

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Σχολή Επιστημών Υγείας
Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας



Διπλωματική Εργασία

Λειτουργική ανάλυση γονιδίων που εμπλέκονται στην απόκριση του

δάκου της ελιάς στο α-πινένιο κατά την προσυζευκτική επικοινωνία

Βασιλείαδης Γεώργιος



Λάρισα, Σεπτέμβριος 2016

Τίτλος: Λειτουργική ανάλυση γονιδίων που εμπλέκονται στην απόκριση του δάκου της ελιάς στο α-πινένιο κατά την προσυζευκτική επικοινωνία

Title: Functional analysis of genes involved in the olive fruit fly response to α-pinene during premating communication

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Μαθιόπουλος Κωνσταντίνος: Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας

Καρπούζας Δημήτριος: Αναπληρωτής Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας

Παπαδοπούλου Καλλιόπη: Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας & Γονιδιωματικής του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, το διάστημα Οκτωβρίου 2015 - Ιουνίου 2016 υπό την επίβλεψη του κ. Κ. Μαθιόπουλου, καθηγητή Μοριακής Βιολογίας, και της Δρ. Κ. Τσουμάνη.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς επιτροπής, τον κ. Ματθιόπουλο, τον κ. Καρπούζα και την κα Παπαδοπούλου για τη συμβολή τους στην επίτευξη της διπλωματικής εργασίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαιτέρως τον επιβλέποντα καθηγητή μου, τον κ. Ματθιόπουλο, για την ευκαιρία που μου έδωσε και για τη συνδρομή του καθ' όλη τη διάρκεια που υπήρξα μέλος του εργαστηρίου του. Αποτελεί, με κάθε ειλικρίνεια, ένα εξαιρετικό παράδειγμα επιστήμονα του οποίου οι υποδείξεις και οι καίριες παρατηρήσεις βοήθησαν ώστε η εργασία να πάρει τη μορφή που έχει.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω, επίσης, την Κωνσταντίνα Τσουμάνη, με την οποία είχα την τύχη να δουλέψω μαζί της, για την άψογη συνεργασία που είχαμε. Η στήριξη και η βοήθειά της από την πρώτη έως την τελευταία μέρα στο εργαστήριο ήταν πραγματικά αξιοσημείωτη. Ήταν αυτή, η καθημερινή υποστήριξή της σε κάθε βήμα της συγκεκριμένης εργασίας, που έκανε δυνατή την πραγματοποίησή της και για αυτό την ευχαριστώ θερμά.

Τη Ντένια για τις ατελείωτες ώρες που περάσαμε μαζί στο εργαστήριο.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω, όλα τα μέλη του εργαστηρίου, τη Γιώτα, τη Μαριλένα, την Έφη, τον Λευτέρη, τον Δημήτρη, την Άννα και τη Στέλλα για το ευχάριστο κλίμα.

Τους γονείς μου για την πνευματική και υλική υποστήριξή τους όλα αυτά τα χρόνια, καθώς και για το ενδιαφέρον και τη φιλότιμη προσπάθειά τους να καταλάβουν με τι ασχολούμαι.

Τη Δώρα που με άντεξε σε όλες τις δύσκολες στιγμές καθώς και για την αγάπη και την υποστήριξή της.

Περίληψη

Ο δάκος της ελιάς (*Bactrocera oleae*) αποτελεί τον σημαντικότερο εχθρό της ελιάς παγκοσμίως και αποτελεί αντικείμενο έρευνας ως προς την εύρεση αποτελεσματικών και φιλικών προς το περιβάλλον τρόπων για την αντιμετώπισή του. Προς την κατεύθυνση αυτή έχουν γίνει έρευνες για το ρόλο που έχει το α-πινένιο, η κύρια εύοσμη χημική ένωση των φυτών, στη σεξουαλική δραστηριότητα του εντόμου, σε μία προσπάθεια ανάπτυξης βιολογικών εντομοκτόνων ενάντια στην παρασιτική του δράση. Στην παρούσα εργασία πραγματοποιείται ο εντοπισμός και η λειτουργική ανάλυση γονιδίων του οσφρητικού συστήματος του δάκου τα οποία εμπλέκονται στην απόκρισή του στο α-πινένιο κατά την προσυζευκτική επικοινωνία.

Έγινε απομόνωση του ολικού RNA από κεφάλια αρσενικών και θηλυκών εντόμων τα οποία είχαν χωριστεί σε τρεις πληθυσμούς, Yes-pin, No-pin και Control-pin, ανάλογα με την έκθεση τους ή όχι στο α-πινένιο. Στη συνέχεια, ακολούθησε μετατροπή του RNA σε cDNA και παράλληλα σχεδιάστηκαν εκκινητές για τα γονίδια που ύστερα μελετήθηκαν. Πραγματοποιήθηκε PCR πραγματικού χρόνου (Real Time PCR) για τα υπό μελέτη γονίδια. Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων προέκυψαν δεδομένα τα οποία υποδεικνύουν ότι γονίδια OBP-56, chemosensory A7a και chemosensory A75a σχετίζονται με το α-πινένιο και την επιρροή που αυτό έχει στη συμπεριφορά του εντόμου. Τέλος, έγινε μία πρώτη προσπάθεια αναγνώρισης του πιθανού ρόλου αυτών των γονιδίων και του τρόπου με τον οποίο εμπλέκονται στην απόκριση του εντόμου στην ουσία.

Abstract

The olive fruit fly (*Bactrocera oleae*) represents the most significant enemy of the olive tree worldwide and is the subject of research towards the finding of efficient and environmentally friendly ways of its control. In this direction, research has been conducted about the role of α -pinene, the most volatile plant compound, in the sexual activity of the insect, in an effort to develop biological pesticides against its parasitic action. In the present study we perform the identification and functional analysis of olfactory genes of the olive fruit fly which **are involved in the insect's response to α -pinene** during premating communication.

Total RNA was extracted from the heads of male and female flies, which had previously been divided into three populations, Yes-pin, No-pin and Control-pin, depending on whether or not they were exposed to α -pinene. Subsequently, RNA was transformed to cDNA and primers for the genes of interest were designed, followed by the use of Real-Time PCR. The data collected demonstrate that the genes OBP-56, chemosensory A7a and chemosensory A75a are related to α -pinene and **influence the fly's behavior. Finally, a first effort was attempted** to identify the possible role of these genes and the way in which they are related **to the insect's response to** the substance.

Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή	
1.1 <i>Bactrocera oleae</i>	12
1.1.1 Ολομεταβολισμός	12
1.1.2 Εξάπλωση	12
1.1.3 Προκαλούμενη ζημιά.....	12
1.1.4 Η φερομόνη του δάκου	13
1.2 α-πινένιο	14
1.2.1 Το πινένιο στη φύση	14
1.2.2 Ισομερή	14
1.2.3 Φυσιολογική δράση	14
1.2.4 Αλληλεπίδραση με έντομα	15
1.2.5 α-πινένιο και δάκος της ελιάς	15
1.3 Αντιμετώπιση	16
1.4 Το οσφρητικό σύστημα	17
1.4.1 Οι οσφρητικοί υποδοχείς (ORs)	18
1.4.2 Οι οσμοδεσμευτικές πρωτεΐνες (OBPs).....	19
1.4.3 Οι πρωτεΐνες χημικής αίσθησης – Chemosensory proteins (CSPs)	23
2. Σκοπός	25
3.1 PCR: Η Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης	27
3.2 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης Πραγματικού χρόνου (Real-Time PCR) .	29
3.3 Εκχύλιση RNA	31
3.4 Επεξεργασία με DNase.....	33
3.5 Σύνθεση cDNA.....	33
3.6 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα (gel) αгарόζης.....	35
4.1 Προηγούμενα Πειράματα.....	38
Πειραματικός σχεδιασμός	38
Ροή εργασιών.....	38
Αποτελέσματα	38
4.2 Επιλογή γονιδίων	40
4.3 Συλλογή νέων ιστών	40
4.4 Απομόνωση και Επεξεργασία του RNA.....	41
4.5 Real-Time PCR	41
5.1 Εντοπισμός και Λειτουργική ανάλυση γονιδίων του Οσφρητικού Συστήματος	50
Chemosensory A7a.....	50

OBP-56	50
Chemosensory A75a	51
5.2 Πρόβλεψη Λειτουργίας των Γονιδίων	51
Chemosensory A7a	51
OBP-56	52
Chemosensory A75a	54
5.3 Επίλογος.....	55
6.1 Νουκλεοτιδικές αλληλουχίες γονιδίων	57
OBP-56	57
Chemosensory A7a	57
Chemosensory A75a	57
6.2 Χαρακτηριστικά των εκκινήτων	58
7. Βιβλιογραφία.....	59

1. Εισαγωγή

1.1 *Bactrocera oleae*

Ο δάκος της ελιάς, *Bactrocera oleae*, (Εικόνα 1) αποτελεί ένα ολομετάβολο, μονοφάγο, δίπτερο έντομο, το οποίο ανήκει στην οικογένεια Tephritidae. Το έντομο αυτό είναι ιδιαίτερα γνωστό λόγω της παρασιτικής δράσης του στον καρπό της ελιάς, δράση που το καθιστά τον σημαντικότερο εχθρό της ελιάς παγκοσμίως.

1.1.1 Ολομεταβολισμός



Εικόνα 1: Ο δάκος της ελιάς, *Bactrocera oleae*

Ο δάκος θεωρείται ένα ολομετάβολο είδος διότι η ανάπτυξή του περιλαμβάνει 4 στάδια: Το αυγό, την προνύμφη, τη νύμφη και το ενήλικο έντομο. Το θηλυκό άτομο, εφόσον συζευχθεί, γεννά τα αυγά του αποκλειστικά στον καρπό της ελιάς (Εικόνες 2 και 6). Από κάθε αυγό θα εκκολαφθεί μία προνύμφη η οποία τρέφεται από τον καρπό της ελιάς – εξού και το γεγονός ότι ο δάκος είναι μονοφάγο είδος – και στη συνέχεια θα μεταμορφωθεί σε νύμφη και, ακολούθως, στο ενήλικο άτομο το οποίο απομακρύνεται από τον καρπό.

1.1.2 Εξάπλωση

Καταγραφές για την επίθεση του δάκου σε ελαιόδεντρα της Μεσογείου υπάρχουν από τους αρχαίους χρόνους. Το γεγονός ότι το έντομο ωοαποθέτει αποκλειστικά σε καρπούς ελιάς περιορίζει την εξάπλωση του στις περιοχές καλλιέργειας και ανάπτυξής της. Πέραν της λεκάνης της Μεσογείου, ο δάκος βρίσκεται σε περιοχές της Νότιας και της Κεντρικής Αφρικής, της Μέσης και της Άπω Ανατολής, της Κεντρικής Αμερικής και πριν από λίγα χρόνια εξαπλώθηκε και στην περιοχή της Καλιφόρνια στις Η.Π.Α [Zygouridis *et al.*, 2009][Daane *et al.*, 2010].

1.1.3 Προκαλούμενη ζημιά

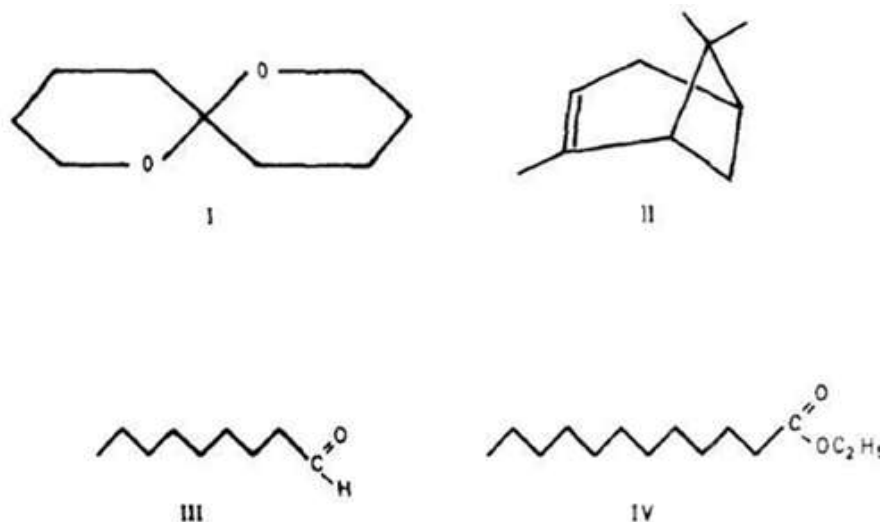
Ο δάκος, ως το σημαντικότερο παράσιτο της ελιάς παγκοσμίως, προκαλεί τόσο ποσοτική όσο και ποιοτική ζημιά. Η ωοαπόθεση μέσα στον καρπό της ελιάς (Εικόνα 6) δημιουργεί οπές (Εικόνα 2) και καθιστά χαμηλή την ποιότητα του παραγόμενου ελαιόλαδου, αυξάνοντας την οξύτητά του. Όπως έχει εκτιμηθεί, ο δάκος ευθύνεται για την καταστροφή της ολικής παραγωγής ελαιών σε ποσοστό 15% με άμεσο αντίκτυπο σε οικονομικό επίπεδο την απώλεια 800 εκατομμυρίων δολαρίων ετησίως [Montiel *et al.*, 2002].



Εικόνα 2: Η προκαλούμενη ζημιά του δάκου στους καρπούς της ελιάς

1.1.4 Η φερομόνη του δάκου

Τα θηλυκά άτομα *B. oleae* παράγουν μία σεξουαλική φερομόνη για να προσελκύσουν τα ώριμα αρσενικά άτομα [Mazomenos *et al.*, 1985]. Παρόλ' αυτά μερικές έρευνες αποκαλύπτουν ότι και τα αρσενικά άτομα παράγουν μικρότερες ποσότητες της ίδιας φερομόνης [Canale *et al.*, 2010]. Η φερομόνη αυτή αποτελείται από 4 συστατικά: 1) το 1,7-διοξάσπειρο-[5,5]-ενδεκάνιο, γνωστό και ως olean, το οποίο είναι και το κύριο συστατικό της φερομόνης, 2) ethyl dodecanoate, 3) nonanal, 4) α-πινένιο (Εικόνα 3) [Mazomenos *et al.*, 1981].



Εικόνα 1: Εικόνα 3: Τα 4 συστατικά της σεξουαλικής φερομόνης του δάκου. I: olean (1,7-διοξάσπειρο-[5,5]-ενδεκάνιο, II: α-πινένιο, III: n-nonanal, IV: ethyl dodecanoate [Mazomenos *et al.*, 1985]

Όσον αφορά τα αρσενικά άτομα δάκου, παράγουν και αυτά μικρότερες ποσότητες της φερομόνης με σκοπό τον αποπροσανατολισμό άλλων αρσενικών ατόμων. Η παραγωγή της φερομόνης από τα αρσενικά φτάνει στο μέγιστο επίπεδο με την ωρίμανση του σπερματικού αδένα - πέντε έως οκτώ ημερών έντομο - και στη συνέχεια μειώνεται έως μηδενισμού της μέχρι την ενδέκατη μέρα [Canale *et al.*, 2010]. Αξίζει να σημειωθεί ότι πρόσφατα ανακαλύφθηκε μία αρσενική φερομόνη η οποία φαίνεται να προσελκύει τα θηλυκά άτομα. Η φερομόνη αυτή είναι η (Z)-9-tricosene, η οποία ονομάζεται muscalure, λόγω του γεγονότος ότι είναι ένα γνωστό συστατικό της σεξουαλικής φερομόνης της οικιακής μύγας (*Musca domestica*). Η muscalure έδειξε σε τεστ βιο-δραστικότητας ότι ακόμα και σε χαμηλές δόσεις έχει τη δυνατότητα να προσελκύει θηλυκά έντομα [Carpita *et al.*, 2012].

Ούτε το nonanal, το οποίο είναι ένα παραπροϊόν οξείδωσης, ούτε το α-πινένιο δεν είναι γνωστό ότι συντίθενται *de novo* από τα έντομα και πιθανότατα αποκτούνται μέσω των ίδιων των φυτών. Μέχρι στιγμής, τα πειραματικά δεδομένα μας δείχνουν ότι το α-πινένιο - το οποίο αναδίδεται σε μεγάλο βαθμό από ημι-άγουρα φύλλα και καρπούς ελιάς - ενισχύει την αρσενική προσέλκυση στη συνθετική φερομόνη [Mazomenos *et al.*, 1985]. Επιπλέον, διεγείρει την ωοαπόθεση των θηλυκών [Scarpati *et al.*, 1993] και προκαλεί ηλεκτροφυσιολογικές αντιδράσεις σε κεραίες τόσο αρσενικών όσο και θηλυκών δάκων [Liscia *et al.*, 2013] ενώ παράλληλα - όπως αναφέρεται σε επόμενη ενότητα - ενισχύει την απόδοση στο ζευγάρωμα ατόμων και των δύο φύλων [Gerofotis *et al.*, 2013].

1.2 α-πινένιο

1.2.1 Το πινένιο στη φύση

Το πινένιο αποτελεί την κύρια εύοσμη χημική ένωση των φυτών και αναδύεται από δέντρα, θάμνους, λουλούδια και χλόη. Αποτελεί το πιο πτητικό συστατικό της τερεβινθίνης (Εικόνα 4), η οποία αποτελεί συστατικό της ρητίνης πολλών κωνοφόρων δέντρων, από τα οποία το πινένιο παίρνει και το

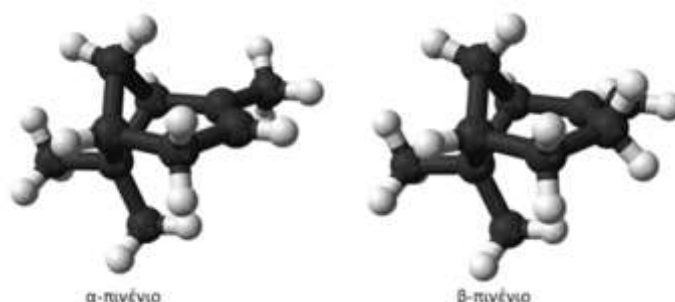


Εικόνα 4: Τερεβινθίνη

όνομά του (pine trees). Χάρη στην ευχάριστη μυρωδιά του, το τερεβινθέλαιο – το οποίο αποτελεί προϊόν αποστάγματος της τερεβινθίνης – έχει χρησιμοποιηθεί στη βιομηχανία των φαρμάκων και των αρωμάτων καθώς και ως πρόσθετο τροφίμων. Στην αρχαιότητα έχει χρησιμοποιηθεί ως φάρμακο ενάντια σε ασθένειες των πνευμόνων και στη χολολιθίαση [Mercier *et al.*, 2009]. Στη σύγχρονη εποχή έχουν περιγραφεί οι παρακάτω ιδιότητες για το τερεβινθέλαιο: αντιφλεγμονώδες, αντι-ιικό, αντικαρκινικό, κυτταροτοξικό, αντιμικροβιακό [Da Silva ACR *et al.*, 2012] αντιπαρασιτικό, αναλγητικό, αντισπαστικές ιδιότητες και απολυμαντικό [Mercier *et al.*, 2009].

1.2.2 Ισομερή

Το πινένιο είναι ένα μονοτερπένιο και ως αποτέλεσμα αποτελείται από δύο μονομερή ισοπρενίου και έχει μοριακό τύπο $C_{10}H_{16}$. Αποτελείται από δύο δομικά ισομερή, το α-πινένιο και το β-πινένιο (Εικόνα 5) [Da Silva ACR *et al.*, 2012].



Εικόνα 5: Διάταξη των ισομερών του πινενίου (α- και β- πινένιο) στο χώρο

1.2.3 Φυσιολογική δράση

Σύμφωνα με την FAO - Διεθνής Οργάνωση Τροφίμων και Γεωργίας του ΟΗΕ – αν και το β-πινένιο είναι πιο πολύτιμο για την βιομηχανία, το α-πινένιο είναι συνήθως πιο άφθονο στη φύση [FAO, 1995]. Φυσιολογικά, το α-πινένιο αναστέλλει τη βλάστηση των σπόρων και την πρωτογενή ανάπτυξη της ρίζας σε φυτά όπως ο αραβόσιτος [Abraham *et al.*, 2000] και διαταράσσει τον ενεργειακό μεταβολισμό δρώντας ως αποσυζεύκτης της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και αναστέλλοντας την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων [Abraham *et al.*, 2003]. Επίσης, οι Harminder *et al.* έδειξαν ότι πέρα από αναστολή της ανάπτυξης των

ριζιδίων, το α-πινένιο οδηγεί τους ιστούς και σε οξειδωτικό στρες μέσω αυξημένης παραγωγής ενεργών ριζών οξυγόνου [Harminder *et al.*, 2006].

1.2.4 Αλληλεπίδραση με έντομα

Το α-πινένιο σχετίζεται και με την άμυνα των φυτών ενάντια σε εξωτερικούς εχθρούς. Αναφέρεται πολλές φορές στη βιβλιογραφία ως εντομοαπωθητικό [Freeman *et al.*, 2008] ενώ άλλες ως ελκυστικό για διαφορετικά είδη εντόμων. Για παράδειγμα, έχει εντομοαπωθητική δράση ενάντια στα *Hylurgops palliatus* και *Hylastes ater* [Perttunen *et al.*, 1957], στις αφίδες (είδη *Aphis*) [Zhang *et al.*, 1991], στην οικιακή μύγα, *Musca domestica* και στη γερμανική κατσαρίδα, *Blattella germanica* [Liao *et al.*, 1999], στο σκαθάρι του ελάτου, *Endroctonus rufipennis* και στο *Icerya seychellarum* [Monzer *et al.*, 2006] καθώς και στο *Kilifia acuminata* [Elrahman *et al.*, 2013]. Αντιθέτως, το ίδιο έχει αναφερθεί ως ελκυστικό σε μια πληθώρα εντόμων όπως *Pieris brassica* [Mitchell *et al.*, 1977], *Dendroctonus frontalis* [Moser *et al.*, 1978], *Epuraea bickhardti* and *E. boreella* [Schröder *et al.*, 1993.] *Pieris rapae* [Honda *et al.*, 1998] *Ips pini* [Erbilgin *et al.*, 2003], *Thanasimus undatulus*, *Enoclerus sphegeus*, and *Temnochila chlorodia* [Zhou *et al.*, 2001]. Ως αποτέλεσμα, το α-πινένιο έχει χρησιμοποιηθεί για να ενισχύσει την προσέλκυση εντόμων σε παγίδες σε προγράμματα διαχείρισης παρασίτων [Borden *et al.*, 1980].

1.2.5 α-πινένιο και δάκος της ελιάς

Πέραν όμως όσων αναφέρθηκαν, το α-πινένιο φαίνεται να έχει σημαντική επίδραση και στη σεξουαλική συμπεριφορά κάποιων εντόμων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί ο δάκος της ελιάς, *Bactrocera oleae*, του οποίου η φερομόνη περιέχει σαν συστατικό της το ίδιο το α-πινένιο [Mazomenos *et al.*, 1981]. Το α-πινένιο φαίνεται όμως ότι έχει και μία γενικότερη επίδραση στη ζωή του εντόμου. Μία πρόσφατη έρευνα [Gerofotis *et al.*, 2016] κατέληξε στα εξής συμπεράσματα:



Εικόνα 6: Θηλυκό άτομο δάκου κατά την ωοαπόθεση

- Η έκθεση σε άρωμα α-πινενίου επηρεάζει μείζονα χαρακτηριστικά του κύκλου ζωής του εντόμου, όπως η μακροζωία και η αναπαραγωγή σε ώριμα άτομα δάκου.
- Η επιρροή αυτή διαμορφώνεται τόσο από το φύλο όσο και από το διατροφικό πλαίσιο του ατόμου.
- Παρατηρείται αύξηση της μακροβιότητας μόνο σε αρσενικά άτομα που βρίσκονται σε διαιτητικό περιορισμό και καθόλου των θηλυκών.
- Το άρωμα α-πινενίου προκαλεί αυξημένη γονιμότητα μόνο σε θηλυκά άτομα που βρίσκονται σε διαιτητικό περιορισμό ενώ διαμορφώνει τα ηλικιακά πρότυπα της ωοαπόθεσης των θηλυκών υπό πλήρεις διατροφικές συνθήκες. Να σημειωθεί ότι για τα αρσενικά δεν υπήρξε αντίστοιχη μελέτη γονιμότητας.

Μία παλαιότερη έρευνα, όμως, συμπληρώνει τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνοντας ότι το α-πινένιο αυξάνει την απόδοση στο ζευγάρι και των δύο φύλων [Gerofotis *et al.*, 2013].

