

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας

«Εφαρμογές Μοριακής Βιολογίας-Μοριακή Γενετική-Διαγνωστικοί Δείκτες»

«Λειτουργική ανάλυση γονιδίων που εμπλέκονται στη σεξουαλική επικοινωνία και την πρόσληψη των φερομονών στο δάκο της ελιάς, *Bactrocera oleae*»

ΜΠΕΛΑΒΙΛΑΣ-ΤΡΟΒΑΣ ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ



Λάρισα, Ιούνιος 2016

Θέμα διπλωματικής εργασίας:

«Λειτουργική ανάλυση γονιδίων που εμπλέκονται στη σεξουαλική επικοινωνία και την πρόσληψη των φερομονών στο δάκο της ελιάς, *Bactrocera oleae*»

«Functional analysis of genes implicated in sexual communication and pheromone perception of the olive fruit fly, *Bactrocera oleae*»

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας & Γονιδιωματικής του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, το διάστημα Μαΐου 2014 - Αυγούστου 2015 υπό την επίβλεψη του κ. Κ. Ματθιόπουλου, καθηγητή Μοριακής Βιολογίας και της κ. Κ. Τσουμάνη, διδάσκουσας Μοριακής Βιολογίας Π.Δ. 407/80.

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Ματθιόπουλος Κωνσταντίνος: Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας, ΠΘ

Καρπούζας Δημήτριος: Αναπληρωτής Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας, ΠΘ

Παπαδοπούλου Καλλιόπη: Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών, ΠΘ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η ολοκλήρωση και παρουσίαση αυτής της εργασίας σηματοδοτεί και το κλείσιμο ενός προσωπικού κύκλου σε αυτό το τμήμα, αλλά και σε αυτή την πόλη, οπότε οι ευχαριστίες αναπόφευκτα θα είναι λίγο διευρυμένες.

Κατ' αρχάς θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Ματθιόπουλο για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε όταν με επέλεξε για να ενταχθώ στην ερευνητική ομάδα του εργαστηρίου του. Γιατί χάρις σε αυτόν και την αντισυμβατική του σκέψη έπαψα να σκέφτομαι σαν "φοιτητής" και ξεκίνησα να σκέφτομαι σαν "ερευνητής", διευρύνοντας κατά πολύ τη φαντασία και τις βλέψεις μου για το μέλλον.

Την Κωνσταντίνα Τσουμάνη, την εργαστηριακή μου "μαμά". Γιατί ήταν δίπλα μου όποτε τη χρειάστηκα, τόσο στο εργαστήριο όσο και έξω από αυτό. Γιατί μου έμαθε να είμαι επιμελής και να εστιάζω στις λεπτομέρειες. Γιατί είναι ένας από τους καλύτερους ανθρώπους που έχω γνωρίσει στη ζωή μου. Ελπίζω κάποτε να καταφέρω να ανταποδώσω, έστω στο ελάχιστο, όσα έχει κάνει για μένα.

Τον Σπύρο Τασσόγλου γιατί πέρα από φίλο και σύντροφο, είχα την χαρά και την τύχη να τον ζήσω και σαν συνεργάτη, και να αντιληφθώ πως παραδόξως η χαοτική του σκέψη σε συνδυασμό με το χαοτικό κόσμο της Βιοπληροφορικής κατάφερνε να δημιουργεί λογικές πορείες!

Όλα τα παιδιά του εργαστηρίου, ιδιαίτερα τη Μαριλένα και τη Γιώτα, με τις οποίες περάσαμε πολλές ευχάριστες εργατωώρες μαζί, γκρινιάζοντας και γελώντας (και ενίοτε κοροϊδεύοντας τον Σπύρο!).

Τους γονείς μου, γιατί ήταν κοντά μου όταν τους χρειάστηκα περισσότερο από ποτέ. Γιατί με στηρίζαν και με στηρίζουν κάθε μέρα και πραγματικά είμαι περήφανος γι' αυτούς.

Τους φίλους και τις φίλες μου, το Μενέλαο, το Μήτσο, το Φραγκίσκο, την Αγγελική γιατί τους ανησύχησα λίγο, αλλά ως γνωστόν τα τσακάλια δε μασάνε και γιατί ξέρω πόσο χαίρονται για την κατάθεση αυτής της διπλωματικής (και το επακόλουθο ΜεταΠτυχίο).

Θέλω, τέλος, να ευχαριστήσω όλους τους ανθρώπους που με κράτησαν γερά, όταν ήρθαν τα δύσκολα και στάθηκαν στα πόδια μου με το κεφάλι ψηλά. Το μάθημα που πήρα ήταν ανεπανάληπτο. Αυτή η εργασία είναι αφιερωμένη σε όλους τους!

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το οσφρητικό σύστημα των εντόμων είναι αυτό που εμπλέκεται σε βασικές λειτουργίες της σεξουαλικής και αναπαραγωγικής τους συμπεριφοράς, όπως είναι η πρόσληψη των φερομονών, η σύζευξη και ο εντοπισμός του κατάλληλου υποστρώματος για την ωοαπόθεση. Η εξάρτηση της συμπεριφοράς του εντόμου και κατ' επέκταση της βιωσιμότητάς του από παράγοντες του οσφρητικού συστήματος, καθιστά το σύστημα αυτό έναν ελκυστικό στόχο για την ανάπτυξη εναλλακτικών παρεμβατικών μεθόδων ελέγχου. Ειδικότερα για έντομα οικονομικής σημασίας που λειτουργούν παρασιτικά σε προϊόντα των αγροτικών καλλιεργειών, όπως ο δάκος της ελιάς, *Bactrocera oleae*, η διερεύνηση της μοριακής βάσης του οσφρητικού συστήματος μπορεί να συνεισφέρει καθοριστικά στη βελτίωση παραδοσιακών μεθόδων ελέγχου, όπως είναι οι παγίδες, και στον αποτελεσματικότερο σχεδιασμό νέων μοριακών μεθόδων αντιμετώπισής του, όπως η τεχνική RIDL.

Προς την κατεύθυνση αυτή, στην παρούσα μελέτη αναλύθηκαν λειτουργικά τρεις οσμοδεσμευτικές πρωτεΐνες (OBPs) που έχουν συνδεθεί με την πρόσληψη των φερομονών σε άλλα έντομα. Τα γονίδια των πρωτεϊνών LUSH (OBP76a), PBP2 (OBP19d) και PBP3 (OBP83a) αρχικά εντοπίστηκαν στο δάκο της ελιάς, χρησιμοποιώντας διαθέσιμες μεταγραφόμενες αλληλουχίες από RNA seq βάσει ομολογίας με τη *Drosophila melanogaster* και αφού επιβεβαιώθηκε *in silico* πως περιλαμβάνουν όλες τις χαρακτηριστικές επικράτειες των OBPs αναλύθηκαν λειτουργικά. Το πρώτο στάδιο της ανάλυσης ήταν η πραγματοποίηση μελέτης των επιπέδων έκφρασης τους σε αρσενικά και θηλυκά άτομα, σε διαφορετικά στάδια της ενήλικης ζωής τους με ποσοτική Real-Time PCR. Τα αποτελέσματα οδήγησαν σε μια πρώτη εκτίμηση του πιθανού ρόλου των γονιδίων αυτών στις φυσιολογικές λειτουργίες του εντόμου. Στη συνέχεια, επιχειρήθηκε η παροδική σίγηση της έκφρασης των γονιδίων-στόχων μέσω της τεχνολογίας RNAi, όπου αφού σχεδιάστηκαν δίκλωνα dsRNA μόρια για το κάθε γονίδιο εισήχθησαν σε ομάδες εντόμων μέσω μικροέγχυσης. Τα επίπεδα σίγησης αναλύθηκαν σε σύγκριση με control δείγματα και εκείνα που πετύχαν την αποσιώπηση σε υψηλό ποσοστό θα χρησιμοποιηθούν για περαιτέρω πειράματα αντίστροφης γενετικής και μελέτης της επίδρασης καταστολής τους στην αναπαραγωγική συμπεριφορά του δάκου.

ABSTRACT

Insect olfactory system is implicated in fundamental functions of its sexual and reproductive functions, such as pheromone perception, mating and oviposition. The dependence of insect behavior, and therefore its viability, on olfactory factors renders olfaction an attractive target for the development of alternative control methods. Especially for insects of economic importance, such as agricultural parasites like the olive fruit fly, *Bactrocera oleae*, the molecular knowledge regarding the olfactory system may significantly contribute to the improvement of traditional monitoring methods, such as traps, and can lead to a more efficient design of new molecular control techniques, such as the RIDL.

Towards this direction, in this study tree odorant binding proteins related with pheromone perception in other insects, were functionally studied. The genes of LUSH (OBP76a), PBP2 (OBP19d) and PBP3 (OBP83a) were initially detected by using transcribed sequences obtained by RNA seq analysis, based on their homologies with *Drosophila melanogaster* and subsequently their functional domains were *in silico* verified. The expression levels of these genes were examined in male and female insects, in different phases of their adult life cycle with quantitative Real-Time PCR. The results led to a preliminary estimate of their possible functional role in insect's physiology. Next, gene silencing was attempted for the three genes, with the use of RNA interference technology. The necessary dsRNA molecules for each gene were designed and delivered through microinjection into pool of insects. The downregulation on these samples was compared with control samples and some genes were successfully silenced. Those will be used for further reverse genetics experiments, in order to testify if their absence affects the reproductive behavior the olive fruit fly.

Περιεχόμενα

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	11
1.1 Ο δάκος της ελιάς.....	11
1.2 Σεξουαλική επικοινωνία	12
1.2.1 Συμπεριφορά συνάθροισης (Lekking behaviour).....	12
1.2.2 Φάσεις της σεξουαλικής επικοινωνίας.....	12
1.3 Οι φερομόνες	13
1.4 Φερομόνες στο δάκο	14
1.4.1 Η θηλυκή φερομόνη <i>Olean</i>	14
1.4.2 Η αρσενική φερομόνη <i>Muscalure</i>	15
1.4.3 Επίπεδα έκκρισης των δύο φερομονών	16
1.4.4 Βιοσύνθεση των φερομονών	18
1.5 Πρόσληψη των φερομονών.....	20
1.5.1 Οσφρητικά όργανα και οσφρητικοί νευρώνες (OSNs).....	20
1.6 Η πρόσληψη σε μοριακό επίπεδο	22
1.7 Οσμοδεσμευτικές πρωτεΐνες.....	22
1.7.1 Οι OBPs.....	22
1.7.2 Οι CSPs	23
1.7.3 Μηχανισμοί δράσης των OBPs.....	24
1.7.4 Άλλες λειτουργίες.....	25
1.8 Οι υποδοχείς	26
1.8.1 Οι οσφρητικοί υποδοχείς (Ors)	26
1.8.2 Οι ιονοτροπικοί υποδοχείς (Irs)	28
1.8.3 Οι γευστικοί υποδοχείς (GRs).....	29
1.9 Άλλα μόρια.....	29
1.10 Οσφρητικό σύστημα και αντιμετώπιση του δάκου	30
2. Σκοπός	32
3. ΜΕΘΟΔΟΙ-ΥΛΙΚΑ	34
3.1 Εργαστηριακές συνθήκες.....	34
3.2 Απομόνωση RNA (RNA extraction).....	34
3.3 Επεξεργασία RNA με DNase (DNase treatment).....	35
3.4 Σύνθεση cDNA με αντίστροφη μεταγραφή από ολικό RNA ιστού.....	36
3.5 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.....	37
3.6 Ανάκτηση μορίων DNA από πήκτωμα αγαρόζης (gel extraction)	38

3.7 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	39
3.8 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real-Time PCR)	41
3.9 Δημιουργία δίκλωνου RNA (dsRNA).....	43
3.10 Παροδική αποσιώπηση γονιδίων (RNA silencing).....	44
3.11 <i>In silico</i> ανάλυση.....	46
3.11.1 Omiga	46
3.11.2 E-RNAi.....	46
3.11.3 Blast (Basic Local Alignment Search Tool)	46
3.11.4 Clustal	47
3.11.5 InterProScan	47
3.11.6 STRING (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins)	47
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	49
4.1 Εντοπισμός γονιδίων από δεδομένα RNA sequencing.....	49
4.2 Ανάλυση των επιπέδων έκφρασης.....	49
4.2.1 Επίπεδα έκφρασης της LUSH.....	50
4.2.2 Επίπεδα έκφρασης του PBP2	51
4.2.3 Επίπεδα έκφρασης του PBP3	52
4.3 Παροδική σίγηση γονιδίων	52
4.3.1 Αποσιώπηση γονιδίου LUSH	53
4.3.2 Αποσιώπηση γονιδίου PBP2.....	54
4.3.3 Αποσιώπηση γονιδίου PBP3.....	55
4.4 Βιοπληροφορική ανάλυση	56
4.4.1 LUSH	57
4.4.2 PBP2	58
4.4.3 PBP3	59
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	62
5.1 Λειτουργική ανάλυση γονιδίων	62
5.1.1 LUSH	63
5.1.2 PBP2	63
5.1.3 PBP3	65
5.2 Παροδική αποσιώπηση γονιδίων.....	66
5.3 Συμπεράσματα από τη μικροέγχυση του dsRNA στο δάκο	67
5.4 Επίλογος – Μελλοντικές προοπτικές.....	68
6. Παραρτημα	71

6.1 Μέθοδος σύγκρισης των C_T	71
6.2 Απόδοση των εκκινητών (efficiency).....	71
6.2 Αλληλουχίες εκκινητών της Real-Time PCR	72
6.3 Νουκλεοτιδικές και αμινοξικές αλληλουχίες LUSH, PBP2, PBP3	72
6.4 Αλληλουχίες amplicon και εκκινητών dsRNA	73
6. Βιβλιογραφία	76
6.1 Εικόνες	81

1. Εισαγωγή

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ο δάκος της ελιάς

Σημασία: Ο δάκος της ελιάς (*Bactrocera oleae*) αποτελεί το σημαντικότερο παράσιτο των ελαιοκαλλιεργειών. Η δράση του εντοπίζεται στις χώρες της μεσογειακής λεκάνης, στην ανατολική και κεντρική Αφρική, στις Κανάριες νήσους, στην Εγγύς και Μέση Ανατολή, την Καλιφόρνια των ΗΠΑ και την Κεντρική Αμερική. Υπολογίζεται πως, λόγω της δραστηριότητάς του, είναι δυνατόν να προκληθούν να ζημιές έως και 800 εκατομμύρια \$ ετησίως στους ελαιοπαραγωγούς με παράλληλη μείωση της ετήσιας παραγωγής από 10 έως 30% και γι' αυτό ξοδεύονται ετησίως περίπου 100 εκατομμύρια \$ για την καταπολέμηση του (Bueno & Jones, 2002). Σε ορισμένες, δε, περιοχές του κόσμου θεωρείται πως ευθύνεται για την απώλεια του 80% της αξίας του ελαιόλαδου και του 100% της επιτραπέζιας ελιάς (Για επισκόπηση: Daane & Johnson, 2010).

Ταξινόμηση: Ανήκει στην τάξη των δίπτερων, όπως εξάλλου και ο οργανισμός μοντέλο στη μοριακή εντομολογία, *Drosophila melanogaster*. Ανήκει, επίσης, στην οικογένεια των Tephritidae η οποία απαριθμεί γύρω στα 4500 γνωστά είδη, μεταξύ των οποίων ορισμένα με έντονη παρασιτική δράση στις αγροτικές καλλιέργειες (π.χ. Μύγα της Μεσογείου/*Ceratitis 11olyphem*, Μύγα της Κερασιάς/*Rhagoletis cerasi*).

Βιολογικός κύκλος: Ο δάκος είναι ένα ολομετάβολο έντομο. Υφίσταται, δηλαδή, τα τέσσερα αναπτυξιακά στάδια μιας πλήρους μεταμόρφωσης. Τα στάδια είναι: 1) το αυγό, 2) η προνύμφη (larva), 3) η νύμφη/βομβύκιο (pupa), 4) το ενήλικο έντομο. Στη φύση συμπληρώνει, συνήθως, 3-5 γενεές ανά έτος, με την πρώτη γενιά ενηλίκων να εμφανίζεται την περίοδο Φεβρουαρίου-Μαρτίου.

