Προσθήκη ίσης ποσότητας φαινόλης/χλωροφορμίου και μεταφορά της υδατικής φάσης σε καθαρό tube
8. Προσθήκη ενός όγκου ισοπροπανόλης, για να καθιζάνει το RNA και καλή ανάμειξη
9. Φυγοκέντρωση στους 4° C για 45 λεπτά
10. Προσεκτική μεταφορά του υπερκείμενου
11. Προσθήκη καθαρής αιθανόλης 70% και φυγοκέντρωση στους 4° C για 5 λεπτά
12. Προσεκτική μεταφορά του υπερκείμενου
13. Αναδιάλυση του RNA σε 25μl H<sub>2</sub>O
14. Ηλεκτροφόρηση μικρής ποσότητας του RNA για ποσοτικοποίηση

### 3.10 Παροδική Αποσιώπηση γονιδίων (RNA silencing)

Γονιδιακή σίγηση ή αποσιώπηση είναι ένας γενικός όρος που περιγράφει επιγενετικές διαδικασίες της γονιδιακής ρύθμισης. Είναι μια μετα-μεταγραφική διαδικασία και πυροδοτείται από την εισαγωγή του δίκλωνου RNA (dsRNA), το οποίο οδηγεί σε αποσιώπηση γονιδίου-στόχου (gene of interest). Η γενική διαδικασία της αποσιώπησης απεικονίζεται παρακάτω (Εικ. 3.4).

Το RNAi μονοπάτι στα κύτταρα ξεκινάει από το ένζυμο DICER, η οποία ως RNase κόβει τα dsRNAs σε μικρότερα των 21–25 νουκλεοτιδίων, που ονομάζονται siRNAs. Αυτά ενσωματώνονται σε ένα πρωτεϊνικό σύμπλοκο με το όνομα RISC. Κατόπιν η RISC

κατευθύνεται σε εκείνα τα mRNA τα οποία είναι συμπληρωματικά με τα siRNAs και τα κόβει, με αποτέλεσμα την αποσιώπηση των εκάστοτε γονιδίων. Η πρωτεΐνη Argonaute είναι το κύριο συστατικό της RISC και μεσολαβεί στην αναγνώριση του στόχου και την κοπή αυτού.



Στα έντομα,, RNAi επιτυγχάνεται με παροχή των dsRNAs είτε με μικροέγχυση είτε μέσω της τροφής (dsRNA feeding) (Li *et al.* 2015) ή με βακτήρια που εκφράζουν dsRNA (διαγονιδιακή έκφραση). Σε αντίστοιχη έρευνα σε μία προσπάθεια για συστηματική αποσιώπηση γονιδίων στο *B. dorsalis*, τα αποτελέσματα της qRT-PCR κατέδειξαν ότι απευθείας σίτιση (feeding) με dsRNA και σίτιση με βακτήρια που εκφράζουν dsRNA επάγουν RNAi (Li *et al.*, 2011).

Η αποσιώπηση των γονιδίων στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε με έγχυση του dsRNA σε ενήλικα έντομα με τη χρήση του μηχανήματος Nanoject II.

Εικόνα 3.4: Διαδικασία RNAi

#### Μεθοδολογία

1. Συνδέουμε το μηχανήμα
  2. Καθαρίζουμε τα εξαρτήματα με αιθανόλη 70%
  3. Επιλέγουμε γυάλινη βελόνα quartz και την κόβουμε κατάλληλα έτσι ώστε να χρησιμοποιηθεί για την έγχυση
  4. Γεμίζουμε τη βελόνα με mineral oil προσεκτικά ώστε να μην δημιουργηθούν φυσαλίδες
  5. Τοποθετούμε κατάλληλα τη βελόνα στο μηχανήμα
  6. Γεμίζουμε τη βελόνα με το dsRNA
  7. Εγχύουμε το dsRNA απευθείας στην αιμολέμφο στα αναισθητοποιημένα έντομα και πιο συγκεκριμένα στην περιοχή κάτω από το φτερό.
- Σημειώνεται ότι η ένεση σε κάθε έντομο γίνεται εις διπλούν για μεγαλύτερα ποσοστά επιτυχίας και περιλαμβάνει τη μεταφορά 69nl του dsRNA κάθε γονιδίου.

## 4. Αποτελέσματα

### 4.1 Μελέτη έκφρασης γονιδίων *PBP5* και *SNMP1*

Τα γονίδια *PBP5* και *SNMP1* ταυτοποιήθηκαν με RNAseq και πραγματοποιήθηκε μελέτη της έκφρασης αυτών με σκοπό την αποσαφήνιση του ρόλου τους στην προσυζευκτική επικοινωνία των εντόμων *B. oleae* και κατ' επέκταση στην αναπαραγωγική συμπεριφορά τους. Για τη διερεύνηση των επιπέδων έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων κατά τη διάρκεια της σεξουαλικής ωρίμανσης των εντόμων, ο πειραματικός σχεδιασμός έπρεπε να εξασφαλίζει τις εξής παραμέτρους: την πρώτη μέρα μεταμόρφωσης της νύμφης σε ενήλικο έντομο πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός αρσενικών και θηλυκών εντόμων και διατήρησή τους σε ξεχωριστά κλουβιά, έτσι ώστε να αποφευχθεί η προσυζευκτική επικοινωνία. Η μέρα αυτή για τα πειραματικά δεδομένα θεωρείται η μέρα μηδέν (0), όπου τα έντομα ήταν ακόμα σεξουαλικά ανώριμα. Αυτήν την ημέρα συλλέχθηκαν οκτώ (8) αρσενικά και οκτώ (8) θηλυκά έντομα και απομονώθηκαν οι κεραίες των εντόμων για την περαιτέρω λειτουργική ανάλυση των υπό μελέτη γονιδίων. Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και για την τέταρτη (4) ημέρα, όπου τα έντομα εξακολουθούσαν να είναι ανώριμα σεξουαλικά. Επιπλέον απομονώθηκαν οι κεραίες από τον ίδιο αριθμό εντόμων την έβδομη (7) και δέκατη (10) ημέρα, κατά τις οποίες τα έντομα πλέον θεωρούνταν σεξουαλικά ώριμα. Επιπρόσθετα τη δέκατη (10) ημέρα άλλα οκτώ (8) αρσενικά και οκτώ (8) θηλυκά έντομα ήρθαν σε επαφή έτσι ώστε να συζευχθούν (mating) και ύστερα από 12 ώρες συλλέχθηκαν και πάλι οι κεραίες. Ατή η ημέρα εθεωρείτο ως ενδέκατη (11) μέρα. Πλέον τα έντομα είχαν μετασυζευκτική επικοινωνία. Τέλος συλλέχθηκαν έντομα τη δωδέκατη (12) ημέρα, δηλαδή δύο μέρες μετά τη σύζευξη, αφού βέβαια τα έντομα είχαν διαχωριστεί σε διαφορετικά κλουβιά, ώστε να αποφευχθεί πιθανή άλλη σύζευξη.

Συνοψίζοντας υπήρχαν οι ακόλουθες συνθήκες διατήρησης των εντόμων για τη συλλογή ιστών (Εικ. 3.1):

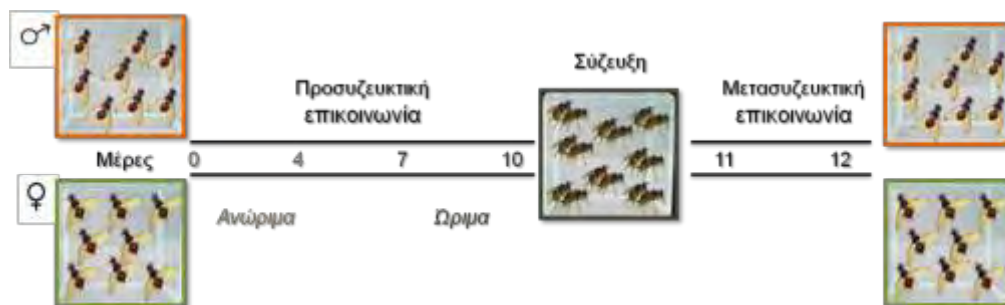
Διαχωρισμένα ανά φύλο σε γειτονικά κλουβιά ώστε να επιτρέπεται η προσυζευκτική επικοινωνία:

- i. Σεξουαλικά ανώριμων ενήλικων εντόμων 0 και 4<sup>ης</sup> ημέρας
- ii. Σεξουαλικά ώριμων ενήλικων εντόμων 7<sup>ης</sup> και 10<sup>ης</sup> ημέρας
- iii. Σεξουαλικά ώριμων ενήλικων εντόμων 10<sup>ης</sup> ημέρας, 12 ώρες μετά τη σύζευξη (11<sup>th</sup> day p-m)

Διαχωρισμένα ανά φύλο σε γειτονικά κλουβιά ώστε να επιτρέπεται η μετασυζευκτική επικοινωνία:

- iv. Σεξουαλικά ώριμων ενήλικων εντόμων 12<sup>ης</sup> ημέρας

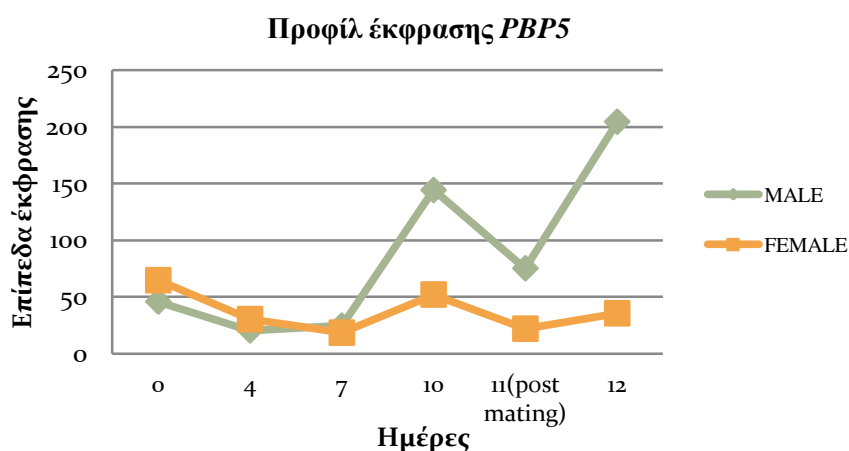
Ακολούθησε απομόνωση RNA από τις κεραίες των αρσενικών και θηλυκών εντόμων και τα επίπεδα έκφρασης των επιλεγμένων γονιδίων καθορίστηκαν με ποσοτική Real-time PCR. Ως hkg χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο της *Actin3* και τα αποτελέσματα κανονικοποιήθηκαν ως προς αυτό.



Εικόνα 3.1: Σχηματική αναπαράσταση των συνθηκών χειρισμού των εντόμων στο εντομοτροφείο κατά τη διεξαγωγή της πειραματικής διαδικασίας.

#### 4.1.1 Έκφραση γονιδίου *PBP5*

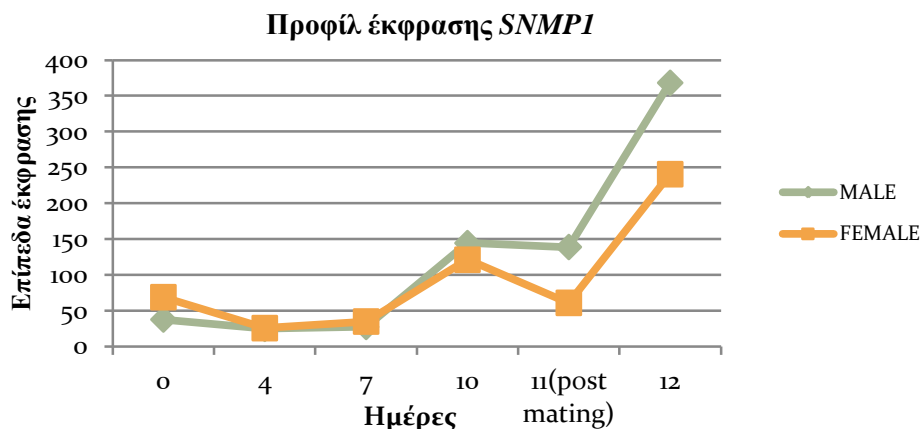
Από το προφίλ έκφρασης του γονιδίου *PBP5* (Γράφημα 4.1) παρατηρούμε ότι από την 0 και 4<sup>η</sup> ημέρα κατά τις οποίες τα έντομα θεωρούνται σεξουαλικά ανώριμα τα επίπεδα των μεταγράφων του γονιδίου, τόσο των αρσενικών όσο και των θηλυκών εντόμων, κυμαίνονται χαμηλά. Από την 7<sup>η</sup> ημέρα τα έντομα πλέον θεωρούνται σεξουαλικά ώριμα και τα επίπεδα διατηρούνται σταθερά. Αύξηση των επιπέδων των μεταγράφων του γονιδίου παρατηρείται μετά την 7<sup>η</sup> μέρα. Συγκεκριμένα η έκφραση κατά τη 10<sup>η</sup> μέρα είναι μεγαλύτερη στα αρσενικά απ' ό,τι θηλυκά έντομα. Την 11<sup>η</sup> ημέρα, δηλαδή μια μέρα μετά τη σύζευξη (post-mating), τα επίπεδα μειώνονται, με αυτά των αρσενικών εντόμων να είναι υψηλότερα των θηλυκών. Τελικά τη 12<sup>η</sup> ημέρα παρατηρούμε ότι τα επίπεδα μεταγράφων του γονιδίου *PBP5* στα αρσενικά έντομα αυξάνονται ξανά, ενώ αυτά των θηλυκών παραμένουν σε χαμηλά επίπεδα.



**Γράφημα 4. 1:** Προφίλ έκφρασης του γονιδίου *PBP5* αρσενικών και θηλυκών εντόμων μετά από Real-Time PCR σε κεραίες υπό συγκεκριμένες συνθήκες και χρονικές στιγμές. Ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε *Actin3*.

#### 4.1.2 Έκφραση γονιδίου *SNMP1*

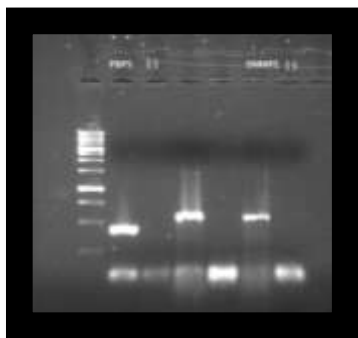
Από το προφίλ έκφρασης του γονιδίου *SNMP1* (Γράφημα 4.2) παρατηρούμε ότι από την 0 και 4<sup>η</sup> ημέρα, κατά τις οποίες τα έντομα θεωρούνται σεξουαλικά ανώριμα τα επίπεδα έκφρασης των μεταγράφων του γονιδίου, τόσο των αρσενικών όσο και των θηλυκών εντόμων, δεν έχουν μεγάλες αποκλίσεις και κυμαίνονται σε χαμηλές τιμές. Από την 7<sup>η</sup> ημέρα τα έντομα πλέον θεωρούνται σεξουαλικά ώριμα και τα επίπεδα διατηρούνται σταθερά. Την ημέρα 10<sup>η</sup> παρατηρείται αύξηση των επιπέδων των μεταγράφων του γονιδίου τόσο στα αρσενικά όσο και στα θηλυκά. Την 11<sup>η</sup> όμως ημέρα, δηλαδή μια μέρα μετά τη σύζευξη (post-mating), τα επίπεδα των μεταγράφων του γονιδίου στα θηλυκά μειώνονται, ενώ αυτά των αρσενικών παραμένουν σταθερά. Τελικά τη 12<sup>η</sup> ημέρα παρατηρούμε ότι τα επίπεδα των μεταγράφων του γονιδίου *SNMP1* στα αρσενικά και θηλυκά έντομα αυξάνονται.



**Γράφημα 4.2:** Προφίλ έκφρασης του γονιδίου *SNMP1* αρσενικών και θηλυκών εντόμων μετά από Real-Time PCR σε κεραιές υπό συγκεκριμένες συνθήκες και χρονικές στιγμές. Ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε *Actin3*.

## 4.2 Παροδική σίγηση γονιδίων *PBP5* και *SNMP1*

Για τη δημιουργία δίκλωνων τμημάτων RNA (dsRNA) σχεδιάστηκαν εκκινητές (Παράρτημα 6.5) και χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα η θέση εκκινητή T7, ανοδικά της μεταγραφόμενης αλληλουχίας των γονιδίων-στόχων. Εν συνεχεία πραγματοποιήθηκε PCR, από την οποία εκτιμήθηκε η συγκέντρωσή τους. Από την ποσοτικοποίηση προέκυψε ότι για 1μl *PBP5* και *SNMP1* αναλογούν 110ng/μl και 40ng/μl αντίστοιχα μετά την αναγωγή (Εικ. 4.2).