1.3 Αντιμετώπιση

Οι προσπάθειες αντιμετώπισης της παρασιτικής δράσης του δάκου της ελιάς μέχρι τώρα γίνονται κατά βάση με τη χρήση συνθετικών εντομοκτόνων, τα οποία φαίνεται ότι παρουσιάζουν σοβαρές προβληματικές όσον αφορά το περιβάλλον αλλά και τη δημόσια υγεία. Αυτές περιλαμβάνουν την ανικανότητα της φυσικής μικροβιακής κοινότητας να αποικοδομήσουν γρήγορα τα συνθετικά εντομοκτόνα και τη μη επιλεκτική αντιμετώπιση μόνο του δάκου αλλά και άλλων εντόμων, διαταράσσοντας τις ισορροπίες των οικοσυστημάτων. Από τη μία πλευρά, η μη αποικοδόμηση οδηγεί στη βιοσυσσώρευσή τους στα ανώτερα επίπεδα της τροφικής αλυσίδας και δη στον άνθρωπο και από την άλλη πλευρά η αποσταθεροποίηση των οικοσυστημάτων μπορεί να έχει απρόβλεπτες δυσμενείς συνέπειες για την αγροτική παραγωγή και τη δημόσια υγεία. Είναι σημαντική η εξεύρεση μεθόδων αντιμετώπισης οι οποίες αν και φιλικές προς το περιβάλλον θα είναι επίσης αποτελεσματικές και θα συναγωνίζονται τις παραπάνω συμβατικές μεθόδους. Γίνονται προσπάθειες ανάπτυξης βιολογικών εντομοκτόνων τα οποία θα είναι βιοαποδομήσιμα, ειδο-ειδικά (θα στοχεύουν σε συγκεκριμένο είδος εντόμων) και ακίνδυνα για τη δημόσια υγεία. Προς αυτήν την κατεύθυνση είναι σημαντική η μελέτη ουσιών οι οποίες έχουν σχέση είτε με τη δυνατότητα επιβίωσης των εντόμων είτε με την αναπαραγωγική τους ικανότητα. Το α-πινένιο επιδρά με πολλούς και διαφορετικούς τρόπους στο δάκο της ελιάς. Ως συστατικό της σεξουαλικής φερομόνης του δάκου είναι σίγουρα μία ουσία που εμπίπτει στις παραπάνω κατηγορίες και η μελέτη της ίσως αποτελέσει μία λύση σε ένα διαρκώς αυξανόμενο παγκόσμιο πρόβλημα. Η μελέτη αυτή της επίδρασης του α-πινενίου στο έντομο είναι λογικό να ξεκινήσει από το οσφρητικό του σύστημα, λόγο του ρόλου του στην πρωταρχική αναγνώριση της ουσίας και την απαρχή των μονοπατιών μεταγωγής σήματος ως την τελική απόκριση του οργανισμού.

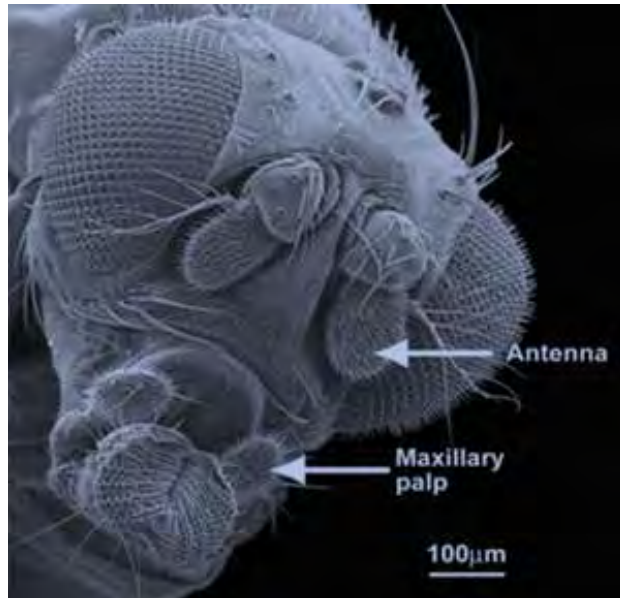
1.4 Το οσφρητικό σύστημα

Η πρόσληψη των οσμών στα ενήλικα έντομα πραγματοποιείται αποκλειστικά στο κεφάλι, από τα δύο κύρια οσφρητικά τους όργανα (Εικόνα 7):

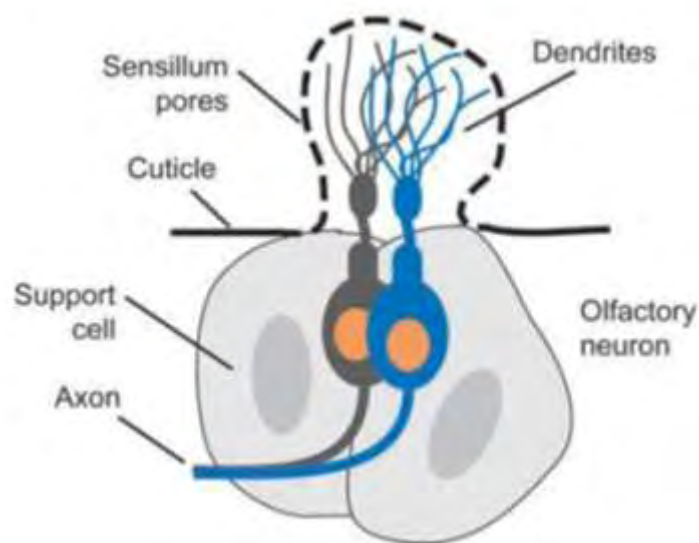
- Τις κεραίες (antennae)
- Τις γναθικές προσακτρίδες (maxillary palps)

Η αναγνώριση των οσμών και η μεταγωγή σήματος από τα οσφρητικά όργανα στον εγκέφαλο επιτελείται από τους οσφρητικούς νευρώνες (OSNs, Odorant Sensory Neurons).

Αυτοί εκτείνονται από τους δένδριτες τους που βρίσκονται έξω από την επιδερμίδα των οσφρητικών οργάνων, μέσα στα τριχίδια, (Εικόνα 8) ως τα σπειράματα (glomeruli) των υπεύθυνων για την όσφρηση συναπτικών κέντρων, στο λοβό (antennal lobe) του εγκεφάλου [Hildebrand *et al*, 1997; Jefferis *et al.*, 2007]. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 8, οι οσμές διαπερνούν το επιδερμικό τοίχωμα των οσφρητικών τριχιδίων μέσα από τους πόρους τους οποίους περιέχουν. Σε κάθε τριχίδιο μπορούν να εδράζονται από ένας έως πέντε OSNs [Vermuelen *et al*, 2004].



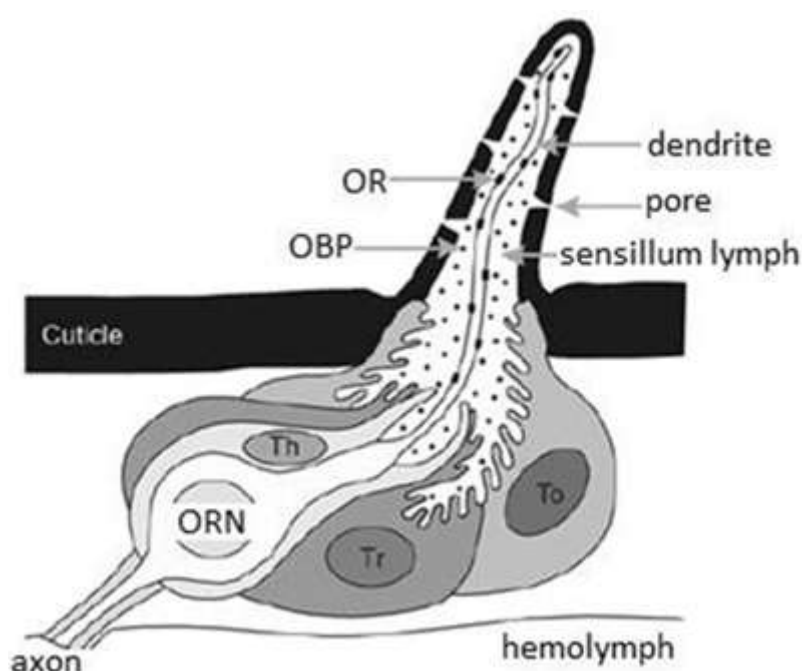
Εικόνα 2: Περιφερική οργάνωση του οσφρητικού συστήματος στη *Drosophila*. Ηλεκτρονική μικρογραφία σάρωσης ενός κεφαλιού *Drosophila*, δείχνει τα δύο κύρια αισθητικά όργανα



Εικόνα 3: Η δομή ενός τυπικού οσφρητικού τριχιδίου, στο οποίο εδράζονται δύο OSNs (διακρίνονται με γκρι και μπλε χρώματα) [Vosshal *et al.*, 2007]

Η ικανότητα του οσφρητικού συστήματος να προσλαμβάνει, να προσδιορίζει και να μεταφέρει στον εγκέφαλο τις οσμές, μόρια τα οποία παρουσιάζουν τεράστια ποικιλομορφία στην προέλευση, στη δομή και στη λειτουργία τους, είναι πραγματικά εκπληκτική. Τα μόρια τα οποία συμμετέχουν σε αυτή τη διαδικασία χωρίζονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες:

- Υποδοχείς (Odorant receptors, ORs)
- Διαλυτές πρωτεΐνες
 - Οσμοδεσμευτικές πρωτεΐνες (Odorant Binding Proteins, OBPs)
 - Πρωτεΐνες Χημικής Αίσθησης (Chemosensory Proteins, CSPs) – μόνο στα έντομα



Εικόνα 4: Γενική οργάνωση του οσφρητικού τριχιδίου ενός εντόμου. Διακρίνονται οι θέσεις των ORs και OBPs [Jacquin-Joly *et al.*, 2004]

1.4.1 Οι οσφρητικοί υποδοχείς (ORs)

Οι οσφρητικοί υποδοχείς, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 9, ανευρίσκονται στην επιφάνεια των δενδριτών των οσφρητικών νευρώνων. Ο ρόλος τους είναι να προσδένονται ειδικά με συγκεκριμένη οσμή. Η σύνδεση με την οσμή τούς ενεργοποιεί προκαλώντας ένα καταρράκτη μοριακών αντιδράσεων έως την μεταγωγή του σήματος στον εγκέφαλο όπου πραγματοποιείται η απόκριση.

Ο συνυποδοχέας OR83b (Orco)

Ο OR83b είναι ένας συνυποδοχέας ο οποίος σχηματίζει ετεροδιμερή σύμπλοκα με όλους τους κοινούς οσφρητικούς υποδοχείς δημιουργώντας μαζί τους μονάδες ανίχνευσης οσμών [Larsson *et al.*, 2004]. Ο Orco αποτελεί ένα καθολικό και αναπόσπαστο κομμάτι των λειτουργικών οσφρητικών υποδοχέων καθώς απουσία του είναι αδύνατη η λειτουργία τους [Benton *et al.* 2006].

1.4.2 Οι οσμοδεσμευτικές πρωτεΐνες (OBPs)

Οι OBPs είναι μικρές υδατοδιαλυτές, εξωκυττάριας πρωτεΐνες που εδράζονται στο λεμφικό υγρό που περιβάλλει τους αισθητικούς δένδριτες. Αποτελούν μία τάξη οσφρητικών πρωτεϊνών, οι οποίες συναντώνται τόσο στα σπονδυλωτά όσο και στα έντομα, και οι οποίες θεωρούνται ότι βοηθούν στη δέσμευση και τη μεταφορά των γενικών οσμών και των φερομονών στους υποδοχείς [Pelosi *et al.*, 1990; Vogt *et al.*, 1985]. Εκφράζονται σε αφθονία στη λέμφο των αισθητικών τριχιδίων στις κεραίες του εντόμου [Klein, 1987; Vogt *et al.*, 1981 & 1989]. Ο ακριβής λειτουργικός ρόλος των πρωτεϊνών αυτών δεν είναι εξακριβωμένος, ωστόσο μια σειρά από πιθανές λειτουργίες, για τα ασπόνδυλα, έχουν συνδεθεί μαζί τους:

- 1) η μεταφορά υδρόφοβων προσδετών,
- 2) η αποτροπή της αποικοδόμησης του προσδέτη προτού ενεργοποιήσει τον οσφρητικό υποδοχέα,
- 3) η δράση ως συμπράγοντα για την ενεργοποίηση της μεταγωγής του σήματος,
- 4) η αποικοδόμηση οσμών μετά την ενεργοποίηση και η απομάκρυνση τους από την λέμφο.

Η ανάγκη για οσφρητική μεταφορά είναι μοναδική για τα χερσαία ζώα, οπότε από αυτήν την άποψη οι OBPs συμβολίζουν μία μεγάλη εξελικτική προσαρμογή του οσφρητικού συστήματος [Vogt *et al.*, 1991].

Ανακάλυψη

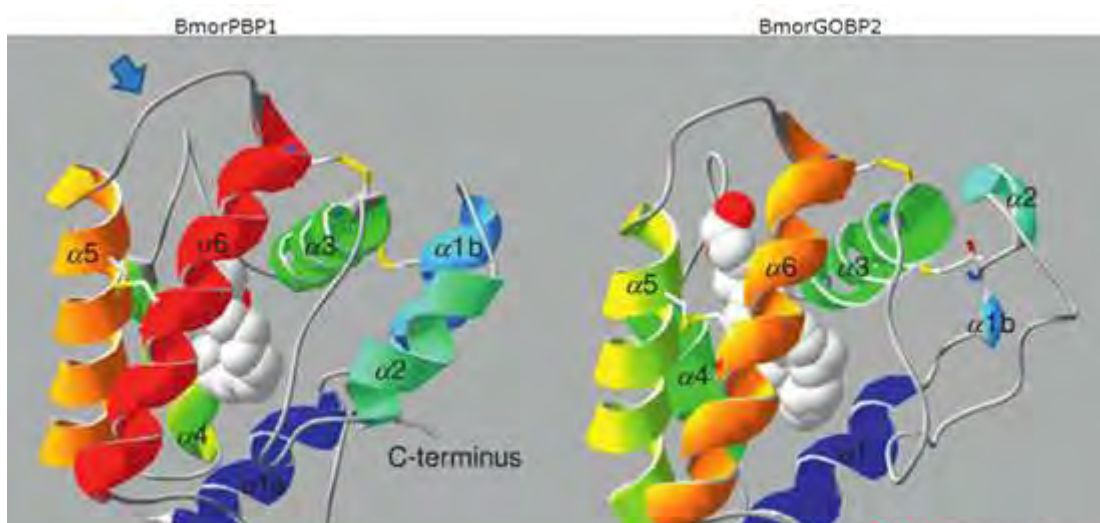
Οι πρώτες OBPs εντόμων ανακαλύφθηκαν στις αρχές της δεκαετίας του 1980 στον γιγάντιο σκόρο *Antheraea polyphemus* [Vogt *et al.*, 1981]. Σε αυτές τις αρχικές βιοχημικές έρευνες οι περισσότερες αλληλουχίες ήταν ημιτελείς. Ολοκληρωμένες cDNA αλληλουχίες ταυτοποιήθηκαν και κλωνοποιήθηκαν πρώτη φορά στο σκόρο του καπνού, *Manduca sexta* [Gyorgyi *et al.*, 1988].

Δομή

Το πιο εκπληκτικό χαρακτηριστικό όλων των αλληλουχιών OBPs είναι 6 υψηλά συντηρημένες κυστεΐνες με συγκεκριμένες αποστάσεις μεταξύ τους [Breer *et al.*, 1990; Raming *et al.*, 1990]. Ο αριθμός των αμινοξέων ανάμεσα στη δεύτερη και την τρίτη κυστεΐνη είναι πάντα τρία, ενώ ανάμεσα στην πέμπτη και την έκτη είναι πάντα οκτώ. Αυτό το πρότυπο στις αμινοξικές αλληλουχίες αποτελεί «υπογραφή» για τις OBPs των εντόμων. Είναι δομικά σημαντικό και οδηγεί στη δημιουργία γεφυρών δισουλφιδικών δεσμών οι οποίες συντηρούν την τρισδιάστατη δομή της πρωτεΐνης [Sandler *et al.*, 2000; Tegoni *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2009]. Η δομή αυτή στην πλειοψηφία των OBPs συμπεριλαμβάνει ένα κοινό βρόγχο με έξι α-έλικες συνδεδεμένες με θηλιές (Εικόνα 10). Άλλα χαρακτηριστικά των OBPs είναι: το μέγεθός τους που κυμαίνεται μεταξύ 15-20 kDa, η σφαιρική υδατοδιαλυτή φύση τους και η παρουσία ενός πεπτιδικού σινιάλου [Zhou, 2010]. 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 προλίνη,

- 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*, 2009).



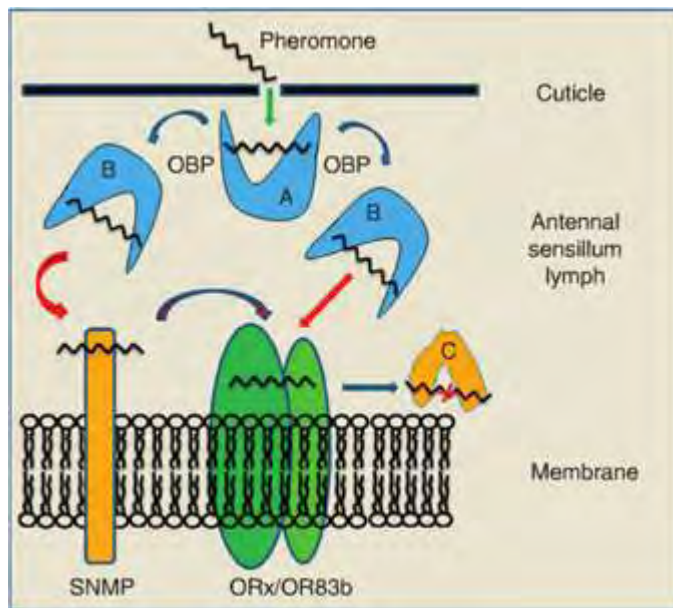
Εικόνα 5: Τρισδιάστατες δομές των OBPs του μεταξοσκώληκα *Bombix mori* BmorPBP1 [Sandler *et al.*, 2000] και BmorPBP2 [Zhou *et al.*, 2009] συνδεδεμένες με τη φερομόνη (E,Z)-10,12-hexadecadienol (απεικονίζεται με σφαίρες). Σημειώνονται τα αμινο-τελικά και καρβοξυ-τελικά άκρα. Οι α-έλικες επισημαίνονται με α1-α6 και α7. Η πιο μεταβλητή περιοχή ανάμεσα στις PBPs του μεταξοσκώληκα επισημαίνεται με το βέλος [τροποποίηση εικόνας: Zhou 2010]

Λειτουργία

Στα έντομα οι OBPs μπορούν να χωριστούν σε 3 υποοικογένειες ανάλογα με το είδος της δράσης τους:

- 1) Pheromone Binding Proteins (PBPs) – πρωτεΐνες οι οποίες συμβάλλουν στην πρόσληψη της φερομόνης και τη μεταφορά της στους υποδοχείς [Maida *et al.*, 2005; Steinbrecht, 1998; Vogt *et al.*, 1981]
- 2) General Odorant-Binding Proteins (GOBPs) – πρωτεΐνες που εκφράζονται εξίσου και στα δύο φύλα, οι οποίες επιτελούν την πρόσληψη των πτητικών γενικών οσμών, όπως είναι οι οσμές που εκλύουν τα φυτά [Laue *et al.*, 1994; Steinbrecht, 1998; Vogt *et al.*, 1999]
- 3) Antennal Specific Proteins (ASPs) – αποτελούν πρωτεΐνες που εκφράζονται σε πολύ υψηλές τιμές στις κεραίες των εντόμων, χωρίς ωστόσο να έχει προσδιοριστεί ο ακριβής τους ρόλος. Η αλληλουχία τους έχει μικρή ομολογία με τις PBPs και GOBPs, αλλά παρουσιάζουν το πρότυπο – «υπογραφή» των έξι κυστεϊνών [Krieger *et al.*, 1996].

Αν και ένα μονοπάτι μεταγωγής σήματος από τους περιφερικούς οσμοδεσμευτικούς υποδοχείς (ORs) προς το κεντρικό νευρικό σύστημα μπορεί να εξηγήσει πώς τα οσφρητικά μηνύματα μεταφράζονται σε συμπεριφορικές αποκρίσεις, ο ρόλος των οσμοδεσμευτικών πρωτεϊνών (OBPs) στην περιφέρεια του οσφρητικού συστήματος παραμένει απροσδιόριστος. Η ανακάλυψη μεμβρανο-συνδεδεμένων ORs τόσο σε σπονδυλωτά όσο και σε έντομα και η λειτουργική έκφρασή τους σε ετερόλογα συστήματα έχει δείξει ότι μπορούν να ενεργοποιηθούν άμεσα από μόρια οσμών και φερομονών. Από την άλλη πλευρά, η πολύ υψηλή συγκέντρωση των OBPs ως διαλυτές πρωτεΐνες γύρω από τους οσφρητικούς



Εικόνα 6: Μεταφορά της φερομόνης από OBPs και πιθανά μονοπάτια μεταγωγής σήματος προς το σύμπλεγμα οσφρητικών υποδοχέων ([Benton *et al.*, 2007], τροποποιημένο από [Zhou *et al.*, 2010])

δενδρίτες και ο μεγάλος αριθμός τους στα γονιδιώματα των εντόμων υποδεικνύουν το σημαντικό ρόλο που πιθανότατα έχουν. Στην πραγματικότητα, η τόσο μεγάλη ποσότητα ενέργειας που χρησιμοποιείται για τη σύνθεση και τη μεταφορά τους δεν μπορεί να δικαιολογηθεί χωρίς ένα αντίστοιχα μεγάλο όφελος για το άτομο ή το είδος. Αυτό είναι ιδιαίτερα αληθές για τα έντομα, τα οποία συχνά ζουν σε μια πολύ κρίσιμη ενεργειακή ισορροπία. Η παρατήρηση της ταχύτατης εξέλιξης και εξάπλωσης των OBPs σημαίνει ότι εμπλέκονται στην γρήγορη προσαρμογή σε

μεταβαλλόμενα περιβάλλοντα. Πολλές έρευνες έχουν αποδείξει τη σημασία που έχουν στη διαμεσολαβούμενη από αυτές αναγνώριση φερομονών [Kaissling *et al.*, 1985], όπως ο ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός των GOBPs και PBPs σε ξεχωριστά αισθητήρια κύτταρα [Laue *et al.*, 1994], ο διαχωρισμός των τυπών OBPs στα οσφρητικά τριχίδια της *Drosophila* [McKenna *et al.*; Pikielny *et al.*, 1994], το υψηλό ποσοστό μετάφρασης από mRNAs σε πρωτεΐνες [Vogt *et al.*, 1989] και η διαφορετική συγγένεια πρόσδεσης για πληθώρα δομών φερομονών [Du *et al.*, 1995; Leal *et al.*, 2005a,b; Pesenti *et al.*, 2008]. Υπερ-δομικές [Steinbrecht *et al.*, 1992, 1998], αναπτυξιακές [Vogt *et al.*, 1989] και ηλεκτροφυσιολογικές μελέτες [Laughlin *et al.*, 2008; van den Berg *et al.*, 1991] έχουν καθιερώσει τη γνώση μας πάνω στις κυτταρικές τους θέσεις και τις οσφρητικές τους λειτουργίες. Πρόσφατες έρευνες έχουν, επίσης, αποδείξει ότι οι PBPs έχουν ένα νευραλγικό ρόλο στην οσφρητική και φερομονική μεταγωγή σήματος [Benton *et al.*, 2006, 2007; Grosse-Wilde *et al.*, 2006; Pensenti *et al.*, 2009; Syed *et al.*, 2006]. Είναι πλέον φανερό πως οι OBPs δρουν ως μεταφορείς με σκοπό να αυξήσουν τη διαλυτότητα των ιδιοχημικών (φερομόνες και μη) και να τα παραδώσουν σε μεμβρανοσυνδεδεμένους ORs είτε μόνες τους, είτε μέσω των πρωτεϊνών SNMPs (sensory neuron membrane proteins). Εν τέλει, η φερομόνη καταβολίζεται από αισθητικές εστεράσες [Ishida *et al.*, 2008; Vogt *et al.*, 1985] (εικόνα 11).

Η αντιστρεπτή σύνδεση φερομονών και άλλων οσμών με OBPs εντόμων έχει δειχθεί σε πολλές έρευνες σε είδη εντόμων. Διαφορετικές υποοικογένειες OBPs έχουν βρεθεί ότι σχετίζονται με διακριτές τάξεις OR νευρώνων. Έτσι, οι PBPs σχετίζονται με νευρώνες ευαίσθητους σε φερομόνες ενώ οι GOBPs με νευρώνες ευαίσθητους σε γενικές οσμές [Vogt *et al.*, 1991] και εκφράζονται σε αισθητικά τριχίδια υπεύθυνα για την ανταπόκριση σε οσμές των φυτών [Laue *et al.*, 1994]. Ανοσοχημικές μελέτες έχουν αποδείξει ότι PBPs και GOBPs είναι όντως παρούσες σε διαφορετικούς τύπους αισθητικών τριχιδίων στα *A. Polyphemus*, *A. pernyi*, *B. mori*, *D. Melanogaster* [Shanbhag, *et al.*, 2001; Steinbrecht, 1998; Steinbrecht *et*

al., 1992, 1995]. Έχοντας υπόψη πως η φερομόνες των εντόμων είναι συνήθως μείγματα χημικών ουσιών συγκεκριμένων για κάθε είδος, τα αποτελέσματα μέχρι στιγμής υποδεικνύουν μία ξεκάθαρη συσχέτιση ανάμεσα στους τύπους κυτταρικών υποδοχέων, τα συστατικά της φερομόνης και τις PBP μέσα στο ίδιο είδος [Zhou, 2010].