Η ζημιά στην ελιά: Η παρασιτική δράση του δάκου στην ελιά προκαλείται από τα γονιμοποιημένα θηλυκά άτομα, τα οποία χρησιμοποιούν τον καρπό της ελιάς για να εναποθέσουν τα αυγά τους. Το εσωτερικό της ελιάς αποτελεί το αποκλειστικό υπόστρωμα στο οποίο μπορεί να αναπτυχθεί η προνύμφη του δάκου. Η προνύμφη τρέφεται από το μεσοκάρπιο του ελαιοκάρπου και δημιουργεί μια στοά από την οποία εξέρχεται του καρπού, προκειμένου να νυμφωθεί.



Εικόνα 1.1. Θηλυκό έντομο τη στιγμή της ωοαπόθεσης και η ζημιά που προκαλείται στην ελιά από την έξοδο της προνύμφης (Malheiro et al, 2015)

Στη φύση, ένα θηλυκό άτομο μπορεί να εναποθέσει περίπου 12 αυγά ημερησίως, και περίπου 200-250 κατά τη διάρκεια της ζωής της (Mavragani-Tsiridou, 2002). Απ' την άλλη, άτομα που

έχουν εκκολαφθεί υπό εργαστηριακές συνθήκες, έχει μετρηθεί πως εναποθέτουν γύρω από 10 έως 40 αυγά ημερησίως και, όσο ζουν, αντίστοιχα μεταξύ 200 και 500 (Zalom et al, 2009).

Αξίζει, τέλος, να σημειωθεί πως εν' αντιθέσει με τις προνύμφες που τρέφονται αποκλειστικά από το μεσοκάρπιο της ελιάς, τα ενήλικα άτομα λαμβάνουν τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά της διατροφής τους από άλλες πηγές, όπως νέκταρ και γύρη φυτών, εκκρίματα φρούτων, περιττώματα πουλιών κ.α. (Daane & Johnson, 2010)

1.2 Σεξουαλική επικοινωνία

Το πλέον κομβικό στοιχείο της συμπεριφοράς του δάκου, το οποίο τον καθιστά και «εχθρό» της ελιάς, είναι η σεξουαλική/αναπαραγωγική του συμπεριφορά, η διαδικασία δηλαδή εύρεσης του συντρόφου του, σύζευξης και τελικά ωοαπόθεσης εντός του ελαιοκάρπου.

Τα θηλυκά άτομα, τα οποία και ωοαποθέτουν, χαρακτηρίζονται ολιγογαμικά (oligogamous), θεωρείται δηλαδή πως ζευγαρώνουν 1-3 φορές κατά τη διάρκεια της ζωής τους (Cavalloro & Delrio, 1970; Zouros & Krimbas, 1970). Αντίθετα, τα αρσενικά χαρακτηρίζονται πολυγαμικά (polygamous), έχουν, δηλαδή, τη δυνατότητα να συζεύγνυνται καθημερινά εφόσον υπάρχουν δεκτικές θηλυκές (Zervas, 1982).

1.2.1 Συμπεριφορά συνάθροισης (Lekking behaviour)

Ο δάκος, όπως προαναφέρθηκε, ανήκει στην οικογένεια των Tephritidae. Τα είδη που ανήκουν σε αυτή την οικογένεια χαρακτηρίζονται, ως προς την σεξουαλική τους συμπεριφορά, ως είδη συνάθροισης (lekking species). Αυτό συνίσταται στην συνάθροιση των αρσενικών ατόμων σε κάποιο σημείο του φυτού ξενιστή, με το καθένα εξ' αυτών να οικειοποιείται και να προστατεύει μια μικρή περιοχή από την οποία μεταδίδει τα οπτικά και οσφρητικά του ερεθίσματα. Οι θηλυκές προσελκύονται στα σημεία αυτά και διαλέγουν το ταίρι τους, βάσει μιας αλληλουχίας γεγονότων που περιγράφεται παρακάτω.

Στο δάκο τα σημεία συνάθροισης (lekking sites) έχουν παρατηρηθεί να βρίσκονται στην προσήνεμη μεριά του ελαιόδενδρου με τα αρσενικά να πραγματοποιούν τις συναθροίσεις τους, τις προσυζευκτικές αλληλεπιδράσεις και τη σύζευξη στα φύλλα της ελιάς (Benelli, 2014). Οι ιδιαιτερότητες που παρατηρούνται στο δάκο, σε σχέση με τα υπόλοιπα Tephritidae, στην παραπάνω διαδικασία χωρίζονται σε ορισμένες φάσεις οι οποίες αναλύονται παρακάτω:

1.2.2 Φάσεις της σεξουαλικής επικοινωνίας

Η αλληλουχία των γεγονότων που οδηγεί τελικά στη σύζευξη, στο δάκο, μπορεί να χωριστεί σε τρεις κύριες φάσεις (Benelli et al, 2012):

i. Στην φάση της προσέλκυσης (attraction)

Στη φάση αυτή τα έντομα έχουν εγκατασταθεί στα σημεία συνάθροισης (lekking sites) και χρησιμοποιούν οπτικά και οσφρητικά σήματα (φερομόνες) προκειμένου να προσελκύσουν άτομα του αντίθετου φύλου. Το στάδιο αυτό ολοκληρώνεται με την έλευση των δύο εντόμων σε κοντινή απόσταση.

ii. Στη φάση της επαφής (courtship)

Σε αυτή τη φάση την επιλογή πραγματοποιεί αποκλειστικά το θηλυκό. Όντας σε κοντινή απόσταση από το αρσενικό, παρατηρεί την ποιότητα των δονήσεων των φτερών του (wing vibration), εξαγώντας συμπεράσματα για τη δύναμη του.

iii. Στη φάση της συνουσίας (copulation)

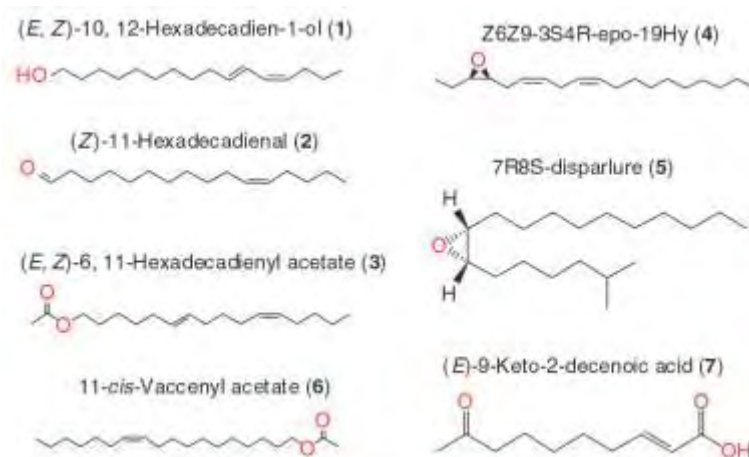
Στη φάση αυτή, αφού το θηλυκό έχει παραμείνει σε κοντινή απόσταση με το αρσενικό, εκείνο επιδιώκει να ζευγαρώσει μαζί του. Στο τελευταίο στάδιο της επαφής τους, έχει παρατηρηθεί πως τα δύο άτομα ψηλαφίζουν με τα πόδια τους το ένα το άλλο.

1.3 Οι φερομόνες

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, το πρώτο στάδιο της σεξουαλικής επικοινωνίας αφορά την προσέλκυση των ατόμων του αντίθετου φύλου. Το κυριότερο προσελκυστικό σήμα που εκλύουν τα άτομα αυτά είναι οι φερομόνες.

Οι φερομόνες είναι πτητικές ενώσεις, χωρίς κατ' ανάγκη παρόμοια χημική δομή, που εκκρίνονται και προσλαμβάνονται από άτομα του ίδιου είδους. Η ομαδοποίηση τους γίνεται βάσει της συμπεριφοράς που έχει παρατηρηθεί να επάγουν στα άτομα που τις προσλαμβάνουν. Η κατηγοριοποίηση, δε, των φερομονών γίνεται βάσει των διαφορετικών συμπεριφορών που έχουν παρατηρηθεί, με τις δύο κύριες κατηγορίες να είναι οι:

- **Σεξουαλικές:** Φερομόνες που εκκρίνονται με σκοπό την προσέλκυση του αντίθετου φύλου και τη σύζευξη.
- **Συνάθροισης:** Φερομόνες που εκκρίνονται και προσλαμβάνονται και από τα δύο φύλα και αποτελούν ειδοποιητήρια σήματα για άτομα του ίδιου είδους σε σχέση με ένα γεγονός (π.χ. πηγή τροφής, ύπαρξη κινδύνου).



Εικόνα 1.2. Οι δομές των κύριων συστατικών των σεξουαλικών φερομονών ορισμένων εντόμων. (1) του μεταξοσκώληκα *Bombyx mori*, (2) του ριγέ σκουληκιού του ρυζιού *Chilo suppressalis*, (3) του κινέζικου μεταξοσκώληκα της δρυός *Antheraea pernyi*, (4) της ιαπωνικής γιγάντιας κάμπιας *Ascotis selenaria creatacea*, (5) του σκώρου τσιγγάνων *Lymantria dispar*, (6) της φρουτόμυγας *Drosophila melanogaster*, (7) της μέλισσας *Apis mellifera*, (Zhou et al, 2010).

Τα θηλυκά άτομα, λοιπόν, όταν προσλαμβάνουν τις σεξουαλικές φερομόνες κατευθύνονται προς τα σημεία συνάθροισης (lekking sites) από τα οποία προήλθαν οι οσμές αυτές και διαλέγουν από τα διαθέσιμα αρσενικά άτομα αυτό με το οποίο θα συζευχθούν.

1.4 Φερομόνες στο δάκο

Στα έντομα που ανήκουν στην οικογένεια των Tephritidae τα οσφρητικά σήματα παίζουν καθοριστικό ρόλο στην διαδικασία εύρεσης συντρόφου. Οι σεξουαλικές φερομόνες οι οποίες αποτελούν το κύριο οσφρητικό σήμα της σύζευξης έχει παρατηρηθεί πως στα έντομα αυτά εκκρίνονται, κατά κανόνα, από τα αρσενικά άτομα. Εξάιρεση από τον κανόνα αυτό αποτελεί ο δάκος, στον οποίο φερομόνες εκκρίνονται από άτομα και των δύο φύλων (Canale et al, 2013), όπως επίσης και στα *Bactrocera dorsalis* (Oriental fruit fly) και *Bactrocera cucurbitae* (Melon fly).

Στο δάκο έχουν εντοπιστεί δύο σεξουαλικές φερομόνες, τις οποίες εκκρίνουν ώριμα σεξουαλικά έντομα του αντίθετου φύλου:

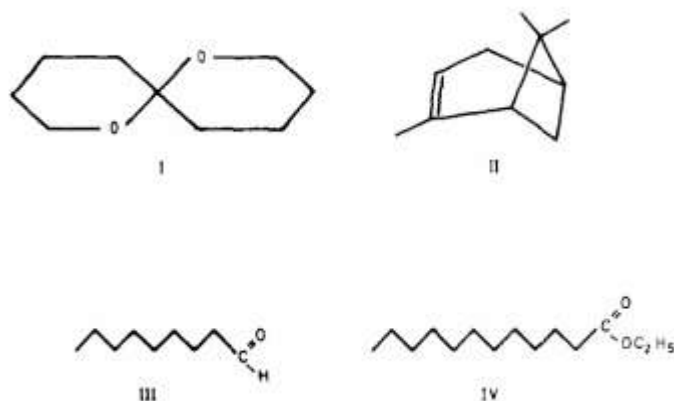
- Η **Olean**, την οποία εκκρίνουν σεξουαλικά ώριμα θηλυκά έντομα
- Η **Muscalure**, την οποία εκκρίνουν σεξουαλικά ώριμα αρσενικά έντομα

1.4.1 Η θηλυκή φερομόνη Olean

Η πρώτη σεξουαλική φερομόνη του δάκου ανακαλύφθηκε το 1980 (Baker et al, 1980), όταν εντοπίστηκε πως τα θηλυκά άτομα εκκρίνουν μια ουσία, την 1,7 dioxaspiro [5,5] undercane από αδένες της ληκύθου του ορθού εντέρου (rectal ampulla), η οποία δρα προσελκυστικά για τα αρσενικά. Η ουσία αυτή ονομάστηκε *Olean* [ή THΣ-olean], ενώ στη βιβλιογραφία αναφέρεται και ως *DSU*. Μεταγενέστερες μελέτες έδειξαν πως η ουσία αυτή δε δρα από μόνη της, αλλά αποτελεί συστατικό ενός μίγματος τεσσάρων ουσιών, οι οποίες δρουν συνεργιστικά. Έπειτα από πειράματα υπό εργαστηριακές συνθήκες, αλλά και στον αγρό επιβεβαιώθηκε πως η *Olean* είναι το δραστικότερο εκ των συστατικών (Mazomenos & Haniotakis, 1981, 1985). Οι ουσίες αυτές είναι οι:

- 1,7 dioxaspiro [5,5] undercane (*Olean*)
- Ethyl dodecanoate
- α -pinene
- nonanal

Από τα συστατικά αυτά τα δύο πρώτα (*Olean*, Methyl-dodecanoate) βιοσυντίθενται από το θηλυκό άτομο στους πρωκτικούς αδένες (rectal glands), ενώ τα άλλα δύο (α -pinene, nonanal) βιοσυντίθενται αλλού στο σώμα του εντόμου ή προσλαμβάνονται από το περιβάλλον.



Εικόνα 1.3. Τα τέσσερα συστατικά της θηλυκής φερομόνης: I. Olean, II. A-pinene, III. N-nonanal, IV. Ethyl-dodecanoate (Mazomenos & Haniotakis, 1985)

Αξίζει επίσης να σημειωθεί πως τα αρσενικά άτομα, παράγουν στους πρωκτικούς αδένες (rectal glands) τους τη ρακεμική μορφή της *Olean* [(S)-olean] χωρίς αυτή όμως να έχει δράση σεξουαλικής φερομόνης. Η ουσία αυτή, ενδεχομένως, έχει δράση φερομόνης συνάθροισης μεταξύ των αρσενικών ατόμων (Haniotakis et al, 1986).

1.4.1.1 Η *Olean* στα ανώριμα αρσενικά άτομα

Η *Olean*, αν και δεν αποτελεί αρσενική φερομόνη, έχει βρεθεί πως συντίθεται, εκτός από τα θηλυκά, και στα σεξουαλικά ανώριμα αρσενικά άτομα (Mazomenos & Pomonis, 1983). Η σύνθεση της *Olean* κινείται αντιστρόφως ανάλογα με τη σεξουαλική ωρίμανση του εντόμου. Ξεκινά, δηλαδή, την πρώτη μέρα και ολοκληρώνεται με την εξ' ολοκλήρου ωρίμανση των γονάδων του, δηλαδή μεταξύ της 8^{ης} και της 11^{ης} μέρας ζωής του (Canale et al, 2012). Η παραγωγή της *Olean* δεν έχει καμία προσελκυστική δράση στα θηλυκά άτομα, δρα ωστόσο προσελκυστικά για τα ώριμα αρσενικά άτομα. Τα ώριμα αρσενικά προσλαμβάνοντας τη φερομόνη εμφανίζουν μια σεξουαλική συμπεριφορά, προς τα ανώριμα αρσενικά, σχεδόν ταυτόσημη με αυτή που εμφανίζουν προς τα ώριμα θηλυκά. Έλκονται, δηλαδή, κοντά τους, πραγματοποιούν τις χαρακτηριστικές κινήσεις των φτερών τους και επιδιώκουν να συζευχθούν μαζί τους. Η συμπεριφορά αυτή των νεαρών αρσενικών, ενδεχομένως να στοχεύει στον αποπροσανατολισμό των ώριμων αρσενικών προκειμένου να μην συζευχθούν με τα θηλυκά και αυτά να παραμένουν διαθέσιμα προς σύζευξη (Benelli et al, 2013).

1.4.2 Η αρσενική φερομόνη *Muscalure*

Τα αρσενικά, σεξουαλικά ώριμα, άτομα εκκρίνουν και αυτά μια σεξουαλική φερομόνη, την (Z)-9-tricosene (Carpita et al, 2012). Η φερομόνη αυτή, η οποία ονομάζεται και *Muscalure*, εντοπίστηκε για πρώτη φορά ως το κύριο συστατικό της φερομόνης της οικιακής μύγας *Musca domestica*, στην οποία εκκρίνεται από τα θηλυκά και δρα προσελκυστικά προς τα αρσενικά άτομα (Carlson et al, 1971).