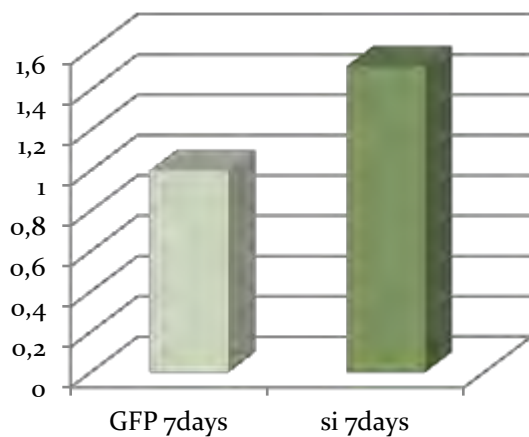


**Εικόνα 4.2:** Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης PCR προϊόντων 2μl *PBP5* και 3μl *SNMP1*.

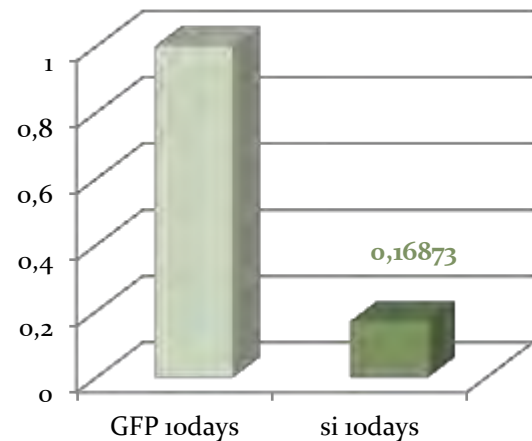
Για να ελεγχεί ο λειτουργικός ρόλος των υπό μελέτη γονιδίων ακολούθησε παροδική αποσιώπηση των γονιδίων *PBP5* και *SNMP1* σε αρσενικά και θηλυκά έντομα. Για το σκοπό δημιουργήθηκαν δίκλιωνα τμήματα RNA (dsRNA) του εκάστοτε γονιδίου, τα οποία εγχύθηκαν απευθείας στην αιμολέμφο σε αρσενικά και θηλυκά έντομα την 6<sup>η</sup> ημέρα της ανάπτυξής τους. Παράλληλα, σε ίδιο αριθμό εντόμων εγχύθηκε και δίκλινο τμήμα RNA του γονιδίου *GFP* (dsGFP), το οποίο λειτουργεί ως δείγμα ελέγχου (control). Για τη διερεύνηση πιθανής αποσιώπησης των γονιδίων απομονώθηκαν ιστοί μια και τρεις μέρες αντίστοιχα μετά την έγχυση, δηλαδή την 7<sup>η</sup> και 10<sup>η</sup> ημέρα της ανάπτυξης των αρσενικών και θηλυκών εντόμων. Οι δύο αυτές ημέρες επιλέχθηκαν με βάση τα προφίλ έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων *PBP5* και *SNMP1*, κατά τις οποίες παρατηρείται αύξηση των επιπέδων των μεταγράφων των γονιδίων. Τα επίπεδα έκφρασης μελετήθηκαν με Real-Time PCR χρησιμοποιώντας ως hkg το γονίδιο *RpL19*, για την κανονικοποίηση των τιμών.

#### 4.2.1 Αποσιώπηση γονιδίου *PBP5* σε αρσενικά έντομα *B. oleae*

Παρατηρούμε ότι την 7<sup>η</sup> ημέρα, δηλαδή μια μέρα μετά την έγχυση των dsRNAs, η έκφραση του γονιδίου *PBP5* σε σχέση με το control είναι αυξημένη (γράφημα 4.3). Επομένως δεν πραγματοποιήθηκε σίγηση του γονιδίου. Τη 10<sup>η</sup> ημέρα σημειώθηκε σημαντική μείωση της έκφρασης του γονιδίου *PBP5*, με ποσοστό μείωσης 84%, κάτι που οδηγεί στο συμπέρασμα επιτυχίας της παροδικής αποσιώπησης του γονιδίου (γράφημα 4.4).



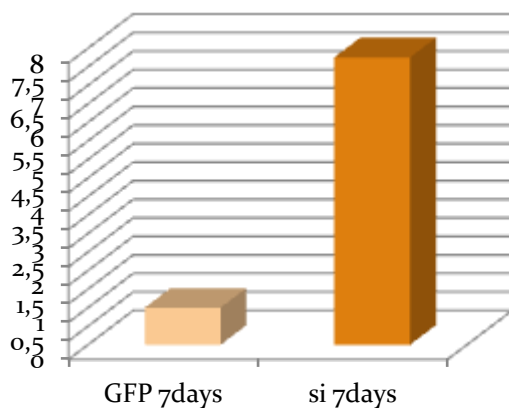
**Γράφημα 4.3:** Επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *PBP5* σε αρσενικά έντομα *B. oleae* την 7<sup>η</sup> ημέρα.



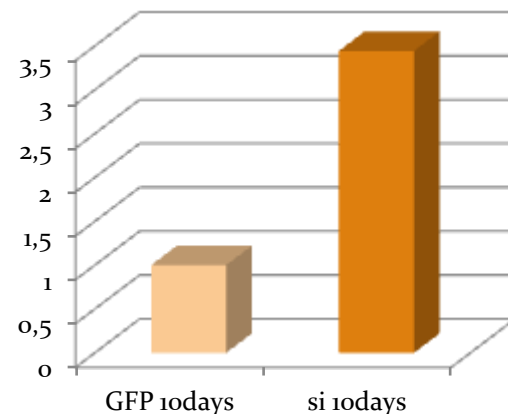
**Γράφημα 4.4:** Επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *PBP5* σε αρσενικά έντομα *B. oleae* την 10<sup>η</sup> ημέρα.

#### 4.2.2 Αποσιώπηση γονιδίου *PBP5* σε θηλυκά έντομα *B. oleae*

Όσον αφορά στα θηλυκά έντομα παρατηρείται ότι την 7<sup>η</sup> ημέρα, δηλαδή μια μέρα μετά την έγχυση των dsRNAs, η έκφραση του γονιδίου σε σχέση με το control είναι αυξημένη (γράφημα 4.5). Επομένως δεν πραγματοποιείται σίγηση του γονιδίου, όπως επίσης και τη 10<sup>η</sup> ημέρα (γράφημα 4.6), εφόσον και αυτήν παρατηρείται επίσης αύξηση του ποσοστού των μεταγράφων αν και σε χαμηλότερη τιμή από αυτήν της 7<sup>ης</sup> ημέρας.



**Γράφημα 4. 4:** Επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *PBP5* σε θηλυκά έντομα *B. oleae* την 7<sup>η</sup> ημέρα.

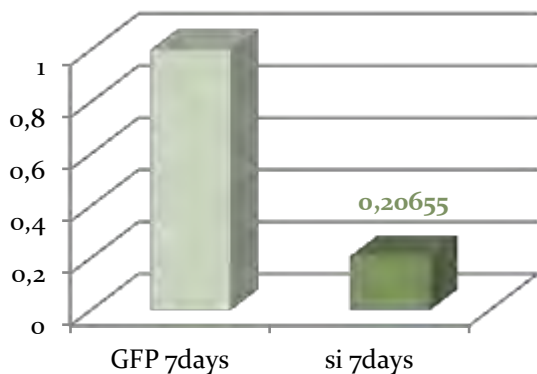


**Γράφημα 4. 3:** Επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *PBP5* σε θηλυκά έντομα *B. oleae* την 10<sup>η</sup> ημέρα.

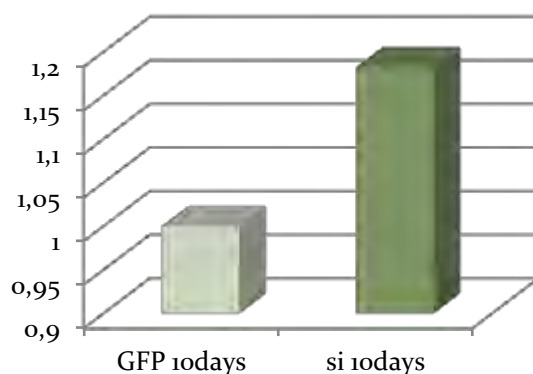


### 4.2.3 Αποσιώπιση γονιδίου *SNMP1* σε αρσενικά έντομα *B. oleae*

Παρατηρούμε ότι την 7<sup>η</sup> ημέρα πραγματοποιείται παροδική σίγηση αφού συγκριτικά με το control ο αριθμός των μεταγράφων μειώνεται, με ποσοστό αποσιώπισης 80% (γράφημα 4.7). Αντίθετα την 10<sup>η</sup> ο αριθμός των μεταγράφων αυξάνεται (γράφημα 4.8).



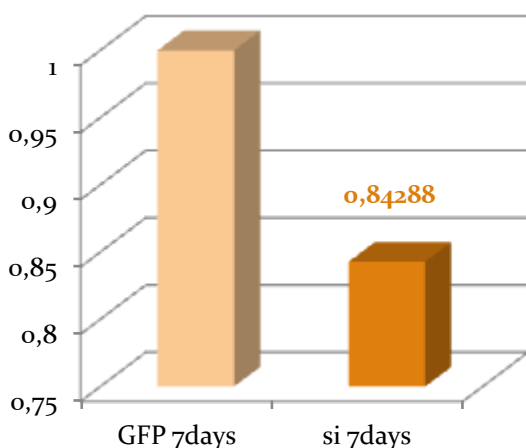
**Γράφημα 4. 7:** Επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *SNMP1* σε αρσενικά έντομα *B. oleae* την 7<sup>η</sup> ημέρα.



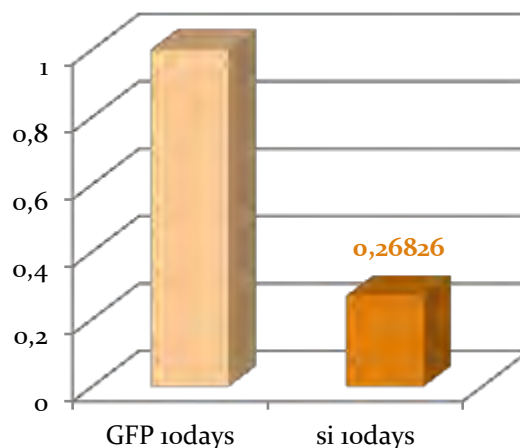
**Γράφημα 4. 8:** Επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *SNMP1* σε αρσενικά έντομα *B. oleae* την 10<sup>η</sup> ημέρα.