Πολλές διαφορετικές OBPs σε ένα είδος μπορεί να ευθύνονται για την πρόσδεση διαφορετικών συστατικών φερομονών. Μία από αυτές μπορεί να έχει δράση PBP και ως εκ τούτου να ενεργοποιεί νευρώνες ευαίσθητους σε φερομόνες. Άλλες μπορεί να δρουν ως πρωτεΐνες με ανταγωνιστική δράση που ενεργοποιούν άλλους νευρώνες σε μία προσπάθεια να αποτρέψουν τη δια-ειδική προσέλκυση. Δύο είδη για παράδειγμα, τα *B. mori* και *M. sexta*, χρησιμοποιούν το ίδιο συστατικό της φερομόνης, το bombykal [Kaissling *et al.*, 1978], αλλά στο *B. mori* το bombykal είναι ένας ανταγωνιστής ενώ, ταυτόχρονα, στο *M. sexta* είναι το βασικό συστατικό της φερομόνης [Zhou, 2010].

Το οσφρητικό σύστημα των εντόμων είναι ικανό να κάνει διάκριση διαφορετικών οσμών παρά το γεγονός ότι κάθε OBP επιδεικνύει ένα ευρύ φάσμα προσδετών. Ένα τέτοιο σύστημα είναι ειδικό αλλά ταυτόχρονα όχι περιορισμένο ως προς τον αριθμό πιθανών προσδετών που μπορεί να αναγνωρίσει. Από την άλλη πλευρά, ισχυρή συγγένεια ανάμεσα στις OBPs και σημειοχημικές ουσίες (πχ, φερομόνες) δεν είναι απαραίτητη αν αναλογιστούμε ότι αυτές οι πρωτεΐνες βρίσκονται σε υψηλές συγκεντρώσεις – έως 10mM – στη λέμφο [Klein, 1987; Vogt *et al.*, 1981]. Η απόφαση που παίρνουν τα έντομα ως προς την αντίδρασή τους σε μία οσμή ίσως βασίζεται σε οσφρητικά μηνύματα (διεγερτικά ή ανασταλτικά ή και τα δύο) τα οποία διανέμονται από τις OBPs στους ORs και η ερμηνεία αυτών των μηνυμάτων γίνεται σε υψηλότερα επίπεδα του μονοπατιού μεταγωγής σήματος. Οι OBPs των εντόμων μαζί με τους ORs έχουν εξελιχθεί ώστε να αναγνωρίζουν τουλάχιστον μία ομάδα ειδο-ειδικών συστατικών και να διαμορφώνουν τη συμπεριφορά των εντόμων κατά το ζευγάρωμα και την εύρεση ξενιστή [Zhou, 2010].

Άλλοι ρόλοι για τις OBPs έχουν προταθεί:

1. Ρόλος σαρωτή για την απομάκρυνση τόσο φερομονών όσο και ξένων φερομονών με σκοπό τη διατήρηση της ενεργότητας του υποδοχέα [Kaissling, 1986; Pelosi *et al.*, 1990].
2. Λειτουργία φίλτρου για την ελάττωση της συγκέντρωσης οσμών, όταν οι συγκεντρώσεις αυτών φτάσουν σε ιδιαίτερα υψηλά επίπεδα τα οποία θα μπορούσαν να προκαλέσουν μακροπρόθεσμη απευαίσθητοποίηση του υποδοχέα [Pelosi *et al.*, 1990].
3. Ηλεκτροφυσιολογικές μετρήσεις σε αισθητήρια όργανα των *A. polyphemus* και *B. mori* έδειξαν ότι οι ApolPBPs και BmorPBPs συμβάλουν στην ενεργοποίηση των ORs και η ενεργοποίηση αυτή εξαρτάται από ειδική, τριαδική συνεργασία ενός υποδοχέα, μίας PBP και μίας φερομόνης [Pophof, 2004]. Ως αποτέλεσμα, ο ρόλος αυτών των πρωτεϊνών φαίνεται να είναι αυτός ενός ενεργού διακόπτη του υποδοχέα, παρά αυτός ενός παθητικού μεταφορέα [Tegoni *et al.*, 2004].
4. Ο εντοπισμός κάποιων OBPs σε διαφορετικά μέρη του εντόμου υποδεικνύει την ύπαρξη διαφορετικών ρόλων από αυτούς της όσφρησης.

1.4.3 Οι πρωτεΐνες χημικής αίσθησης – Chemosensory proteins (CSPs)

Οι πρωτεΐνες χημικής αίσθησης (CSPs) είναι μόρια μικρότερα από τις οσμοδεσμευτικές πρωτεΐνες αποτελούμενα από 100-120 κατάλοιπα αμινοξέων περίπου και τα οποία εκφράζονται σε μεγάλες ποσότητες κυρίως στη λέμφο των αισθητηρίων οργάνων των εντόμων αλλά και σε άλλους ιστούς. Δεν έχουν ανιχνευθεί καθόλου σε σπονδυλωτά ζώα [Vogt *et al.*, 1981; Pelosi, 1998, 2005; Steinbrecht, 1998; Vogt *et al.*, 1999; Jacquin-Joly *et al.*, 2001; Calvello *et al.*, 2003]. Παρουσιάζουν πολύ υψηλή διαλυτότητα και την ικανότητα αντιστρεπτής σύνδεσης με μικρά μόρια, όπως οσμές και φερομόνες. Είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι οι CSPs είναι πολύ πιο συντηρημένες από τις OBPs, με πολλές φορές πάνω από 50% ομολογία ακόμα και μεταξύ μορίων φυλογενετικά απομακρυσμένων ειδών [Pelosi *et al.*, 2006].

Ανακάλυψη

Περίεργως, η πρώτη CSP που απομονώθηκε δεν είχε σχέση με την όσφρηση. Ήταν η p10 η οποία απομονώθηκε από την κατσαρίδα και ο ρόλος της είναι η αναγέννηση των ποδιών της [Nomura *et al.*, 1992]. Προφανώς, η σχέση που έχει η p10 με τις CSPs αναγνωρίστηκε μόνο μετά τον καθορισμό της αλληλουχίας της [Kitabayashi *et al.*, 1998]. Μια παρόμοια πρωτεΐνη, η OS-D (ή A10), κλωνοποιήθηκε από τις κεραίες της *D. melanogaster* σε δύο ανεξάρτητες μελέτες [McKenna *et al.*; Pikielny *et al.*, 1994]. Αργότερα, πρωτεΐνες με αλληλουχικές ομοιότητες με την OS-D απομονώθηκαν από τα αισθητήρια όργανα κάποιων φασμιδίων [Tuccini *et al.*, 1996; Mameli *et al.*, 1996; Marchese *et al.*, 2000] και ακρίδων [Angeli *et al.* 1999]. Η ύπαρξη αυτών των πρωτεϊνών στη λέμφο των αισθητηρίων οργάνων, η οποία αποκαλύφθηκε από ανοσο-κυτταρο-χημικές μελέτες, υποδηλώνει ότι τουλάχιστον μερικές από αυτές τις διαλυτές πρωτεΐνες θα μπορούσαν να εμπλέκονται στη χημική αίσθηση των εντόμων. Η γενική ονομασία των πρωτεϊνών χημικής αίσθησης (CSPs) προτάθηκε από τους Angeli *et al.* για αυτήν την τάξη των πολυπεπτιδίων ώστε να εμπεριέχει τους ρόλους τόσο της όσφρησης όσο και της γεύσης [Angeli *et al.* 1999]. Από τότε πολλές CSPs έχουν απομονωθεί και κλωνοποιηθεί από αρκετά είδη εντόμων, τα οποία ανήκουν σε διαφορετικές τάξεις (orders), όπως Λεπιδόπτερα [Maleszka *et al.*, 1997; Nagnan-Le Meillour *et al.*, 2000; Picimbon *et al.*, 2000a; Robertson *et al.*, 1999; Jacquin-Joly *et al.*, 2001; Picimbon *et al.*, 2001], Υμενόπτερα [Calvello *et al.*, 2003; 2005; Danty *et al.*, 1998; Briand *et al.*, 2002; Ishida *et al.*, 2002; Ozaki *et al.*, 2005], Βλατιόεα (Blattoidea) [Kitabayashi *et al.*, 1998, Picimbon *et al.*, 1999; Riviere, 2003], Ορθόπτερα [Angeli *et al.* 1999, Picimbon *et al.*, 2000b; Ban *et al.*, 2003; Jin *et al.*, 2005] και Ημίπτερα [Jacobs *et al.*, 2005].

Δομή

Οι CSPs έχουν μια δομή η οποία αποτελείται κυρίως από α-έλικες, αλλά με διαφορετική αναδίπλωση από τις OBPs [Sandler *et al.*, 2000; Lartigue *et al.*, 2002; Tegoni *et al.*, 2004]. Η «υπογραφή» των CSPs αποτελείται από τέσσερις κυστεΐνες συνδεδεμένες με δισουλφιδικό δεσμό μεταξύ γειτονικών καταλοίπων, συνθέτοντας δύο μικρούς βρόγχους των οκτώ και τεσσάρων αμινοξέων. Είναι ενδιαφέρον να παρατηρήσουμε ότι τα συντηρημένα αμινοξικά κατάλοιπα φαίνεται να βρίσκονται σε συγκεκριμένα σημεία της αλληλουχίας ενώ άλλες περιοχές είναι

πιο μεταβλητές. Παρόλ' αυτά η αλληλουχική ομοιότητα δε σημαίνει απαραίτητα και λειτουργική ομοιότητα, αφήνοντας ανοικτή την πιθανότητα ότι κάποιες CSPs, και ίσως και κάποιες OBPs, να επιτελούν ρόλους άσχετους με τη χημική αίσθηση [Pelosi *et al.*, 2006].

Έκφραση και λειτουργία

Αν και οι περισσότερες CSPs εκφράζονται στη λέμφο των αισθητηρίων οργάνων, κάποιες έχουν βρεθεί να εκφράζονται και σε άλλα μέρη του σώματος. Έτσι, αν και στο λεπιδόπτερο *C. cactorum* [Maleszka *et al.*, 1997] οι CSPs είναι άφθονες στις γναθικές προσακτρίδες, σε ένα άλλο λεπιδόπτερο, το *M. brassicae*, πρωτεΐνες της ίδιας οικογένειας έχουν βρεθεί στις κεραίες, την προβοσκίδα, τις χειλικές προσακτρίδες και τους αδένες της φερομόνης [Jacquin-Joly *et al.*, 2001]. Στις ακρίδες, CSPs έχουν απομονωθεί από τις κεραίες, τον τάρσο (τμήμα του ποδιού) και στοματικά όργανα, αλλά ταυτόχρονα εκφράζονται σε μεγάλες ποσότητες στα φτερά [Angeli *et al.* 1999; Ban *et al.*, 2003; Jin *et al.*, 2005]. Μία άλλη CSP εκκρίνεται από τον βολβό εκσπερμάτισης της *D. melanogaster* [Dyanov *et al.*, 1995], όπου ο ρόλος της απελευθέρωσης ορμονών μπορεί να υποτεθεί.

Πολλά είναι τα δεδομένα που υποστηρίζουν ότι οι OBPs και CSPs εντόμων αναπαριστούν 2 κλάσεις πρωτεϊνών με παρόμοιο ρόλο, παρά τις διαφορετικές δομές τους. Αρχικά οι OBPs είχαν θεωρηθεί ως πρωτεΐνες ενεργές σε γεγονότα γύρω από τον υποδοχέα, ενώ οι CSPs αν και συμμετείχαν με κάποιον τρόπο, η δράση τους παρέμενε άγνωστη. Αυτή η άποψη υποστηρίχθηκε και από το γεγονός της παρατήρησης ότι οι OBPs ήταν εκφρασμένες αποκλειστικά στις κεραίες (antennal specific) ενώ πολλά μόρια τα οποία ήταν κατηγοριοποιημένα ως CSPs λόγω της αμινοξικής τους αλληλουχίας είχαν ανιχνευθεί τόσο σε ιστούς χημικής αίσθησης όσο και σε ιστούς χωρίς αυτήν την ιδιότητα. Κάποια από αυτά στην πραγματικότητα είναι πιθανό να εμπλέκονται στην αποθήκευση και απελευθέρωση φερομονών [Dyanov *et al.*, 1995] και ένα μόριο αυτής της τάξης έχει βρεθεί να προάγει την αναγέννηση των ποδιών στην κατσαρίδα, όπως έχει προαναφερθεί. Παρόλ' αυτά, σε κάποια έντομα όπως το μυρμήγκι της Αργεντινής μία Chemosensory protein έχει αναφερθεί ως antennal specific [Ishida *et al.*, 2002]. Όπως, αντίστοιχα, έχει δειχθεί ότι στην σφήκα του χαρτιού *Polistes dominulus* οι CSPs έχουν antennal specific δράση, ενώ οι OBPs εκφράζονταν και στα πόδια και τα φτερά [Calvello *et al.*, 2003]. Ίδια κατανομή έχει ανιχνευθεί και σε μια άλλη σφήκα, *Vespa crabro*, υποδεικνύοντας ότι διαφορετικά είδη πιθανότατα να επέλεξαν OBPs ή CSPs ως τις «σημαντικές πρωτεΐνες» κατά τη διάρκεια της εξέλιξης [Pelosi *et al.*, 2006].

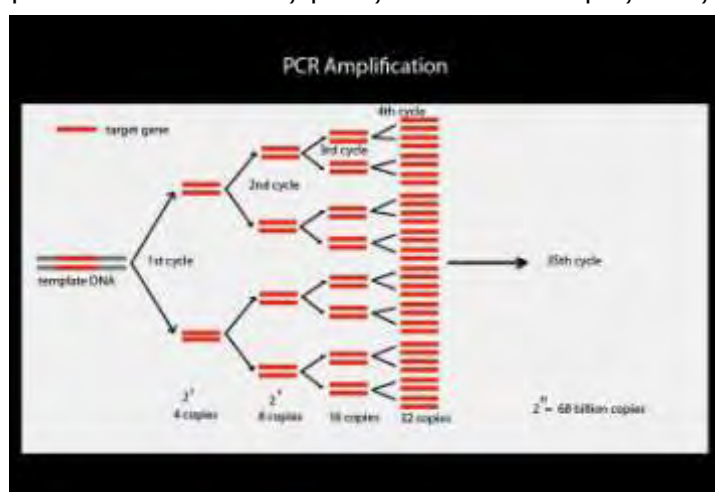
2. Σκοπός

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν ο εντοπισμός και η λειτουργική ανάλυση γονιδίων του οσφρητικού συστήματος του *Bactrocera oleae* τα οποία εμπλέκονται στην απόκριση του εντόμου στο α-πινένιο – είτε άμεσα για τα αρσενικά άτομα, είτε έμμεσα για τα θηλυκά άτομα, μέσω της σύζευξης με εκτεθειμένα έντομα. Προς την κατεύθυνση αυτή χρησιμοποιήθηκαν τα στοιχεία από το RNA sequencing από προηγούμενα πειράματα ώστε να επιλεχθούν τα προς μελέτη γονίδια. Στόχος ήταν η ανάδειξη κάποιου συσχετισμού ανάμεσα στην ύπαρξη ή όχι του α-πινενίου και στην έκφραση των μορίων του οσφρητικού συστήματος. Αυτό αποτελεί ένα βήμα προς την ταυτοποίηση των μορίων του οσφρητικού συστήματος του δάκου της ελιάς τα οποία αναγνωρίζουν και συνδέονται με το α-πινένιο, προκαλώντας την τελική απόκριση του εντόμου σε αυτό μετά από μεταγωγή του σήματος στον εγκέφαλο.

3. Υλικά και Μέθοδοι

3.1 PCR: Η Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) θα μπορούσαμε εύκολα να πούμε ότι αποτελεί ένα από τα πιο ισχυρά εργαλεία της μοριακής βιολογίας. Η ανακάλυψή της [Saiki *et al.*, 1985; Mullis *et al.*, 1987] και η βελτιστοποίησή της με τη χρήση μιας θερμοσταθερής Taq DNA πολυμεράσης από το *Thermus Aquaticus* [Saiki *et al.*, 1988] έχει διευκολύνει σε μεγάλο βαθμό και έχει φέρει πραγματική επανάσταση στον τομέα της μοριακής διαγνωστικής. Αρχή της μεθόδου είναι ο ενζυμικός πολλαπλασιασμός ενός ή μερικών αντιγράφων ενός



Εικόνα 7: Τα αντίγραφα της αλληλουχίας στόχου (κόκκινο χρώμα) μετά από κάθε κύκλο της PCR.

που μπορεί να χρειαζόταν διάστημα μηνών. Επιπλέον, η PCR έχει μειώσει ή εξαλείψει πλήρως την ανάγκη για χρήση ραδιενέργειας σε διαγνωστικές αναλύσεις ρουτίνας. Οι αλλαγές αυτές επέτρεψαν στη μοριακή διαγνωστική να μπει στο κλινικό εργαστήριο και να χρησιμοποιηθεί για γενετικές υπηρεσίες, όπως οι αναλύσεις διαλογής φορέων ή γενικού πληθυσμού για γνωστές μεταλλάξεις, η προγεννητική διάγνωση κληρονομικών ασθενειών και η ταυτοποίηση άγνωστων μεταλλάξεων. Το βραβείο Νόμπελ Χημείας απονεμήθηκε στον Dr. K. Mullis το 1993, για την καθοριστική του συμβολή στην ανακάλυψη και ανάπτυξη της τεχνικής PCR.

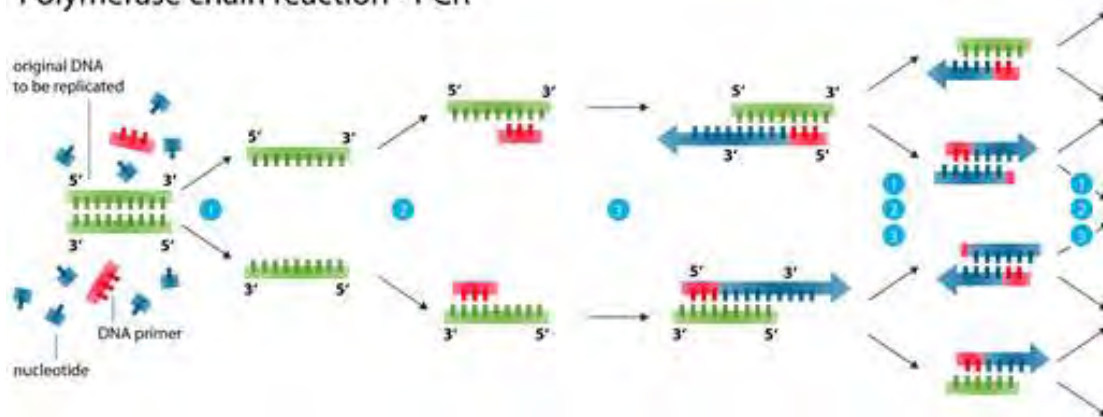
Το DNA στόχος (template) επεκτείνεται μετά από πολλαπλές αντιγραφές σε σημείο που να είναι ανιχνεύσιμο. Ως αφετηρίες του πολλαπλασιασμού του DNA στόχου χρησιμοποιούνται 2 συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια (18-22 βάσεις συνήθως) – τα οποία ονομάζονται εκκινητές ή primers – που έχουν αλληλουχία συμπληρωματική προς τις πλευρικές αλληλουχίες του DNA στόχου, το καθένα αντίστοιχα προς τον έναν κλώνο του στόχου και με αντίθετη κατεύθυνση. Ο αριθμός των αντιγράφων του DNA στόχου εξαρτάται από τον αριθμό των κύκλων της αντίδρασης, εφόσον μετά από κάθε κύκλο διπλασιάζεται, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 12.

τμήματος DNA, παράγοντας χιλιάδες ή και εκατομμύρια αντίγραφα του τμήματος αυτού μέσω πολλαπλών κύκλων της αντίδρασης. Το σημαντικότερο στοιχείο της PCR είναι ο πολύ μεγάλος αριθμός αντιγράφων της επιθυμητής αλληλουχίας που παράγεται με την εκθετική ενίσχυσή της (Εικόνα 12), γεγονός που επιτρέπει την ανίχνευση γνωστών μεταλλάξεων μέσα σε μία μόνο ημέρα σε αντίθεση με παλαιότερα

Κάθε κύκλος της PCR αποτελείται από 3 στάδια (εικόνα 13):

1. **Αποδιάταξη:** Κατά το στάδιο αυτό η θερμοκρασία της αντίδρασης αυξάνεται έως ότου να φτάσει τους 95°C περίπου, ώστε να καταστεί δυνατή η λύση των δεσμών υδρογόνου και η αποδιάταξη του δίκλωνου DNA στις δύο μονόκλωνες αλυσίδες που το αποτελούν.
2. **Υβριδισμός:** Κατά το στάδιο αυτό η θερμοκρασία μειώνεται¹ ώστε να γίνει δυνατή η σύνδεση των εκκινητών (primers) με τη συμπληρωματική τους αλληλουχία πάνω στο DNA στόχο (υβριδισμός).
3. **Επιμήκυνση:** Κατά το στάδιο αυτό η θερμοκρασία αυξάνεται στους 72°C περίπου ώστε το ένζυμο Taq πολυμεράση να προσθέσει νουκλεοτίδια στο 3' άκρο των εκκινητών επιμηκώνοντας την αλληλουχία τους, δημιουργώντας δίκλωνα τμήματα DNA ίδια με τα αρχικά.

Polymerase chain reaction - PCR



Εικόνα 8: Τα στάδια της PCR: 1. Αποδιάταξη, 2. Υβριδοποίηση, 3. Επιμήκυνση

Ο βέλτιστος αριθμός κύκλων σε μια PCR προσδιορίζεται πειραματικά με βάση την επιθυμητή παραγωγή προϊόντος αλλά και την αποφυγή σχηματισμού μη ειδικού προϊόντος. Συνήθως ο βέλτιστος αριθμός κύκλων είναι 25-35, αλλά αυτό μπορεί να ποικίλει ανάλογα με την εφαρμογή. Μετά από κάποιους κύκλους η εκθετική ενίσχυση της συγκεκριμένης περιοχής του DNA στόχου σταδιακά σταματά και μετά διέρχεται σε μία στατική φάση. Αυτή η δεύτερη φάση λέγεται πλατό αύξησης (amplification plateau).

Υλικά

- DNA
- Εκκινητές (Forward και Reverse)
- dNTPs
- DNA Taq πολυμεράση
- Ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμου (Buffer)
- MgCl₂

¹ Η θερμοκρασία υβριδισμού (annealing temperature), εξαρτάται από το μήκος και τη σύσταση των εκκινητών σε βάσεις CG και AT. Όταν το μήκος των εκκινητών δεν είναι μεγαλύτερο των 20 βάσεων, η θερμοκρασία τήξης μπορεί να προσεγγιστεί από τον τύπο: $T_m = (A+T) \times 2^\circ\text{C} + (G+C) \times 4^\circ\text{C}$.

Μέθοδος

Γίνεται προσθήκη των κάτωθι αντιδραστηρίων στα ειδικά PCR σωληνάκια:

Υλικό	Αρχική Συγκέντρωση	Τελική Συγκέντρωση	Ποσότητα (μL)
DNA		10-40ng	Εξαρτάται από το C _{αρχικό}
Buffer	10x	1x	2,0
dNTPs	40mM	0,8mM	0,4
Εκκινητής F	10pmol/μL	0,4-0,6μM	0,7
Εκκινητής R	10pmol/μL	0,4-0,6μM	0,7
Taq πολυμεράση	5units/μL	1unit	0,2
ddH ₂ O	-	-	Συμπληρώνει τον όγκο
Τελικός Όγκος			20

Έπειτα τα σωληνάκια τοποθετούνται σε ειδικό θερμοκυκλοποιητή και επωάζονται σε κατάλληλο πρόγραμμα εναλλαγής θερμοκρασιών:

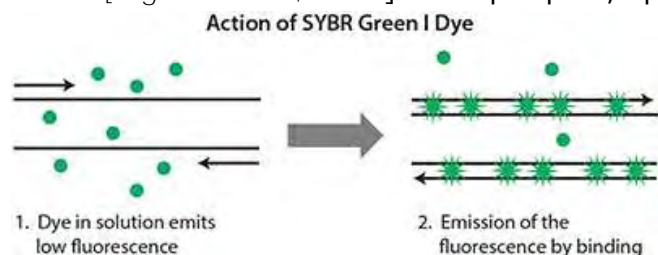
Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος	Κύκλος
Αρχική Αποδιάταξη	95°C	5min	1
Αποδιάταξη	95°C	30sec	30
Υβριδισμός	55°C	20sec	
Επιμήκυνση	72°C	30sec	
Τελική Επιμήκυνση	72°C	2min	1
Διατήρηση	4°C	-	-

3.2 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης Πραγματικού χρόνου (Real-Time PCR)

Στα μέσα της δεκαετίας του 1990 αναπτύχθηκε μια νέα διαδικασία ανάλυσης και ποσοτικού προσδιορισμού του DNA ή του RNA, η οποία βασίζεται στη μέθοδο PCR και επιτρέπει τον ποσοτικό προσδιορισμό των προϊόντων της PCR σε πραγματικό χρόνο [Higuchi *et al.*, 1993; Heid *et al.*, 1996; Gibson *et al.*, 1996]. Αυτή η τεχνική υψηλής ακρίβειας και ευαισθησίας επιτρέπει τον ποσοτικό προσδιορισμό των προϊόντων της PCR κατά την εκθετική φάση της αντίδρασης. Λειτουργεί, δηλαδή, αντίθετα από τις κλασσικές μεθόδους τελικού σημείου, καθώς έχει σχεδιαστεί για να προσφέρει πληροφορίες ταυτόχρονα με τη διαδικασία πολλαπλασιασμού, χωρίς να απαιτεί χειρισμούς μετά την PCR. Όπως και η αρχική μέθοδος PCR, έτσι και αυτή η τεχνική έφερε επανάσταση στη μοριακή έρευνα.