Η παραγωγή της *Muscalure* στο δάκο, ξεκινά με τη σεξουαλική ωρίμανση των αρσενικών ατόμων και θεωρείται πως η προσελκυστική της δράση έγκειται στη δεύτερη φάση της σεξουαλικής επικοινωνίας, αυτή της κοντινής επαφής.



Εικόνα 1.4. Η αρσενική φερομόνη *Muscalure* (pherobase.com)

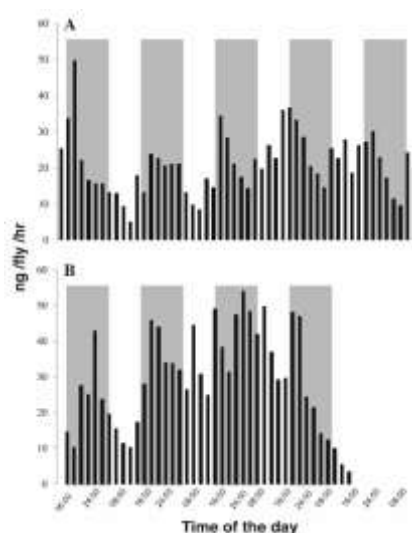
1.4.3 Επίπεδα έκκρισης των δύο φερομονών

Η ανακάλυψη και επιτυχής απομόνωση των δύο φερομονών, από αρσενικούς και θηλυκούς δάκους, όπως επίσης και η επιτυχής σύνθεση τους στο εργαστήριο άνοιξε το δρόμο για την αναλυτικότερη διερεύνηση αυτού του σταδίου της σεξουαλικής επικοινωνίας. Μια σειρά από μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί, έκτοτε, εξετάζοντας τις διαφορές στα επίπεδα έκφρασης και απόκρισης των δύο φύλων στις φερομόνες αυτές ανά ημέρα καθώς και ανά ώρα.

Κατ' αρχάς, σε ό,τι αφορά τη θηλυκή φερομόνη *Olean*:

- Ανά ώρα

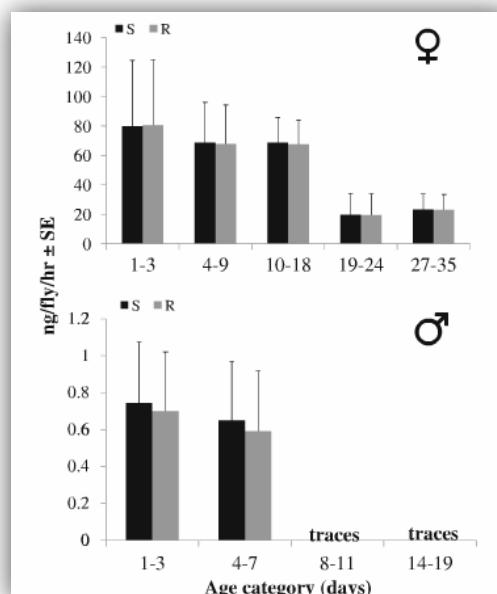
Εντοπίστηκε πως τα θηλυκά άτομα εκκρίνουν διαρκώς την *Olean* στη διάρκεια της ημέρας με αποκορύφωμα λίγο πριν και κατά τη διάρκεια της σκοτόφασης. Η έκκριση της φερομόνης δε φτάνει ποτέ σε μηδενικά επίπεδα, ωστόσο το παρόν πρότυπο έκκρισης δεν επιβεβαιώνεται απόλυτα. Είναι σαφές, τέλος, η αύξηση στην έκκριση των φερομονών ως λογικό αποτέλεσμα της ηλικιακής και σεξουαλικής ωρίμανσης του εντόμου (Levi-Zada et al, 2012).



Εικόνα 1.5. Τα ημερήσια επίπεδα έκφρασης της *Olean*, κατά τη διάρκεια πέντε ημερών, σε: Α. Ένα θηλυκό άτομο 5 ημερών, Β. Ένα θηλυκό άτομο 17 ημερών. Το γκρι χρώμα αντιπροσωπεύει το διάστημα της σκοτόφασης (Levi-Zada et al, 2012).

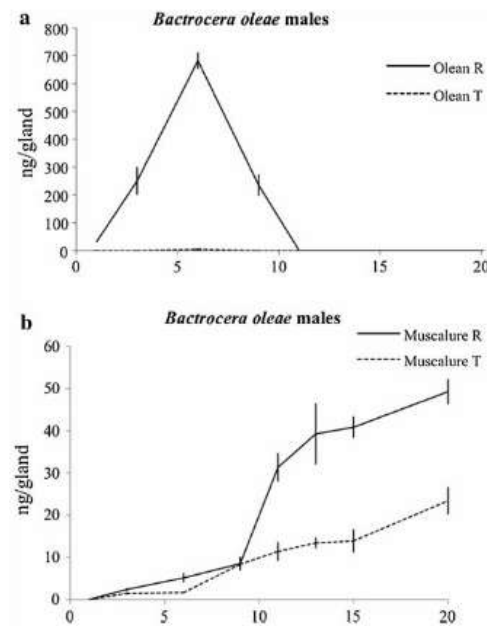
- Ανά ημέρα

Η εξέταση των επιπέδων έκκρισης της *Olean* σε θηλυκά, αλλά και σε αρσενικά, άτομα φανερώνει πως και στα δύο φύλα υπάρχει σύνθεση και έκκριση της φερομόνης από την πρώτη μέρα ζωής των ενήλικων ατόμων. Στα θηλυκά τα επίπεδα έκκρισης παραμένουν με την σεξουαλική ωρίμανση (8^η μέρα) του ατόμου και εμφανίζουν πτωτικές τάσεις από τη 19^η μέρα και έπειτα. Αντιθέτως, στα αρσενικά άτομα η έκκριση της φερομόνης ολοκληρώνεται με το τέλος της σεξουαλική ωρίμανση του εντόμου και έπειτα μηδενίζεται (Levi-Zada et al, 2012). Τέλος, πρέπει να σημειωθεί πως τα επίπεδα έκκρισης της *Olean* στα θηλυκά είναι πολύ υψηλότερα από τα αντίστοιχα επίπεδα στα αρσενικά. Χαρακτηριστικά αναφέρεται πως στις πρώτες 18 ημέρες ζωής των θηλυκών ατόμων οι ποσότητες έκκρισης κινούνται μεταξύ 60-80 ng/ανά έντομο/ανά ώρα, ενώ οι αντίστοιχες ποσότητες των αρσενικών είναι 0,8 ng/ανά έντομο/ανά ώρα.



Εικόνα 1.6. Τα επίπεδα έκφρασης της *Olean* ανά ημέρα σε ένα αρσενικό και ένα θηλυκό δάκο. Με γκρι χρώμα η φερομόνη *Olean*, με μαύρο το ρακεμικό εναντιομερές της (Levi-Zada et al, 2012).

Στα αρσενικά άτομα έχουν πραγματοποιηθεί αναλυτικότερες μετρήσεις σε ό,τι αφορά τα επίπεδα έκκρισης των δύο φερομονών, όπως και των ρακεμικών τους ενώσεων στους αδένες της ληκύθου του ορθού εντέρου (rectal ampulla). Επιβεβαιώνεται σε αυτές πως η έκκριση της *Olean* κορυφώνεται μεταξύ της 5^{ης} και 8^{ης} μέρας, εκμηδενίζοντας τα επίπεδα έκκρισης την 11^η μέρα. Απ' την άλλη, η αρσενική φερομόνη *Muscalure* εμφανίζει χαμηλά επίπεδα έκκρισης όσο το αρσενικό άτομο είναι σεξουαλικά ανώριμο, αυξάνοντας κατακόρυφα τα επίπεδα με την ωρίμανση του και συνεχώς μέχρι την 21^η μέρα της ζωής του (Canale et al, 2013).



Εικόνα 1.7. Εμφανίζονται τα επίπεδα έκκρισης των δύο φερομονών (*Olean*, *Muscalure*) στα αρσενικά άτομα, κατά τη διάρκεια της ζωής τους (Canale et al, 2013).

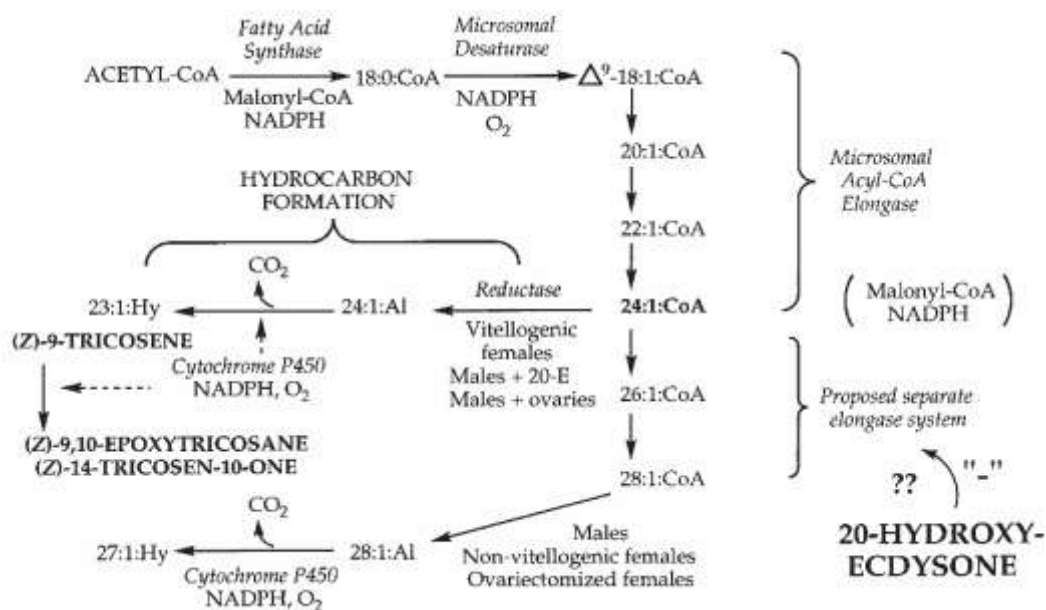
1.4.4 Βιοσύνθεση των φερομονών

Για τη βιοσύνθεση των δύο φερομονών δεν υπάρχουν διαθέσιμα στοιχεία που να έχουν προκύψει από μελέτες στο δάκο της ελιάς. Ως εκ τούτου, στην παρούσα ενότητα θα αναφερθούν κάποια βασικά στοιχεία για τη βιοσύνθεση των φερομονών στα έντομα που ανήκουν στην τάξη των δίπτερων, καθώς και πληροφορίες για το βιοσυνθετικό μονοπάτι των δύο φερομονών από μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί σε άλλα δίπτερα και αποτελούν ένα χρήσιμο οδηγό για μελλοντικές μελέτες και στο δάκο.

Στα δίπτερα οι φερομόνες αποτελούν ενώσεις υδρογονανθράκων οι οποίες συντίθενται σε εξειδικευμένα υποεπιδερμικά κοιλιακά κύτταρα [subcuticular abdominal epidermal cells (oenocytes)] και αποτίθενται στις επιδερμικές επιφάνειες (cuticular surfaces). Λόγω της δομικής τους ομοιότητας με τα συστατικά του στρώματος της εφυμενίδος (epicuticular layer) όλων των εντόμων (Blomquist et al, 1998) θεωρείται πως, οι φερομόνες, προκύπτουν από τροποποιήσεις των μεταβολικών μονοπατιών που παράγουν επιδερμικά λιπίδια (cuticular lipids) (Nelson & Blomquist, 1995).

- **Βιοσύνθεση της *Muscalure***

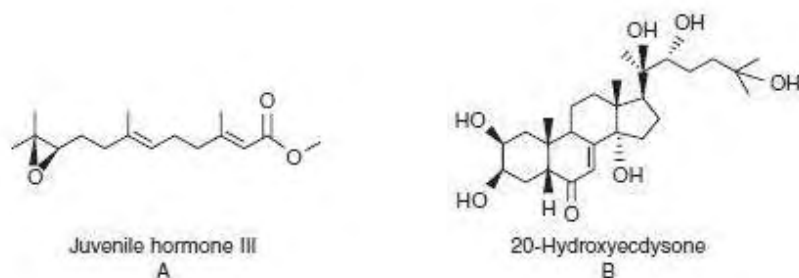
Σε ό,τι αφορά την αρσενική φερομόνη του δάκου Z9-tricosene (*Muscalure*), το βιοσυνθετικό της μονοπάτι στην οικιακή μύγα *Musca domestica* έχει αποκαλυφθεί και αποτυπώνεται στην παρακάτω εικόνα.



Εικόνα 1.8. Το βιοσυνθετικό μονοπάτι της *Muscalure* στη μύγα *Musca domestica* (Tillman et al, 1999)

- **Ρύθμιση των βιοσυνθετικών μονοπατιών**

Τέλος, σε σχέση με την ορμονική ρύθμιση της παραγωγής φερομονών φαίνεται πως κάθε τάξη διαθέτει διακριτούς ρυθμιστικούς ενδοκρινικούς παράγοντες. Πιο συγκεκριμένα, στα Δίπτερα τέτοιο ρόλο φαίνεται να έχουν Εκδυστεροειδείς ουσίες, όπως η 20-υδροξυεκδυσόνη (20-E), στα Βλαποειδη και τα Κολεόπτερα η ορμόνη νεότητας (Juvenile hormone, JH), μια ορμόνη που σχετίζεται με την ωρίμανση των ωοθηκών, και στα Λεπιδόπτερα το νευροπεπτίδιο PBAN. Να σημειωθεί, ωστόσο, πως διάφορες μελέτες υποδεικνύουν αλληλεπίδραση της JH με τα εκδυστεροειδή των Διπτέρων, κατά τη διαδικασία της ενδοκρινικής ρύθμισης (για επισκόπηση: Tillman et al, 1999).



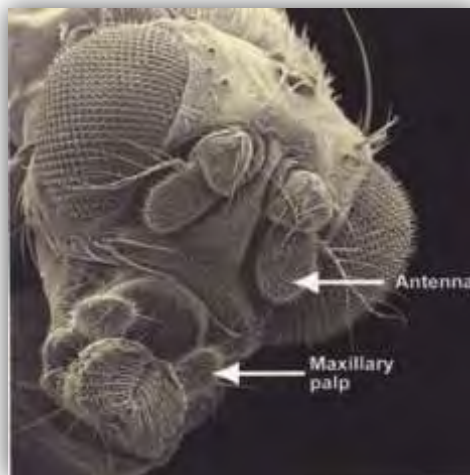
Εικόνα 1.9. Η χημική δομή των ρυθμιστικών μορίων Α. Ορμόνη νεότητας, Β. 20-υδροξυεκδυσόνη (Blomquist et al, 2003)

1.5 Πρόσληψη των φερομονών

Η πρόσληψη των φερομονών, όπως και όλων των πτητικών οσμών, στα έντομα, πραγματοποιείται στα δύο κύρια οσφρητικά τους όργανα:

1. Τις **κεραίες** (antennae)
2. Τις **γναθικές προσακτρίδες** (maxillary palps)

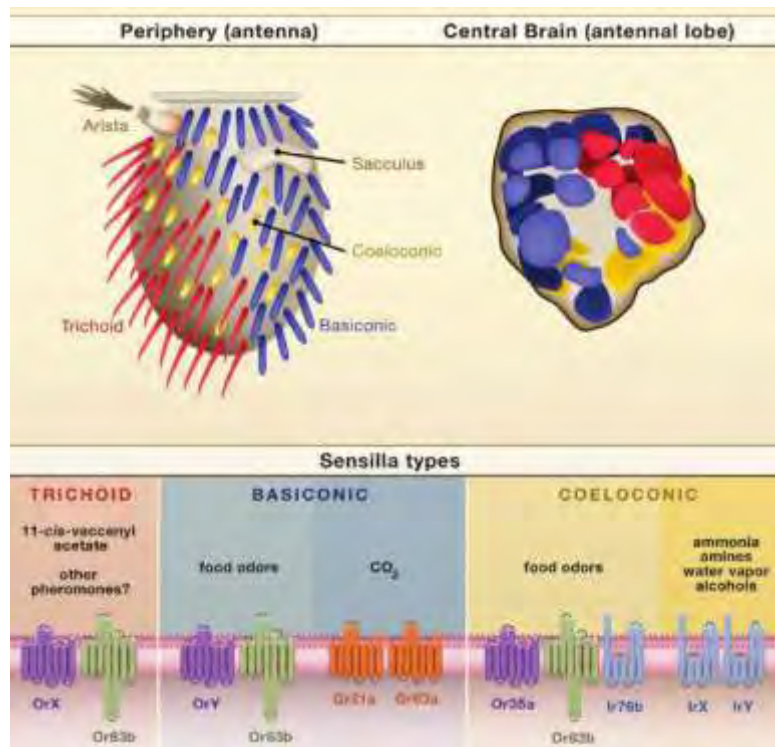
Τα όργανα αυτά εδράζονται στο κεφάλι τους και περιβάλλονται από έναν πολύ μεγάλο αριθμό εξειδικευμένων πορώδη τριχιδίων, που ονομάζονται αισθητικά τριχίδια (sensilla), εντός των οποίων εισέρχεται η οσμή κατά την έναρξη της αναγνώρισης της. Τα αισθητικά τριχίδια, διαχωρίζονται σε ορισμένες κατηγορίες ανάλογα με τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά και το είδος των οσμών που προσλαμβάνουν.