### 4.2.4 Αποσιώπιση γονιδίου *SNMP1* σε θηλυκά έντομα *B. oleae*

Όσον αφορά στα θηλυκά έντομα την 7<sup>η</sup> ημέρα παρατηρείται ότι η έκφραση του γονιδίου σε σχέση με το control μειώνεται, με ποσοστό 22%, άρα πραγματοποιείται σίγηση του γονιδίου (γράφημα 4.9). Την 10<sup>η</sup> ημέρα τα επίπεδα έκφρασης είναι περισσότερο μειωμένα με ποσοστό 84% (γράφημα 4.10). Αρά σημειώνεται ορατή μείωση των επιπέδων των μεταγράφων του *SNMP1*, γεγονός που υποδηλώνει επιτυχία παροδικής σίγησης.



**Γράφημα 4. 6:** Επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *SNMP1* σε θηλυκά έντομα *B. oleae* την 7<sup>η</sup> ημέρα.



**Γράφημα 4. 5:** Επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *SNMP1* σε θηλυκά έντομα *B. oleae* την 10<sup>η</sup> ημέρα.

## 5. Συζήτηση

Το οσφρητικό σύστημα του δάκου της ελιάς *B. oleae* αποτελεί αντικείμενο μελέτης λόγω της σπουδαιότητάς του, αφού τόσο η επιβίωση (εντοπισμός τροφής), όσο και η αναπαραγωγή (αναγνώριση συντρόφου και ωοαπόθεση) του δάκου της ελιάς εξαρτώνται από οσφρητικά ερεθίσματα. Πιστεύεται ότι η μελέτη του οσφρητικού μπορεί να συνεισφέρει στην ανάδειξη μορίων-κλειδιών που αφορούν σε οσφρητικές απαντήσεις, με σκοπό τον έλεγχο της συμπεριφοράς του εντόμου και κατ' επέκταση τη μείωση των πληθυσμών του.

Στόχος αυτής της εργασίας είναι η μελέτη των γονιδίων *PBP5* και *SNMPI*, που εμπλέκονται στο οσφρητικό σύστημα του εντόμου και η ανάδειξη αυτών ως στόχους, που θα συνεισφέρουν στην ανάπτυξη νέων εναλλακτικών μεθόδων καταπολέμησης του εντόμου *B. oleae*.

Με γνώμονα αυτό, ταυτοποιήθηκαν τα γονίδια *PBP5* και *SNMPI* μέσω RNAseq και μελετήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης αυτών με ποσοτική Real-Time PCR σε κεραίες αρσενικών και θηλυκών εντόμων *B. oleae* σε συγκεκριμένες χρονικές στιγμές και συνθήκες (Εικ. 3.1). Τα αποτελέσματα των λειτουργικών αναλύσεων κατέδειξαν διαφορετική έκφραση στα δύο φύλα και στις συνθήκες που διερευνήθηκαν, υποδεικνύοντας την πολυπλοκότητα των εμπλεκόμενων γονιδίων αλλά επιτρέποντας ωστόσο μια πρώτη εκτίμηση του ρόλου τους.

Πιο συγκεκριμένα για τα αρσενικά έντομα *B. oleae* παρατηρούμε ότι τις ημέρες 0 και 4<sup>η</sup> τα επίπεδα μεταγράφων του γονιδίου *PBP5* είναι χαμηλά. Αυτό πιθανότατα οφείλεται στο γεγονός ότι τα έντομα είναι ακόμα σεξουαλικά ανώριμα (γράφημα 4.1). Την 7<sup>η</sup> και 10<sup>η</sup> ημέρα τα επίπεδα των μεταγράφων του γονιδίου *PBP5* αυξάνονται και αυτό πιθανόν σημειώνεται επειδή τα έντομα πλέον είναι σεξουαλικά ώριμα, οπότε εκλύουν και προσλαμβάνουν φερομόνες. Η αύξηση αυτή ενδεχομένως να αιτιολογείται από το ότι τα θηλυκά έντομα *B. oleae* εκλύουν φερομόνες, ώστε να προσελκύσουν τα αρσενικά για ζευγάρωμα κι έτσι αυτά με τη σειρά τους να εκφράζουν σε υψηλά επίπεδα του *PBP5*, προκειμένου να δεσμεύσουν τις εκλυόμενες φερομόνες. Την 11<sup>η</sup> ημέρα, δηλαδή μια μέρα μετά τη σύζευξη (post-mating), τα επίπεδα μειώνονται, με αυτά των αρσενικών εντόμων να είναι υψηλότερα των θηλυκών, ενώ τελικά τη 12<sup>η</sup> ημέρα τα επίπεδα μεταγράφων του γονιδίου *PBP5* στα αρσενικά έντομα αυξάνονται ξανά. Η μεταβολή των επιπέδων των μεταγράφων του γονιδίου από την 11<sup>η</sup> και 12<sup>η</sup> ημέρα ερμηνεύεται πιθανότατα από το γεγονός ότι τα αρσενικά έντομα *B. oleae* είναι πολυγαμικά και μπορούν να ζευγαρώνουν ημερησίως εάν υπάρχουν διαθέσιμα θηλυκά (Zervas, 1982).

Για τα θηλυκά έντομα *B. oleae* παρατηρούμε ότι τις ημέρες 0 και 4<sup>η</sup> τα επίπεδα μεταγράφων του γονιδίου *PBP5* είναι χαμηλά. Αυτό πιθανότατα οφείλεται στο γεγονός ότι τα έντομα είναι ακόμα σεξουαλικά ανώριμα ώστε να ανταποκριθούν στην έκλυση φερομονών από τα αρσενικά (γράφημα 4.1). Την 7<sup>η</sup> και 10<sup>η</sup> ημέρα τα επίπεδα των μεταγράφων του γονιδίου αυξάνονται και αυτό πιθανόν σημειώνεται επειδή τα έντομα πλέον είναι σεξουαλικά ώριμα. Τη 10<sup>η</sup> ημέρα τα επίπεδα είναι αυξημένα, όμως λιγότερο σε σχέση με τα αρσενικά. Την 11<sup>η</sup> ημέρα και 12<sup>η</sup> ημέρα δεν παρατηρείται επιπλέον αύξηση της έκφρασης, αλλά μείωση. Αυτό συμβαίνει πιθανώς διότι, αν και τα αρσενικά ως πολυγαμικά εκλύουν ποσότητες σεξουαλικής φερομόνης muscalure, τα θηλυκά έντομα είναι ολιγογαμικά και ζευγαρώνουν 1-3 φορές κατά τη διάρκεια της ζωής τους (Tzanakakis *et al.*, 1968), σε σύγκριση με τα αρσενικά. Επομένως πιθανότατα δεν κρίνεται αναγκαία η έκφραση της οσμοδεσμευτικής πρωτεΐνης PBP5 από τα θηλυκά έντομα, ώστε να δεσμευτούν φερομόνες σχετικές με επόμενη σύζευξη, εκλυόμενες από τα αρσενικά. Άλλωστε τα θηλυκά έντομα *C. capitata* που έχουν ζευγαρώσει υπόκεινται σε δραματική και σχεδόν άμμεση αλλαγή της συμπεριφοράς τους από τις φερομόνες των αρσενικών ώστε να προχωρήσουν στην ωοαπόθεση στον ξενιστή και όχι σε επόμενη σύζευξη (Siciliano *et al.*, 2014).

Στο σκόρο *Agrotis ipsilon*, που η έκλυση σεξουαλικών φερομονών γίνεται από τα θηλυκά, η μελέτη των επιπέδων διαφορετικής έκφρασης στα δύο φύλα στις κεραίες, χρησιμοποιώντας ως hkg την  $\beta$ -actin, αποκάλυψε μικρή αύξηση των επιπέδων του γονιδίου στα θηλυκά σε σχέση με τα αρσενικά (Shao-Hua Gu *et al.*, 2014). Επιπλέον, στη μεσογειακή

μύγα *C. capitata*, που η έκλυση φερομονών γίνεται από τα αρσενικά έντομα, μελέτη των επιπέδων των μεταγράφων του *PBP5* αποκάλυψε αφθονία μεταγράφων στις κεραίες των αρσενικών και το ρόλο του αφενώς στην αναγνώριση φερομονών εκλυόμενων από τα αρσενικά και αφετέρου στην αναγνώριση συντρόφου κατά τη διαδικασία ζευγαρώματος (Siciliano *et al.*, 2014).

Από τα παραπάνω λοιπόν μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η πρωτεΐνη δέσμωσης φερομονών (*PBP5*), η οποία ανήκει στην οικογένεια των *OBPs* (*Odorant-binding protein 28a*) και αποτελεί πρωτεΐνη που συνδέεται με φερομόνες:

- ♦ ενδεχομένως εμπλέκεται στην αναγνώριση αρσενικών και θηλυκών φερομονών που σχετίζονται με τη σύζευξη
- ♦ μεσολαβεί στην προσυζευκτική επικοινωνία κατά την αναγνώριση συντρόφου
- ♦ με μία ευρύτερη σκοπιά ότι πιθανόν στις κεραίες αρσενικών εντόμων *B. oleae* παίζει ρόλο στον εντοπισμό φερομονών που σχετίζονται με τη σύζευξη, ενώ η ίδια πρωτεΐνη στις κεραίες των θηλυκών συμμετέχει στον εντοπισμό ελαιόκαρπων-ξενιστών και ωοαπόθεσης.