Ένας από τους τρόπους για να γίνει η παρατήρηση των αποτελεσμάτων της PCR σε πραγματικό χρόνο είναι μέσω χρωστικών που παρεμβάλλονται στο DNA. Η βασική αρχή αυτής της τεχνικής περιγράφηκε για πρώτη φορά από τον Higuchi, ο

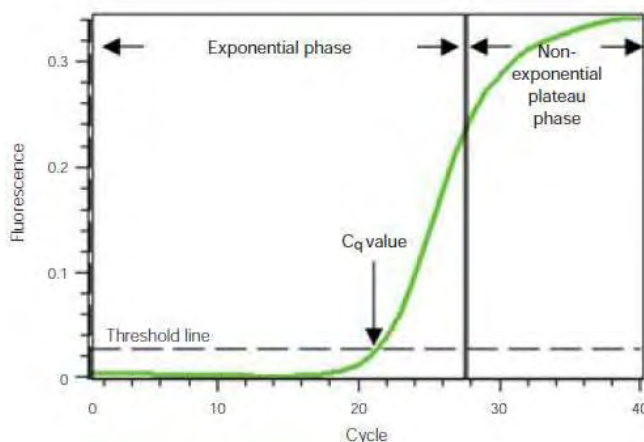
οποίος παρακολούθησε την αύξηση του φθορισμού που εκπέμπει το βρωμιούχο αιθίδιο [Higuchi *et al.*, 1993]. Πιο πρόσφατα, άρχισε να χρησιμοποιείται ευρέως η



Εικόνα 9: Η δράση της χρωστικής SYBR Green I

χρωστική SYBR Green I, η οποία είναι λιγότερο τοξική από το βρωμιούχο αιθίδιο και ενσωματώνεται στο δίκλωνο DNA. Η χρωστική αυτή ενσωματώνεται στη μικρή αύλακα του δίκλωνου DNA, γεγονός που αυξάνει σε μεγάλο βαθμό το φθορισμό του. Κατά

την πορεία της αντίδρασης PCR, η ποσότητα του δίκλωνου DNA στόχου αυξάνεται εκθετικά, με παράλληλη αύξηση της ποσότητας της χρωστικής SYBR Green I που ενσωματώνεται, και άρα αύξηση του φθορισμού που εκπέμπεται. Σε κάθε κύκλο, ο εκπεμπόμενος φθορισμός αυξάνεται σταδιακά κατά τη φάση της επιμήκυνσης της αντίδρασης, ενώ είναι μικρός ή απουσιάζει εντελώς κατά τη φάση αποδιάταξης (Εικόνα 14). Ο αριθμός των κύκλων PCR στον οποίο ο φθορισμός (άρα η ποσότητα του DNA) ξεπεράσει μία συγκεκριμένη ουδό (Threshold) είναι αντιστρόφως ανάλογος με την αρχική ποσότητα του DNA. Αυτός ο αριθμός ονομάζεται C_q (ή C_t) (Εικόνα 15). Αν για παράδειγμα έχουμε δύο δείγματα και το C_q του πρώτου είναι 25 ενώ του δεύτερου 27, τότε η αρχική ποσότητα του πρώτου δείγματος είναι τετραπλάσια του δεύτερου, εφόσον σε κάθε κύκλο έχουμε διπλασιασμό του προϊόντος της αντίδρασης.



Εικόνα 10: Η χαρακτηριστική σιγμοειδής καμπύλη μιας Real-Time PCR. Η αντίδραση διαχωρίζεται στην εκθετική και μη εκθετική φάση.

Η κανονικοποίηση του δείγματος στην Real-Time PCR είναι ένα απαραίτητο βήμα της ανάλυσης των αποτελεσμάτων. Η αξιοπιστία οποιουδήποτε πειράματος μπορεί να βελτιωθεί με την παράλληλη ενίσχυση ενός γονιδίου σταθερής έκφρασης (housekeeping gene) το οποίο λειτουργεί ως γονίδιο αναφοράς (reference gene) για κάθε δείγμα που θέλουμε να μελετήσουμε. Με αυτόν τον τρόπο υπολογίζουμε τη σχετική ποσότητα κάθε δείγματος ως προς το γονίδιο αναφοράς αντί της απόλυτης τιμής των C_q . Κάποιες φορές χρησιμοποιούνται παραπάνω του ενός reference genes ώστε να αυξηθεί η αξιοπιστία των αποτελεσμάτων.

Τέλος, μεγάλη σημασία έχει και το μέγεθος του προϊόντος της Real-Time PCR. Ιδανικότερο θεωρείται ένα προϊόν της τάξης των 80-120bp. Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται η υψηλότερη δυνατή ειδικότητα και απόδοση της αντίδρασης. Τρόποι για την επιβεβαίωση της ειδικότητας του προϊόντος της PCR, είναι η ηλεκτροφόρηση σε gel αгарόζης και ο έλεγχος της καμπύλης αποδιάταξης (melting curve analysis). Στην καμπύλη αυτή παρουσιάζεται η θερμοκρασία τήξης

του προϊόντος και σε περίπτωση που παρατηρηθεί διαφορετική θερμοκρασία από την αναμενόμενη τότε έχει ενισχυθεί ένα μη-ειδικό προϊόν.

Υλικά

- DNA
- Εκκινητές (Forward και Reverse)
- iTaq Universal SYBR Green Supermix (Mix διάλυμα, στο οποίο περιέχονται τα: hot-start iTaq DNA polymerase, dNTPs, MgCl₂, SYBR[®] Green I dye)

Μέθοδος

Γίνεται προσθήκη των κάτωθι αντιδραστηρίων σε ειδικά PCR σωληνάκια:

Υλικό	Ποσότητα
cDNA	Εξαρτάται από τη συγκέντρωση
Buffer mix	7,5μL (1X)
Εκκινητής F	0,45
Εκκινητής R	0,45
ddH ₂ O	Συμπληρώνει τον όγκο
Τελικός Όγκος	15μL

Για κάθε διαφορετικό δείγμα DNA γίνεται ξεχωριστή αντίδραση με κάθε διαφορετικό ζευγάρι εκκινητών των υπό εξέταση γονιδίων καθώς και με δύο γονίδια αναφοράς για να υπάρχει σωστή κανονικοποίηση. Τα επιλεγμένα γονίδια ήταν τα 14-3-3zeta και GAPDH.

Τέλος, ακολουθεί η ανάλυση των αποτελεσμάτων με τη χρήση του προγράμματος CFX Manager Software (Bio-Rad CFX96).

3.3 Εκχύλιση RNA

Η εκχύλιση του RNA (RNA extraction) από αποθηκευμένους ιστούς είναι συχνά το πρώτο βήμα για την ανάλυση των αποτελεσμάτων ενός πειράματος. Με την διαδικασία αυτή απομονώνεται το συνολικό RNA από τον ιστό ενός οργανισμού. Τα επίπεδα του RNA μας δείχνουν τα επίπεδα έκφρασης του αντίστοιχου γονιδίου.

Υλικά

- Ιστοί
- Ειδικά έμβολα απουσίας RNase²

² Η RNase είναι ένζυμο που καταλύει την αποδόμηση του RNA. Η μόλυνση ενός δείγματος RNA με RNase είναι καταστροφική και θα πρέπει να αποφεύγεται με κάθε μέσο. Υπάρχουν

- Trizol
- BCP
- Γλυκογόνο
- Παγωμένη αιθανόλη 75%

Μέθοδος

Η εκχύλιση χωρίζεται σε 4 στάδια:

Ομογενοποίηση

- Οι ιστοί, οι οποίοι ήταν αποθηκευμένοι σε σωληνάκια στους -20°C , πολτοποιούνται με τη χρήση ειδικού εμβόλου πλήρους απουσίας RNase με σταδιακή προσθήκη 1ml Trizol έως ότου ομογενοποιηθούν πλήρως³.
- Τα σωληνάκια ανακατεύονται με χρήση vortex.
- Αφήνονται 5 min σε θερμοκρασία δωματίου.

Εξαγωγή

- Ακολουθεί φυγοκέντρωση για 10min στα 12000g στους 4°C .
- Μεταφορά του υπερκείμενου υγρού σε νέο σωληνάκι (eppendorf).
- Προσθήκη BCP ποσότητας 10% του τελικού όγκου του διαλύματος και συνεχές ανακάτεμα για 15min.
- Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 3min.
- Φυγοκέντρωση για 18min στα 12000g στους 4°C .
- Προσεκτική μεταφορά της υδατικής φάσης σε νέο eppendorf και διατήρηση στον πάγο.

Κατακρήμνιση

- Προσθήκη 1ml Trizol και 0,5ml γλυκογόνου.
- Vortex και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1h.
- Φυγοκέντρωση για 30min στα 12000g στους 4°C .
- Αφαίρεση του υπερκείμενου.

Πλύση

- Πλύση του ιζήματος με 130μl παγωμένης αιθανόλης 75%.
- Φυγοκέντρωση για 5min στα 7500g στους 4°C .
- Αφαίρεση αιθανόλης, πλύση του ιζήματος με 130μl παγωμένης αιθανόλης 75%. και φυγοκέντρωση για 5min στα 12000g στους 4°C (x3 φορές).
- Αφαίρεση αιθανόλης και στέγνωμα του ιζήματος σε στείρες συνθήκες.
- Αναδιάλυση του ιζήματος σε ποσότητα H_2O και vortex.
- Αποθήκευση στους -20°C .

RNases που είναι διάχυτες στο περιβάλλον, όπως για παράδειγμα η RNase7 η οποία βρίσκεται στο ανθρώπινο δέρμα [Harder *et al.*, 2002]

³ Για ιστούς πλούσιους σε χητίνη (όπως οι κεραίες του εντόμου), προηγείται προσθήκη των δειγμάτων σε υγρό άζωτο, ώστε να καταστεί δυνατή η πλήρης ομογενοποίηση.

3.4 Επεξεργασία με DNase

Πριν από την μετατροπή του RNA σε cDNA μετά από εκχύλιση, ένα βήμα είναι απαραίτητο για την αποφυγή λανθασμένων αποτελεσμάτων: η αποδόμηση τυχόν τμημάτων DNA που απομονώθηκαν μαζί με το RNA κατά την εκχύλιση. Το ένζυμο που καταλύει την αποσύνθεση του DNA ονομάζεται DNase.

Υλικά

- RNA
- Buffer
- DNase
- Inactivation Buffer

Μέθοδος

- Σε ειδικό PCR σωληνάκι προστίθενται τα κάτωθι αντιδραστήρια:

Υλικό	Συγκέντρωση	Ποσότητα
RNA	Εξαρτάται από το δείγμα	Εξαρτάται από τη συγκέντρωση
Buffer	1X	1,5μl
DNase	0,4units	0,3μl
ddH ₂ O	-	Συμπληρώνει τον όγκο
Τελικός Όγκος		15μl

- Ακολουθεί επώαση στους 37°C για 25min.
- Στη συνέχεια προστίθεται 1μl Inactivation Buffer και ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5min
- Φυγοκέντρωση σε θερμοκρασία δωματίου στα 11000g για 2min
- Μεταφορά του υπερκειμένου σε νέο σωληνάκι

3.5 Σύνθεση cDNA

Για να μπορεί να πραγματοποιηθεί PCR για την ανίχνευση των mRNA μεταγράφων, άρα για την ανίχνευση των επιπέδων έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων, χρειάζεται πρώτα η μετατροπή του RNA σε cDNA. Αυτό είναι απαραίτητο διότι το DNA είναι ένα μόριο αρκετά πιο σταθερό και ανθεκτικό από το RNA και διότι η PCR χρησιμοποιεί θερμο-ανθεκτικές DNA πολυμεράσες οι οποίες δεν αναγνωρίζουν την αζωτούχο βάση ουρακίλη του RNA. Η αντίδραση καταλύεται από το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφή.

Υπάρχουν τρεις διαφορετικοί τύποι εκκινητών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη σύνθεση cDNA: Ειδικοί εκκινητές για συγκεκριμένη αλληλουχία-στόχο, oligo dT εκκινητές και τυχαίοι εκκινητές. Στο συγκεκριμένο πείραμα χρησιμοποιήθηκε μείγμα τυχαίων εκκινητών (random primers). Το

πλεονέκτημα της μεθόδου αυτής είναι ότι αυξάνονται οι πιθανότητες να έχουμε στον τελικό πληθυσμό των cDNA που παρήχθησαν όλο τον στόχο από το 3' ως το 5' άκρο του.

Υλικά

- RNA
- Random Primers
- dNTPs
- Buffer
- RNase Inhibitor
- Reverse Transcriptase

Μέθοδος

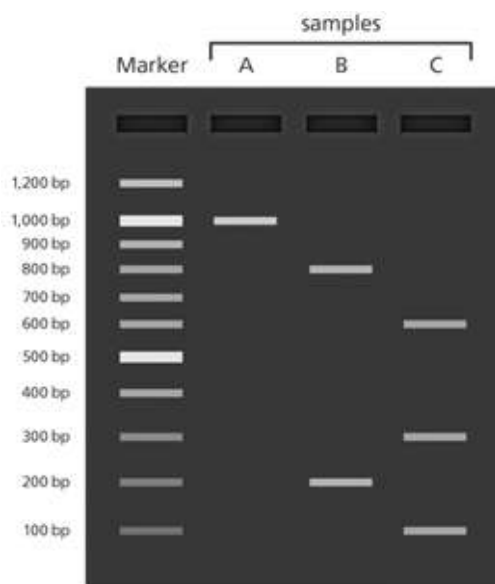
Συνολικά τα αντιδραστήρια που θα χρειαστούμε είναι τα εξής:

Υλικό	Συγκέντρωση	Ποσότητα
RNA	Εξαρτάται από το δείγμα	Εξαρτάται από τη συγκέντρωση
Random Primers	10ng/μl	1,5μl
dNTPs	40mM	2,0μl
Buffer	1X	4,0μl
RNase inhibitor	40units	1,2μl
Reverse Transcriptase	200units	1,2μl
ddH2O	-	Συμπληρώνει τον όγκο
Τελικός όγκος		40μl

- Αρχικά γίνεται προσθήκη σε σωληνάριο του RNA και των τυχαίων εκκινήτων. Γίνεται επώαση στους 70°C για 10min.
- Στη συνέχεια, τα σωληνάρια μεταφέρονται στον πάγο για 5min και γίνεται προσθήκη των υπόλοιπων αντιδραστηρίων.
- Επώαση στους 42°C για 1h και τέλος στους 80°C για 10min.

3.6 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα (gel) αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης είναι μία μέθοδος η οποία χρησιμοποιείται στη βιοχημεία και τη μοριακή βιολογία για το διαχωρισμό μορίων DNA (αλλά και RNA και πρωτεϊνών) με βάση το μήκος της αλληλουχίας τους. Ο διαχωρισμός πραγματοποιείται με την εφαρμογή τάσης στα δύο άκρα του gel, η οποία προκαλεί τη μετακίνηση των αρνητικά φορτισμένων μορίων DNA από τον αρνητικό πόλο προς το θετικό. Η μετακίνηση αυτή παρεμποδίζεται σε ένα βαθμό από το gel της αγαρόζης, προκαλώντας τη διαφορετική ταχύτητα μετακίνησης του DNA ανάλογα



Εικόνα 11: Σχέδιο ηλεκτροφόρησης ενός gel αγαρόζης. Το gel αποτελείται από 4 πηγαδάκια (wells). Στο πρώτο έχει εισαχθεί ο ladder και στα επόμενα 3 τα δείγματα A, B και C. Με τη βοήθεια του ladder, παρατηρούμε ότι το δείγμα A αποτελείται από μόρια DNA 1000bp, το B από DNA 800bp και 200bp και το C από DNA μήκους 600bp, 300bp και 100bp.

με το μέγεθός του: Όσο μεγαλύτερο το μέγεθος του DNA τόσο πιο αργή και η μετακίνηση κατά μήκος του gel. Με τη χρήση ενός μάρτυρα (ladder), δηλαδή ενός μείγματος του οποίου γνωρίζουμε το ακριβές μήκος των μορίων που το αποτελούν, μας δίνεται η δυνατότητα να υπολογίσουμε το μήκος των μορίων του DNA των δειγμάτων (Εικόνα 16).

Η περιεκτικότητα του gel σε αγαρόζη επηρεάζει την ταχύτητα μετακίνησης των δειγμάτων. Για διαχωρισμό μεγαλύτερων σε μήκος δειγμάτων χρησιμοποιούνται πιο αραιά gel, ενώ για το διαχωρισμό μικρότερων μορίων, πιο πυκνά αντίστοιχα. Η οπτικοποίηση των δειγμάτων πραγματοποιείται με τη χρήση μια χρωστικής που ονομάζεται βρωμιούχο αιθίδιο. Η χρωστική αυτή παρεμβάλλεται στη μεγάλη αύλακα του DNA και το κάνει να φθορίζει υπό την επίδραση υπεριώδους ακτινοβολίας.

Υλικά

- Ρυθμιστικό διάλυμα TBE 5X (1L: 54g Tris-base, 20mL EDTA 0,5M (pH:8), 27,5g Boric acid)
- Αγαρόζη
- Ladder
- Διάλυμα φόρτωσης (Loading buffer) 10X (0,25% μπλε της βρωμοφαινόλης, 0,25% κυανού της ξυλόλης, 15% φικκόλη σε νερό)
- Βρωμιούχο αιθίδιο

Μέθοδος

Για τη δημιουργία 100ml ενός τυπικού gel αгарόζης 1%, 0,5X TBE η μέθοδος που ακολουθείται είναι η εξής:

- Ζύγιση 1gr αгарόζης και προσθήκη σε κωνική φιάλη.
- Δημιουργία ποσότητας ρυθμιστικού διαλύματος TBE 0,5X από αρχικό διάλυμα TBE 5X.
- Προσθήκη 100ml TBE 0,5X στη φιάλη.
- Ακολουθεί προσεκτική θέρμανση της κωνικής φιάλης, με ταυτόχρονη ανάδευση ανά τακτά χρονικά διαστήματα, μέχρι την πλήρη διάλυση της αгарόζης.
- Προσθήκη 4μl βρωμιούχου αιθιδίου στην κωνική φιάλη και ανακίνησή της.
- Περίχυση του περιεχομένου της φιάλης σε μήτρα ηλεκτροφόρησης και τοποθέτηση ειδικών χτενών στις θέσεις της μήτρας. Όταν στερεοποιηθεί το gel, οι χτένες θα έχουν δημιουργήσει ειδικά πηγαδάκια (wells).
- Το gel αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να στερεοποιηθεί πλήρως και στη συνέχεια αφαιρούνται οι χτένες.

Για την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων ακολουθούνται τα εξής βήματα:

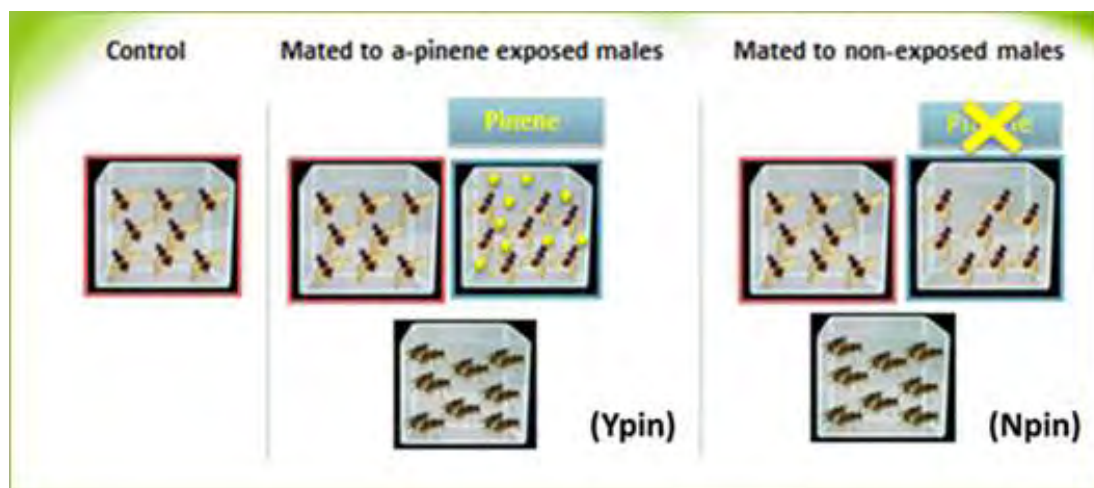
- Αφαίρεση του gel από την ειδική μήτρα και τοποθέτησή του στην ειδική συσκευή ηλεκτροφόρησης.
- Προσθήκη του loading buffer μέχρι πλήρους κάλυψης των πηγαδιών του gel.
- Προσεκτική εισαγωγή των δειγμάτων και του ειδικού μάρτυρα στα πηγαδάκια της αντίδρασης.
- Εφαρμογή τάσης με τη χρήση ειδικών ηλεκτροδίων.
- Παρατήρηση των αποτελεσμάτων με τη χρήση υπεριώδους λαμπτήρα.

4. Αποτελέσματα

4.1 Προηγούμενα Πειράματα

Πριν την έναρξη της παρούσας διπλωματικής εργασίας είχε προηγηθεί μία πειραματική διαδικασία της οποίας το παρόν έργο αποτελεί φυσική συνέχεια και επέκταση. Τα πειράματα έλαβαν χώρα στο Εργαστήριο Εντομολογίας και Γεωργικής Ζωολογίας, του Τμήματος Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας στον Βόλο.

Πειραματικός σχεδιασμός



Εικόνα 12: Σχεδιασμός των προηγούμενων πειραμάτων

Χρησιμοποιήθηκαν τρεις διαφορετικοί πληθυσμοί θηλυκών ατόμων δάκου 12 ημερών. Σκοπός ήταν η ταυτοποίηση γονιδίων τα οποία παρουσιάζουν διαφορετική έκφραση σε θηλυκά άτομα εφόσον αυτά συζευχθούν με αρσενικά άτομα τα οποία:

1. έχουν υποστεί έκθεση σε α-πινένιο (η ομάδα αυτή ονομάζεται **Yes-pin** ή **Ypin** ή απλά **Y**),
2. δεν έχουν εκτεθεί στην ουσία (η ομάδα αυτή ονομάζεται **No-pin** ή **Npin** ή απλά **N**).

Ως δείγμα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν μη συζευγμένα θηλυκά άτομα 12 ημερών (η ομάδα αυτή ονομάζεται **Control-pin** ή **Cpin** ή απλά **C**) (Εικόνα 12).

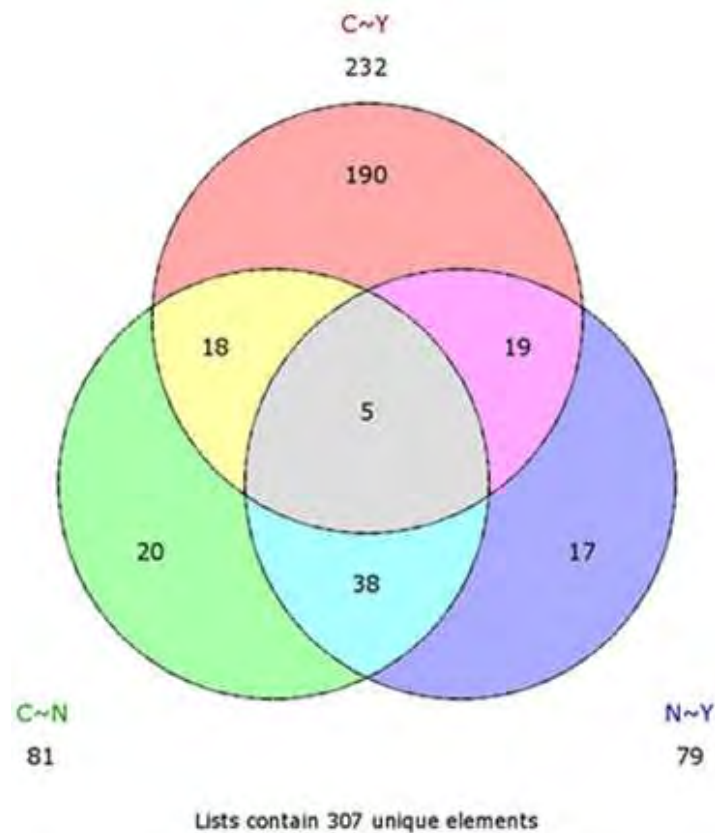
Ροή εργασιών

- Τα κεφάλια των θηλυκών ατόμων συλλέχθηκαν λίγα λεπτά μετά τη σύζευξη ώστε να διασφαλισθεί ότι η διαδικασία ήταν ολοκληρωμένη και χωρίστηκαν ανάλογα με τον πληθυσμό στον οποίο ανήκαν.
- Ακολούθησε ανάλυση μέσω Illumina RNA sequencing (RNA seq) ανά πληθυσμό εντόμων.
- Στη συνέχεια έγινε η ταυτοποίηση των γονιδίων τα οποία παρουσίαζαν διαφορετική έκφραση ανάμεσα στους ελεγχόμενους πληθυσμούς.

Αποτελέσματα

Τα αποτελέσματα του RNA seq (το οποίο, όπως αναφέρθηκε, έγινε μόνο για τα θηλυκά άτομα) έδειξαν τα ακόλουθα αποτελέσματα. Συνολικά 307 γονίδια ταυτοποιήθηκαν τα οποία εμφάνιζαν διαφορετική έκφραση ανάμεσα σε τουλάχιστον

2 από τους 3 πληθυσμούς υπό έλεγχο: Cpin, Npin και Ypin. Συγκεκριμένα, τα γονίδια χωρίστηκαν σε 3 λίστες, L1: Διαφορά ανάμεσα στα C ~ N, L2: Διαφορά ανάμεσα στα C ~ Y, L3: Διαφορά ανάμεσα στα Y ~ N (Εικόνα 18)



Εικόνα 13. Διάγραμμα Venn των διαφορικά εκφρασμένων γονιδίων του RNA sequencing.