Εικόνα 1.10. Απεικόνιση της κεραίας και των γναθικών προσακτρίδων στη *Drosophila melanogaster* (Laissue & Vosshall, 2008)

1.5.1 Οσφρητικά όργανα και οσφρητικοί νευρώνες (OSNs)

Ο κύριος ρόλος των αισθητικών τριχιδίων είναι να στεγάζουν και να προστατεύουν τους οσφρητικούς νευρώνες (OSNs, Odorant Sensory Neurons). Τα αισθητικά τριχίδια διακρίνονται σε τρία κύρια είδη: i) τα τριχοειδή (trichoid), ii) τα βασικωνικά (basiconic), και iii) τα κοιλοκωνικά (coelonic). Τα τρία αυτά είδη εμφανίζουν σημαντικές διαφορές ως προς το μέγεθος, τη μορφολογία, τους τύπους των ενώσεων που αναγνωρίζουν οι νευρώνες τους καθώς και την κατανομή τους στην κεραία. Μέσω μελετών που έχουν πραγματοποιηθεί, ως επί το πλείστον, στη *Drosophila melanogaster* έχει αποδειχθεί πως τα τριχοειδή αισθητικά τριχίδια έχουν μεγαλύτερη ειδικευση στην αναγνώριση φερομονών, ενώ τα αντίστοιχα βασικωνικά στην αναγνώριση των τροφών (Jefferis *et al*, 2007).



Εικόνα 1.11. Απεικόνιση των διαφορετικών κατηγοριών αισθητικών τριχιδίων, των θέσεων τους στην κεραία καθώς και των οσμών που αναγνωρίζουν (Spletter & Luo, 2009)

Οι OSNs προσδιορίζουν τις οσμές και μεταφέρουν το μήνυμα στον εγκέφαλο, ενώ εδράζονται στο τρίτο τμήμα της κάθε κεραίας και στις γναθικές προσακτρίδες. Παρά τη σημαντική ποικιλομορφία στη μορφολογία των οργάνων αυτών, μεταξύ των ειδών, η δομή των οσφρητικών αισθητικών τριχιδίων παραμένει υψηλά συντηρημένη και αποτελείται από ένα επιδερμικό τοίχωμα, το οποίο περιλαμβάνει πολλαπλούς πόρους μέσα από τους οποίους εισέρχονται οι οσμές. Το κάθε οσφρητικό τριχίδιο περιλαμβάνει τους δενδρίτες από ένα έως πέντε οσφρητικών νευρώνων (Vermuelen *et al*, 2004). Οι άξονες των OSNs εκτείνονται ως τα σπειράματα (glomeruli) των υπεύθυνων για την όσφρηση συναπτικών κέντρων, στο λοβό (antennal lobe) του εγκεφάλου (Hildebrand *et al*, 1997).

Στο ενήλικο άτομο της *Drosophila melanogaster* υπολογίζεται πως περίπου 410 αισθητικά τριχίδια περιβάλλουν την κάθε κεραία, ενώ περίπου 60 περιβάλλουν τις γναθικές κροσακτρίδες (Couto *et al*. 2005).

Η **κεραία** καλύπτεται και από τα τρία είδη αισθητικών τριχιδίων. Συνολικά, σε κάθε κεραία περιέχονται περίπου 1100-1250 OSNs, με τα αρσενικά άτομα να διαθέτουν σχεδόν 20% λιγότερα βασικονικά τριχίδια και 30% περισσότερα τριχοειδή τριχίδια απ' ότι τα θηλυκά (Stocker, 2001).

Οι **γναθικές προσακτρίδες** είναι πολύ απλούστερες δομές από τις κεραίες και καλύπτονται εξ ολοκλήρου μόνο από ένα είδος τριχιδίων, τα μεγάλα βασικονικά (large basiconic). Κάθε γναθική προσακτρίδα περιέχει 120 OSNs, ενώ το άνω άκρο της περιέχει ~60 αισθητικά τριχίδια, όπου το καθένα εδράζει από δύο νευρώνες. Οι λειτουργικές αναλύσεις των 120 αυτών

νευρώνων έδειξαν έξι διαφορετικές λειτουργικές κλάσεις, οι οποίες αναπαριστούν τους διαφορετικούς συνδυασμούς των Ors που εκφράζονται στους νευρώνες αυτούς.

Οι άξονες των OSNs είτε προέρχονται από τις κεραίες, είτε από τις γναθικές προσακτρίδες συγκλίνουν σε περίπου 43 διαφορετικά σπειράματα του λοβού της κεραίας. Πειράματα σε πολλά είδη εντόμων (μύγες, μέλισσες, κουνούπια κ.α.) έδειξαν πως οι διαφορετικοί OSNs ανταποκρίνονται αφενός σε διαφορετικές οσμές, αλλά και με διαφορές στον τύπο της απάντησης (διεγερτικά ή ανασταλτικά) και στην ένταση αυτής.

Αντίθετα, κατά το αναπτυξιακό στάδιο της προνύμφης της *D. Melanogaster* έχει διαπιστωθεί η ύπαρξη ενός ζεύγους οσφρητικών οργάνων που ονομάζονται ραχιαία όργανα (dorsal organs). Το καθένα από αυτά περιέχει 21 οσφρητικούς νευρώνες, που εκτείνουν δενδρίτες σε ένα μοναδικό τριχίδιο που ονομάζεται θολωτό τριχίδιο (dome sensillum). Οι άξονες των νευρώνων αυτών εκτείνονται σε ένα μικρό σπείραμα του προνυμφικού λοβού της κεραίας.

1.6 Η πρόσληψη σε μοριακό επίπεδο

Οι οσμές/φερομόνες από τη στιγμή της εισόδου τους στα οσφρητικά όργανα έως την ενεργοποίηση του νευρώνα (OSN) είναι αναγκαίο να αλληλεπιδράσουν με μια σειρά μορίων προκειμένου να ολοκληρώσουν επιτυχώς το έργο τους. Τα μόρια αυτά χωρίζονται σε ορισμένες λειτουργικές κατηγορίες:

- Τις οσμοδεσμευτικές πρωτεΐνες
- Τους υποδοχείς
- Άλλα μόρια

1.7 Οσμοδεσμευτικές πρωτεΐνες

Οι οσμοδεσμευτικές πρωτεΐνες είναι οι πρώτες πρωτεΐνες με τις οποίες αλληλεπιδρούν οι φερομόνες και οι οσμές. Οι πρωτεΐνες αυτές είναι μικρές υδατοδιαλυτές, εξωκυττάρειες πρωτεΐνες που εδράζονται στο λεμφικό υγρό που περιβάλλει τους αισθητικούς δενδρίτες και η βασική τους λειτουργία είναι η προστασία των υδρόφοβων οσμών, τις οποίες και μεταφέρουν στους ειδικούς υποδοχείς που εδράζονται στην επιφάνεια του νευρώνα, μέσω μηχανισμών που δε γνωρίζουμε ακόμη επαρκώς. Επιπλέον, οι πρωτεΐνες αυτές έχουν εντοπιστεί και σε δομές στις οποίες συντίθενται και απελευθερώνονται οι φερομόνες.

Η κύρια κατηγορία οσμοδεσμευτικών πρωτεϊνών ονομάζονται OBPs (Odorant binding proteins), ενώ υπάρχει και μια δεύτερη κατηγορία με παρόμοια λειτουργικά χαρακτηριστικά που ονομάζονται χημειοδεκτικές πρωτεΐνες, CSPs (Chemosensory proteins):

1.7.1 Οι OBPs

Οι OBPs αποτελούν την πρώτη οικογένεια πρωτεϊνών που ανακαλύφθηκαν και συσχετίστηκαν με την λειτουργία του οσφρητικού συστήματος, μέσω μελετών στο σκόρο *Antheraea 22olyphemus*, το 1981 (Vogt & Riddiford, 1981). Οι OBPs έχουν εντοπιστεί και αναλυθεί, επίσης, σε αρκετά σπονδυλωτά παρουσιάζοντας έντονες λειτουργικές και δομικές διαφορές με τους αντίστοιχους των εντόμων (Για περισσότερα: Pelosi et al, 2014). Στο παρόν κείμενο θα αναφερθούν αποκλειστικά τα χαρακτηριστικά των OBPs που παράγουν τα έντομα.

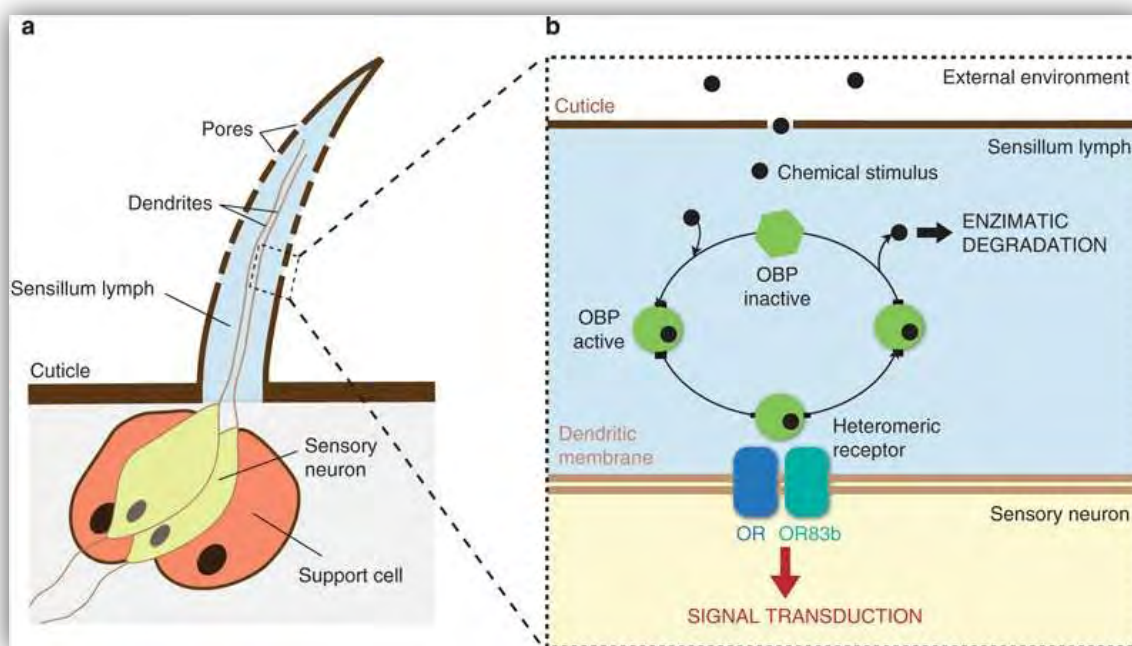
Δομή: Οι OBPs έχουν μια εξαιρετικά συμπαγή και σταθερή δομή αποτελούμενη από 130-140 αμινοξέα. Η πλειοψηφία αυτών μοιράζονται ένα κοινό βρόγχο με έξι α-έλικες συνδεδεμένες με θηλιές που συγκρατούνται από τρεις δισουλφιδικούς δεσμούς. Επιπλέον, σχεδόν όλοι οι OBPs διατηρούν ένα μοτίβο έξι υψηλά συντηρημένων κυστεϊνών, το οποίο αποτελεί και την «υπογραφή» τους και είναι της μορφής (C1-X₂₀₋₃₅-C2-X₃-C3-X₂₀₋₃₀-C4-X₈₋₁₂-C5-X₈-C6). Ο αριθμός των αμινοξέων που διαμεσολαβεί ανάμεσα στη δεύτερη και την Τρίτη κυστεΐνη είναι πάντα τρία, και ο αντίστοιχος μεταξύ της πέμπτης και της έκτης είναι πάντα οκτώ (Pelosi et al, 2006). Άλλα χαρακτηριστικά των OBPs είναι: το μέγεθος τους που κυμαίνεται μεταξύ 15-20 kDa, η σφαιρική υδατοδιαλυτή φύση τους και η παρουσία ενός πεπτιδικού σινιάλου αρχή της αλληλουχίας τους. Επιπλέον, οι OBPs των εντόμων, έχοντας πολύ έντονες αποκλίσεις στα χαρακτηριστικά τους, κατηγοριοποιούνται σε 5 υποοικογένειες: 1) Τους κλασσικούς OBPs, που διατηρούν τα παραπάνω γνωρίσματα, 2) τους διμερείς OBPs, που φέρουν δύο μοτίβα έξι-κυστεϊνών, 3) τους plus-C OBPs, οι οποίοι φέρουν δύο επιπλέον συντηρημένα κατάλοιπα κυστεΐνης, καθώς και ένα προλίνης, 4) τους minus-C OBPs, που έχουν δύο λιγότερες συντηρημένες κυστεΐνες και 5) τους ατυπικούς OBPs, που φέρουν 9-10 κυστεΐνες και ένα εκτεταμένο C-τελικό άκρο (Liu R. Et al, 2010).

Ταξινόμηση: Στα έντομα οι OBPs χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες ανάλογα με το είδος της δράσης τους: α) pheromone binding proteins (PBPs), β) general odor binding proteins (GOBPs), γ) antennal specific proteins (ASPs). Οι PBPs συμβάλλουν στην πρόσληψη της φερομόνης και τη μεταφορά της στους υποδοχείς ενώ οι GOBPs στην πρόσληψη των πτητικών γενικών οσμών, όπως είναι οι οσμές που εκλύουν τα φυτά. Σε ό,τι αφορά τις ASPs, αποτελούν πρωτεΐνες που εκφράζονται σε πολύ υψηλές τιμές στις κεραίες των εντόμων, χωρίς ωστόσο να έχει προσδιοριστεί ο ακριβής τους ρόλος.

Έκφραση και λειτουργία: Εκφράζονται σε αφθονία στη λέμφο των αισθητικών τριχιδίων στις κεραίες του εντόμου. Οι OBPs έχουν βρεθεί να δεσμεύουν ειδικά ένα πολύ περιορισμένο αριθμό πιθανών προσδετών. Έτσι, οι OBPs φαίνεται πως αναγνωρίζουν τάξεις δομικά όμοιων οσμών, ενώ μπορούν να διακρίνουν σημειοχημικές ουσίες (π.χ. φερομόνες) με διαφορετικές χημικές δομές. Τέλος, παρά τη δομική τους ομολογία φέρουν κοιλώματα δέσμευσης (binding cavities) διαφορετικών μεγεθών και υδρόφοβα περιβάλλοντα που μπορούν να συνδέονται αντίστροφα με ένα μεγάλο εύρος οργανικών μορίων και φυσικά παραγόμενων οσμών (Tegoni et al, 2004).