---

Όσον αφορά στα επίπεδα μεταγραφής του γονιδίου *SNMPI* στα αρσενικά έντομα *B. oleae*, παρατηρούμε ότι τη ημέρα 0 και 4<sup>η</sup> τα επίπεδα είναι χαμηλά (γράφημα 4.2). Αυτό ενδεχομένως οφείλεται στη σεξουαλική ανωριμότητα που χαρακτηρίζει τα έντομα. Την 7<sup>η</sup> και 10<sup>η</sup> ημέρα παρατηρείται αύξηση των επιπέδων των μεταγράφων του γονιδίου στα αρσενικά. Αυτό δικαιολογείται από το γεγονός ότι στο δάκο της ελιάς η έκλυση φερομονών γίνεται από τα θηλυκά, επομένως τα αρσενικά έχουν πιο αυξημένα επίπεδα μεταγράφων, που ενδεχομένως υποδηλώνει την ενεργοποίηση του γονιδίου *SNMPI* των αρσενικών για πρόσληψη των οσμών που σχετίζονται με το ζευγάρι. Την 11<sup>η</sup> ημέρα της ανάπτυξης τα επίπεδα παραμένουν σταθερά, ενώ τη 12<sup>η</sup> ημέρα αυξάνονται πολύ. Αυτό ερμηνεύεται πιθανότατα από το γεγονός ότι τα αρσενικά έντομα *B. oleae* είναι πολυγαμικά και μπορούν να ζευγαρώνουν ημερησίως εάν υπάρχουν διαθέσιμα θηλυκά (Zervas, 1982), γι' αυτό και τα επίπεδα του γονιδίου αυξάνονται, ώστε να προσλαμβάνουν φερομόνες σχετικές με τη σύζευξη εκλυόμενες από τα θηλυκά.

Στα θηλυκά έντομα την 0 και 4<sup>η</sup> ημέρα τα επίπεδα των μεταγράφων είναι χαμηλά ενδεχομένως λόγω της σεξουαλικής ανωριμότητάς τους (γράφημα 4.2). Την 7<sup>η</sup> και 10<sup>η</sup> ημέρα που ωριμάζουν σεξουαλικά παρατηρείται αύξηση των επιπέδων, διότι έκλυση σεξουαλικών φερομονών δε γίνεται μόνο από τα θηλυκά αλλά και από τα αρσενικά. Έτσι τα επίπεδα των μεταγράφων του γονιδίου εμφανίζονται αυξημένα ώστε να δεσμεύσουν τις εκλυόμενες από τα αρσενικά φερομόνες και να λάβουν το σήμα για ζευγάρι. Την 11<sup>η</sup> ημέρα, δηλαδή μία μέρα μετά τη σύζευξη, τα επίπεδα των μεταγράφων μειώνονται, αλλά τη 12<sup>η</sup> ημέρα αυξάνονται ξανά. Αυτή η απότομη αύξηση την 12<sup>η</sup> ημέρα πιθανώς υποδηλώνει ότι τα θηλυκά έντομα *B. oleae*, αν και ολιγογαμικά (Tzanakakis *et al.*, 1968), συνεχίζουν να προσλαμβάνουν αρρενο-εκλυόμενες φερομόνες σχετικές με τη σύζευξη. Στη *D. melanogaster* έχει αποδειχτεί πως το *SNMP* δρα ως συνυποδοχέας της αρρενο-ειδικής φερομόνης *cVA* (Jin *et al.*, 2008), που ρυθμίζει τη σεξουαλική και κοινωνική συμπεριφορά (Benton *et al.*, 2007). Έτσι συμπεραίνεται ότι το *SNMPI* ενδεχομένως να εμπλέκεται στην αναγνώριση φερομονών εκλυόμενων από τα αρσενικά.

Από μελέτη έκφρασης σε κεραίες στο *Spodoptera exigua* του γονιδίου *SNMPI* χρησιμοποιώντας ως *hkg* την *GAPDH*, πέραν από την απόδειξη ότι εκφράζεται μόνο στις κεραίες, η έκφρασή του στα αρσενικά είναι ελαφρά μικρότερη από αυτή των θηλυκών (Chengcheng *et al.*, 2014). Επιπλέον μελέτη του *S. inferens* κατέδειξε έκφραση του ίδιου γονιδίου στις κεραίες αλλά και πάλι με τα επίπεδα έκφρασης στα αρσενικά έντομα σημαντικά χαμηλότερα από αυτά των θηλυκών. Στην παρούσα εργασία τα επίπεδα μεταγράφων του γονιδίου *SNMPI* (γράφημα 4.2) παρατηρούνται περισσότερο αυξημένα επίπεδα στα αρσενικά έντομα *B. oleae* σε σχέση με τα θηλυκά.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει ότι η έκλυση σεξουαλικών φερομονών του σκώρου γίνεται από τα θηλυκά και προσλαμβάνεται από τα αρσενικά με εξαιρετική ευαισθησία. Σε μελέτη

λοιπόν του σκόρου *Heliothis virescens* (λεπιδόπτερο) αποδείχτηκε η εμπλοκή του *SNMPI* στην αναγνώριση φερομόνης και επομένως η συμμετοχή του στη μεσολάβηση απόκρισης από νευρώνες στην κεραία, καθώς και η αξιοσημείωτη ευαισθησία του στην ανίχνευση φερομονών (Pregitzer *et al.*, 2014).

Με βάση ότι οι Sensory Neuron Membrane Proteins (SNMPs), που εκφράζονται στην επιφάνεια των αισθητήριων οσφρητικών νευρώνων και εμπλέκονται στην ανίχνευση φερομονών (Benton, 2009) και κυρίως το καλά μελετημένο μοντέλο της *D. melanogaster*, μπορούμε να συμπεράνουμε:

- ♦ την πιθανή εμπλοκή του *SNMPI* στην αναγνώριση φερομονών και στο δάκο της ελιάς.

---

Επιπλέον πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις παροδικής αποσιώπησης μετά από έγχυση δίκλωνου RNA (dsRNA) σε αρσενικά και θηλυκά έντομα, την 6<sup>η</sup> ημέρα της ανάπτυξής τους. Πέραν από τα γονίδια-στόχους *PBP5* και *SNMPI* εγχύθηκε και δίκλωνο τμήμα RNA του γονιδίου *GFP* (dsGFP), το οποίο λειτουργεί ως δείγμα-ελέγχου (control). Για τη διερεύνηση πιθανής αποσιώπησης των γονιδίων απομονώθηκαν ιστοί (κεραίες) την 7<sup>η</sup> και 10<sup>η</sup> ημέρα της ανάπτυξης των αρσενικών και θηλυκών εντόμων.

Στα αρσενικά έντομα *B. oleae* την 7<sup>η</sup> ημέρα παρατηρούμε ότι, παρά την έγχυση dsPBP5, δε μειώνεται ο αριθμός των μεταγράφων του γονιδίου συγκριτικά με το control dsGFP. Αυτό μαρτυρά αποτυχία σίγησης του γονιδίου (γράφημα 4.3), που όμως δε μπορεί να οφείλεται σε σφάλμα κατά την πειραματική διαδικασία ή σε μη έγχυση του dsPBP5, διότι τη 10<sup>η</sup> ημέρα παρατηρείται σίγηση. Αντίθετα παρατηρείται αύξηση των επιπέδων μεταγραφής του. Αυτό αιτιολογείται πιθανότατα από το γεγονός ότι αφενώς μπορεί να υπάρχει πολύ μεγάλη ποσότητα μεταγράφων στο έντομο και έτσι να μην είναι αποτελεσματική η σίγηση και αφετέρου διότι μπορεί οι εκκινητές, που χρησιμοποιήθηκαν για την Real-Time PCR, να ενισχύουν επίσης το dsRNA. Από την άλλη βέβαια στα αρσενικά έντομα τη 10<sup>η</sup> ημέρα της ανάπτυξής τους παρατηρείται ορατή μείωση με ποσοστό 84% (γράφημα 4.4.). Αυτό μαρτυρά:

- ✓ την επιτυχία έγχυσης του δίκλωνου τμήματος του υπό μελέτη γονιδίου (dsPBP5) στα έντομα την 6<sup>η</sup> ημέρα της ανάπτυξής τους και αποφυγή δημιουργίας πληγής
- ✓ και τέλος την επιτυχία της παροδικής αποσιώπησης του γονιδίου τη 10<sup>η</sup> ημέρα της ανάπτυξής του.

Στα θηλυκά έντομα *B. oleae* την 7<sup>η</sup> ημέρα της ανάπτυξής τους παρατηρούμε ότι παρά την έγχυση dsPBP5, δε μειώνεται ο αριθμός των μεταγράφων του γονιδίου συγκριτικά με το control. Αυτό μαρτυρά αποτυχία σίγησης του γονιδίου (γράφημα 4.5). Επιπλέον και τη 10<sup>η</sup> ημέρα της ανάπτυξής τους τα επίπεδα των μεταγράφων του γονιδίου είναι αυξημένα. Έτσι, μάλλον καταλήγουμε στο συμπέρασμα:

- \* ενδεχόμενου σφάλματος κατά την πειραματική διαδικασία, όπως μη έγχυση του dsPBP5 ή λάθος σήμανση κατά τη μεταφορά δειγμάτων κατά το RNA extraction ή τη σύνθεση cDNA
- \* αποτυχίας παροδικής αποσιώπησης του γονιδίου *PBP5* στα θηλυκά έντομα.