[Γονίδια αποκλειστικά της λίστας L1 (C~N) με πράσινο χρώμα (20 RNAs),
Γονίδια αποκλειστικά της λίστας L2 (C~Y) με κόκκινο χρώμα (190 RNAs),
Γονίδια αποκλειστικά της λίστας L3 (Y~N) με μπλε χρώμα (17 RNAs),
Γονίδια που εμφανίζονταν στις λίστες L1 και L2 με κίτρινο χρώμα (18 RNAs),
Γονίδια που εμφανίζονταν στις λίστες L1 και L3 με γαλαζοπράσινο χρώμα (38 RNAs),
Γονίδια που εμφανίζονταν στις λίστες L2 και L3 με ροζ χρώμα (19 RNAs),
Γονίδια που εμφανίζονταν και στις 3 λίστες με γκρι χρώμα (5 RNAs)]

Όπως ήταν αναμενόμενο, κάποια γονίδια εμφανίζονταν σε παραπάνω από μία λίστα. Για παράδειγμα, το mRNA του γονιδίου Chemosensory A7a εμφανιζόταν τόσο στη λίστα L2 όσο και στην L3. Αυτό σημαίνει πολύ απλά ότι παρουσίαζε σημαντικές ποσοτικές διαφορές τόσο ανάμεσα στο C και το Y, όσο και ανάμεσα στο Y και το N.

4.2 Επιλογή γονιδίων

Στην προσπάθεια αναγνώρισης των γονιδίων τα οποία εμφανίζονταν στα αποτελέσματα του RNA seq, πραγματοποιήθηκε ανάλυση BLASTX ώστε να ταυτοποιηθούν τα γονίδια βάσει ομολογίας. Τα προς μελέτη γονίδια που επιλέχθηκαν στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας από το σύνολο των 307 γονιδίων του RNA seq είναι αυτά τα οποία σχετίζονται άμεσα με τη λειτουργία του οσφρητικού συστήματος του δάκου. Συνολικά για τα τρία γονίδια που επιλέχθηκαν, τα top BLASTX hits έδειξαν ομολογία με τα γονίδια της *Drosophila melanogaster*, εφόσον δεν έχουν χαρακτηριστεί ακόμα στο δάκο. Συγκεκριμένα έγινε μελέτη των κάτωθι γονιδίων:

Γονίδια	Αποτελέσματα RNA seq (μόνο θηλυκά άτομα)
OBP-56a	Διαφορική έκφραση ανάμεσα σε Y και N
Chemosensory A7a	Διαφορική έκφραση ανάμεσα σε Y και N και Y και C
Chemosensory A75a	Διαφορική έκφραση ανάμεσα σε Y και N και Y και C

4.3 Συλλογή νέων ιστών

Σε μια προσπάθεια να πιστοποιηθούν τα αποτελέσματα του RNA sequencing, έγινε συλλογή νέων ιστών κατά τα προηγούμενα από άτομα άγριου πληθυσμού, συμπεριλαμβανομένων και των αρσενικών αυτήν την φορά. Τα αρσενικά χωρίστηκαν κατ' αντιστοιχία σε πληθυσμούς ανάλογα με το αν είχαν εκτεθεί σε απινένιο (Yes-pin ή Ypin) ή όχι (No-pin ή Npin). Χρησιμοποιήθηκαν παρθένα αρσενικά άτομα ως δείγματα ελέγχου (Control-pin ή Cpin). Τα κεφάλια συλλέχθηκαν και χωρίστηκαν σε 3 δείγματα ανά πληθυσμό, ως εξής: **Female C-1,2 και 3**, **Female Y-1,2 και 3**, **Female N-1,2 και 3**. Αντίστοιχα για τα αρσενικά άτομα: **Male C-1,2 και 3**, **male Y-1,2 και 3**, **male N-1,2 και 3**:

	Female			Male		
Control pin (C)	♀ C ₁	♀ C ₂	♀ C ₃	♂ C ₁	♂ C ₂	♂ C ₃
Yes pin (Y)	♀ Y ₁	♀ Y ₂	♀ Y ₃	♂ Y ₁	♂ Y ₂	♂ Y ₃
No pin (N)	♀ N ₁	♀ N ₂	♀ N ₃	♂ N ₁	♂ N ₂	♂ N ₃

Κάθε βιολογικό δείγμα αποτελούταν από 8-10 κεφάλια εντόμων.

4.4 Απομόνωση και Επεξεργασία του RNA

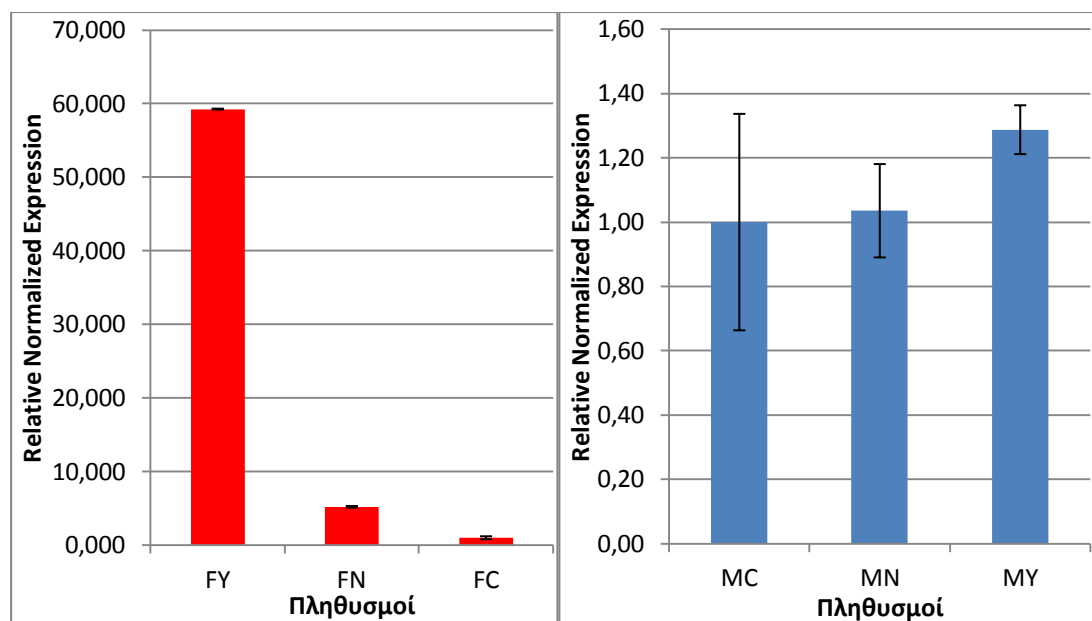
Για να ελεγχθεί η πιστότητα των αποτελεσμάτων του RNA sequencing, ακολουθήθηκε η λειτουργική ανάλυση των γονιδίων του οσφρητικού συστήματος τα οποία έδειξαν διαφορετική έκφραση τουλάχιστον ανάμεσα στα Yes-pin και No-pin με τη χρήση της τεχνικής της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-Time PCR). Για το σκοπό αυτό, απομονώθηκε RNA από τα κεφάλια ώριμων αρσενικών και θηλυκών ατόμων τα οποία είχαν διαχωριστεί βάσει φύλου ανά πληθυσμό στον οποίο ανήκαν και περαιτέρω σε 3 δείγματα ανά πληθυσμό, έτσι ώστε κάθε βιολογικό δείγμα να περιέχει 8-10 κεφάλια εντόμων. Ακολούθησε επεξεργασία με DNase, ένα ένζυμο το οποίο αποικοδομεί μόρια DNA, ως μέθοδος επιβεβαίωσης της απομόνωσης αποκλειστικά του RNA. Για να γίνει δυνατή η ποσοτικοποίηση του δείγματος μέσω Real-Time PCR, είναι απαραίτητη η ύπαρξη δίκλωνου μορίου. Αυτό επιτυγχάνεται με τη χρήση του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση (Reverse Transcriptase – RT) το οποίο έχει τη δυνατότητα να συνθέσει το συμπληρωματικό cDNA κλώνο του μονόκλωνου RNA του δείγματος.

4.5 Real-Time PCR

Για την επίτευξη της ανάλυσης μέσω της τεχνικής της Real-Time PCR είναι απαραίτητος ο σχεδιασμός κατάλληλων εκκινητών βάσει της αλληλουχίας των μεταγράφων των υπό μελέτη γονιδίων. Επίσης σχεδιάστηκαν εκκινητές που ενίσχυαν τα γονίδια σταθερής έκφρασης GAPDH και 14-3-3zeta, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ως γονίδια αναφοράς (reference genes) για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων. Η απόδοση κάθε ζεύγους εκκινητών (primer set) ελέγχθηκε μέσω PCR με μήτρα γονιδιακό DNA δάκου με σκοπό την βελτιστοποίηση των συνθηκών της αντίδρασης. Αυτή πραγματοποιήθηκε με εναλλαγές της θερμοκρασίας και της συγκέντρωσης των εκκινητών.

Ακολούθησε η PCR πραγματικού χρόνου για τον έλεγχο της πιστότητας των αποτελεσμάτων του RNA sequencing μέσω την ανάλυση της διαφορετικής έκφρασης των γονιδίων-στόχων. Η ειδικότητα της αντίδρασης ελέγχθηκε από την καμπύλη αποδιάταξης των προϊόντων της Real-Time κατά την οποία δεν παρατηρήθηκε η ύπαρξη διμερών των εκκινητών ή παραπροϊόντων. Για τη μεγαλύτερη εγγύτητα των αποτελεσμάτων σε κάθε Real-Time PCR τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν διπλότυπα (duplicates). Για κάθε διαφορετικό πληθυσμό εξετάστηκαν τρία βιολογικά δείγματα. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν για κάθε γονίδιο ανά πληθυσμό με χρήση του μέσου όρου από τα τρία δείγματα. Τα αποτελέσματα είναι τα ακόλουθα:

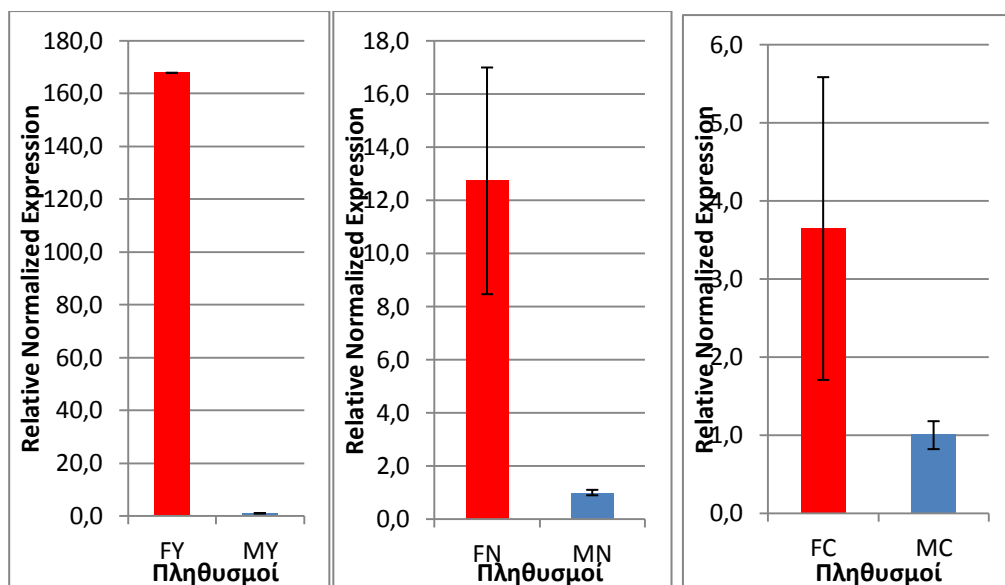
Chemosensory A7a



Διάγραμμα 1. Chemosensory A7a Θηλυκά – Αρσενικά. F Θηλυκό – Female, M Αρσενικό – Male, C Control πινένιο, Y Yes πινένιο, N No πινένιο. Τα αποτελέσματα των θηλυκών ατόμων εμφανίζονται με κόκκινο χρώμα ενώ των αρσενικών με μπλε για ευκολότερη ανάγνωση. Οι γραμμές σφάλματος απεικονίζουν το τυπικό σφάλμα για κάθε πληθυσμό (standard error of the mean). Η διαφορική έκφραση ανάμεσα στα FY άτομα και τους υπόλοιπους πληθυσμούς των θηλυκών ατόμων, είναι στατιστικά σημαντική. Η στατιστική ανάλυση έγινε με χρήση των δοκιμασιών Student's t-test και Analysis of Variance (ANOVA) σε διάστημα εμπιστοσύνης 90%.

Ξεκινώντας με το γονίδιο Chemosensory A7a, παρατηρείται αρχικά μία ξεκάθαρη υπερέκφραση του γονιδίου στα θηλυκά Yes-Pin άτομα σε σύγκριση με τα υπόλοιπα θηλυκά άτομα. Αυτό το γεγονός επιβεβαιώνεται και από τα αποτελέσματα του RNA sequencing τα οποία τοποθετούσαν το γονίδιο στις λίστες με διαφορική έκφραση ανάμεσα σε Yes-pin και No-pin και ανάμεσα σε Yes-Pin και Control-Pin, κάτι το οποίο φαίνεται ξεκάθαρα από το αντίστοιχο γράφημα.

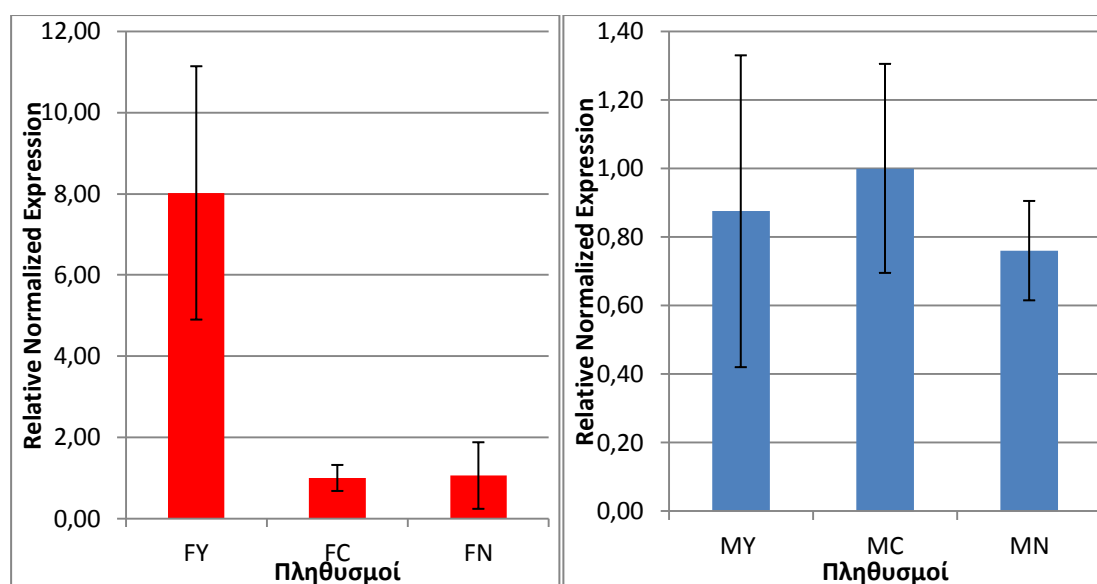
Όσον αφορά τα αρσενικά άτομα υπάρχει μία σε γενικές παρόμοια έκφραση σε όλους τους πληθυσμούς. Διαφαίνεται, επίσης, μια πολύ μικρή τάση μεγαλύτερης έκφρασης του γονιδίου στον πληθυσμό Yes-Pin χωρίς όμως να μας επιτρέπει να βγάλουμε ένα ασφαλές συμπέρασμα από το γράφημα.



Διάγραμμα 2. Chemosensory A7a Πληθυσμοί. F Θηλυκό – Female, M Αρσενικό – Male, C Control πινένιο, Y Yes πινένιο, N No πινένιο. Τα αποτελέσματα των θηλυκών ατόμων εμφανίζονται με κόκκινο χρώμα ενώ των αρσενικών με μπλε για ευκολότερη ανάγνωση. Οι γραμμές σφάλματος απεικονίζουν το τυπικό σφάλμα για κάθε πληθυσμό (standard error of the mean). Η διαφορική έκφραση ανάμεσα στα FY άτομα και τα MY, είναι στατιστικά σημαντική. Η στατιστική ανάλυση έγινε με χρήση των δοκιμασιών Student's t-test και Analysis of Variance (ANOVA).

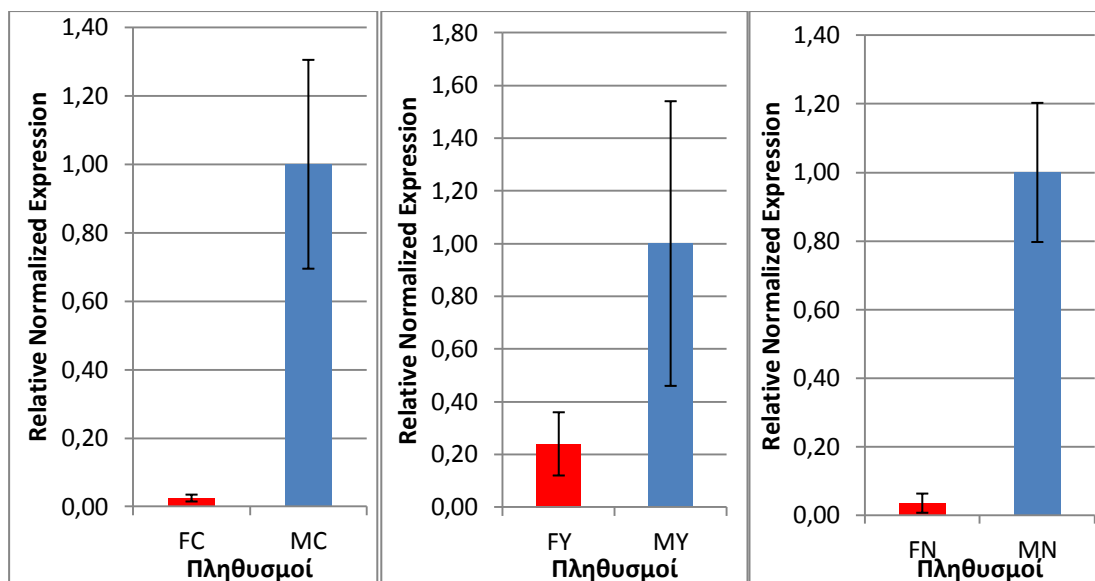
Τα γραφήματα στα οποία φαίνεται για κάθε πληθυσμό η έκφραση ανά φύλο δίνουν μία πολύ ενδιαφέρουσα εικόνα. Η έκφραση του γονιδίου των θηλυκών εντόμων ξεπερνά σε μεγάλο βαθμό την έκφραση των αρσενικών. Συγκρίνοντας τα τρία αυτά γραφήματα με αυτό των θηλυκών (Διάγραμμα 1) παρατηρείται ότι αν και στο τελευταίο οι πληθυσμοί έχουν μεγάλες διαφορές στα επίπεδα έκφρασης στα τρία γραφήματα πληθυσμών διαφαίνεται μία μεγαλύτερη έκφραση του γονιδίου στα θηλυκά άτομα όλων των πληθυσμών σε σύγκριση με τα αρσενικά. Αυτό δείχνει την υπερέκφραση του γονιδίου στα θηλυκά άτομα σε σύγκριση με τα αρσενικά και υποδεικνύει έναν πιθανό φυλο-ειδικό ρόλο. Να σημειωθεί ότι μόνο η διαφορά ανάμεσα στους πληθυσμούς FY και MY είναι στατιστικά σημαντική. Στους υπόλοιπους πληθυσμούς μας δίνεται μία τάση. Αυτά τα αποτελέσματα αποτελούν μία πρώτη ένδειξη σχετικά με τη φύση του Chemosensory A7a και τον συσχετισμό που έχει αυτό το γονίδιο με το α-πινένιο.

OBP-56



Διάγραμμα 3. OBP-56 Θηλυκά – Αρσενικά. F Θηλυκό – Female, M Αρσενικό – Male, C Control πινένιο, Y Yes πινένιο, N No πινένιο. Τα αποτελέσματα των θηλυκών ατόμων εμφανίζονται με κόκκινο χρώμα ενώ των αρσενικών με μπλε για ευκολότερη ανάγνωση. Οι γραμμές σφάλματος απεικονίζουν το τυπικό σφάλμα για κάθε πληθυσμό (standard error of the mean). Καμία στατιστικά σημαντική διαφορά δεν παρατηρείται. Η στατιστική ανάλυση έγινε με χρήση των δοκιμασιών Student's t-test και Analysis of Variance (ANOVA) σε διάστημα εμπιστοσύνης 90%.

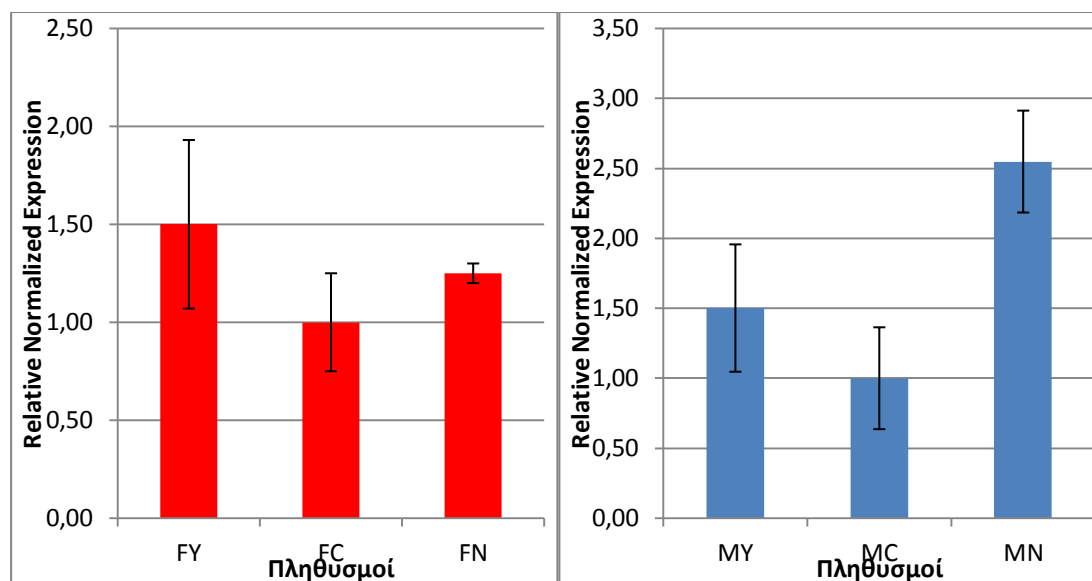
Στη συνέχεια, φαίνονται τα αποτελέσματα της Real-Time PCR για το OBP-56. Καταρχήν, εξετάζοντας το πρώτο γράφημα, των θηλυκών εντόμων παρατηρείται μία μεγαλύτερη έκφραση του γονιδίου στα Yes-pin άτομα, η οποία όμως δεν είναι στατιστικά σημαντική. Η υπερέκφραση αυτή σε κάποιο βαθμό επιβεβαιώνει τα αποτελέσματα του RNA sequencing, στο οποίο το OBP-56 βρισκόταν στη λίστα διαφορικής έκφρασης ανάμεσα σε Yes-pin και No-pin. Για να υπάρξει μία πλήρης επιβεβαίωση του παραπάνω αποτελέσματος θα έπρεπε να φαίνεται μία ενδιάμεση έκφραση του γονιδίου στον πληθυσμό Control-pin, λόγω του ότι από το RNA sequencing δεν υπήρξε διαφορική έκφραση ούτε ανάμεσα σε Control-pin και Yes-pin ούτε ανάμεσα σε Control-pin και No-pin. Αντίθετα στα αρσενικά, όλα τα άτομα ανεξαρτήτως πληθυσμού φάνηκε να έχουν μία παρόμοια έκφραση.



Διάγραμμα 4. OBP-56 Πληθυσμοί. F Θηλυκό – Female, M Αρσενικό – Male, C Control πινένιο, Y Yes πινένιο, N No πινένιο. Τα αποτελέσματα των θηλυκών ατόμων εμφανίζονται με κόκκινο χρώμα ενώ των αρσενικών με μπλε για ευκολότερη ανάγνωση. Οι γραμμές σφάλματος απεικονίζουν το τυπικό σφάλμα για κάθε πληθυσμό (standard error of the mean). Η διαφορική έκφραση ανάμεσα στα δύο φύλα στους πληθυσμούς Control-pin και No-pin είναι στατιστικά σημαντική. Η στατιστική ανάλυση έγινε με χρήση των δοκιμασιών Student's t-test και Analysis of Variance (ANOVA) σε διάστημα εμπιστοσύνης 90%.