1.7.2 Οι CSPs

Οι χημειοδεκτικές πρωτεΐνες (CSPs) είναι πρωτεΐνες με παρόμοια δράση με τις OBPs, αλλά σημαντικές διαφορές στη δομή και την έκφραση. Σε ό,τι αφορά τη δομή, αποτελούνται από περίπου 100-120 αμινοξέα διατηρώντας ωστόσο ένα διαφορετικό μοτίβο από τις OBPs, έχοντας συντηρημένα τέσσερα (αντί για έξι) κατάλοιπα κυστεΐνης (C1-X6-C2-X6-18-C3-X2-C4) μέσω των οποίων συγκροτούν δύο (αντί για τρεις) δισουλφιδικούς δεσμούς (Angeli et al, 1999). Σε ό,τι αφορά την έκφραση, πέρα από τα υψηλά επίπεδα που έχουν παρατηρηθεί στις κεραίες (όπως οι OBPs), έντονη έκφραση τους έχει παρατηρηθεί και στα πόδια του εντόμου (Tomaselli et al, 2006).



Εικόνα 1.12. Σχηματική εικόνα της δομής ενός αισθητικού τριχιδίου (a) καθώς και των πρώτων βημάτων μεταγωγής του σήματος, μέσω της δράσης των OBPs (Sánchez-Gracia et al, 2009)

1.7.3 Μηχανισμοί δράσης των OBPs

Οι λεπτομέρειες της λειτουργίας των OBPs διερευνώνται για να προσδιοριστεί ο ακριβής τρόπος με τον οποίο ενεργοποιούν το νευρώνα αφού αλληλεπιδράσει με αυτούς η φερομόνη. Έχουν προταθεί δύο μοντέλα, χωρίς να αποκλείεται διαφορετικά έντομα να έχουν και διαφορετικό μηχανισμό ενεργοποίησης των νευρώνων τους.

- **Ενεργοποίηση *per se***

Ο πρώτος μηχανισμός προτείνει πως οι φερομόνες δρουν ως προσδέτης ενεργοποιώντας απευθείας τον νευρώνα, με τους OBPs να έχουν συνοδευτικό ρόλο μεταφοράς τους στον κατάλληλο υποδοχέα και και προστασίας τους από την υδατική λέμφο. Το μοντέλο αυτό έχει αναλυθεί διεξοδικά σε έντομα που ανήκουν στην τάξη των λεπιδόπτερων, όπως ο σκόρος *Bombyx mori* μέσω μελετών της αλληλεπίδρασης της φερομόνης του *Bombykol* με την πρωτεΐνη του BmorPBP1 (Wojtasek & Leal, 1999). Η πρωτεΐνη αυτή δεσμεύει ισχυρά τη φερομόνη και ακολούθως την απελευθερώνει, μέσω pH-εξαρτώμενων αλλαγών που συμβαίνουν στη στερεοδιαμόρφωση της.

- **Σύμπλοκο φερομόνης-OBP**

Ο δεύτερος μηχανισμός προτείνει πως η φερομόνη δεν δρα αυτούσια ως προσδέτης στον υποδοχέα, αλλά είναι το σύμπλοκο φερομόνης και OBP που επιτελεί αυτό το ρόλο, χωρίς η φερομόνη να απελευθερώνεται. Το μοντέλο αυτό έχει μελετηθεί στη φρουτόμυγα *Drosophila melanogaster*, μέσω μελετών της αλληλεπίδρασης της φερομόνης της cVA με την πρωτεΐνη DmelOBP76a, γνωστή και ως LUSH. Η είσοδος της cVA στα αισθητικά τριχίδια και η πρόσληψη της από τη LUSH προκαλεί μια αλλαγή στη στερεοδιαμόρφωση της πρωτεΐνης, με αποτέλεσμα










το σύμπλοκο όταν φτάνει στην επιφάνεια του νευρώνα να ενεργοποιεί τον υποδοχέα Or67d, χωρίς να απελευθερώνεται η φερομόνη (Laughlin et al, 2008).

1.7.4 Άλλες λειτουργίες

Πέρα από το ρόλο τους στη πρόσληψη και τη μεταφορά των οσμών, ορισμένοι OBPs και CSPs έχουν συνδεθεί και με μια σειρά άλλων λειτουργιών των εντόμων.

Αναπαραγωγικές: Αρχικά, έχουν εντοπιστεί στα αναπαραγωγικά όργανα και στους αδένες απελευθέρωσης των φερομονών σε μια σειρά οργανισμών, υποδεικνύοντας τον πιθανό τους ρόλο στην απελευθέρωση των φερομονών στο περιβάλλον. Τέτοια παραδείγματα είναι οι CSPs που έχουν εντοπιστεί στις αδένες που απελευθερώνουν τις φερομόνες στα έντομα *Bombyx mori* (Dani et al, 2011) και *Mamestra brassicae* (Jacquin-Joly et al, 2001). Αντίστοιχες πρωτεΐνες έχουν εντοπιστεί να μεταφέρονται μαζί με τα σπερματικά υγρά αρσενικών εντόμων στα θηλυκά κατά τη σύζευξη, δεσμευμένα με φερομόνη. Τέτοια παραδείγματα είναι ο OBP10 στα *Helicoverpa armigera* και *H. Assulta* (Sun et al, 2012), ο OBP22 στο κουνούπι *Aedes aegypti* (Li et al, 2008) και ο CSP91 στο *Locusta migratoria* (Ban et al, 2013).

Άλλες: Πέρα από το ρόλο σε αναπαραγωγικές λειτουργίες, CSPs και OBPs έχουν συνδεθεί και με μια σειρά άλλων λειτουργιών. Η πρωτεΐνη p10, η οποία όταν εντοπίστηκε στην κατσαρίδα *Periplaneta americana* αποτέλεσε την πρώτη χαρακτηρισμένη CSP, εμπλέκεται στην ανάπτυξη των άκρων του εντόμου (Nomura et al, 1992). Η CSP5 της μέλισσας *Apis mellifera*, εντοπίζεται αποκλειστικά σε αυγά και ωοθήκες και είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη του εμβρύου (Maleszka et al, 2007). Η CSP4 των *Helicoverpa armigera* και *H. Assulta*, λόγω της παρουσίας τους σε υψηλή συγκέντρωση στην προβοσκίδα θεωρείται πως δρουν σαν επιφανειοδραστικές ουσίες για να διευκολύνουν τα έντομα να ρουφήξουν την τροφή τους (Liu et al, 2014a). Ορισμένοι CSPs έχουν συνδεθεί με την ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα (Liu et al, 2014b; Xuan et al, 2015). Ο OBP56a εκφράζεται στη στοματική κοιλότητα της μύγας *Phormia regina*, έχοντας δράση διαλυτικού λιπαρών οξέων (Ishida et al, 2013). Τέλος, έχουν αναφερθεί OBPs οι οποίοι δρουν σε ζευγάρι (tandem) σχηματίζοντας μια γέφυρα λίγων αμινοξέων. Τέτοια παραδείγματα είναι στο κουνούπι *Aedes aegypti* η σιελογόνος πρωτεΐνη D7r4 η οποία εμπλέκεται σε αντιφλεγμονώδεις διεργασίες (Calvo et al, 2009) και η OBP45, η οποία έχει αναφερθεί στις ωοθήκες και τα αυγά να εμπλέκεται στην ωρίμανση του ωαρίου (Costa-da-Silva et al, 2013).

<i>Periplaneta americana</i>		Legs	P10 (CSP)	Limb regeneration
<i>Locusta migratoria</i>		Testis	CSP91	Pheromone delivery
<i>Mamestra brassicae</i>		Pheromone glands	CSPs	Pheromone delivery
<i>Agrotis ipsilon</i>		Pheromone glands	CSPs	Pheromone delivery
<i>Bombyx mori</i>		Pheromone glands	CSPs	Pheromone delivery
<i>Helicoverpa armigera</i>		Sex organs, proboscis	OBP10, CSP4	Pheromone delivery, surfactant
<i>Apis mellifera</i>		Mandibular glands, eggs	OBPs, CSPs	Pheromone delivery, embryo development
<i>Phormia regina</i>		Oral disk	OBP56a	Fatty acid solubiliser
<i>Aedes aegypti</i>		Saliva, sperm, ovaries	D7r4 (OBP), OBP22, OBP45	Antiinflammatory, pheromone delivery, egg development

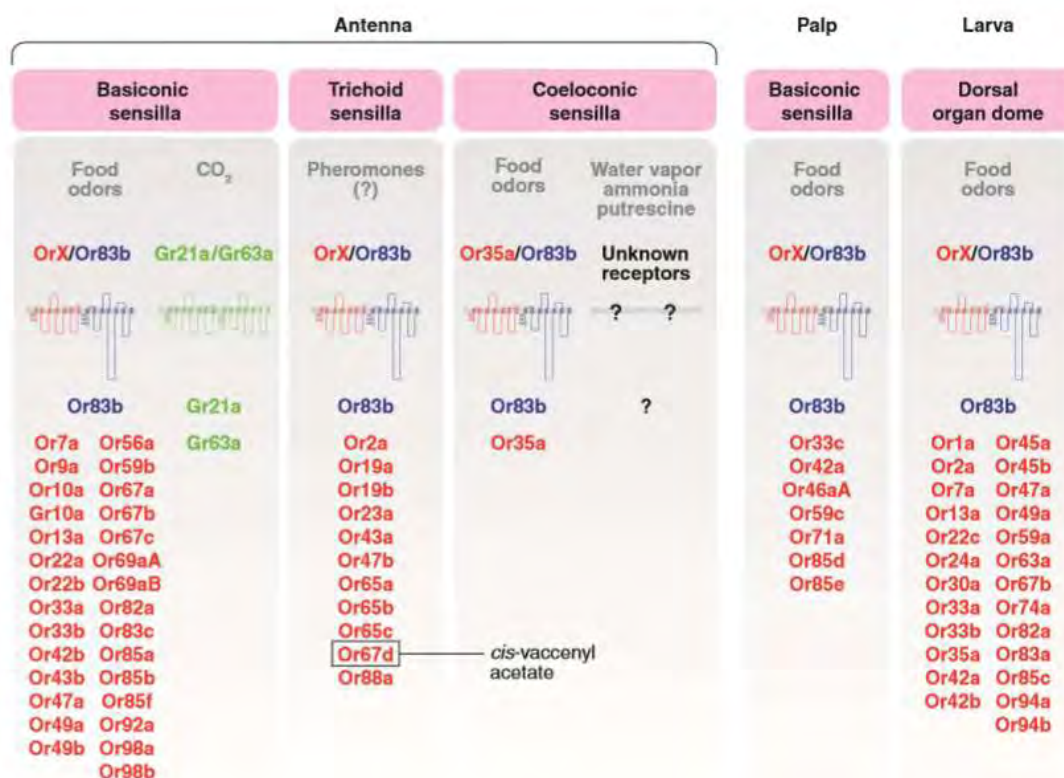
Εικόνα 1.13. OBPs και CSPs εντόμων που εμπλέκονται σε μη-οσφρητικές διεργασίες (Pelosi et al, 2014)

1.8 Οι υποδοχείς

Οι υποδοχείς επιτελούν το δεύτερο βήμα στην οσφρητική διαδικασία. Εδράζονται στην επιφάνεια των οσφρητικών νευρώνων (OSNs) και σε αυτούς μεταφέρονται οι φερομόνες αφού αλληλεπιδράσουν με τις οσμοδεσμευτικές πρωτεΐνες. Η δύο κύριες κατηγορίες υποδοχέων είναι οι οσφρητικοί υποδοχείς (Odorant receptors, Ors) και οι ιονοτροπικοί υποδοχείς (Ionotropic receptors, Irs). Επίσης, στην κατηγορία αυτή εντάσσονται και οι γευστικοί υποδοχείς (Gustatory receptors, GRs) λόγω της συνεισφοράς τους στην οσφρητική διαδικασία, παρόλο που επιτελούν και άλλες λειτουργίες.

1.8.1 Οι οσφρητικοί υποδοχείς (Ors)

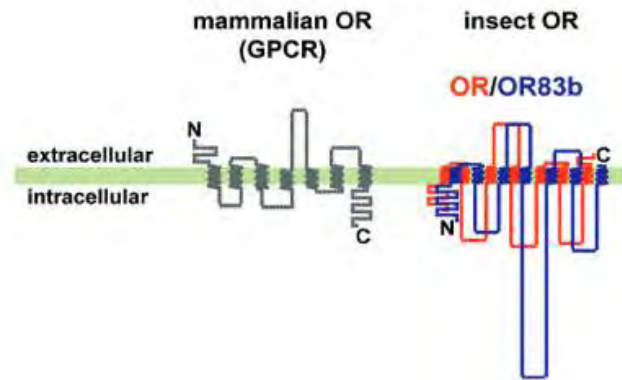
Οι οσφρητικοί υποδοχείς (Ors) αποτελούν τη βασική κατηγορία υποδοχέων που εμπλέκονται στην οσφρητική διαδικασία. Αρχικώς, ανακαλύφθηκαν στον ποντικό το 1991 (Buck & Axel, 1991) και έπειτα από μια μακρά περίοδο λόγω των ιδιαίτερα έντονων δομικών διαφορών ανακαλύφθηκαν και στη *Drosophila melanogaster* το 1999, μέσω βιοπληροφορικών (Clyne et al, 1999) και μοριακών προσεγγίσεων (Vosshall et al, 1999). Ο κάθε OR δεν αναγνωρίζει αποκλειστικά μία οσμή, αλλά μπορεί να ενεργοποιηθεί από πολλαπλά διαφορετικά χημικά ερεθίσματα. Ο συνδυασμός του σήματος που δίνουν αυτοί δημιουργεί τελικά τη μοναδική αναπαράσταση της κάθε οσμής στον εγκέφαλο (Ache et al. 2005). Οι υποδοχείς αυτοί εντοπίζονται στα ενήλικα άτομα στις τρεις κατηγορίες τριχιδίων της κεραίας (βασικωνικά, τριχοειδικά, κοιλοκωνικά) όπως και στα τριχίδια των γναθικών προσαρκτίδων και τις προνύμφες.



Εικόνα 1.14. Συνοπτική λίστα των υποδοχέων που εκφράζονται στις κεραίες, στις γναθικές προσακτρίδες και στο αναπτυξιακό στάδιο της προνύμφης (larva), κατηγοριοποιημένα βάσει της λειτουργικής τους τάξης και του τριχιδίου (Vosshall & Stocker, 2007).

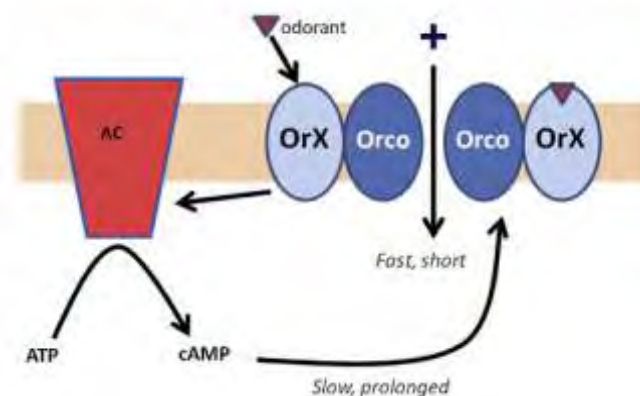
Δομή: Οι Ors των εντόμων έχουν μια ιδιαίτερη δομή, αρκετά διαφορετική από την αντίστοιχη των Ors των θηλαστικών και μοναδική στη φύση. Πιο συγκεκριμένα, οι Ors των θηλαστικών έχουν επτά διαμεμβρανικές περιοχές οι οποίες συγκροτούν μια δομή GPCR (Mombaerts, 1999). Οι αντίστοιχοι υποδοχείς των εντόμων, αποτελούνται επίσης από επτά διαμεμβρανικές περιοχές, ωστόσο δεν χαρακτηρίζονται ως GPCR καθώς εμφανίζουν διαφορετική τοπολογία. Εμφανίζουν, δηλαδή, μια δομή αντίστροφη από αυτή των GPCR με το αμινοτελικό του άκρο να εντοπίζεται εσωτερικά του κυτταροπλάσματος και το καρβοξυτελικό εξωτερικά (Benton et al, 2006; Wistrand et al, 2006).