Η αποτυχία σίγησης αιτιολογείται πιθανότατα από το γεγονός ότι μπορεί να υπάρχει πολύ μεγάλη ποσότητα μεταγράφων στο έντομο (γράφημα 4.1) και έτσι να μην είναι αποτελεσματική η σίγηση. Αλλά σε αυτήν την περίπτωση θα έπρεπε τα επίπεδα του control και του dsPBP5 να είναι ίδια, κάτι το οποίο δεν παρατηρείται. Οπότε δεν μπορούμε να βγάλουμε ασφαλές συμπέρασμα.

Στα αρσενικά έντομα *B. oleae* την 7<sup>η</sup> ημέρα της ανάπτυξής τους παρατηρούμε ότι ο αριθμός των μεταγράφων του γονιδίου *SNMPI* μειώνεται συγκριτικά με το control dsGFP, με ποσοστό αποσιώπησης 80% (γράφημα 4.7). Άρα συμπεραίνουμε:

- ✓ επιτυχία ένεσης του δίκλωνου τμήματος του υπό μελέτη γονιδίου (dsSNMPI) στα έντομα την 6<sup>η</sup> ημέρα της ανάπτυξής τους
- ✓ επιτυχία παροδικής αποσιώπησης του γονιδίου την 7<sup>η</sup> ημέρα της ανάπτυξής τους.

Αντίθετα τη 10<sup>η</sup> ημέρα της ανάπτυξης των εντόμων τα επίπεδα μεταγράφων του γονιδίου αυξάνονται και φαίνεται να επανέρχονται στα αρχικά επίπεδα, συγκριτικά με το control dsGFP (γράφημα 4.8). Η σίγηση του γονιδίου *SNMPI* στα αρσενικά την 7<sup>η</sup> ημέρα και η

επαναφορά των επιπέδων των μεταγράφων τη 10<sup>η</sup>, αιτιολογείται από το προφίλ έκφρασης του γονιδίου (γράφημα 4.2), όπου την 7<sup>η</sup> ημέρα τα επίπεδα των μεταγράφων είναι μειωμένα ενώ τη 10<sup>η</sup> ημέρα παρατηρείται αύξηση των επιπέδων. Επομένως ενδέχεται η αναποτελεσματικότητα της σίγησης να οφείλεται στην αυξημένη έκφραση του γονιδίου κατά τη 10<sup>η</sup> μέρα, δηλαδή στο μεγάλο αριθμό μεταγράφων εκείνη την ημέρα ανάπτυξης των εντόμων.

Στα θηλυκά έντομα *B. oleae* την 7<sup>η</sup> ημέρα της ανάπτυξής τους παρατηρείται ότι η έκφραση των μεταγράφων του γονιδίου σε σχέση με το control μειώνεται, με ποσοστό 22%, άρα πραγματοποιείται σίγηση του γονιδίου (γράφημα 4.9). Την 10<sup>η</sup> ημέρα τα επίπεδα έκφρασης είναι περισσότερο μειωμένα με ποσοστό 84% (γράφημα 4.10). Αρά σημειώνεται ορατή μείωση των επιπέδων του γονιδίου *SNMP1* γεγονός που υποδηλώνει:

- ✓ επιτυχία έγχυσης του δίκλωνου τμήματος του υπό μελέτη γονιδίου (dsSNMP1) στα έντομα την 6<sup>η</sup> ημέρα της ανάπτυξής και αποφυγή πληγής
- ✓ επιτυχία παροδικής αποσιώπησης του γονιδίου την 7<sup>η</sup> ημέρα της ανάπτυξής τους και
- ✓ επιπλέον διατήρηση της αποσιώπησης έως τη 10<sup>η</sup> ημέρα της ανάπτυξης των εντόμων.

## Μελλοντικές προοπτικές

Το προφίλ έκφρασης των γονιδίων *PBP5* και *SNMP1* καθώς και τα αποτελέσματα της παροδικής αποσιώπησης αυτών, καθιστούν απαραίτητη την περαιτέρω μελέτη των δύο γονιδίων, με στόχο τη αποσαφήνιση του ρόλου τους στο οσφρητικό σύστημα του δάκου της ελιάς, *B. oleae*. Κρίνεται απαραίτητη η συλλογή ιστών σε επιπλέον ημέρες της ανάπτυξης των εντόμων, από αυτές που μελετήθηκαν στη συγκεκριμένη εργασία. Αυτό θα συμβάλλει στην καλύτερη κατανόηση της συμπεριφοράς του εντόμου. Επιπλέον πειράματα πρέπει να διεξαχθούν και με τη μέθοδο RNAi, ώστε ταυτόχρονα να παρατηρηθούν και οι φαινότυποι των εντόμων. Ο έλεγχος των φαινοτύπων ενδεχομένως να συμβάλλει στη διευκρίνιση συμμετοχής των υπό μελέτη γενετικών τόπων στην αναπαραγωγική διαδικασία του εντόμου και άρα να οδηγήσει στην ανάπτυξη νέων εναλλακτικών μεθόδων καταπολέμησης του δάκου ελαττώνοντας τα επίπεδα του πληθυσμού του.

## 6. Παράρτημα

### 6.1 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

Η θερμοκρασία υβριδοποίησης ( $T_{an}$ ) που εφαρμόσαμε ήταν  $50^{\circ}\text{C}$  και εξαρτάται από τη θερμοκρασία τήξης ( $T_m$ ) των εκκινητών. Επιπλέον το στάδιο της επιμήκυνσης πραγματοποιήθηκε για 40 λεπτά στους  $72^{\circ}\text{C}$ .

$94^{\circ}\text{C}$	5min
$94^{\circ}\text{C}$	30sec
$50^{\circ}\text{C}$	30sec
$72^{\circ}\text{C}$	40sec
$72^{\circ}\text{C}$	4min
$4^{\circ}\text{C}$	$\infty$

### 6.2 Δημιουργία δίκλωνου RNA (dsRNA)

Σε αυτό το στάδιο πραγματοποιήσαμε δύο αντιδράσεις, μία με τελικό όγκο 20μl και μια με τελικό όγκο 40μl, τις οποίες αναμίξαμε μετά το 3ο βήμα της πειραματικής διαδικασίας. Επιπλέον στο 5ο βήμα προσθέσαμε 1μl TURBO DNase σε όγκο 20μl και 2μl σε όγκο 40μl.

### 6.3 Μέθοδος σύγκρισης των $C_T$ ( $\Delta\Delta C_T$ )

Η μέθοδος  $\Delta\Delta C_T$ , είναι μία παραλλαγή της μεθόδου Livak, πιο εύκολη στην εφαρμογή και ουσιαστικά δίνει τα ίδια αποτελέσματα. Δίνεται από τον τύπο:

$$\text{Ratio (reference/target)} = 2^{CT(\text{reference}) - CT(\text{target})}$$

### 6.4 Efficiencies

Για μέγιστη αποτελεσματικότητα της qPCR είναι απαραίτητη η μελέτη των εξής χαρακτηριστικών:

- Γραμμική πρότυπη καμπύλη ( $R^2 > 0.980$ )
- Υψηλή τιμή efficiency (90–105%)
- Συνέπεια στις επαναληπτικές αντιδράσεις

Η τιμή Efficiency, E, υπολογίζεται από τον παρακάτω τύπο:

$$E = 10^{-1/\text{slope}}$$

Ενώ η τιμή Efficiency ως ποσοστό υπολογίζεται από τον ακόλουθο τύπο:

$$\% \text{ Efficiency} = (E - 1) \times 100\%$$

**Efficiency εκκινητή PBP5:** E= 74,5% με  $R^2= 0,989$

**Efficiency εκκινητή SNMP1:** E= 108% με  $R^2= 0,974$

Τιμή Efficiency κοντά στο 100% είναι ο καλύτερος δείκτης. Στην πράξη η τιμή E κυμαίνεται από 90–105%. Μικρότερη τιμή υποδεικνύει «κακό» σχεδιασμό των εκκινητών ή λάθος στις συνθήκες της αντίδρασης. Τιμή E μεγαλύτερη από 100% υποδεικνύει λάθος στο χειρισμό της πιπέτας ή ύπαρξη παραπροϊόντων, όπως δημιουργία διμερών στους εκκινητές.