Όσον αφορά τα τρία γραφήματα της συσχέτισης των δύο φύλων είναι εύκολο να παρατηρηθεί το πρότυπο που δημιουργείται, στο οποίο το γονίδιο έχει μία μεγαλύτερη έκφραση καθολικά σε όλα τα αρσενικά άτομα σε σύγκριση με τα θηλυκά άσχετα με τον πληθυσμό των ατόμων. Το αποτέλεσμα αυτό υποδεικνύει τον πιθανό φυλο-ειδικό ρόλο του γονιδίου, κάτι που αναλύεται σε επόμενο κεφάλαιο (Ενότητα 5.2).

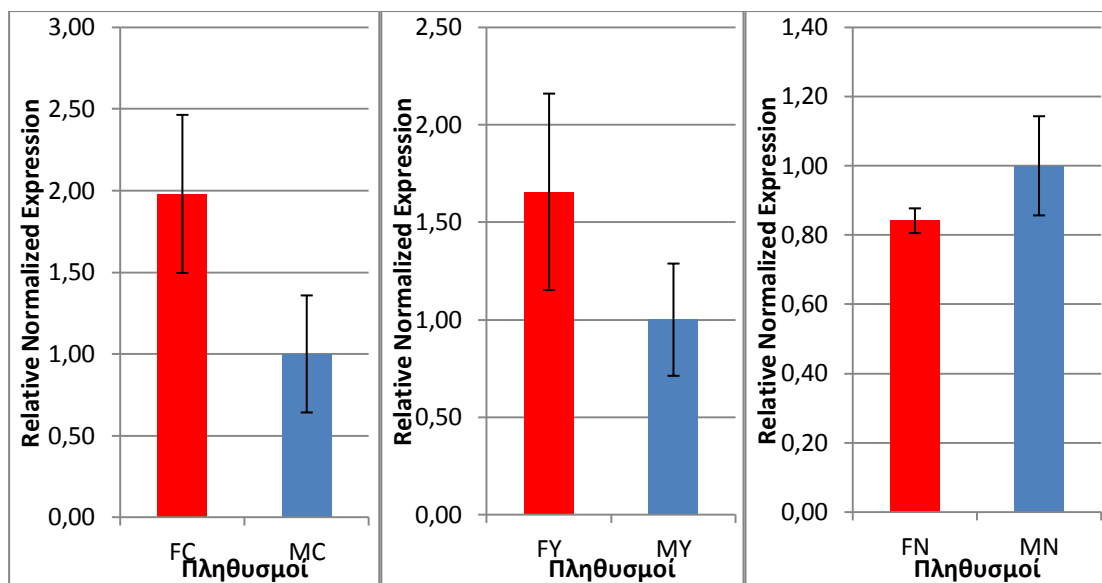
Chemosensory A75a



Διάγραμμα 5. Chemosensory A75a Θηλυκά – Αρσενικά. F Θηλυκό – Female, M Αρσενικό – Male, C Control πινένιο, Y Yes πινένιο, N No πινένιο. Τα αποτελέσματα των θηλυκών ατόμων εμφανίζονται με κόκκινο χρώμα ενώ των αρσενικών με μπλε για ευκολότερη ανάγνωση. Οι γραμμές σφάλματος απεικονίζουν το τυπικό σφάλμα για κάθε πληθυσμό (standard error of the mean). Καμία στατιστικά σημαντική διαφορά δεν παρατηρείται. Η στατιστική ανάλυση έγινε με χρήση των δοκιμασιών Student's t-test και Analysis of Variance (ANOVA) σε διάστημα εμπιστοσύνης 90%.

Ακολουθώντας, στα δύο τελευταία Διαγράμματα (Διάγραμμα 5 και 6) αναλύονται τα αποτελέσματα του Chemosensory A75a. Κατά τη σύγκριση των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου, στο πρώτο γράφημα παρατηρείται μία πολύ μικρή τάση μεγαλύτερης έκφρασης του Yes-pin αλλά η οποία δεν είναι σε καμία περίπτωση τέτοια ώστε να εξαχθεί κάποιο συμπέρασμα αναφορικά με τους διαφορετικούς χειρισμούς των πληθυσμών. Συνεπώς δεν επιβεβαιώνονται τα αποτελέσματα του RNA sequencing το οποίο τοποθετούσε το γονίδιο στις λίστες διαφορετικής έκφρασης τόσο ανάμεσα στα Yes-pin και No-pin όσο και ανάμεσα στα Yes-pin και Control-pin.

Από την άλλη πλευρά, στα αρσενικά άτομα παρατηρείται μία μεγάλη έκφραση του γονιδίου του No-pin πληθυσμού η οποία ακολουθείται από την έκφραση στον Yes-pin πληθυσμό με τον πληθυσμό Control-pin να έχει την χαμηλότερη έκφραση από όλους. Αυτή η εικόνα είναι σίγουρα ενδιαφέρουσα παρά το γεγονός ότι η εξαγωγή ενός ασφαλούς συμπεράσματος όσον αφορά την έκφραση του Chemosensory A75a είναι αδύνατη.



Διάγραμμα 6. Chemosensory A75a Θηλυκά – Αρσενικά. F Θηλυκό – Female, M Αρσενικό – Male, C Control πινένιο, Y Yes πινένιο, N No πινένιο. Τα αποτελέσματα των θηλυκών ατόμων εμφανίζονται με κόκκινο χρώμα ενώ των αρσενικών με μπλε για ευκολότερη ανάγνωση. Οι γραμμές σφάλματος απεικονίζουν το τυπικό σφάλμα για κάθε πληθυσμό (standard error of the mean). Καμία στατιστικά σημαντική διαφορά δεν παρατηρείται. Η στατιστική ανάλυση έγινε με χρήση των δοκιμασιών Student's t-test και Analysis of Variance (ANOVA) σε διάστημα εμπιστοσύνης 90%.

Στα τρία τελευταία γραφήματα (Διάγραμμα 6) είναι ενδιαφέρον ότι τα θηλυκά άτομα έχουν μία τάση μεγαλύτερης έκφρασης στους πληθυσμούς Yes-pin και Control-pin ενώ στον πληθυσμό των No-pin φαίνεται μία μικρή τάση μεγαλύτερης έκφρασης του γονιδίου από τα αρσενικά άτομα. Αυτές οι διαφορές δεν είναι, όμως, στατιστικά σημαντικές και απλά μας δείχνουν μία τάση μεγαλύτερης έκφρασης στους αντίστοιχους πληθυσμούς.

5. Συζήτηση

Ο δάκος της ελιάς *Bactrocera oleae*, αποτελεί το σημαντικότερο εχθρό του φυτού παγκοσμίως. Οι υπάρχοντες τρόποι αντιμετώπισής του είναι κατά βάση συνθετικά εντομοκτόνα, ουσίες οι οποίες αναπόφευκτα επιβαρύνουν το περιβάλλον, διαταράσσουν τα οικοσυστήματα και αποτελούν κίνδυνο για την υγεία των καταναλωτών καθώς και για τη δημόσια υγεία γενικότερα. Η εξεύρεση βιολογικών εντομοκτόνων είναι ίσως η μοναδική λύση στα ανωτέρω προβλήματα και αποτελεί πολύ σημαντικό αντικείμενο έρευνας.

Το πινένιο αποτελεί την κύρια εύοσμη χημική ένωση των φυτών. Αναδύεται από μεγάλη πληθώρα φυτών και αποτελεί συστατικό της ρητίνης των κωνοφόρων δέντρων. Το α-πινένιο είναι το στερεοϊσομερές της ουσίας που είναι πιο άφθονο στη φύση, το οποίο άλλοτε δρα ως εντομοαπωθητικό και άλλοτε ως ελκυστικό για διαφορετικά είδη εντόμων. Συγκεκριμένα για τον δάκο της ελιάς, για τον οποίο αποτελεί συστατικό της σεξουαλικής φερομόνης του, φαίνεται πως επιδρά ενισχυτικά στο ζευγάρωμα του εντόμου. Το α-πινένιο ως οσμή εισέρχεται στον οργανισμό μέσω του οσφρητικού συστήματος του εντόμου, οπότε η διερεύνηση γονιδίων που εμπλέκονται στη λειτουργία του συστήματος αυτού αποτελεί στόχο της παρούσας εργασίας.

Μέσω του οσφρητικού του συστήματος ο δάκος έχει τη δυνατότητα να βρει ξενιστή, άτομα του άλλου φύλου για να ζευγαρώσει, κατάλληλα μέρη για να ωοαποθέσει και να αποφεύγει κινδύνους. Με λίγα λόγια το οσφρητικό είναι το σύστημα που του επιτρέπει να αλληλεπιδρά με το συνεχώς μεταβαλλόμενο περιβάλλον του.

Στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν ο εντοπισμός και η λειτουργική ανάλυση γονιδίων του οσφρητικού συστήματος του *Bactrocera oleae* τα οποία εμπλέκονται στην απόκριση του εντόμου στο α-πινένιο. Στη λογική αυτή, αρσενικά και θηλυκά άτομα δάκου εκτέθηκαν σε άρωμα α-πινενίου, τα πρώτα άμεσα ενώ τα δεύτερα έμμεσα μέσω ζευγαρώματος με εκτεθειμένα αρσενικά. Τα έντομα αυτά χωρίστηκαν σε πληθυσμούς ανάλογα με το αν είχαν εκτεθεί ή όχι σε πινένιο και σε πληθυσμούς control. Ακολούθησε απομόνωση ολικού τρανσκριπτόματος από τα κεφάλια των εντόμων και μετατροπή σε cDNA για περαιτέρω ανάλυση. Χρησιμοποιώντας στοιχεία από RNA sequencing από προηγούμενα πειράματα, έγινε επιλογή των γονιδίων με τα οποία ασχοληθήκαμε, για τα οποία σχεδιάστηκαν εκκινητές. Στη συνέχεια, έγινε ποσοτική Real-Time PCR στα δείγματα για να ελεγχθούν πρότυπα διαφορετικής έκφρασης ανάμεσα στους διαφορετικούς πληθυσμούς.

5.1 Εντοπισμός και Λειτουργική ανάλυση γονιδίων του Οσφρητικού Συστήματος

Με βάση τα αποτελέσματα του RNA sequencing, έγινε έλεγχος μέσω Real-Time PCR σε 3 γονίδια του οσφρητικού συστήματος: Τα Chemosensory A7a, Chemosensory A75a και OBP-56. Αρχικά, τα γονίδια αυτά εντοπίστηκαν σε όλους τους πληθυσμούς και των δύο φύλων. Κατά τη λειτουργική ανάλυση παρατηρήθηκαν ιδιαίτερα πρότυπα έκφρασης τα οποία θα αναλυθούν ανά γονίδιο:

Chemosensory A7a

Για το γονίδιο Chemosensory A7a παρατηρήθηκε υπερέκφραση στα θηλυκά άτομα τα οποία ήταν εκτεθειμένα (έμμεσα, μέσω σύζευξης με εκτεθειμένα αρσενικά) σε α-πινένιο. Αυτό ήταν και το αναμενόμενο πρότυπο έκφρασης το οποίο επιβεβαιώνεται από τα δεδομένα του RNA sequencing, τα οποία σημειώνουν σημαντική διαφορά ανάμεσα στα θηλυκά Yes-pin σε σύγκριση τόσο με τα No-pin όσο και με τα Control-pin. Συνεπώς προκύπτει ότι το συγκεκριμένο γονίδιο εμπλέκεται με κάποιο τρόπο στην απόκριση των θηλυκών κατά τη σύζευξη με τα εκτεθειμένα στο α-πινένιο αρσενικά. Όσον αφορά τα αρσενικά άτομα, δεν παρατηρείται κάποιο διαφορικό πρότυπο έκφρασης. Να σημειωθεί ότι δεν υπάρχουν διαθέσιμα δεδομένα RNA sequencing για τα αρσενικά άτομα. Στα γραφήματα στα οποία φαίνεται για κάθε πληθυσμό η έκφραση ανά φύλο, παρατηρείται μεγαλύτερη έκφραση στα θηλυκά συγκριτικά με τα αρσενικά σε όλους τους πληθυσμούς, υποδεικνύοντας κάποιο φυλο-ειδικό ρόλο.

OBP-56

Για το γονίδιο OBP-56 παρατηρήθηκε μεγαλύτερη έκφραση στα θηλυκά Yes-pin άτομα σε σύγκριση με τους άλλους πληθυσμούς των θηλυκών. Τα αποτελέσματα του RNA sequencing τοποθετούν το γονίδιο στη λίστα διαφορικής έκφρασης ανάμεσα στα Yes και No-pin. Σύμφωνα με αυτό, θα έπρεπε να παρατηρείται μία ενδιάμεση έκφραση του γονιδίου στον πληθυσμό Control-pin, λόγω του ότι από το RNA sequencing δεν υπήρξε διαφορική έκφραση ούτε ανάμεσα σε Control-pin και Yes-pin ούτε ανάμεσα σε Control-pin και No-pin. Ως αποτέλεσμα, επιβεβαιώνεται η υπερέκφραση του Yes-pin πληθυσμού σε σύγκριση με τον No-pin, αλλά η παρατηρούμενη υπερέκφραση του Yes-pin σε σύγκριση με το Control-pin δε συμβαδίζει με τα αποτελέσματα του RNA sequencing. Όσον αφορά τα αρσενικά άτομα δεν διαφοροποιείται η έκφραση του γονιδίου, καθώς τα παρατηρούμενα επίπεδα είναι παρόμοια σε όλους τους πληθυσμούς. Σε σύγκριση ανάμεσα στα επίπεδα έκφρασης αρσενικών και θηλυκών ατόμων, φαίνεται ότι τα αρσενικά άτομα παρουσιάζουν σταθερά μεγαλύτερη έκφραση του γονιδίου ανεξαρτήτως πληθυσμού, γεγονός που υποδηλώνει την ύπαρξη κάποιου φυλο-ειδικού ρόλου.

Chemosensory A75a

Κατά τη λειτουργική ανάλυση του γονιδίου Chemosensory A75a, στα θηλυκά άτομα παρατηρούνται παρόμοια επίπεδα έκφρασης στους τρεις πληθυσμούς, πράγμα το οποίο αντιτίθεται στα αποτελέσματα του RNA sequencing, τα οποία έδειχναν διαφορετική έκφραση του γονιδίου τόσο ανάμεσα στα Yes-pin και No-pin όσο και ανάμεσα στα Yes-pin και Control-pin. Όσον αφορά τα αρσενικά άτομα διαφαίνεται μία μεγαλύτερη έκφραση του γονιδίου του πληθυσμού No-pin. Τέλος, συγκριτικά ανάμεσα στα δύο φύλα, τα θηλυκά άτομα έχουν μία τάση μεγαλύτερης έκφρασης στους πληθυσμούς Yes-pin και Control-pin ενώ στον πληθυσμό των No-pin υπάρχει μία μικρή τάση μεγαλύτερης έκφρασης του γονιδίου στα αρσενικά άτομα. Μία πιθανή εξήγηση των αποτελεσμάτων αυτών (κυρίως όσον αφορά τα αρσενικά άτομα) είναι η αυξημένη έκφραση του γονιδίου κατά τη σύζευξη σε σχέση με μη συζευγμένα άτομα. Μία άλλη πιθανή εξήγηση είναι ότι το γονίδιο έχει έναν τελείως διαφορετικό ρόλο από αυτόν που θα μπορούσε να παρατηρηθεί στη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία (Ενότητα 5.2). Δυστυχώς, τα αποτελέσματα δε δίνουν τη δυνατότητα μίας πιο σίγουρης πρόβλεψης για το ρόλο του γονιδίου.

5.2 Πρόβλεψη Λειτουργίας των Γονιδίων

Τα πρότυπα έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων όπως προέκυψαν τόσο από τη λειτουργική ανάλυση μέσω Real-Time PCR όσο και από το RNA sequencing δίνουν τη δυνατότητα μιας πρώτης εκτίμησης της πιθανής λειτουργίας των γονιδίων.

Chemosensory A7a

Το παρατηρούμενο πρότυπο έκφρασης για το συγκεκριμένο γονίδιο, το οποίο περιλαμβάνει την υπερέκφρασή του στα θηλυκά Yes-pin άτομα, υποδεικνύει πως πιθανότατα παίζει ρόλο στην απόκριση του θηλυκού εντόμου σε αρσενικά άτομα που έχουν εκτεθεί σε άρωμα α-πινενίου. Γνωρίζουμε ότι η έκθεση σε α-πινένιο ενισχύει την απόδοση και των δύο φύλων στο ζευγάρι [Gerofotis *et al.*, 2013]. Αυτό που θα μπορούσε να υποθεθεί είναι ότι το Chemosensory A7a συνεισφέρει στην αναγνώριση των εκτεθειμένων αρσενικών από τα θηλυκά άτομα και με αυτόν τον έμμεσο τρόπο ενισχύεται η απόδοση και των αρσενικών στο ζευγάρι. Αυτό που δεν είναι γνωστό είναι ο τρόπος με τον οποίο το άρωμα α-πινενίου προκαλεί διαφορετική έκφραση κάποιων γονιδίων στα θηλυκά άτομα τα οποία συζευγνύονται με εκτεθειμένα αρσενικά.

1. Μία πιθανότητα θα ήταν ότι το α-πινένιο διατηρείται στο σώμα των αρσενικών και μέσω της σεξουαλικής επαφής μεταφέρεται στο θηλυκό. Μία πιθανή, οπότε, λειτουργία του γονιδίου είναι η σύνδεσή του με το ίδιο το α-πινένιο και άρα η επιτέλεση του πρώτου βήματος σε ένα μονοπάτι μεταγωγής σήματος που καταλήγει σε αυξημένη σεξουαλική δραστηριότητα των θηλυκών.

2. Μία άλλη πιθανότητα είναι το α-πινένιο να συνδέεται με κάποια OBP ή κάποια CSP στα αρσενικά άτομα και το Chemosensory A7a να συνδέεται με την πρωτεΐνη αυτή. Ίσως ακόμα να είναι η σύνδεση του α-πινενίου στην OBP ή CSP αυτή που να προκαλεί αλλαγές στη δομή της πρωτεΐνης οι οποίες να επιτρέπουν τη σύνδεση με το Chemosensory A7a.
3. Μία τρίτη πιθανότητα είναι το α-πινένιο να προκαλεί ένα καταρράκτη μοριακών αντιδράσεων στο αρσενικό άτομο και το Chemosensory A7a να αντιδρά με κάποιο μόριο του μονοπατιού και μέσω αυτού να προκαλεί αλλαγές στο θηλυκό άτομο.

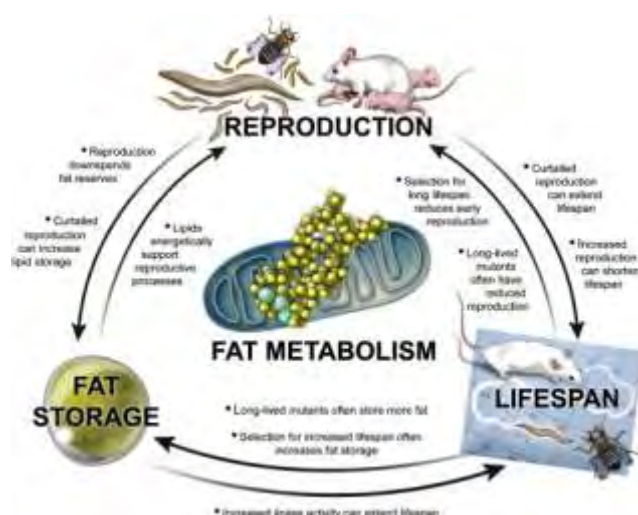
OBP-56

Η παρατήρηση ότι το γονίδιο αυτό έχει μεγαλύτερη έκφραση στα αρσενικά άτομα (όλων των πληθυσμών) σε σύγκριση με τα θηλυκά υποδεικνύει ότι έχει κάποιο ρόλο στη σεξουαλική συμπεριφορά των εντόμων. Η ύπαρξη του, όμως, και σε θηλυκά άτομα δείχνει ότι δεν αποτελεί ένα γονίδιο ειδικό για τα αρσενικά άτομα αλλά ότι έχει κάποιο ρόλο και στα δύο φύλα. Έρευνα στο ομόλογό του γονίδιο PregOBP56a του *Phormia regina* (blowfly, μύγα του κρέατος) έχει δείξει έκφραση σε ένα σύμπλεγμα κυττάρων το οποίο βρίσκεται ανάμεσα στην ψευδοτραχεία του εντόμου και το στοματικό δίσκο, σε σημείο δηλαδή που έρχεται σε άμεση επαφή με την τροφή του εντόμου κατά τη σίτιση [Ishida *et al.*, 2013]. Στην ίδια έρευνα αποδεικνύεται η ικανότητα σύνδεσης του PregOBP56a με λιπαρά οξέα και προτείνεται ο ρόλος του στη μεταφορά των λιπών στο μέσο έντερο προς απορρόφηση.

Λαμβάνοντας υπόψη όλα τα παραπάνω καθώς και την επίδραση του α-πινενίου στη γονιμότητα των ατόμων δάκου καθώς και στη μακροζωία αρσενικών ατόμων υπό διαιτητικό περιορισμό (Ενότητα 1.1.5), είναι εύλογο να αναρωτηθούμε αν υπάρχει κάποια σύνδεση ανάμεσα στην αναπαραγωγή, τη μακροζωία και την αποθήκευση λίπους. Έχει γίνει προσπάθεια από ερευνητές ώστε να βρεθεί μία τέτοια σύνδεση (για παράδειγμα [Hansen *et al.*, 2013]). Τα αποτελέσματα που έχουν βρεθεί είναι αρκετά ενδιαφέροντα:

- Πολυάριθμες μελέτες σε θηλαστικά [Crane, 1991; Fettman *et al.*, 1997; McElroy *et al.*, 1987; Pallier *et al.*, 1980; Salmeri *et al.*, 1991; Stotsenburg, 1913] αλλά και έντομα [Judd *et al.*, 2011; Socha *et al.*, 1991; Strong, 1967; Thomsen *et al.*, 1955] έχουν δείξει ότι η γοναδεκτομή οδηγεί σε αύξηση του βάρους και της λιπώδους μάζας.
- Χειρουργική ή γενετική αφαίρεση του αναπαραγωγικού συστήματος αυξάνει σημαντικά τη διάρκεια ζωής πολλών ζώων [Drori *et al.*, 1976; Flatt, 2011; Hatle *et al.*, 2008; Leroi, 2001; Partridge *et al.*, 2005]. Τα αποτελέσματα αυτά είναι ιδιαίτερα εμφανή στον *C. elegans* και στο συγγενικό είδος του δάκου, τη *Drosophila* [Arantes-Oliveira *et al.*, 2002; Flatt *et al.*, 2008; Hsin *et al.*, 1999; Maynard Smith, 1958].
- Έχει βρεθεί ότι η υπερέκφραση της λιπάσης LIPL-4 είναι αρκετή για την επιμήκυνση της ζωής σκουληκιών αγρίου τύπου [Wang *et al.*, 2008]. Παρομοίως, οι desaturases FAT-5 και FAT-6 είναι απαραίτητες για την επέκταση της ζωής τόσο μέσω της ινσουλίνης όσο και μέσω βλαστικών σειρών, υποδεικνύοντας ότι ο αποκορεσμός των λιπαρών οξέων παίζει ένα σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της μακροβιότητας [Goudeau *et al.*, 2011; Murphy *et al.*, 2003].

Θα μπορούσε, κατά συνέπεια, να ειπωθεί ότι ίσως υπάρχει μία σύνδεση ανάμεσα στην επεξεργασία των λιπαρών οξέων από τον οργανισμό και τη διάρκεια ζωής του. Γνωρίζοντας ότι το α-πινένιο προκαλεί μακροβιότητα σε αρσενικά άτομα υπό διαιτητικό περιορισμό, θα μπορούσαμε να αναρωτηθούμε αν αυτός ο ρόλος επιτελείται από το OBP-56, μέσω της ικανότητας σύνδεσής του με λιπαρά οξέα (που έχει αποδειχθεί στο ομόλογο του, PregOBP56a). Η καλύτερη αξιοποίηση του αποθηκευμένου λιπώδους ιστού πιθανότατα να έχει μεγάλη σημασία σε άτομα με μειωμένα διατροφικά αποθέματα. Για να διαλευκανθεί αυτή η υπόθεση θα μπορούσαν να ελεγχθούν σε μελλοντικά πειράματα τα επίπεδα του γονιδίου μετά από έκθεση σε α-πινένιο ατόμων υπό διαιτητικό περιορισμό (Ενότητα 5.3).



Εικόνα 14: Η αναπαραγωγή, ο μεταβολισμός των λιπαρών οξέων και η διάρκεια ζωής είναι πολύ στενά διασυνδεδεμένα μεταξύ τους. Αν και ο αιτιατός μηχανισμός δεν είναι ακόμα απόλυτα γνωστός, πολλαπλές γραμμές πειραματικών αποδείξεων υποδεικνύουν προς μία στενή σχέση ανάμεσα στα τρία (βλέπε τις κουκίδες στην Εικόνα) [Hansen *et al.*, 2013].