Ο συνυποδοχέας OR83b (Orco): Το πλέον χαρακτηριστικό γνώρισμα της δομής των οσφρητικών υποδοχέων είναι η καθολική παρουσία υποδοχέα του OR83b, ο οποίος έχει αποδειχτεί πως επιτελεί ρόλο συν-υποδοχέα (Larsson et al, 2004) και γι' αυτό στη βιβλιογραφία πλέον αναφέρεται ως OR coreceptor ή Orco (Vosshall & Hansson, 2011). Το συμπέρασμα αυτό προέκυψε από το γεγονός πως είναι υψηλά συντηρημένος ανάμεσα σε διαφορετικά είδη εντόμων, σε αντίθεση με τους υπόλοιπους οσφρητικούς υποδοχείς αποτελεί το μοναδικό υψηλά συντηρημένο υποδοχέα (Krieger et al, 2003) ενώ ο ίδιος δε φαίνεται να δρα άμεσα στην αναγνώριση κάποιας οσμής (Elmore et al, 2003). Το πιθανότερο είναι πως ο Orco συγκροτεί ετεροδιμερές από κοινού με τον εκάστοτε OR, και το σύμπλεγμα αυτών των δύο υποδέχεται τις οσμές στην επιφάνεια του οσφρητικού νευρώνα.



Εικόνα 1.15. Οι δομικές διαφορές των Ors εντόμων και θηλαστικών. Διακρίνεται η χαρακτηριστική αντιστροφή N-τελικών και C-τελικών, όπως και η παρουσία του συνυποδοχέα OR83b (Benton 2006).

Μηχανισμός λειτουργίας: Ο ακριβής μηχανισμός λειτουργίας των Ors των εντόμων αποτελεί από την ανακάλυψη τους και έπειτα ένα συνεχές αντικείμενο δημόσιας συζήτησης, λόγω των ιδιαιτεροτήτων που εμφανίζει η δομή τους. Η επικρατούσα θεωρία υποστηρίζει πως το σύμπλεγμα OR/Orco σχηματίζει ένα μη-ειδικό οσμο-εξαρτώμενο κανάλι κατιόντων (odorant-gated non-selective cation channel) που επιτρέπει τη διαπερατότητα στα ιόντα Ca^{2+} , Na^+ και K^+ . Το σύμπλεγμα ενεργοποιείται με την πρόσδεση της οσμής και επιτρέπει στα ιόντα να το διαπεράσουν και να πραγματοποιήσουν τη μεταγωγή του σήματος (Sato et al, 2008). Ωστόσο, επιπλέον στοιχεία υποδηλώνουν πως ενδεχομένως το σύμπλεγμα να έχει και δεύτερο μηχανισμό ενεργοποίησης, μέσω μεταβοτροπικού (metabotropic) σηματοδοτικού μονοπατιού, παρόμοιο με εκείνο των GPCR (Wicher et al, 2008).



Εικόνα 1.16. Οι 2 μηχανισμοί μεταγωγής του σήματος στο σύμπλεγμα OR/Orco. Αφενός, φαίνεται το ιονοτροπικό μονοπάτι άμεσης εισαγωγής των ιόντων με την πρόσδεση της οσμής, αφετέρου φαίνεται η ενεργοποίηση της αδενυλικής κυκλάσης (AC) που ενεργοποιεί το άνοιγμα του καναλιού έμμεσα μέσω της παραγωγής cAMP (Carragher et al, 2015).

1.8.2 Οι ιονοτροπικοί υποδοχείς (Irs)

Πρόκειται για μόρια με παρόμοιο ρόλο, αλλά διαφορετική δομή από τους Ors, τα οποία ανακαλύφθηκαν πρόσφατα (Benton et al, 2009). Εδράζονται στα κοιλοκωνικά τριχίδια της κεραίας τα οποία δεν εκφράζουν Ors (πλην του OR35a) και η γονιδιακή τους οικογένεια περιλαμβάνει στη *D. Melanogaster* 66 γονίδια. Εμφανίζουν σημαντικές διαφορές ως προς την έκφραση και τη λειτουργία τους σε σχέση με τους Ors, με σημαντικότερη πως προσδέτες των

Irs αναγνωρίζονται πολύ ασθενώς ή καθόλου από τους Ors, ενώ οι ισχυροί προσδέτες των Ors δεν προκαλούν διέγερση στους Irs. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον εμφανίζει το γονίδιο IR84a το οποίο εντοπίζει περιβαλλοντικά «αφροδιασιακά» στην τροφή και προάγει την σεξουαλική συμπεριφορά στις μύγες σε περιοχές με άφθονες θρεπτικές ουσίες για τους απογόνους τους. Οι Irs, σε αντίθεση με τους Ors, δεν εντοπίζονται μόνο στα έντομα, αλλά η ύπαρξη τους έχει διαπιστωθεί σε όλα τα είδη που έχουν εξεταστεί και ανήκουν στην κατηγορία των πρωτοστόμιων (Rytz et al, 2013). Για πολλούς Irs της *Drosophila*, δε, έχουν βρεθεί ορθόλογα γονίδια σε άλλα είδη εντόμων, όπως κουνούπια (Liu et al, 2010), μέλισσες (Croset et al, 2010) και σκόρους (Bengtsson et al., 2012).

1.8.3 Οι γευστικοί υποδοχείς (GRs)

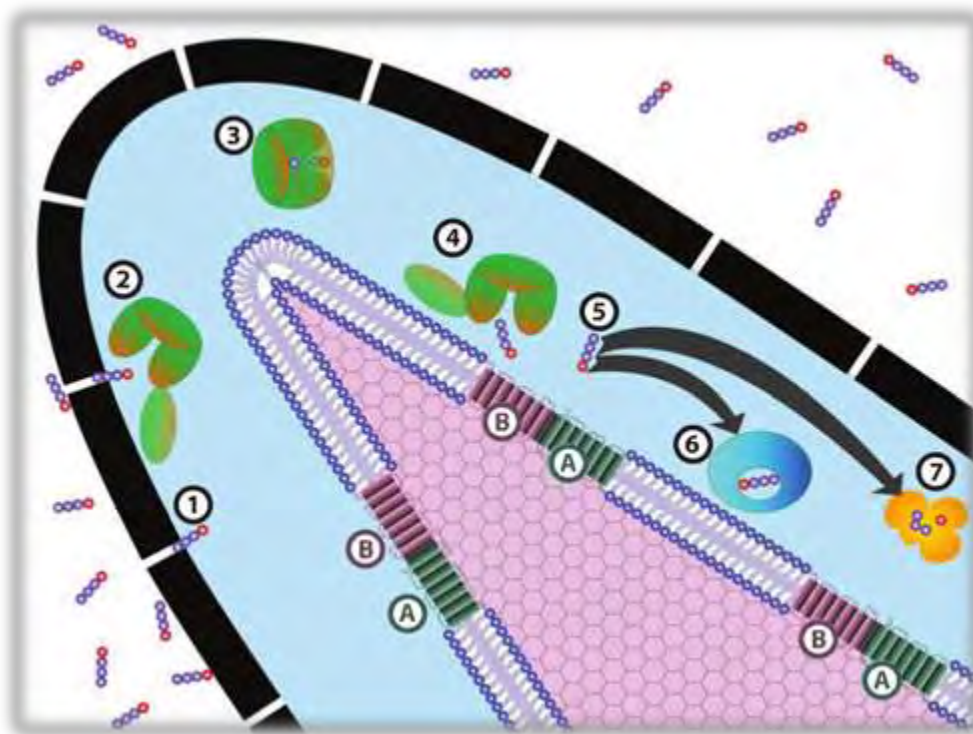
Οι GRs προσδιορίστηκαν μετά τους Ors, λόγω ορισμένων δομικών ομοιοτήτων τους. Ρόλος τους είναι η αναγνώριση των γεύσεων και βρίσκονται σε άλλα σημεία του εντόμου (κυρίως στα πόδια και τα φτερά, αλλά και στην προβοσκίδα του κεφαλιού) έχοντας δικά τους νευρωνικά μονοπάτια, ανεξάρτητα από τους Ors. Ωστόσο, ορισμένοι GRs έχουν βρεθεί να παίζουν ρόλο στα οσφρητικά μονοπάτια και δη σε μονοπάτια αναγνώρισης φερομονών. Συγκεκριμένα, ο GR68a στη *Drosophila* έχει συσχετιστεί με τη συμπεριφορά των εντόμων κατά τη σύζευξη, δρώντας πιθανά ως ο υποδοχέας κάποιας μη-πτητικής φερομόνης που εκλύει το θηλυκό στο αρσενικό κατά το πρώιμο στάδιο της σύζευξης (Bray & Amrein, 2003).

1.9 Άλλα μόρια

Ένζυμα αποικοδόμησης οσμών (ODEs, Odorant Degrading Enzymes): Πρόκειται για ένζυμα τα οποία βρίσκονται είτε στη διαλυτή τους μορφή εξωκυτταρικά, είτε ενδοκυτταρικά δεσμευμένα στη μεμβράνη ή στο κυτταρόπλασμα. Ο ρόλος τους έγκειται στην αποικοδόμηση του προσδέτη μετά από την αλληλεπίδραση του με τον υποδοχέα (Vogt et al, 2003).

Sensory Neuronal Membrane Proteins (SNMPs): Πρόκειται για πρωτεΐνες που εκφράζονται στην επιφάνεια των οσφρητικών νευρώνων και ως πιθανοί ρόλοι έχουν προταθεί: α) η δράση τους ως Ors στα λεπιδόπτερα, β) η αλληλεπίδραση και καθοδήγηση του συμπλέγματος OBP-προσδέτη, γ) η αλληλεπίδραση με άλλες πρωτεΐνες των δενδριτικών κυττάρων, όπως οι Ors, και ο σχηματισμός ετεροδιμερών συμπλεγμάτων. Η πρωτεΐνη αυτή η οποία ανακαλύφθηκε πρώτα στο σκόρο *Antheraea polyphemus* (Rogers et al, 1997), έχει αποδειχτεί πως δρα στη *Drosophila* ως συνυποδοχέας της φερομόνης της, cVA (Jin et al, 2008).

Γουανυλικές κυκλάσες (GCs): Οι GCs αποτελούν διαμεμβρανικές πρωτεΐνες των οποίων ο φυσιολογικός ρόλος είναι η μετατροπή της τριφωσφορικής γουανοσίνης (GTP) σε μονοφωσφορική κυκλική γουανοσίνη (cGMP). Ορισμένες έχει προταθεί ότι εμπλέκονται στην πρόσληψη των οσμών/φερομονών ή στη ρύθμιση της.



Εικόνα 1.17. Σχηματική απεικόνιση των βασικών σημείων της πρόσληψης των οσμών στα τριχίδια της κεραίας. **1:** Η οσμή διαπερνά τους πόρους. **2-3:** Μία οσμοδεσμευτική πρωτεΐνη την παραλαμβάνει και τη μεταφέρει δια της λέμφου. **4:** Η οσμή ενεργοποιεί το σύμπλοκο OR/Orco στην επιφάνεια του νευρώνα. **5-6-7:** Αφού ολοκληρώσει τη μεταγωγή του σήματος η οσμή απενεργοποιείται και αποικοδομείται από ODEs (Leal 2013).

1.10 Οσφρητικό σύστημα και αντιμετώπιση του δάκου

Η ανάγκη για βελτίωση των μεθόδων καταπολέμησης με έμφαση στην ειδοειδικότητα οδηγεί αναπόφευκτα στην ανάγκη για διεύρυνση των μοριακών δεδομένων και στην εστίαση σε συγκεκριμένα μόρια με κρίσιμο ρόλο για τις βασικές λειτουργίες του δάκου. Η εξάρτηση της συμπεριφοράς του εντόμου και κατ' επέκταση της βιωσιμότητάς του από παράγοντες του οσφρητικού συστήματος, καθιστά το σύστημα αυτό έναν ελκυστικό στόχο για την ανάπτυξη εναλλακτικών παρεμβατικών μεθόδων ελέγχου. Η διεύρυνση των γνώσεων μας σε σχέση με τις ιδιαιτερότητες και τα χαρακτηριστικά των επιμέρους μορίων του οσφρητικού συστήματος καθώς και της ακριβούς αλληλεπίδρασης αυτών με τις οσμές και τις φερομόνες αναμένεται να συμβάλει καθοριστικά στην ανάπτυξη περισσότερο ειδοειδικών προσεγγίσεων, για τον αποτελεσματικότερο έλεγχο και την καταπολέμηση του δάκου. Για παράδειγμα, η απεικόνιση της τρισδιάστατης δομής των OBP's που δεσμεύουν τις φερομόνες θα μπορούσε να οδηγήσει στο σχεδιασμό συνθετικών μορίων που θα λειτουργούν ως ανταγωνιστές των φυσικών προσδετών, βελτιώνοντας έτσι παραδοσιακές μεθόδους καταπολέμησης, όπως οι παγίδες.

Επιπλέον, μπορεί να συμβάλει στις υπό ανάπτυξη μοριακών μεθόδων καταπολέμησης του δάκου, οι οποίες φαίνεται πως ξεπερνούν τις παρενέργειες των παραδοσιακών μεθόδων καταπολέμησης με βασικότερη αυτών τη Μέθοδο Στείρου Εντόμου (SIT) (για επισκόπηση: Alphey et al, 2008). Η βελτίωση των γνώσεων μας επί του οσφρητικού συστήματος θα μπορούσε να οδηγήσει στο ξεπέρασμα των μειονεκτημάτων της τεχνικής με κύριο την ανταγωνιστική υστέρηση των

εργαστηριακών εντόμων σε σχέση με τα αγρίου-τύπου. Η αναλυτική κατανόηση του μηχανισμού δέσμευσης φερομονών θα μπορούσε να προσδώσει στα άτομα του εργαστηριακού πληθυσμού ένα σημαντικό ανταγωνιστικό πλεονέκτημα.

2. Σκοπός

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η λειτουργική ανάλυση γονιδίων τα οποία εμπλέκονται στη πρόσληψη των φερομονών από το δάκο της ελιάς, *Bactrocera oleae*. Αρχικά, χρησιμοποιώντας διαθέσιμες μεταγραφόμενες αλληλουχίες που είχαν προκύψει με RNA seq από το κεφάλι του δάκου εντοπίστηκαν τα γονίδια LUSH, PBP2 και PBP3, τα ομόλογα γονίδια των οποίων έχουν συνδεθεί με την πρόσληψη των φερομονών στη *Drosophila melanogaster* και άλλα έντομα. Ακολούθως σχεδιάστηκαν ομόλογοι primers και αναλύθηκαν με ποσοτική Real-Time PCR τα επίπεδα έκφρασης τους στις κεραίες, καθώς εκεί εδράζονται οι οσφρητικοί νευρώνες, σε διαφορετικά στάδια της ζωής των εντόμων. Στη συνέχεια, επιχειρήθηκε παροδική σίγηση των γονιδίων αυτών, με χρήση της τεχνολογίας RNAi μέσω μικροέγχυσης dsRNA, σε ομάδες εντόμων, για κάθε γονίδιο. Ακολούθως απομονώθηκαν οι κεραίες και εξετάστηκαν τα επίπεδα σίγησης μέσω Real-Time PCR, με σκοπό την αποσαφήνιση του πιθανού τους ρόλου στην σεξουαλική συμπεριφορά του δάκου.

3. Μέθοδοι-Υλικά

3. ΜΕΘΟΔΟΙ-ΥΛΙΚΑ

3.1 Εργαστηριακές συνθήκες

Ο πληθυσμός των εντόμων δάκου της ελιάς που χρησιμοποιήθηκε για τη διεξαγωγή των πειραμάτων προέρχεται από την εργαστηριακή σειρά «Δημόκριτος» (Democritos lab strain) και εκτράφηκε στο εντομοτροφείο του εργαστηρίου Μοριακής Βιολογίας & Γονιδιωματικής, του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας.

Τα έντομα διατηρούνται σε εργαστηριακές συνθήκες θερμοκρασίας 25°C, υγρασίας περίπου 58% και φωτοπερίοδο 12:12 φως/σκοτάδι.

3.2 Απομόνωση RNA (RNA extraction)

Το RNA, και συγκεκριμένα το mRNA, είναι ο δείκτης της έκφρασης ενός γονιδίου καθώς το ίδιο αποτελεί τον αγγελιαφόρο της γενετικής πληροφορίας. Στην παρούσα μελέτη απομονώσαμε ολικό RNA από τις κεραίες εντόμων, καθώς εκεί εντοπίζονται τα εξεταζόμενα γονίδια για να εξεταστούν τα επίπεδα έκφρασης αυτών.