## 6.5 Αλληλουχίες

- Οι αλληλουχίες των γονιδίων PBP5 και SNMP1 είναι οι παρακάτω:

### SNMP1

ATGTTCAAAAAAATTCTCATCGGTTCCGGCTATTGCGCTCGCATTAGGAATCTTCGTTGGATTTGTGGGGTTTCCAAA  
 GTTGTGAAATAAAATGATAAAAGGGCAATTGAATTTGAAACCTGGCAGCGAACC CGCGACAAATGTGGGAAAAATT  
 CCCCATCGCCTTGAATTTTTCAATTTACGTCTTCAACCTAACAAATCCCGATGAAGTGCAAAATGGCGGAAAAACCA  
 CATGTGCAAGAAGTCGGACCGTTTGTATTGAGGAATGGAAGGACAAATACGATTTGGAGGACTTCGAGGATGAG  
 GACGCGGTGGCCTACAATATGCGCAACACATTCATTTTCAGACCCGATTTGGGCTTGAGCGGTGAGGATTTAATCG  
 TGATGCCACATCCACTTATACAAATAATGTCTATAGCCGTCAAGCGCGACAAGGAAGCCTTAATCAACATGATATC  
 CGAGGGTATTCAAGCACTATTAAAGCCCACTACTCCATTTGTGCGTGCACCTTTTATGGACATTTTTTTTCGAGGCCA  
 TCGATGTCGACTGCTCGGTGATCATTTCGCGAGCAAAGGCAATTTGTTTGAATTTTCACACCGGCGCGATCAAAGG  
 AGCAGAAAAAGTGAATGCAACACATTTTAAATTTTCACTCTTTGGTGGGGCCAAATCACACTGACGCCGGTTCGCTAT  
 AAGGTCGCGAGAGGCGTCAAGGTTAGTCGTGATATTGGACGCGTTCTTGAGTTTACGACGCTGAAGAGCTGAGT  
 GTCTGGGATGGTGAAGTGAATCAGTTTCGCGGCACCGACACAACATTTTGTCTCCACTAATGCAGCCCGAAG  
 AGGGACTGTGGTCTTTTGTGCTGATCTGTGCTGTTCTTTGGGTGCAGATTTGAGAAAAAGACCAGTTATGCAGG  
 CATACAGCATACTACTATACACTCGACTTGGGCGATCCAAAGAACGATCCAGATAAGCATTGTTTCTGCAGGGAT  
 TACCCCGACAACCTGCCACCAAAAGGTACCATGGATCTTACGCTGTGTAATGAGGCCCCCATGATTGTGCTGTTGC  
 CACACTTTTTCAAGGCCGATCCGAAATTTGGTTACAGACGTAGATGGTTTGGATCCGCGAGGAGGAAAAAGCATGGCG  
 TCTTTATTGTTTTCGAAAGGATATCCGGTACACCACTATCTGCTGCTAAGCGTCTGCAATTTAGCCTATCTGTGATG  
 CCCGTACCAGAAGTAGAGGTTATGAAGAACCTACGTACACTACCATGCCACTCTTTGGGTGCGAGGAAAGCGGCA  
 AGTTTGGATAAGACATGGACTGATATGTTGAAGAAAAAGGTTTTCTTAGTCATTAATAAATAACATCTTTAAAT  
 GGATGGCAACAATTCTCGGAGCATTTGGGTGTAATAATCAGCCTCTATATGCTATTTGGTAAAAATCAAATCACCAC  
 AACGAATGTCACACCAACAACCTGAAGTTAATGCGATCGATAAACATTA

### PBP5

ATGAAGCTCTTAACATTTGCCTAATTGTTTGTGTAGCGCTTATATCAAATGCTAAGTGCGGTCACGAAGAGGCAA  
 AAGCAGCTGCAGAGGAGTGAAGGATGAAGTTGGTGAACAGACGATGACGTTGAGACGATTTTGAAGTTGCAAC  
 CAGCTGAGACTATGGAGGCGAAATGTCTGCACGCATGCGTCATAAAAAAGATTTCGGTGTGATGAATGGCGATGGCA  
 AGATTGATAGAGATAAAGCCATGGAGGTTTTGACAAATTACTAGTGGCAATGAAGAGCAACATGCCTTGGGCG  
 TGGAAGTTCTAGAAGCATGTGCTGACATTTGATGTAACGACGATCATTGTGAAGCAGCTGAGGAATATCGCACCT  
 GCATGCATGCCAAAGCTAAGGAAAAATGGCTTTGTAATGGGGCGTGT

- Οι αλληλουχίες των προϊόντων ενίσχυσης που χρησιμοποιήθηκαν ως μήτρα για τη δημιουργία των δίκλωνων τμημάτων (dsRNA) είναι οι παρακάτω:

### PBP5

TTGCCTAATTGTTTGTGTAGCGCTTATATCAAATGCTAAGTGCGGTCACGAAGAGGCAAAAGCAGCTGCAGAGGAG  
 TGTAAGGATGAAGTTGGTGCACAGACGATGACGTTGAGACGATTTTGAAGTTGCAACCAGCTGAGACTATGGA  
 GGCGAAATGTCTGCACGCATGCGTCATAAAAAAGATTTCGGTGTGATGAATGGCGATGGCAAGATTGATAGAGATAA  
 AGCCATGGAGTTTTGACAAATTACTAGTGGCAATGAAGAGCAACATGCCTTGGGCGTGGAAAGTTCTAGAAGC  
 ATGTGCTGACATTTGATGTAACGACGATCATTGTGAAGCAGCTGAGGAATATCGCACCTGCATGCATGCCAAAGCT  
 AAGGAAAAATGGCTTTGTAATGGGG

### SNMP1

GCTCGCATTAGGAATCTTCGTTGGATTTGTGGGGTTTCCAAAGTTGTTGAATAAAATGATAAAAGGGCAATTGAAT  
 TTGAAACCTGGCAGCGAACC CGCGACAAATGTGGGAAAAATCCCCATCGCCTTGAATTTTTCAATTTACGTCTTCA  
 ACCTAACAAATCCCGATGAAGTGCAAAATGGCGGAAAAACCATGTGCAAGAAGTCGGACCGTTTGTATTGAGG  
 AATGGAAGGACAAATACGATTTGGAGGACTTCGAGGATGAGGACGCGGTGGCCTACAATATGCGCAACACAT  
 CATTTTCAGACCCGATTTGGGCTTGAGCGGTGAGGATTTAATCGTGTATGCCACATCCACTTATACAAATAATGTCT  
 ATAGCCGTCAAGCGCGACAAGGAAGCCTTAATCAACATGATATCCGAGGGTATTCAAGCACTATTTAAGCCAC  
 TACTCCATTTGTGCGTGCACCTTTTATGGACATTTTTTTTCGAGGCATCGATGTCGACTGCTCGGTGATCATTTG  
 CAGCAAAGGCAATTTGTTT

- Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία δίκλωνων τμημάτων RNA για το εκάστοτε γονίδιο με τη βοήθεια του E-RNAi είναι:

Γονίδιο στόχος	Εκκινητής	Αλληλουχία	T <sub>m</sub> (°C)	Μήκος (nt)
PBP5	PBP5_dsF_c16724_	taatacgactcactatagggTTGCCTAATTGTTTGTGTAGCG	60	20
	PBP5_dsR_c16724_	taatacgactcactatagggCCCCATTACAAAGCCATTTT	59	20
SNMP1	SNMP1_dsF_c53460	aatacgactcactatagggGCTCGCATTAGGAATCTTCG	59	20
	SNMP1_dsR_c53460	taatacgactcactatagggAAACAAATTGCCTTTGCTGC	60	20



Εικόνα 6.1: Οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων στο πρόγραμμα E-RNAi με σκοπό το σχεδιασμό εκκινητών για τη δημιουργία δίκλωνων τμημάτων RNA (dsRNA) των γονιδίων PBP5\_ (αριστερά) και SNMP1 (δεξιά).