Όσον αφορά την αναπαραγωγή, είναι γνωστό ότι είναι μια ενεργειακά ζημιογόνα διαδικασία κατά την οποία είναι συχνά αναγκαία η κινητοποίηση των αποθηκευμένων λιπαρών οξέων, όπως έχουν δείξει έρευνες σε διαφορετικούς οργανισμούς, όπως στις σαύρες (στις οποίες η έλλειψη λίπους οδηγεί σε αργή ωοαπόθεση και μειωμένο μέγεθος αυγών) [Dial *et al.*, 1981], σε βατράχους [Wells, 2001], σε μαιμούδες [McCabe *et al.*, 2013], σε είδη ψαριών [Tanasichuk *et al.*, 1989; Dygert, 1990; Jorgensen *et al.*, 1997; Craig *et al.*, 2000], σε οστρακοειδή [Freites *et al.*, 2013] κ.α. Θα μπορούσε, οπότε, η καλύτερη αξιοποίηση του αποθηκευμένου λιπώδους ιστού να οδηγεί σε αυξημένη γονιμότητα, όπως παρατηρήθηκε τόσο σε αρσενικά όσο και σε θηλυκά άτομα δάκου και ακόμα περισσότερο σε αυτά υπό διαιτητικό περιορισμό τα οποία χρειάζονται μία ενεργειακή στρατηγική επιβίωσης και αναπαραγωγής (Ενότητα 1.1.5).

Ποιος είναι παρά ταύτα ο αιτιολογικός παράγοντας για το γεγονός ότι στην έρευνα των Gerofotis *et al.* το α-πινένιο δεν οδήγησε και τα θηλυκά άτομα σε μακροβιότητα εφόσον η καλύτερη κινητοποίηση των αποθηκευμένων λιπαρών οξέων υποβοηθάει τόσο τη μακροζωία όσο και την αναπαραγωγή; Όπως ήδη αναφέρθηκε, τα ζώα κινητοποιούν τις αποθήκες λιπώδους ιστού που διαθέτουν κατά την αναπαραγωγή. Εξάλλου, μειωμένη ή καθόλου αναπαραγωγική δραστηριότητα οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα λίπους στο σώμα του ζώου. Αυτή η σχέση ανάμεσα στην αναπαραγωγή και την αποθήκευση λίπους φαίνεται πως αντιπροσωπεύει μία αναπόφευκτη ενεργειακή ανταλλαγή. Σε όλο αυτό το επονομαζόμενο σενάριο του «κόστους της αναπαραγωγής», η εξάντληση των ενεργειακών αποθεμάτων για την υποστήριξη της αναπαραγωγής θεωρείται ότι θέτει σε κίνδυνο την ικανότητα του οργανισμού να υποστηρίξει τη σωματική του

συντήρηση και την επιβίωσή του [Kirkwood, 1977; Williams, 1966]. Ως αποτέλεσμα, λιπίδια τα οποία επιμερίζονται ως προς την αναπαραγωγή, για παράδειγμα, δε θα είναι διαθέσιμα για άλλες διαδικασίες υποστηρικτικές προς τη ζωή [Shanley *et al.*, 2000]. Συμπερασματικά, λοιπόν, είναι πιθανό αυτή η καλύτερη αξιοποίηση του αποθηκευμένου λιπώδους ιστού – μέσω της επίδρασης του α-πινενίου – να δίνει στον οργανισμό ένα πλεονέκτημα, σε σχέση με τα μη εκτεθειμένα άτομα, αλλά αυτό το πλεονέκτημα να χρησιμοποιείται με διαφορετικό τρόπο ανάλογα με το άτομο, τις διατροφικές συνθήκες, το φύλο, το περιβάλλον κλπ. Ως αποτέλεσμα αυτού, τα θηλυκά άτομα το χρησιμοποιούν για την ενίσχυση της αναπαραγωγής ενώ τα αρσενικά τα οποία δεν μπορούσαν να το κάνουν αυτό, ενίσχυσαν τη μακροβιότητά τους.

Chemosensory A75a

Τα αποτελέσματα της Real-Time PCR για το Chemosensory A75a κάνουν δύσκολη την εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με το ρόλο του γονιδίου. Ειδικά στην περίπτωση που ο ρόλος αυτός είναι άσχετος με τη σεξουαλική συμπεριφορά του εντόμου, η αποκάλυψή του είναι αδύνατη και χρειάζεται μία τελείως διαφορετική πειραματική προσέγγιση (Ενότητα 5.3). Στο πλαίσιο αυτό, έγινε μία βιβλιογραφική αναζήτηση για το γονίδιο σε μια προσπάθεια εύρεσης πληροφοριών σχετικών με τη λειτουργία του.

Σε μία έρευνα των Richard R. Copley *et al.*, ελέγχεται η υπόθεση ότι οι λειτουργικές ιδιότητες των θέσεων δέσμευσης γνήσιων μεταγραφικών παραγόντων υπόκεινται σε ισχυρότερους εξελικτικούς περιορισμούς σε σύγκριση με το υπόλοιπο γονιδίωμα [Copley *et al.*, 2007]. Προς αυτήν την κατεύθυνση, οι ερευνητές χρησιμοποιούν το μοντέλο της NFκB/Rel-εξαρτώμενης γονιδιακής ρύθμισης σε 7 αποκλίνοντα είδη *Drosophila*, και συγκεκριμένα τις Dorsal, Dif και Relish, οι οποίες είναι μέλη της οικογένειας πρωτεϊνών Rel. Η οικογένεια αυτή περιλαμβάνει διάφορες τάξεις μεταγραφικών παραγόντων [Silverman *et al.*, 2001] οι οποίες παρουσιάζουν μία ομόλογη πρωτεϊνική περιοχή περίπου 300 αμινοξέων, τη Rel Homology Domain (RHD), η οποία είναι υπεύθυνη για τη σύνδεση με το DNA και τη δημιουργία διμερών [Finn *et al.*, 2006]. Στα πλαίσια της εργασίας τους, οι ερευνητές έλεγξαν ολόκληρα τα γονιδιώματα των εντόμων για την εύρεση θέσεων δέσμευσης Rel. Ένα από τα γονίδια τα οποία περιέχουν τέτοιες θέσεις δέσμευσης και στα 7 είδη *Drosophila* είναι το Chemosensory A75a⁴. Επίσης, ελέγχθηκε η συγγένεια δέσμευσης των γονιδίων αυτών με τις πρωτεΐνες Rel και βαθμολογήθηκε από το 0 έως το 1, με το 0 να υποδηλώνει καμία συγγένεια και το 1 να υποδηλώνει απόλυτη συγγένεια. Το Chemosensory A75a έδειξε πολύ υψηλή συγγένεια και με τις 3 πρωτεΐνες με βαθμολογίες συγγένειας περίπου 0,8.

Όπως, λοιπόν, αναφέρθηκε και πιο πάνω η πρωτεΐνη Dorsal είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας ο οποίος κατά βάση εγκαθιδρύει το ραχικοκοιλιακό πρότυπο στο έμβρυο της *Drosophila* [Nusslein-Volhard, 1979] και ελέγχει την ανοσολογική απόκριση [Lemaitre *et al.*, 1995]. Αντίστοιχα, οι πρωτεΐνη Dif (Dorsal-related immunity factor) παίζει σημαντικό ρόλο στην άμυνα του οργανισμού ενάντια σε μύκητες [Rutschmann *et al.*, 2000; Gobert *et al.*, 2003], σε gram-θετικά βακτήρια [Brown *et al.*, 2009] και στον έλεγχο της ανοσολογικής απόκρισης [Christofi *et al.*, 2013]. Τέλος, η πρωτεΐνη Relish έχει επίσης ρόλο στην

⁴ Το γονίδιο αυτό είναι το ομόλογο γονίδιο του υπό μελέτη Chemosensory A75a στη *Drosophila*, από το οποίο πήρε και το όνομά του.

άμυνα του οργανισμού μέσω του ελέγχου της κυτταρικής απόκρισης μετά από βλάβες στο DNA [Karpac *et al.*, 2011], της άμυνας ενάντια σε gram-αρνητικά βακτήρια [Libert *et al.*, 2006], σε ιούς [Costa *et al.*, 2009] καθώς και στον έλεγχο της κυτταρικής απόκρισης σε χαμηλά επίπεδα αμινοξέων [Wu *et al.*, 2007].

Συμπερασματικά, η έρευνα των Copley *et al.*, δίνει νέα δεδομένα που αναδεικνύουν την ανάγκη μίας διαφορετικής οπτικής πάνω στον ρόλο του Chemosensory A75a, η οποία καθιστά μία διαφορετική πειραματική προσέγγιση απαραίτητη (Ενότητα 5.3). Με γνώμονα τα δεδομένα αυτά είναι δυνατό να στηρίξουμε την υπόθεση της αλληλεπίδρασης των Dorsal, Dif και Relish με το Chemosensory A75a (Εικόνα 20). Με βάση αυτό θα μπορούσε να υποτεθεί ότι το γονίδιο παίζει κάποιο ρόλο στην ανάπτυξη του εμβρύου του εντόμου ή στην άμυνα του οργανισμού. Ελλείψει, όμως, παραπάνω στοιχείων είναι αδύνατη η πρόβλεψη περαιτέρω λεπτομερειών της δράσης του γονιδίου.



Εικόνα 15: Εικόνα από τη βάση δεδομένων STRING, η οποία δείχνει την προβλεπόμενη αλληλεπίδραση μεταξύ του Chemosensory A75a (CheA75a) με τα Dorsal (dl), Relish (Rel) και Dif. Ως ενδιάμεσα μόρια εμφανίζονται τα CG10555 (με πιθανό ρόλο τη ρύθμιση της μεταγραφής του DNA), Sin3A (με ρόλο στην ανάπτυξη του εντόμου) και Ιστονική απακετυλάση 3 (Hdac3 – με ρόλο στη ρύθμιση της κυτταρικής ανάπτυξης και της απόπτωσης) [Szkliarczyk *et al.*, 2015]

5.3 Επίλογος

Η συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία αποτελεί την πρώτη προσπάθεια ταυτοποίησης γονιδίων του οσφρητικού συστήματος του δάκου της ελιάς τα οποία εμπλέκονται στην απόκριση του εντόμου στο α-πινένιο. Η περαιτέρω, όμως, αναζήτηση του ρόλου του καθενός από τα γονίδια αυτά καθίσταται αναγκαία. Σε μελλοντικές προσεγγίσεις του ζητήματος, η σίγηση των γονιδίων ξεχωριστά ή ακόμα και η παράλληλη σίγηση άνω του ενός, θα βοηθήσει στη διαλεύκανση της λειτουργίας των γονιδίων. Η σίγηση των γονιδίων και ο έλεγχος του βαθμού στον οποίο τα έντομα αποκρίνονται στο α-πινένιο, θα αποκαλύψει κατά πόσο τα γονίδια αυτά έχουν άμεση σχέση με τις επιδράσεις της ουσίας στα έντομα και κατά πόσο υπάρχουν και άλλα γονίδια που έχουν παρόμοιους ρόλους. Θα μπορούσαν ακόμα να διερευνηθούν τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων ως απόκριση στο α-πινένιο υπό συνθήκες διαιτητικού περιορισμού και το κατά πόσο η σίγησή τους επηρεάζει τη σεξουαλική απόδοση και τη μακροβιότητα των εντόμων (Ενότητα 5.2). Με αυτόν τον τρόπο, για παράδειγμα, μπορεί να ελεγχθεί η υπόθεση ότι το OBP-56 έχει ενεργό ρόλο στην επιτέλεση των διαδικασιών αυτών. Τέλος, θα αποτελούσε ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα η αναζήτηση του ρόλου του Chemosensory A75a στην ανάπτυξη του εμβρύου και στην άμυνά του. Ένα πείραμα σίγησης του γονιδίου στο στάδιο της εγκαθίδρυσης του ραχιοκοιλιακού προτύπου, για παράδειγμα, μπορεί να αποβεί διαφωτιστικό για τη λειτουργία του γονιδίου και τον πιθανό ρόλο του α-πινενίου στη ανάπτυξη και την άμυνα του εντόμου.

6. Παράρτημα

6.1 Νουκλεοτιδικές αλληλουχίες γονιδίων

OBP-56

ATGAAATCCTCTATCGTTTGCTGCATCCTGGCGACAATACTGCTCAGTCTGTGCGTTTTC
AGTGCGGACGCGGGTTTACGTAAACCCAAGCAGCTCACACCGGAGTTGGCAGCGAAGT
TCGAAGTATTGACCGCTTGGATTGCTTATCGTCTCAATTTGAAACACGCCAAGGAAGCTT
GTGTGGGAGAATATGGTTTTACGGATCAGCTCGCCACCAATTTGGTCAAAAATAAGGGTG
GCGAATCCAAGTGATCAGGAGAAGTGCTACGTAAACTGTCTCTACAATAAATTGGTATTC
TATAAGGACAACGCCATTAACAAACAGGCCATGAAGGAGTCGCTGTATGAAATTGTGGG
AGAACAGCGTTTATTGGATATTGTTAATGGTTGTCTGAGTGCTGGCGGCACCAACGCAT
GTGATAAGGTGTACAAGTTCATGCTTGCGCCTCACCGBAATTCGATAAAGTACGCAGT
GATATATTCTTGCCTGATGAA

Chemosensory A7a

ATGGATTATCGCTTGCGGTTGCGACTCTTCTACCCAATCGTAGTAATATATTTACAGTTGC
AGGCGGCAAATGCCAATGACCGCAATATTGAGCTGAATTCCTTTCAACCGATGTCGGAG
TACGACGACACCTGGGTGGGTTGGGATACTTTGCGCTTGAAAAAAAAAATCGCGCAAGGA
ATTGGGCATGACTGGCGATGTAAAGATCAACCAGAATTTGGGCAACGAGCAGCAGGTTT
CGCTGCATATTTACAAATACGATCGTGAGAGTAAACGACGCGGCCCGATTGTGTTTCAAA
CGCAAAAACCTTTCTGTAAACTAGCGGAGTCACTCGAGAGCACATATGATGGCATGGTA
AAAGCATCAAATTTACCGGAAAAGTTCGAGTGTCCATTTCTAAGAACACCTACACCTAC
AAGGATTATATACTCGATACCGATATCCTTGTGAAGGACGTGCCGAATGGCGATTATTTG
ATTGTGGCAGTTTTGAAAAATAACGGAAAGGCTGTTAGTGGAATCGAAGTGGATGTGAC
AGTTTCGAAT

Chemosensory A75a

ATGAAGTTCTGCCAGAGCGCAATTTTGATTATAATTTGTGTGTTGAACGGTTTTGTGAAG
GCCGAACAACCATACACCGTTAAGAATGAGCGGTTAGAATATTTCAAGGGTTTAAAAGA
GACATTCGTTGATATGAGCGATTTGAAAGTTGTCGGACGTCAGCGTTTCATCAATGGCAG
TGTGACTTTTGGCGAAGACATGTTTAGTGAGCATTATAAGTTCCAAGTAGAAATTTTCTC
CTCACCACAAAGTGATGGTCAATATAAGCAATTGCCAATGGGCGTGCCACGTACGCCTG
TTTGTGAGGGCATCAAAGATTTATATACGAAATTGTTGCAACCGTCATTAGTTGAGGGTG
AAAATACCAACTTTCCATTTGTACCCGAAGAGGGTTTGTGTCCTTTACCGAAGGGTGATT
ATTATGTAAAAAATTTGGATATGAACACAGACTCTTGGCCAAACCAAATACCACGTGGGC
TGTTGAAAGCGAAATTAACATTTTTCAAAGACGAAATAAATGTTGGAGGCATTTTTGTGA
TAATAAGAGTCGAAGATCGGGAGTGA

6.2 Χαρακτηριστικά των εκκινητών

Γονίδιο	Εκκινητής	T _a	Μέγεθος προϊόντος (bp)	Κωδικοποιητική περιοχή
OBP-56	F: AGGACAACGCCATTAACAAACAG	55°C	100	302-401
	R: CCAGCACTCAGACAACCATTAAC	55°C		
Chem A7a	F: GGTGGGTTGGGATACTTTGCG	55°C	104	135-238
	R: AAACCTGCTGCTCGTTGCC	55°C		
ChemA75a	F: TAGTTGAGGGTGAAAATACC	55°C	109	347-455
	R: CAAGAGTCTGTGTTTCATATCC	55°C		

7. Βιβλιογραφία

Abd Elrahman, M. Monzer, Hesham A. Srouf and Ahmed M. Abd El-Ghany. (2013). Isolation and identification of volatile substances in Alphonso mango leaves repellent to *Kilifia acuminata* (Signoret) (Hemiptera: Coccidae). *New York Science Journal* 2013; 6(12)

Abraham D, Braguini WL, Kelmer-Bracht AM, Ishii-Iwamoto EL. (2000) Effects of four monoterpenes on germination, primary root growth, and mitochondrial respiration of maize. *Journal of Chemical Ecology* 26:611–624.

Abraham D, Francischini AC, Pergo EM, Kelmer-Bracht AM, Ishii-Iwamoto EL. (2003) Effects of α -pinene on the mitochondrial respiration of maize seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry* 41:985–991.

Ana Cristina Rivas da Silva, Paula Monteiro Lopes, Mariana Maria Barros de Azevedo, Danielle Cristina Machado Costa, Celuta Sales Alviano and Daniela Sales Alviano. (2012). Biological Activities of α -Pinene and β -Pinene Enantiomers. *Molecules* 2012, 17, p. 6305–6316

Angeli, S., Ceron, F., Scaloni, A., Monti, M., Monteforti, G., Minnocci, A., Petacchi, R. and Pelosi, P. (1999) Purification, structural characterization, cloning and immunocytochemical localization of chemoreception proteins from *Schistocerca gregaria*. *Eur. J. Biochem.* 262, 745–754.

Arantes-Oliveira, N., Apfeld, J., Dillin, A., and Kenyon, C. (2002). Regulation of life-span by germ-line stem cells in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 295, 502–505.

B.E. Mazomenos, G.E. Haniotakis. (1981). A multicomponent female sex pheromone of *Dacus oleae* Gmelin: Isolation and bioassay. *Journal of Chemical Ecology* 7: 437–444.

Ban, L. P., Scaloni, A., Brandazza, A., Angeli, S., Zhang, L., Yan, Y. H. and Pelosi, P. (2003) Chemosensory proteins of *Locusta migratoria*. *Insect Mol. Biol.* 12, 125–134.

Beatrice Mercilaer, Josiane Prost, and Michel Prost. (2009). The essential oil of turpentine and its major volatile fraction (α - and β -pinenes): a review. *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health*, 22(4): p. 331–342

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), e20.

Benton, R., Vannice, K. S., and Vosshall, L. B. (2007). An essential role for a CD36-related receptor in pheromone detection in *Drosophila*. *Nature* 450, 289–293

Borden JH, Lindgren BS, Chong L (1980) Ethanol and α -pinene as synergists for the aggregation pheromones of two *Gnathotrichus* species. *Canadian Journal of Forest Research* 10: 290–292.

Breer, H., Boekhoff, I., and Tareilus, E. (1990). Rapid kinetics of second messenger formation in olfactory transduction. *Nature* 345(6270), 65–68.

Briand, L., Nespoulous, C., Huet, J. C., Takahashi, M. and Pernollet, J. C. (2002) Characterization of a chemosensory protein (ASP3c) from honeybee (*Apis mellifera* L.) as a brood pheromone carrier. *Eur. J. Biochem.* 269, 4586–4596.

Brown, A.E., Baumbach, J., Cook, P.E., Ligoxygakis, P. (2009). Short-term starvation of immune deficient *Drosophila* improves survival to gram-negative bacterial infections. *PLoS ONE* 4(2): e4490.

Calvello, M., Brandazza, A., Navarrini, A., Dani, F. R., Turillazzi, S., Felicioli, A. and Pelosi, P. (2005) Expression of odorant-binding proteins and chemosensory proteins in some Hymenoptera. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 35, 297–307.

Calvello, M., Guerra, N., Brandazza, A., D'Ambrosio, C., Scaloni, A., Dani, F. R., Turillazzi, S. and Pelosi, P. (2003) Soluble proteins of chemical communication in the social wasp *Polistes dominulus*. *Cell. Mol. Life Sci.* 60, 1933–1943.

Carpita A, Canale A, Raffaelli A, Saba A, Benelli G et al. (2012) (Z)-9-tricosene identified in rectal gland extracts of *Bactrocera oleae* males: First evidence of a male-produced female attractant in olive fruit fly. *Naturwissenschaften* 99: 77–81.

Christofi T and Apidianakis Y. *Drosophila* immune priming against *Pseudomonas aeruginosa* is short-lasting and depends on cellular and humoral immunity [version 1; referees: 1 approved, 3 approved with reservations]. *F1000Research* 2013, 2: 76

- Copley R. R., Totrov M., Linnell J., Field S., Ragoussis J. and Udalova I. A. (2007). Functional conservation of Rel binding sites in drosophilid genomes. *Genome Res.* September 2007 17: 1327-1335
- Costa, A., Jan, E., Sarnow, P., Schneider, D. (2009). The Imd pathway is involved in antiviral immune responses in *Drosophila*. *PLoS ONE* 4(10): e7436.
- Craig, S. R., MacKenzie D. S., Jones G., Gatlin D. M. (2000). Seasonal changes in the reproductive condition and body composition of free-ranging red drum, *Sciaenops ocellatus*.
- Crane, S.W. (1991). Occurrence and management of obesity in companion animals. *J. Small Anim. Pract.* 32, 275–282.
- Danty, E., Arnold, G., Huet, J. C., Huet, D., Masson, C. and Pernollet, J. C. (1998) Separation, characterization and sexual heterogeneity of multiple putative odorant-binding proteins in the honeybee *Apis mellifera*, L. (Hymenoptera: Apidea). *Chem. Senses* 23, 83–91.
- Dial, B.E. & Fitzpatrick, L.C. *Oecologia* (1981) 51: 310.
- Drori, D., and Folman, Y. (1976). Environmental effects on longevity in the male rat: exercise, mating, castration and restricted feeding. *Exp. Gerontol.* 11, 25–32.
- Du, G., and Prestwich, G. D. (1995). Protein structure encodes the ligand binding specificity in pheromone binding proteins. *Biochemistry* 34(27), 8726–8732.
- Dyanov, H. M. and Dzitoeva, S. G. (1995) Method for attachment of microscopic preparations on glass for in situ hybridization, PRINS and in situ PCR studies. *Biotechniques* 18, 822–826.
- Dygert, P., (1990). Seasonal changes in energy content and proximate composition associated with somatic growth and reproduction in a representative age-class of female English sole. *Transactions of the American Fisheries Society* 119, 791–801.
- Erbilgin N, Raffa KF. (2001) Modulation of predator attraction to pheromones of two prey species by stereochemistry of plant volatiles. *Oecologia* 127: 444-453. doi:10.1007/s004420000606.
- Erbilgin N., Powell J.S., and Raffa K.F. 2003. Effect of varying monoterpene concentrations on the response of *Ips pini* (Coleoptera: Scolytidae) to its aggregation pheromone: implications for pest management and ecology of bark beetles. *Agric. Forest Entomol.* 5:269-274.
- Fettman, M.J., Stanton, C.A., Banks, L.L., Hamar, D.W., Johnson, D.E., Hegstad, R.L., and Johnston, S. (1997). Effects of neutering on bodyweight, metabolic rate and glucose tolerance of domestic cats. *Res. Vet. Sci.* 62, 131–136.
- Finn, R.D., Mistry, J., Schuster-Bockler, B., Griffiths-Jones, S., Hollich, V., Lassmann, T., Moxon, S., Marshall, M., Khanna, A., Durbin, R., et al. (2006). Pfam: Clans, web tools and services. *Nucleic Acids Res.* 34: D247–D251.
- Flatt, T. (2011). Survival costs of reproduction in *Drosophila*. *Exp. Gerontol.* 46, 369–375.
- Flatt, T., Min, K.J., D’Alterio, C., Villa-Cuesta, E., Cumbers, J., Lehmann, R., Jones, D.L., and Tatar, M.** (2008). *Drosophila* germ-line modulation of insulin signaling and lifespan. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 6368–6373.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. (1995). Flavours and fragrances of plant origin. Chapter 8
- Freeman, B.C. and G.A. Beattie. (2008). An Overview of Plant Defenses against Pathogens and Herbivores. *The Plant Health Instructor*. (ano: The American Phytopathological Society)
- Freites L., Garcia N., Lodeiros C., Maeda-Martinez A. N., Troccoli L., Vasquez A., Guderley H. (2013). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 2013, 93(7), 1871–1880.
- Gerofotis C. D., Ioannou C. S., Nakas C. T., Papadopoulos N. T. (2016). The odor of a plant metabolite affects life history traits in dietary restricted adult olive flies. *Scientific Reports* 6, Article number: 28540
- Gerofotis C. D., Ioannou C. S., Papadopoulos N. T. (2013). Aromatized to Find Mates: α -Pinene Aroma Boosts the Mating Success of Adult Olive Fruit Flies. *PLoS ONE* 8(11): e81336.
- Gibson, U. E. M., Heid, C. A. and Williams, P. M. (1996). A novel Method for Real-Time Quantitative RT-PCR. *Genome Res.* 6, 995-1001.