Υλικά:

- Ο επιθυμητός ιστός
- Υγρό άζωτο
- Διάλυμα Tri-Sure
- BCP (1-βρωμο-3-χλωροπροπάνιο)
- Ισοπροπανόλη
- Γλυκογόνο
- Αιθανόνη 75%
- DEPC-H₂O

Μέθοδος:

Για την απομόνωση RNA από δείγμα που περιλαμβάνει 5 ζεύγη κεραιών, αποθηκευμένων σε διάλυμα 20μL Tri-Sure.

1. Εξαγωγή των δειγμάτων από τους -80°C και τοποθέτηση των tubes στον πάγο. Αφού ξεπαγώσουν σύντομη φυγοκέντρηση (spin-down) για την καθίζηση τυχόν υπολειμμάτων από τα τοιχώματα.
2. Αφαίρεση του Tri-Sure με πιπέτα και εισαγωγή του tube σε διάλυμα υγρού αζώτου, χωρίς να πραγματοποιηθεί επαφή του υγρού αζώτου με τον ιστό.
3. Λιοτρίβιση του ιστού με χρήση RNase-free έμβολων (pestles), μέχρι την πλήρη κονιορτοποίηση του ιστού.
4. Σταδιακή προσθήκη Tri-Sure αποθηκευμένου στους 4°C, έως ότου το διάλυμα αποκτήσει τελικό όγκο 300μL
5. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου (RT) για 5min.
6. Ελαφρύ ανάδευση με Vortex και επώαση σε RT για άλλα 5min.
7. Φυγοκέντρηση με ταχύτητα 12.000 RPM, σε θερμοκρασία 4°C για 10min, για την καθίζηση των κυτταρικών υπολειμμάτων.
8. Μεταφορά του υπερκείμενου σε καθαρό tube χωρητικότητας 1,5mL.

9. Προσθήκη 30μL διαλύματος BCP (1/10 αρχικού όγκου) και ήπια ανάδευση, χωρίς vortex, για 15sec.
10. Επώαση σε RT για 3min.
11. Φυγοκέντρηση με ταχύτητα 12.000g (rcf), σε θερμοκρασία 4°C για 18min.
12. Προσεκτική μεταφορά της υδατικής φάσης σε καθαρό tube χωρητικότητας 1,5mL και διατήρηση στον πάγο.
13. Προσθήκη ίσου όγκου παγωμένης ισοπροπανόλης και 0,5μL γλυκογόνου.
14. Καλή ανάδευση με Vortex και επώαση σε RT για τουλάχιστον 1 ώρα.
15. Φυγοκέντρηση με ταχύτητα 12.000g, σε θερμοκρασία 4°C για 30min, για την κατακρήμνιση του RNA σε μορφή ιζήματος (pellet).
16. Γρήγορη αφαίρεση του υπερκείμενου και πλύση με 200μL παγωμένης αιθανόλης 75%.
17. Φυγοκέντρηση με ταχύτητα 7.500g, σε θερμοκρασία 4°C για 5min.
18. Αφαίρεση υπερκείμενου και πλύση του pellet με 200mL παγωμένης αιθανόλης 75%.
19. Φυγοκέντρηση με ταχύτητα 7.500g, σε θερμοκρασία 4°C για 5min.
20. Επανάληψη των βημάτων 18 και 19, άλλες 2 φορές.
21. Αφαίρεση της αιθανόλης και στέγνωμα του pellet μέχρι να εξατμιστεί όλη η αιθανόλη που βρίσκεται εντός του tube (περίπου 10min).
22. Αναδιάλυση του pellet σε 8μL DEPC-H₂O, καλή ανάδευση με Vortex μέχρι την πλήρη διαλυτοποίηση του pellet και αποθήκευση του RNA σε θερμοκρασία -20°C (για βραχυπρόθεσμη χρήση) ή -80°C (για μακροπρόθεσμη χρήση).

3.3 Επεξεργασία RNA με DNase (DNase treatment)

Η επεξεργασία του απομονωμένου RNA με το ένζυμο δεοξυριβονουκλεάση I (DNase I) είναι ένα απαραίτητο βήμα για τον καθαρισμό του RNA από ενδεχόμενες προσμίξεις DNA και χρήση του σε περαιτέρω πειράματα.

Η DNase I είναι μια ενδονουκλεάση η οποία, μη-ειδικά, καταλύει το υδρολυτικό σπάσιμο των φωσφοδιεστερικών δεσμών του DNA διασπώντας το σε δι-, τρι- ή ολιγονουκλεοτίδια. Η DNase δρα σε μονόκλωνα και δίκλωνα μόρια DNA, όπως και σε υβρίδια DNA:RNA.

Υλικά

- Διάλυμα RNA
- Ένζυμο DNase I
- Ρυθμιστικό διάλυμα (Buffer) ενζύμου DNase I (10 mM Tris-HCl, 2.5 mM MgCl₂, 0.5 mM CaCl₂, pH 7.6 σε θερμοκρασία 25°C)
- Ρυθμιστικό διάλυμα απενεργοποίησης του ενζύμου (Inactivation buffer)
- Αποστειρωμένο dd H₂O

Μέθοδος

Υλικά	Ποσότητες
RNA	8μL
Buffer	1μL (1X)
DNase	0,2μL (0,4units)
ddH₂O	- (συμπληρώνει τον όγκο)

επώαση στους 37°C για 25min,	
Inactivation Buffer	1,5 µL
<ul style="list-style-type: none"> - Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου (RT) για 5min - Φυγοκέντρωση στα 11.000g για 5min και μεταφορά του υπερκείμενου σε καθαρό PCR tube 	
Τελικός όγκος	~10µL

Με την ολοκλήρωση της παρούσας διαδικασίας το RNA θεωρείται πλήρως καθαρισμένο και μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε περαιτέρω πειράματα. Συνήθως, μόλις ολοκληρωθεί ο καθαρισμός υπολογίζεται η συγκέντρωση του RNA και αναλόγως αραιώνεται περαιτέρω.

3.4 Σύνθεση cDNA με αντίστροφη μεταγραφή από ολικό RNA ιστού

Η αντίστροφη μεταγραφή είναι η διαδικασία κατά την οποία το RNA μετατρέπεται σε δίκλωνο μέσω της σύνθεσης μιας συμπληρωματικής cDNA αλυσίδας. Η μετατροπή αυτή επιλέγεται για την καλύτερη προστασία του, καθώς ως μονόκλωνο το RNA είναι περισσότερο ασταθές και συνεπώς ευαίσθητο σε ένζυμα αποικοδόμησης. Επιπλέον για τη δυνατότητα ενίσχυσής του μέσω PCR, όπως στην περίπτωση της ανάλυσης της γονιδιακής έκφρασης, το μόριο πρέπει να βρίσκεται σε δίκλωνη μορφή.

Υλικά:

- Ολικό RNA του επιθυμητού ιστού
- Τυχαιοί εκκινητές
- dNTPs
- Ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση
- Ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμου (5X)
- Αναστολέας ριβονουκλεασών

Μέθοδος:

Η διαδικασία αυτή δεν περιλαμβάνει κύκλους και πραγματοποιείται εντός θερμοκυκλοποιητή. Ο ρόλος των τυχαίων εκκινητών είναι, χάριν στη μικρή εξειδίκευσή τους, να προσδεθούν τυχαία στο σύνολο του RNA μορίου, έτσι ώστε να υβριδοποιηθούν και να συντεθεί η συμπληρωματική αλυσίδα σε όλο το μήκος του και όχι μόνο σε κάποιο τμήμα του. Για την πραγματοποίηση του εισάγονται σε PCR σωληνάκια των 20µL τα παρακάτω υλικά:

Υλικά	Ποσότητες
RNA	εξαρτάται απ' την συγκέντρωση

τυχαίοι εκκινητές	1,5μL (450ng)
επώαση στους 70°C για 10min, έπειτα στον πάγο για 5min	
dNTPs	1μL (2mM)
Buffer	4μL (1X)
Αναστολέας ριβονουκλεασών	1μL (40u)
Αντίστροφη μεταγραφάση	1μL (200u)
ddH ₂ O	εξαρτάται από τη τιμή του RNA
επώαση στους 39°C για 50min και έπειτα στους 70°C για 10min	
Τελικός όγκος	20μL

3.5 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση αποτελεί μια μέθοδο που χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό, την απομόνωση και την ταυτοποίηση μορίων, όπως το DNA (Sambrook *et al*, 1989). Τα μόρια του DNA εισάγονται σε ειδικές θέσεις εντός του πηκτώματος αγαρόζης (gel), ενός πορώδους μέσου με βασικό συστατικό την αγαρόζη, το οποίο είναι τοποθετημένο μέσα σε μια συσκευή που φέρει δύο πόλους για τη δημιουργία ηλεκτρικού πεδίου (συσκευή ηλεκτροφόρησης). Αφού εφαρμοστεί το ηλεκτρικό πεδίο το DNA αρχίζει να μετακινείται (εντός του gel) προς τον θετικό πόλο της συσκευής λόγω του αρνητικού φορτίου που φέρει σε ουδέτερο pH. Βάσει, λοιπόν, των διαφορών στο μέγεθος του DNA πραγματοποιείται ο διαχωρισμός, με τα μικρότερα σε μέγεθος (ζεύγη βάσεων) δείγματα να μετακινούνται ταχύτερα προς το θετικό πόλο.

Η οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων της ηλεκτροφόρησης πραγματοποιείται μέσω της εισαγωγής μιας φθορίζουσας χρωστικής, του βρωμιούχου αιθιδίου, που παρεμβάλεται εντός της διπλής έλικας του DNA και ανιχνεύεται υπό την επίδραση υπεριώδους φωτός. Επιπλέον, ο υπολογισμός του μεγέθους των δειγμάτων μας βασίζεται στη σύγκριση με μάρτυρα γνωστού μοριακού βάρους (ladder), ο οποίος αποτελεί ένα μίγμα τμημάτων με διακριτά μοριακά μεγέθη και μετακινείται παράλληλα με το DNA στο ηλεκτρικό πεδίο.

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 την παρασκευή 100mL πηκτώματος αгарόζης 1%, 0,5X TBE ακολουθούνται τα εξής βήματα:

1. Προσθήκη 1gr αгарόζης σε κωνική φιάλη.
2. Προσθήκη 100ml TBE στην ίδια φιάλη.
3. Θέρμανση της κωνικής φιάλης, με ανάδευση ανά τακτά διαστήματα, έως ότου διαλυθεί πλήρως η αгарόζη.
4. Προσθήκη 4μL βρωμιούχου αιθιδίου και ανακίνηση.
5. Εισαγωγή του διαλύματος αгарόζης στις ειδικές μήτρες και τοποθέτηση χτενών για τη δημιουργία μικρών πηγαδιών, εντός του πηκτώματος.
6. Αναμονή μέχρι να στερεοποιηθεί πλήρως και αφαίρεση των χτενών.

Για την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων:

1. Τοποθέτηση του πηκτώματος στη συσκευή ηλεκτροφόρησης.
2. Προσθήκη διαλύματος TBE 0,5X ώστε να καλυφθούν πλήρως τα πηγαδάκια της ηλεκτροφόρησης.
3. Προσθήκη διαλύματος φόρτωσης στα, προς ηλεκτροφόρηση, δείγματα.
4. Εισαγωγή των δειγμάτων καθώς και του Ladder στα διαφορετικά πηγαδάκια του πηκτώματος.

Η παρακολούθηση της ηλεκτροφόρησης μπορεί να γίνει είτε δια γυμνού οφθαλμού, παρατηρώντας τα δύο συστατικά του διαλύματος φόρτωσης (μπλε βρωμοφαινόλης ~300bp, κυανού ξυλόλης ~4000bp), είτε δια της υπεριώδους ακτινοβολίας.

3.6 Ανάκτηση μορίων DNA από πήκτωμα αгарόζης (gel extraction)

Η ανάκτηση μορίων DNA στοχεύει στην απομόνωση και τον καθαρισμό μιας αλληλουχίας η οποία έχει διαχωριστεί από τις υπόλοιπες ενός δείγματος σε πήκτωμα αгарόζης. Η διαδικασία πραγματοποιείται με το πέρας μιας ηλεκτροφόρησης και το τμήμα που περιέχει την επιθυμητή αλληλουχία, αφού κοπεί με νυστέρι από το υπόλοιπο πήκτωμα, υφίσταται επεξεργασία προκειμένου να απομονωθεί πλήρως το DNA που εμπεριέχεται σε αυτό.

Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε με το πρωτόκολλο GF-1 Gel DNA Recovery, της εταιρείας Gene ON.

Υλικά:

- Buffer GB
- Διάλυμα πλύσης μεμβρανών (WB-Wash Buffer)

- Υδατικό διάλυμα ελεύθερο νουκλεασών (Elution Buffer)

Μέθοδος:

1. Τοποθέτηση του κομματιού του πηκτώματος με την επιθυμητή ζώνη σε σωληνάκι τύπου erppendorf 1,5mL και ζύγιση του.
2. Μετά τον υπολογισμό του βάρους του, προστίθεται ίση ποσότητα του Buffer GB, με το κομμένο τμήμα.
3. Ανάδευση και επώαση σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 60°C, έως ότου λιώσει πλήρως το πηκτώμα ~15min.
4. Ανάδευση στο Vortex και επιστροφή στο υδατόλουτρο για μερικά λεπτά.
5. Μεταφορά του διαλύματος σε στήλη (spin column) η οποία είναι τοποθετημένη μέσα σε σωλήνα συλλογής και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1min.
6. Φυγοκέντρηση του διαλύματος για 1min στις 10.000 στροφές, απόχυση του εκλούσματος από το σωλήνα συλλογής και επανατοποθέτηση της στήλης στον σωλήνα συλλογής.
7. Προσθήκη 750μL Wash Buffer και φυγοκέντρηση στις 10.000 στροφές (g) για 1min. Το εκλούσμα αποχύνεται από το σωλήνα συλλογής.
8. Το διάλυμα αφήνεται για 3-4min στον πάγο.
9. Χωρίς να προστεθεί κάποιο διάλυμα τα tubes εισάγονται εκ νέου για φυγοκέντρηση στις 10.000 στροφές για 1min προκειμένου να στεγνώσουν πλήρως.
10. Η στήλη (spin column) αφαιρείται από το σωλήνα και τοποθετείται πάνω από ένα καθαρό σωληνάκι τύπου erppendorf.
11. Προστίθενται προσεκτικά στο κέντρο της στήλης 25μL Elution buffer, το οποίο έχει προθερμανθεί σε υδατόλουτρο για ~10min και αφήνεται για 2-3min στον πάγο.
12. Το δείγμα φυγοκεντρείται για 1min στις 10.000 στροφές, και το DNA που έχει πια ανακτηθεί αποθηκεύεται στους 4°C.

3.7 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η PCR αποτελεί μια εξαιρετικά διαδοσμένη τεχνική στη μοριακή βιολογία. Παρουσιάστηκε για πρώτη φορά το 1986 (Mullis *et al*, 1986). Αρχή της είναι ο ενζυμικός πολλαπλασιασμός επιλεγμένων αλληλουχιών DNA σε πολλαπλά αντίγραφα, μέσω επαναλαμβανόμενων κύκλων με εναλλαγές στη θερμοκρασία. Σε κάθε κύκλο ο νεοσυντιθέμενος κλώνος λειτουργεί ως εκμαγείο για τη σύνθεση νέων, πολλαπλασιάζοντας εκθετικά την αλληλουχία στόχο.

Ένας κύκλος PCR περιλαμβάνει τρία κύρια στάδια:

1. **Το στάδιο της αποδιάταξης.** Στο στάδιο αυτό αποδιατάσσεται το δίκλωνο DNA στις δύο μονόκλωνες αλυσίδες του, σε υψηλή θερμοκρασία 94-95°C.
2. **Το στάδιο της υβριδοποίησης.** Στο στάδιο αυτό υβριδοποιούνται οι εκκινητές (primers) στις αποδιαταγμένες αλυσίδες. Η θερμοκρασία υβριδοποίησης (T_a) εξαρτάται από την θερμοκρασία τήξης των εκκινητών (T_m). Η T_m υπολογίζεται σύμφωνα με τον τύπο: $T_m = 4 * (\text{αριθμός βάσεων G+C}) + (\text{αριθμός βάσεων A+T})$, ενώ η T_a ισούται με $T_m - 5$ (Thein & Wallace, 1986).