## 7. Βιβλιογραφία

- Beneli G., (2013), Aggressive Behavior and Territoriality in the Olive Fruit Fly, *Bactrocera oleae*(Rossi) (Diptera: Tephritidae): Role of Residence and Time of Day, *Journal of Insect Behavior*, 145-161
- Benelli G., Daane K. M., Canale A., Niu Chang-Ying, Messing R. H., Vargas R I., (2014), Sexual communication and related behaviours in Tephritidae: current knowledge and potential applications for Integrated Pest Management, *Springer*, 87:385–405.
- Benelli G., Bonsignori G., Stefanini C., Raspi A., Canale A., (2013), The production of female sex pheromone in *Bactrocera oleae* (Rossi) young males does not influence their mating chances, *Entomological Science*, 16(1), pages 47–53.
- Bengtsson, J. M., Trona, F., Montagné, N., Anföra, G., Ignell, R., Witzgall, P., & Jacquin-Joly, E., (2012), Putative chemosensory receptors of the codling moth, *Cydia pomonella*, identified by antennal transcriptome analysis. *PLoS one*, 7(2), e31620.
- Benton R., Kirsten S. Vannice & Leslie B. Vosshall. (2007), An essential role for a CD36-related receptor in pheromone detection in *Drosophila*, *Nature* 450, 289-293
- Benton, R., Sachse, S., Michnick, S. W., & Vosshall, L. B. (2006), Atypical membrane topology and heteromeric function of *Drosophila* odorant receptors in vivo. *PLoS biology*, 4(2), 20.
- Benton, R., Vannice, K. S., Gomez-Diaz, C., & Vosshall, L. B. (2009). Variant Ionotropic Glutamate Receptors as Chemosensory Receptors in *Drosophila*. *Cell*, 136(1), 149-162.
- Canale A, Carpita A, Conti B, Canovai R, Raspi A (2012), Effect of age on 1,7-dioxaspiro-[5.5]-undecane production in both sexes of olive fruit fly, *Bactrocera oleae* (Rossi) (Diptera Tephritidae). Proceedings of the meeting “Integrated Protection of Fruit Crops”. (eds. A De Cristofaro & A Di Palma) Vico del Gargano, September 12-17-2010 IOBC Bulletin, 74, 219–225.
- Canale A., Germinara S. G., Carpita A., Benelli G., Bonsignori G., Stefanini C., Raspi A., Rotundo G. (2013), Behavioural and electrophysiological responses of the olive fruit fly, *Bactrocera oleae* (Rossi) (Diptera: Tephritidae), to male- and female-borne sex attractants, *Chemoecology*, 23(3), 155-164
- Chengcheng Liu, Jin Zhang, Yang Liu, Guirong Wang, Shuanglin Dong, (2014), expression of snmp1 and snmp2 genes in antennal sensilla of *Spodoptera exigua* (HÜBNER), *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, Volume 85, Issue 2, pages 114–126
- Croset, V., Rytz, R., Cummins, S. F., Budd, A., Brawand, D., Kaessmann, H., Gibson, T.J., & Benton, R. (2010). Ancient protostome origin of chemosensory ionotropic glutamate receptors and the evolution of insect taste and olfaction. *PLoS genetics*, 6(8), e1001064.
- Daane K. M. and Johnson M. W., (2009), Olive Fruit Fly: Managing an Ancient Pest in Modern Times, *Annual Review of Entomology*, Vol. 55: 151-169
- Gu SH, Yang RN, Guo MB, Wang GR, Wu KM, Guo YY, Zhou JJ, Zhang YJ.(2013), Molecular identification and differential expression of sensory neuron membrane proteins in the antennae of the black cutworm moth *Agrotis ipsilon*, *J Insect Physiol.*, 59(4)
- Jefferis, G. S., Potter, C. J., Chan, A. M., Marin, E. C., Rohlfsing, T., Maurer Jr, C. R., & Luo, L. (2007). Comprehensive Maps of *Drosophila* Higher Olfactory Centers: Spatially Segregated Fruit and Pheromone Representation. *Cell*, 128(6), 1187-1203.
- Jin, X., Ha, T. S., & Smith, D. P. (2008). SNMP is a signaling component required for pheromone sensitivity in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(31), 10996-11001.
- Lance, D. R., & McInnis, D. O. (2005). Biological basis of the sterile insect technique. In *Sterile Insect Technique* (pp. 69-94). Springer Netherlands.
- Larsson M. C., Domingos A. I., Jones W. D., Chiappe M.E, Amrein H., Vosshall L. B.,(2004). *Or83b* Encodes a Broadly Expressed Odorant Receptor Essential for *Drosophila* Olfaction, *Neuron*, 43(5),703–714.
- Li X., Zhang M., Zhang H., (2011), RNA Interference of Four Genes in Adult *Bactrocera dorsalis* by Feeding Their dsRNAs, *PLoS One*, 6(3): e17788
- Lin J, Redies C, (2012), Histological evidence: housekeeping genes beta-actin and GAPDH are of limited value for normalization of geneexpression, *Dev Genes Evol.*, 222(6):369-76

- Liu, C., Pitts, R. J., Bohbot, J. D., Jones, P. L., Wang, G., & Zwiebel, L. J. (2010). Distinct olfactory signaling mechanisms in the malaria vector mosquito *Anopheles gambiae*. *PLoS biology*, 8(8), e1000467.
- Liu, R., Lehane, S., He, X., Lehane, M., Hertz-Fowler, C., Berriman, M., Field, L., & Zhou, J. J. (2010). Characterisations of odorant-binding proteins in the tsetse fly *Glossina morsitans morsitans*. *Cellular and molecular life sciences*, 67(6), 919-929.
- Liuqi Gu, D. C. Knipple, (2012), Recent advances in RNA interference research in insects: Implications for future insect pest management strategies, Volume 45, March 2013, Pages 36–40
- Liuqi Gu, Douglas C. Knipple, (2013), Recent advances in RNA interference research in insects: Implications for future insect pest management strategies, Volume 45, Pages 36–40
- M. E. Tzanakakis, J. A. Tsitsipis, A. P. Economopoulos, (1989), Frequency of Mating in Females of the Olive Fruit Fly Under Laboratory Conditions., 1309-1312
- Mazomenos BE (1989) *Dacus oleae*. In: Robinson AS, Hooper G (eds) *World Crop Pests – Fruit Flies: Their Biology, Natural Enemies and Control*, Vol. 3A. p 169. Elsevier, Rotterdam.
- Park SK, Shanbhag SR, Wang Q, Hasan G, Steinbrecht RA, Pikielny CW, (2000). Expression patterns of two putative odorant-binding proteins in the olfactory organs of *Drosophila melanogaster* have different implications for their functions, *Cell Tissue Res.*, 300(1):181-92.
- Pelosi, P., Zhou, J. J., Ban, L. P., & Calvello, M. (2006). Soluble proteins in insect chemical communication. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 63(14), 1658-1676.
- Pregitzer P, Greschista M, Breer H, Krieger J., (2014) The sensory neurone membrane protein SNMP1 contributes to the sensitivity of a pheromone detection system, *Insect Mol Biol.*, 23(6):733-42.
- Price D. R. G. & Gatehouse J. A. , (2008), RNAi-mediated crop protection against insects. *Trends in Biotechnology*, 26, 393–400
- Rytz, R., Croset, V., & Benton, R. (2013). Ionotropic Receptors (IRs): Chemosensory Ionotropic Glutamate Receptors in *Drosophila* and beyond. *Insect biochemistry and molecular biology*, 1-10.
- Shao-Hua Gu, Liang Sun, Ruo-Nan Yang, Kong-Ming Wu, Yu-Yuan Guo, Xian-Chun Li, Jing-Jiang Zhou, and Yong-Jun Zhang (2014), Molecular Characterization and Differential Expression of Olfactory Genes in the Antennae of the Black Cutworm Moth *Agrotis ipsilon*, *PLoS One*, 9(8): e103420.
- Siciliano P., He X.L., Woodcock C., Pickett J.A., Field L.M., Birkett M.A., Kalinova B., Gomulski L.M., Scolari F., Gasperi G., Malacrida A.R., Zhou J.J. (2014), Identification of pheromone components and their binding affinity to the odorant binding protein CcapOBP83a-2 of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*, *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 48, 51-62.
- Siciliano P., Scolari F., Gomulski L. M., Falchetto M., Manni M., Gabrieli P., Field L. M., Jing-Jiang Zhou, Gasperi G., Malacrida A. R., (2014), Sniffing Out Chemosensory Genes from the Mediterranean Fruit Fly, *Ceratitis capitata*, Volume 9, Issue 1, e85523
- Silbering A. F., Benton R. (2009), Ionotropic and metabotropic mechanisms in chemoreception: ‘chance or design’?, *EMBO reports*, 11, 173–179.
- Smart R., Aidan K., Beale M., Vargas E., Carraher C. Kralicek A. V., Christie D. L., Chen C., Newcomb R. D., Warr C. G., (2008), *Drosophila* odorant receptors are novel seven transmembrane domain proteins that can signal independently of heterotrimeric G proteins, *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 38(8), 770–780.
- Steinbrecht R. A., (1998), Odorant-Binding Proteins: Expression and Function, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 855,323–332.
- Suh E, Bohbot J. D., Zwiebel L. J.(2014), Peripheral olfactory signaling in insects, *Current Opinion in Insect Science*, 6:86–92.
- Thom C., Gilley, D., Hooper, J., Esch, H., (2007) "The scent of the waggle dance", *PLoS Biology* 5 (9): e228
- Vogt, R. G. (2003). Biochemical diversity of odor detection: OBPs, ODEs and SNMPs. *Insect pheromone biochemistry and molecular biology*, 391-445.
- Vossen P., Varela L., Devarenne A., (2005), Olive Fruit Fly
- Wilke A.(2009), Mini-review: Genetic enhancements to the sterile insect technique to control mosquito populations, *AsPac J. Mol. Biol. Biotechnol.*, 17 (3) : 65-74.

- Wilke A., Nimmo D., John O., Kojin B., Capurro M., Marrelli M.,(2009), Mini-review: Genetic enhancements to the sterile insect technique to control mosquito populations, *AsPac J. Mol. Biol. Biotechnol.*, 17 (3) : 65-74.
- Xiaoxue Li, Xiaolong Dong, Cong Zou, Hongyu Zhang, (2015), Endocytic pathway mediates refractoriness of insect *Bactrocera dorsalis* to RNA interference, 5: 8700
- Ya-Nan Zhang, Jun-Yan Jin, Rong Jin, Yi-Han Xia, Jing-Jiang Zhou, Jian-Yu Deng, Shuang-Lin Dong, (2013), Differential Expression Patterns in Chemosensory and Non-Chemosensory Tissues of Putative Chemosensory Genes Identified by Transcriptome Analysis of Insect Pest the Purple Stem Borer *Sesamia inferens* (Walker), *PLoS One.*, 8(7): e69715.
- Younus F., Chertemps T., Pearce S. L., Pandey G., Bozzolan F., Coppin C. W. , Russell R. J. , Coisne M., Oakeshott J, G., (2014). Identification of candidate odorant degrading gene/enzyme systems
- Zachary N., Richard G. V., (2008), The SNMP/CD36 gene family in Diptera, Hymenoptera and Coleoptera: *Drosophila melanogaster*, *D. pseudoobscura*, *Anopheles gambiae*, *Aedes aegypti*, *Apis mellifera*, and *Tribolium castaneum*, *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 38 (4): 398–41