- Gobert, V., Gottar, M., Matskevich, A.A., Rutschmann, S., Royet, J., Belvin, M., Hoffmann, J.A., Ferrandon, D. (2003). Dual activation of the *Drosophila* toll pathway by two pattern recognition receptors. *Science* 302(5653): 2126--2130.
- Goudeau, J., Bellemin, S., Toselli-Mollereau, E., Shamalnasab, M., Chen, Y., and Aguilaniu, H. (2011). Fatty acid desaturation links germ cell loss to longevity through NHR-80/HNF4 in *C. elegans*. *PLoS Biol.* 9, e1000599.
- Grosse-Wilde, E., Svatos, A., and Krieger, J. (2006). A pheromone-binding protein mediates the bombykol induced activation of a pheromone receptor in vitro. *Chem. Senses* 31, 547–555.
- Gyorgyi, T. K., Roby-Shemkovitz, A. J., and Lerner, M. R. (1988). Characterization and cDNA cloning of the pheromone-binding protein from the tobacco hornworm, *Manduca sexta*: A tissue-specific developmentally regulated protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 (24), 9851–9855.
- Hansen M, Flatt T, Aguilaniu H. (2013) Reproduction, fat metabolism, and life span: what is the connection? *Cell Metab.* 2013 Jan 8; 17(1): 10-9.
- Harder J, Schroder J. M. (2002). RNase 7, a novel innate immune defense antimicrobial protein of healthy human skin. *J Biol Chem.* 2002 Nov 29; 277(48):46779-84. Epub 2002 Sep 18.
- Hatle, J.D., Paterson, C.S., Jawaid, I., Lentz, C., Wells, S.M., and Fronstin, R.B. (2008). Protein accumulation underlying lifespan extension via ovariectomy in grasshoppers is consistent with the disposable soma hypothesis but is not due to dietary restriction. *Exp. Gerontol.* 43, 900–908.
- Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J. and Williams, P. M. (1996). Real-time quantitative PCR. *Genome Res.* 6, 986-994
- Higuchi R., Fockler C., Dollinger G and Watson R. (1993) Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology* 11, 1026-30.
- Hildebrand, J. G., & Shepherd, G. M. (1997). Mechanisms of olfactory discrimination: converging evidence for common principles across phyla. *Annual review of neuroscience*, 20(1), 595-631.
- Honda K., Ômura H., and Hayashi N. 1998. Identification of floral volatiles from *Ligustrum japonicum* that stimulate flower-visiting by cabbage butterfly, *Pieris rapae*. *J. Chem. Ecol.* 24: 2167-2180.**
- Hsin, H., and Kenyon, C. (1999). Signals from the reproductive system regulate the lifespan of *C. elegans*. *Nature* 399, 362–366.
- Ishida Y, Ishibashi J, Leal WS (2013) Fatty Acid Solubilizer from the Oral Disk of the Blowfly. *PLoS ONE* 8(1): e51779.
- Ishida, Y., Chiang, V. and Leal, W. S. (2002) Protein that makes sense in the Argentine ant. *Naturwissenschaften* 89, 505–507.
- Ishida, Y., and Leal, W. S. (2008). Chiral discrimination of the Japanese beetle sex pheromone and a behavioral antagonist by a pheromone-degrading enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 9076–9080.
- Jacobs, S. P., Liggins, A. P., Zhou, J. J., Pickett, J. A., Jin, X. and Field, L. M. 2005. OS-D-like genes and their expression in aphids (Hemiptera: Aphididae). *Insect Mol. Biol.* 14, 423–432.
- Jacquin-Joly, E., Vogt, R. G., Francois, M. C. and Nagnan-Le Meillour, P. (2001) Functional and expression pattern analysis of chemosensory proteins expressed in antennae and pheromonal gland of *Mamestra brassicae*. *Chem. Senses* 26, 833–844.
- Jacquin-Joly, E., & Merlin, C. (2004). Insect olfactory receptors: contributions of molecular biology to chemical ecology. *Journal of chemical ecology*, 30(12), p. 2361
- Jefferis, G. S., Potter, C. J., Chan, A. M., Marin, E. C., Rohlffing, 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., Brandazza, A., Navarrini, A., Ban, L. P., Zhang, S., Steinbrecht, R. A., Zhang, L. and Pelosi, P. (2005) Expression and immunolocalisation of odorant-binding and chemosensory proteins in locusts. *Cell. Mol. Life Sci.* 62, 1156–1166.
- Jorgensen, E.H., Johansen, S.J.S., Jobling, M., (1997). Seasonal patterns of growth, lipid deposition, and lipid depletion in anadromous Arctic charr. *Journal of Fish Biology* 51, 312–326.

- Judd, E.T., Wessels, F.J., Drewry, M.D., Grove, M., Wright, K., Hahn, D.A., and Hatle, J.D. (2011). Ovariectomy in grasshoppers increases somatic storage, but proportional allocation of ingested nutrients to somatic tissues is unchanged. *Aging Cell* 10, 972–979.
- Kaissling, K. E. (1986). Chemo-electrical transduction in insect olfactory receptors. *Annu. Rev. Neurosci.* 9, 121–145.
- Kaissling, K. E., Kasang, G., Bestmann, H. J., Stransky, W., and Vostrowsky, O. (1978). A new pheromone of the silkworm moth *Bombyx mori*. *Naturwissenschaften* 65, 382–384.
- Kaissling, K.-E., Klein, U., De Kramer, J. J., Keil, T. A., Kanaujia, S., and Hemberger, J. (1985). **Insect olfactory cells: Electrophysiological and biochemical studies** In “**Molecular Basis of Nerve Activity**,” (J. P. Changeux, F. Hucho, A. Maelicke, and E. Neuman, Eds.), pp. 173–183. De Gruyter, Berlin.
- Karpac, J., Younger, A., Jasper, H. (2011). Dynamic coordination of innate immune signaling and insulin signaling regulates systemic responses to localized DNA damage. *Dev. Cell* 20(6): 841--854.
- Kent M. Daane and Marshall W. Johnson (2010) *Olive Fruit Fly: Managing an Ancient Pest in Modern Times*. *Annual Review of Entomology* 55(1): 151-69
- Kirkwood, T.B. (1977). Evolution of ageing. *Nature* 270, 301–304.
- Kitabayashi, A. N., Arai, T., Kubo, T. and Natori, S. (1998). Molecular cloning of cDNA for p10, a novel protein that increases in the regenerating legs of *Periplaneta americana* (American cockroach) *Insect Biochem. Mol. Biol.* 28, 785–790.
- Klein, U. (1987). Sensillum-lymph proteins from antennal olfactory hairs of the moth *Antheraea polyphemus* (Saturniidae). *J. Insect Biochem.* 17, 1193–1204.
- Krieger, J., von Nickisch-Roseneck, E., Mameli, M., Pelosi, P., and Breer, H. (1996). Binding proteins from the antennae of *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 26, 297–307.
- 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.
- Lartigue, A., Campanacci, V., Roussel, A., Larsson, A.M., Jones, T.A., Tegoni, M. and Cambillau, C. (2002) X-ray structure and ligand binding study of a moth chemosensory protein. *J. Biol. Chem.*, 277, 32094–32098.
- Laue, M., Steinbrecht, R. A., and Ziegelberger, G. (1994). Immunocytochemical localization of general odourant-binding protein in olfactory sensilla of the silkworm *Antheraea polyphemus*. *Naturwissenschaften* 81, 178–180.
- Laughlin, J. D., Ha, T. S., Jones, D. N. M., and Smith, D. P. (2008). Activation of pheromone-sensitive neurons is mediated by conformational activation of pheromone-binding protein. *Cell* 133, 1255–1265.
- Leal, W. S., Chen, A. M., Erickson, M. L. (2005a). Selective and pH-dependent binding of a moth pheromone to a pheromone-binding protein. *J. Chem. Ecol.* 31, 2493–2499.
- Leal, W. S., Chen, A. M., Ishida, Y., Chiang, V. P., Erickson, M. L., Morgan, T. I., and Tsuruda, J. M. (2005b). Kinetics and molecular properties of pheromone binding and release. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 5386–5391.
- Lemaitre, B., Meister, M., Govind, S., Georgel, P., Steward, R., Reichhart, J.M., Hoffmann, J.A. (1995). Functional analysis and regulation of nuclear import of dorsal during the immune response in *Drosophila*. *EMBO J.* 14(3): 536--545.
- Leroi, A.M. (2001). Molecular signals versus the Loi de Balancement. *Trends Ecol. Evol.* 16, 24–29.
- Liao S.C. 1999. Mortality and repellency effects of essential oils from citrus against the housefly and German cockroach. *Zhonghua Kunchong*, 19 (2): 153-160.
- Libert, S., Chao, Y., Chu, X., Pletcher, S.D. (2006). Trade-offs between longevity and pathogen resistance in *Drosophila melanogaster* are mediated by NFκB signaling. *Aging Cell* 5(6): 533--543.

Liscia A, Angioni P, Sacchetti P, Poddighe S, Granchietti A et al. (2013) Characterization of olfactory sensilla of the olive fly: Behavioral and electrophysiological responses to volatile organic compounds from the host plant and bacterial filtrate. *J Insect Physiol* 59: 705-716.

Liu, R., Lehane, S., He, X., Lehane, M., Hertz-Fowler, C., Berriman, M., Pickett, J. A., Field, L. M., and Zhou, J. J. (2009). Characterisations of odorant-binding proteins in the tsetse fly *Glossina morsitans morsitans*. *Cell Mol. Life Sci.* 2009 Dec 10. [Epub ahead of print].

Maida, R., Mameli, M., Müller, B., Krieger, J., and Steinbrecht, R. A. (2005). The expression pattern of four odorant-binding proteins in male and female silk moths, *Bombyx mori*. *J. Neurocytol.* 34, 149–163.

Maleszka, R. and Stange, G. (1997) Molecular cloning, by a novel approach, of a cDNA encoding a putative olfactory protein in the labial palps of the moth *Cactoblastis cactorum*. *Gene* 202, 39–43.

Mameli, M., Tuccini, A., Mazza, M., Petacchi, R. and Pelosi, P. (1996) Soluble proteins in chemosensory organs of phasmids. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 26, 875–882.

Marchese, S., Angeli, S., Andolfo, A., Scaloni, A., Brandazza, A., Mazza, M., Picimbon, J.-F., Leal, W. S. and Pelosi, P. (2000) Soluble proteins from chemosensory organs of *Eurycantha calcarata* (Insecta, Phasmatodea). *Insect Biochem. Mol. Biol.* 30, 1091–1098.

Maynard Smith, J. (1958). The effects of temperature and of egg-laying on the longevity of *Drosophila subobscura*. *J. Exp. Biol.* 35, 832–842.

Mazomenos BE, Haniotakis GE (1981) A multicomponent female sex pheromone of *Dacus oleae* Gmelin: Isolation and bioassay. *Journal of Chemical Ecology* 7: 437-444. doi:10.1007/BF00995766.

Mazomenos BE, Haniotakis GE (1985) Male olive fruit fly attraction to synthetic sex pheromone components in laboratory and field tests. *Journal of Chemical Ecology* 11: 397-405

McCabe G, Fernandez D, Erhardt C (2013) Ecology of reproduction in Sange mangabeys (*Cercocebus sanjei*): dietary strategies and energetic condition during a high fruit period. *Am J Primates* 75:1196-1208

McElroy, J.F., and Wade, G.N. (1987). Short- and long-term effects of ovariectomy on food intake, body weight, carcass composition, and brown adipose tissue in rats. *Physiol. Behav.* 39, 361–365.

McKenna, M. P., Hekmat-Scafe, D. S., Gaines, P., and Carlson, J. R. (1994). Putative *Drosophila* pheromone-binding proteins expressed in a subregion of the olfactory system. *J. Biol. Chem.* 269, 16340–16347.

Mitchell J.D. 1977. Differential host selection by *Pieris brassicae* (the large white butterfly) on *Brassica oleracea* (the wild cabbage). *Entomol. Exp. Appl.* 22:208-219.

Montiel Bueno A., Jones O. (2002) Alternative methods for controlling the olive fly, *Bactrocera oleae*, involving semiochemicals. *International Organization for Biological and Integrated Control of Noxious Animals and Plants West Palaearctic Regional Section (IOBC/WPRS) Bulletin*, 25: 1-11.

Monzer M.A.; M.S. Salem, M.I. El-Said and A.M. Abd El-Ghany (2006). Resistance of Alphonso mango cultivars to the Margardoid mealybug, *Icerya seychellarum* (Westwood) in relation to leaf quality. I. Leaf secondary metabolites. *Egypt. J. Agric. Res.*, 84(1): 17-29.

Moser J.C., and Browne, L.E. 1978. A nondestructive trap for *Dendroctonus frontalis* Zimmermann (Coleoptera: Scolytidae). *J. Chem. Ecol.* 4:1-7.

Mullis, K. B and Faloona, F. A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. ***Methods Enzymol.*** 155, 335-350.

Murphy, C.T., McCarroll, S.A., Bargmann, C.I., Fraser, A., Kamath, R.S., Ahringer, J., Li, H., and Kenyon, C. (2003). Genes that act downstream of DAF-16 to influence the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 424, 277–283.

Nagnan-Le Meillour, P., Cain, A. H., Jacquin-Joly, E., François, M. C., Ramachandran, S., Maida, R. and Steinbrecht, R. A. (2000) Chemosensory proteins from the proboscis of *Mamestra brassicae*. *Chem. Senses* 25, 541–553.

Nomura, A., Kawasaki, K., Kubo, T. and Natori, S. (1992) Purification and localization of p10, a novel protein that increases in nymphal regenerating legs of *Periplaneta americana* (American cockroach). *Int. J. Dev. Biol.* 36, 391–398.

- Nusslein-Volhard, C. (1979). Maternal effect mutations that affect the spatial coordinates of the embryo of *Drosophila melanogaster*. *Subtelný, Konigsberg, 1979* : 185--211.
- Ozaki, M., Wada-Katsumata, A., Fujikawa, K., Iwasaki, M., Yokohari, F., Satoji, Y., Nisimura, T. and Yamaoka, R. (2005) Ant nestmate/non-nestmate discrimination by a chemosensory sensillum. *Science* 309, 311–314.
- Pallier, E., Aubert, R., and Lemonnier, D. (1980). Effect of diet and ovariectomy on adipose tissue cellularity in mice. *Reprod. Nutr. Dev.* 20 (3A), 631–636.
- Partridge, L., Gems, D., and Withers, D.J. (2005). Sex and death: what is the connection? *Cell* 120, 461–472.
- Pelosi, P. (1998) Odorant-binding proteins: structural aspects. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 855, 281–293.
- Pelosi, P., J.-J. Zhou, L. P. Ban and M. Calvello (2006). Soluble proteins in insect chemical communication. *Cell. Mol. Life Sci.* 63 (2006) 1658–1676
- Pelosi, P., M. Calvello L. P. Ban (2005). Diversity of Odorant-binding Proteins and Chemosensory Proteins in Insects. *Chem. Senses* 30 (suppl 1): i291-i292.
- Pelosi, P., Maida, R. (1990). Odorant binding proteins in vertebrates and insects: Similarities and possible common function. *Chem. Senses* 15, 205–215.
- Perttunen V. 1957. Reactions of two bark beetle species, *Hylugops palliatus* Gyll. and *Hylastes ater* Payk. (Col., Scolytidae) to the terpene alpha-pinene. *Ann. Entomol. Fenn.* 23:101-110
- Pesenti, M. E., Spinelli, S., Bezirard, V., Briand, L., Pernollet, J. C., Tegoni, M., and Cambillau, C. (2008). Structural basis of the honey bee PBP pheromone and pH-induced conformational change. *J. Mol. Biol.* 380, 158–169.
- Pesenti, M. E., Spinelli, S., Bezirard, V., Briand, L., Pernollet, J. C., Campanacci, V., Tegoni, M., and Cambillau, C. (2009). Queen bee pheromone binding protein pH-induced domain swapping favors pheromone release. *J. Mol. Biol.* 390, 981–990.
- Philippe P. Laissue and Leslie B. Vosshall (2008) *The Olfactory Sensory Map in Drosophila*. *Adv Exp Med Biol.* 2008; 628: 102-14
- Picimbon, J. F. and Leal, W. S. (1999) Olfactory soluble proteins of cockroaches. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 29, 973– 978.
- Picimbon, J. F., Dietrich K., Krieger J. and Breer, H. (2001) Identity and expression pattern of chemosensory proteins in *Heliothis virescens* (Lepidoptera, Noctuidae). *Insect Bio- chem. Mol. Biol.* 31, 1173–1181.
- Picimbon, J. F., Dietrich, K., Angeli, S., Scaloni, A., Krieger, J., Breer, H. and Pelosi, P. (2000a) Purification and molecular cloning of chemosensory proteins from *Bombyx mori*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 44, 120–129.
- Picimbon, J. F., Dietrich, K., Breer, H. and Krieger, J. (2000b) Chemosensory proteins of *Locusta migratoria* (Orthoptera: Acrididae). *Insect Biochem. Mol. Biol.* 30, 233–241.
- Pikielny, C. W., Hasan, G., Rouyer, F. and Rosbach, M. (1994) Members of a family of *Drosophila* putative odorant-binding proteins are expressed in different subsets of olfactory hairs. *Neuron* 12, 35–49.
- Pophof, B. (2004). Pheromone-binding proteins contribute to the activation of olfactory receptor neurons in the silkworms *Antheraea polyphemus* and *Bombyx mori*. *Chem. Senses* 29, 117–125.
- Raming, K., Krieger, J., and Breer, H. (1990). Primary structure of a pheromone-binding protein from *Antheraea pernyi*: Homologies with other ligand-carrying proteins. *J. Comp. Physiol. [B]* 160, 503–509.
- Riviere, S. (2003) PhD Thesis. Acc. no. AAM77025.
- Robertson, H. M., Martos, R., Sears, C. R., Todres, E. Z., Walden, K. K. and Nardi, J. B. (1999) Diversity of odourant binding proteins revealed by an expressed sequence tag project on male *Manduca sexta* moth antennae. *Insect Mol. Biol.* 8, 501–518.

- Rutschmann, S., Jung, A.C., Hetru, C., Reichhart, J.M., Hoffmann, J.A., Ferrandon, D. (2000). The Rel protein DIF mediates the antifungal but not the antibacterial host defense in *Drosophila*. *Immunity* 12(5): 569-580.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Schraf, S. J., Higuchi, Horn, G. T., R., Mullis, K. B. and Erlich, H. A. (1988). Primerdirected enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491.
- Saiki, R. K., Schraf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., and Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230, 1350-1354.
- Salmeri, K.R., Bloomberg, M.S., Scruggs, S.L., and Shille, V. (1991). Gonadectomy in immature dogs: effects on skeletal, physical, and behavioral development. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 198, 1193-1203.
- Sandler, B. H., Nikonova, L., Leal, W. S., and Clardy, J. (2000). Sexual attraction in the silkworm moth: Structure of the pheromone-binding-protein-bombykol complex. *Chem. Biol.* 7, 143-151.
- Scarpati ML, Loscalzo R, Vita G (1993) Olea europaea volatiles attractive and repellent to the olive fruit fly (*Dacus oleae*, Gmelin). *Journal of Chemical Ecology* 19: 881-891.
- Schröder L.M. 1993. Attraction of *Epuraea bickhardti* St.-Claire Deville and *E. boreella* (Zetterstedt) (Coleoptera, Nitidulidae) to ethanol and alpha-pinene. *Entomol. Fenn.* 4:133-135.**
- Shanbhag, S. R., Hekmat-Scafe, D., Kim, M. S., Park, S. K., Carlson, J. R., Pikielny, C., Smith, D. P., and Steinbrecht, R. A. (2001). Expression mosaic of odorant-binding proteins in *Drosophila* olfactory organs. *Microsc. Res. Tech.* 55, 297-306.
- Shanley, D.P., and Kirkwood, T.B. (2000). Calorie restriction and aging: a life-history analysis. *Evolution* 54, 740-750.
- Silverman, N. and Maniatis, T. 2001. NF-B signaling pathways in mammalian and insect innate immunity. *Genes & Dev.* 15: 2321-2342.
- Socha, R., Sula, J., Kodrik, D., and Gelbi, I. (1991). Hormonal control of vitellogenin synthesis in *Pyrhocoris apterus* (L.) (Heteroptera). *J. Insect Physiol.* 37, 805-816.**
- Steinbrecht, R. A. (1998). Odorant-binding proteins: Expression and function. *Ann. NY Acad. Sci.* 30, 323-332.
- Steinbrecht, R. A., Laue, M., and Ziegelberger, G. (1995). Immunolocalization of pheromone-binding protein and general odorant-binding protein in olfactory sensilla of the silk moths *Antheraea* and *Bombyx*. *Cell Tissue Res.* 282, 203-217.
- Steinbrecht, R. A., Ozaki, M., and Ziegelberger, G. (1992). Immunocytochemical localization of pheromone-binding protein in moth antennae. *Cell Tissue Res.* 282, 203-217.
- Stotsenburg, J.M. (1913). The effect of spaying and semi-spaying young albino rats (*Mus norvegicus albinus*) on the growth in body weight and body length. *Anat. Rec.* 7, 183-194.
- Strong, L. (1967). Feeding activity, sexual maturation, hormones, and water balance in the female African migratory locust. *J. Insect Physiol.* 13, 495-507.
- Syed, Z., Ishida, Y., Taylor, K., Kimbrell, D. A., and Leal, W. S. (2006). Pheromone reception in fruit flies expressing a moth's odorant receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 16538-16543.
- Szklarczyk D, Franceschini A, Wyder S, Forslund K, Heller D, Huerta-Cepas J, Simonovic M, Roth A, Santos A, Tsafou KP, Kuhn M, Bork P, Jensen LJ, von Mering C. STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic Acids Res.* 2015 Jan; 43:D447-52.
- Tanasichuk, R.W., Mackay, W.C., (1989). Quantitative and qualitative characteristics of somatic and gonadal growth of yellow perch, *Perca flavescens* from Lac Ste. Anne, Alberta. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 46, 989-994.
- Tegoni, M., Campanacci, V., and Cambillau, C. (2004). Structural aspects of sexual attraction and chemical communication in insects. *Trends Biochem. Sci.* 29, 257-264.
- Thomsen, E., and Hamburger, K. (1955). Oxygen consumption of castrated females of the blow-fly, *Calliphora erythrocephala* Meig. *J. Exp. Biol.* 32, 692-699.

- Tuccini, A., Maida, R., Rovero, P., Mazza, M. and Pelosi, P. (1996) Putative odorant-binding proteins in antennae and legs of *Carausius morosus* (Insecta, Phasmatodea). *Insect Biochem. Mol. Biol.* 26, 19–24.
- Van den Berg, M. J., and Ziegelberger, G. (1991). On the function of the pheromone binding protein in the olfactory hairs of *Antheraea polyphemus*. *J. Insect Physiol.* 37, 79–85.
- Vogt, R. G., and Riddiford, L. M. (1981). Pheromone binding and inactivation by moth antennae. *Nature* 293, 161–163.
- Vogt, R. G., Callahan, F. E., Rogers, M. E., and Dickens, J. C. (1999). Odorant binding protein diversity and distribution among the insect orders, as indicated by LAP, an OBP-related protein of the true bug *Lygus lineolaris* (Hemiptera, Heteroptera). *Chem. Senses* 24, 481–495.
- Vogt, R. G., Koehne, A. C., Dubnau, J. T., and Prestwich, G. D. (1989). Expression of pheromone binding proteins during antennal development in the gypsy moth *Lymantria dispar*. *J. Neurosci.* 9, 3332–3346.
- Vogt, R. G., Riddiford, L. M., and Prestwich, G. D. (1985). Kinetic properties of a sex pheromone-degrading enzyme: The sensillar esterase of *Antheraea polyphemus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 8827–8831.
- Vogt, R. G., Rybczynski, R., and Lerner, M. R. (1991). Molecular cloning and sequencing of general odorant-binding proteins GOBP1 and GOBP2 from the tobacco hawk moth *Manduca sexta*: Comparisons with other insect OBPs and their signal peptides. *J. Neurosci.* 11, 2972–2984.
- Vosshall, L. B., & Stocker, R. F. (2007). Molecular architecture of smell and taste in *Drosophila*. *Annual review of neuroscience*, 30, p. 508.
- Wang, M.C., O'Rourke, E.J., and Ruvkun, G. (2008). Fat metabolism links germline stem cells and longevity in *C. elegans*. *Science* 322, 957–960.**
- Wells, K. D. 2001. The energetics of calling in frogs, pp. 45-60. In: M. J. Ryan, ed. *Anuran Communication*. Smithsonian Institution Press, Washington, DC
- Williams, G.C. (1966). Natural selection, the costs of reproduction, and a refinement of Lack's principle. *Am. Nat.* 100, 687–690.**
- Wu, J., Randle, K.E., Wu, L.P. (2007). *ird1* is a Vps15 homologue important for antibacterial immune responses in *Drosophila*. *Cell. Microbiol.* 9(4): 1073--1085.
- Zhang S. and Cao R. 1991. A study on the interactions among several plant secondary compounds and aphids. *J Environ. Sci. (China)*; 3(1): 89-94
- Zhou J.L., Ross D.W., and Niwa C.G. 2001. Kairomonal response of *Thanasimus undatulus*, *Enoclerus sphegeus* (Coleoptera: Cleridae), and *Temnochila chlorodia* (Coleoptera: Trogositidae) to bark beetle semiochemicals in eastern Oregon. *Environ. Entomol.* 30: 993-998.
- Zhou, J.-J. (2010). Odorant-Binding Proteins in Insects. *Vitamins & Hormones* Vol. 83, Academic Press, 2010, pp. 241-272.
- Zhou, J.-J., Field, L. M., and He, X. L. (2010). Insect odorant-binding proteins: Do they offer an alternative pest control strategy? *Outlooks Pest Manag.* 21(1), 31–34.
- Zhou, J.-J., Robertson, G., He, X., Dufour, S., Hooper, A. M., Pickett, J. A., Keep, N. H., and Field, L. M. (2009). Characterisation of *Bombyx mori* Odorant-binding proteins reveals that a general odorant-binding protein discriminates between sex pheromone components. *J. Mol. Biol.* 389, 529–545.
- Zygouridis NE, Augustinos AA, Zalom FG, Mathiopoulos KD. 2009. Analysis of olive fly invasion in California based on microsatellite markers. *Heredity* 102:402–12