3. **Το στάδιο της επιμήκυνσης.** Στο στάδιο αυτό δρα το ένζυμο Taq πολυμεράση, το οποίο αναγνωρίζοντας τους εκκινητές επιμηκώνει την επιθυμητή αλληλουχία. Η θερμοκρασία για την αντίδραση επιμήκυνσης είναι 72-74°C.

Ανάλογα με το μέγεθος του επιθυμητού προϊόντος ρυθμίζεται και ο αριθμός των κύκλων, λαμβάνοντας υπόψιν ότι συνήθως μετά τους 30 κύκλους η μέθοδος εμφανίζει συχνά λάθη. Ο υπολογισμός των τελικών αντιγράφων της αλληλουχίας προκύπτει ως 2^ν αντίγραφα του κάθε αρχικού μορίου DNA, όπου ν οι κύκλοι της PCR.

Παρακάτω φαίνονται τα στάδια μιας τυπικής αντίδρασης PCR:

Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος	Κύκλος
Αρχική αποδιάταξη	94°C	4min	1
Αποδιάταξη	94°C	30sec	30
Υβριδισμός	T _a	30sec	
Επιμήκυνση	72°C	1kb/sec	
Τελική επιμήκυνση	72°C	5min	1
Διατήρηση	4°C	-	-

Υλικά:

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

Μέθοδος:

Για την πραγματοποίηση μιας τυπικής αντίδρασης PCR τελικού όγκου 20μl προστίθενται στα ειδικά PCR σωληνάκια:

Υλικά	C _{αρχικό}	C _{τελικό}	Ποσότητα
DNA	-	10-40ng	εξαρτάται από το C _{αρχ}
Buffer	10X	1X	2μL
dNTPs	40mM	0,8mM	0,4μL
εκκινητής F	10pmol/μL	0,4-0,6μM	0,7μL
εκκινητής R	10pmol/μL	0,4-0,6μM	0,7μL
Taq πολυμεράση	5units/μL	1unit	0,2μL
ddH₂O	-	-	συμπληρώνει τον όγκο
Τελικός όγκος			20μL

Έπειτα τα σωληνάκια τοποθετούνται στον θερμοκυκλοποιητή με το κατάλληλο πρόγραμμα και αφήνονται να επωásουν για όση ώρα χρειάζεται.

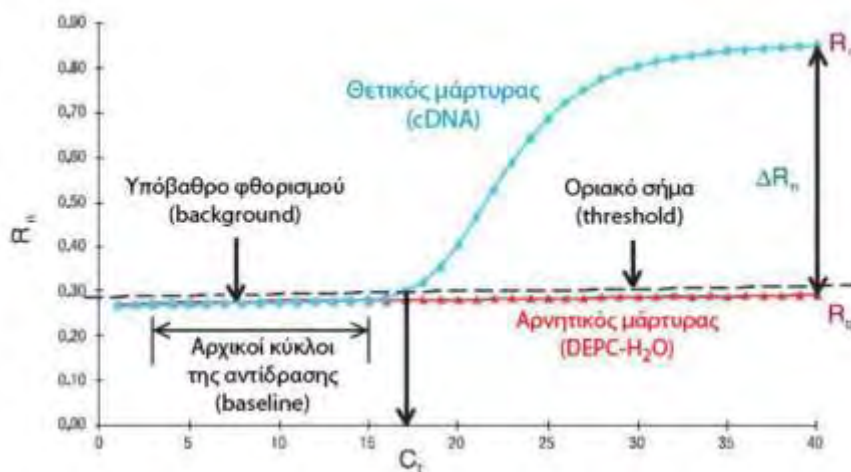
3.8 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real-Time PCR)

Η Real-time PCR αποτελεί μια τεχνική η οποία χρησιμεύει στον ακριβή προσδιορισμό της ποσότητας DNA ή RNA που βρίσκεται αρχικά σε ένα δείγμα, καθώς και στη σύγκριση των ποσοτικών τιμών της ίδιας αλληλουχίας μεταξύ διαφορετικών δειγμάτων. Η αρχή της μεθόδου είναι ίδια με αυτήν της PCR, περιέχει δηλαδή τα ίδια 3 στάδια και χρησιμοποιούνται τα ίδια υλικά, αλλά επιπλέον μας δίνει τη δυνατότητα να παρακολουθούμε την πορεία ενίσχυσης των τμημάτων μας, σε πραγματικό χρόνο.

Η δυνατότητα αυτή οφείλεται στη δράση μιας φθορίζουσας χρωστικής, που ονομάζεται SYBR Green. Η SYBR Green ενσωματώνεται στα δίκλωνα μόρια που συντίθενται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης στο διάλυμα παράγοντας φθορισμό, η ένταση του οποίου είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του παραγόμενου προϊόντος. Μειονέκτημα κατά τη χρήση της χρωστικής αυτής ως σύστημα ανίχνευσης είναι πως μπορεί να ενσωματώνεται σε οποιοδήποτε δίκλωνο μόριο, εκτός του μορίου-στόχου, συμπεριλαμβάνοντας και διμερή των εκκινητών ή ενισχυμένα μη-ειδικά προϊόντα της αντίδρασης και να οδηγεί τελικά σε αύξηση του συνολικού φθορισμού. Η ποσοτικοποίηση του αρχικού δείγματος υπολογίζεται μέσω της τιμής C_q (ή C_t), η οποία αποτελεί τον αριθμό των κύκλων που απαιτούνται για να ξεπεράσει το προϊόν το όριο ανίχνευσης φθορισμού (threshold). Η τιμή αυτή είναι αντιστρόφως ανάλογη της αρχικής ποσότητας της μήτρας DNA (βλέπε εικ. 3.1).

Για την αξιόπιστη σύγκριση των επιπέδων mRNA σε διαφορετικά δείγματα απαραίτητη είναι και η διαδικασία κανονικοποίησης των τιμών έκφρασής τους. Της αντιστάθμισης δηλαδή πειραματικών σφαλμάτων, που μπορεί να οφείλονται είτε στο χειρισμό των δειγμάτων (όπως η εισαγωγή διαφορετικών τελικών ποσοτήτων γενετικού υλικού από το κάθε δείγμα στην αντίδραση), είτε στις διαφορετικές αποδόσεις των αντιδράσεων αντίστροφης μεταγραφής αλλά και της ίδιας της PCR. Για την κανονικοποίηση των τιμών η πιο συνήθης μέθοδος είναι η παράλληλη ενίσχυση ενός γονιδίου σταθερής έκφρασης (housekeeping gene, *hkg*) σε όλους τους ιστούς, που θα λειτουργήσει ως εσωτερικός μάρτυρας και θα αποτελέσει ουσιαστικά το γονίδιο αναφοράς. Τελικά η κανονικοποιημένη ποσότητα της αλληλουχίας στόχου προσδιορίζεται ως προς την έκφραση του γονιδίου αναφοράς (σχετική έκφραση). Η σχετική ποσοτικοποίηση πραγματοποιείται με τη μέθοδο σύγκρισης των C_t ($\Delta\Delta C_t$) (Livak *et al*, 2001).

Στην παρούσα διαδικασία η ανάλυση όλων των δεδομένων της Real-Time PCR έγινε με χρήση του προγράμματος CFX Manager Software (Bio-Rad CFX96).



Εικόνα 3.1. Σχηματική απεικόνιση της καμπύλης της ποσοτικής Real-Time PCR. Διακρίνονται οι παράμετροι παρακολούθησης και ελέγχου της αντίδρασης.

Το μέγεθος του προϊόντος της αντίδρασης της Real-Time PCR, τέλος, πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 80-120bp για να εξασφαλιστεί η ειδικότητα και η υψηλή απόδοση της ενίσχυσης. Η ειδικότητα της ενίσχυσης μπορεί να διαπιστωθεί μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης μέσω της καμπύλης αποδιάταξης (melting curve analysis). Με την ανάλυση αυτή προσδιορίζεται η θερμοκρασία τήξης (T_m) των προϊόντων της αντίδρασης. Έτσι διαπιστώνεται τελικά ο τυχόν σχηματισμός διμερών των εκκινητών ή μη ειδικών προϊόντων, που όντας μικρότερα σε μέγεθος παρουσιάζουν χαμηλότερη θερμοκρασία τήξης.

Παρακάτω φαίνονται τα στάδια μιας τυπικής Real-Time PCR:

Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος	Κύκλος
Αρχική αποδιάταξη	95°C	4min	1
Αποδιάταξη	95°C	20sec	39
Υβριδισμός	T_a	30sec	
Απαλοιφή θορύβου	95°C-55°C	ανά 5sec μειώνεται η T κατά 0,5°C	1

Υλικά:

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

Μέθοδος:

Για την πραγματοποίηση μιας Real-time PCR προστίθενται στα ειδικά PCR σωληνάκια τα παρακάτω συστατικά με τελικό όγκο 15μL. Τα συστατικά της αντίδρασης dNTPs, Taq πολυμεράση, ρυθμιστικό διάλυμα πολυμεράσης, MgCl₂ και SYBR Green βρίσκονται ήδη στο Buffer mix.

Για το κάθε δείγμα cDNA πραγματοποιείται ξεχωριστή αντίδραση ενίσχυσης με το εκάστοτε ζεύγος εκκινητών ανά γονίδιο, καθώς και με τους εκκινητές του *hkg*, που στην παρούσα διαδικασία πρόκειται για το ριβοσωμικό γονίδιο *RpL19*.

Στην παρούσα ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το σύστημα:

Υλικά	Ποσότητες
cDNA	εξαρτάται από τη συγκέντρωση
Buffer mix	7,5μL (1X)
Εκκινητής R	0,6μL
Εκκινητής F	0,6μL
ddH ₂ O	συμπληρώνει τον όγκο
Τελικός όγκος	15μL

3.9 Δημιουργία δίκλωνου RNA (dsRNA)

Το RNA στον άνθρωπο αλλά και γενικότερα στη φύση, εντοπίζεται κυρίως στη μονόκλωνη του μορφή. Έχει, ωστόσο, τη δυνατότητα να σχηματίζει δίκλωνα μόρια γεγονός που συναντάται σε κάποια είδη ιών που χρησιμοποιούν δίκλωνα μόρια RNA ως το γενετικό τους υλικό, όπως π.χ. στους ροταϊούς. Το RNA εντοπίζεται επίσης σε δίκλωνη μορφή (dsRNA) ως μέρος των μηχανισμών αποσιώπησης της γονιδιακής έκφρασης (RNA interference, RNAi) που λαμβάνουν χώρα φυσιολογικά στα ευκαρυωτικά κύτταρα. Οι μηχανισμοί του RNAi έχουν αποτελέσει ένα εξαιρετικά χρήσιμο μοριακό εργαλείο, για τη διενέργεια πειραμάτων λειτουργικής ανάλυσης γονιδίων.

Το μέγεθος των dsRNA κυμαίνεται περίπου στα 20-25 ζεύγη βάσεων και για τη δημιουργία τους είναι απαραίτητη η ύπαρξη ενός δίκλωνου DNA που θα λειτουργήσει ως μήτρα. Το DNA αυτό παρασκευάζεται μέσω PCR, φέροντας στα άκρα του την αλληλουχία του υποκινητή T7 που θα αποτελέσει τη θέση πρόσδεσης της RNA πολυμεράσης, για την πραγματοποίηση της αντίστροφης μεταγραφής. Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα πειραματική διαδικασία για τη δημιουργία του δίκλωνου RNA είναι το MEGAscript® kit, της εταιρείας Ambion.

Υλικά

- Ρυθμιστικό διάλυμα (Reaction Buffer)
- Διάλυμα των τεσσάρων ριβονουκλεοτιδίων (ATP, CTP, GTP, UTP)

- Διάλυμα RNA πολυμεράσης (RNA Polymerase Enzyme Mix)
- Turbo DNase
- Nuclease-free H₂O
- Διάλυμα οξικού αμμωνίου
- Φαινόλη
- Χλωροφόρμιο
- Ισοπροπανόλη

Μέθοδος

1. Ξεπάγωμα των αντιδραστηρίων με τοποθέτηση του Reaction Buffer σε θερμοκρασία δωματίου (πάγκος) και των διαλυμάτων ριβονουκλεοτιδίων στον πάγο.
2. Προσθήκη σε θερμοκρασία δωματίου (RT) με διαδοχική σειρά: 1) του H₂O, 2) των ριβονουκλεοτιδίων, 3) του Buffer.

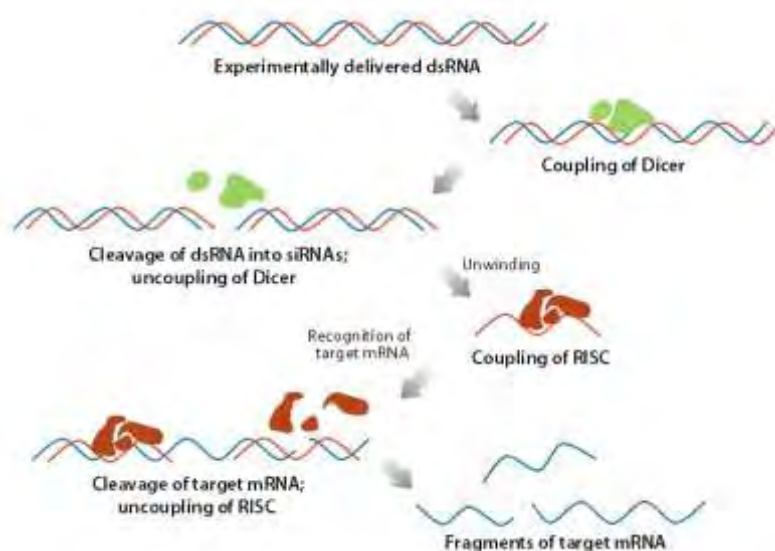
Υλικά	Ποσότητες
DNA	εξαρτάται από τη συγκέντρωση
Reaction Buffer	2μL (1X)
Διαλύματα ριβονουκλεοτιδίων	8μL (2μL από το καθένα)
Mix RNA πολυμεράσης	2μL
ddH ₂ O	συμπληρώνει τον όγκο
Τελικός όγκος	20μL

3. Καλή ανάμειξη των συστατικών του διαλύματος και επώαση στους 37°C για 16h.
4. Προσθήκη της Turbo DNase 1μL και επώαση στους 37°C για 15min.
5. Προσθήκη 115μL Nuclease-free H₂O, 15μL διαλύματος οξικού αμμωνίου και καλή ανάμειξη των συστατικών του διαλύματος
6. Προσθήκη ίσης ποσότητας φαινόλης/χλωροφορμίου και μεταφορά της υδατικής φάσης σε καθαρό tube, έπειτα από ήπια ανάδευση
7. Προσθήκη ίσου όγκου ισοπροπανόλης, για την καθίζηση του RNA και καλή ανάμειξη.
8. Φυγοκέντρωση με ταχύτητα 11.000g στους 4°C για 45min.
9. Προσεκτική μεταφορά του υπερκείμενου σε καθαρό tube και προσθήκη 200μL αιθανόλης 70%.
10. Φυγοκέντρωση στους 4°C για 5min και προσεκτική μεταφορά του υπερκείμενου σε καθαρό tube.
11. Αναδιάλυση του dsRNA σε 25μL Nuclease-free H₂O
12. Ηλεκτροφόρηση μικρής ποσότητας του RNA για ποσοτικοποίηση.

3.10 Παροδική αποσιώπηση γονιδίων (RNA silencing)

Η RNA παρεμβολή (RNAi) είναι μια φυσιολογική βιολογική διαδικασία των ευκαρυωτικών οργανισμών κατά την οποία μόρια RNA που συνθέτει το ίδιο το κύτταρο εμποδίζουν την μετάφραση τη μετάφραση ορισμένων γονιδίων, μπλοκάροντας ή καταστρέφοντας το mRNA. Το μονοπάτι του RNAi ξεκινά από ένα ένζυμο που ονομάζεται Dicer, το οποίο διασπά μακρυά μόρια dsRNA σε μικρότερα δίκλωνα μόρια μεγέθους περίπου 20 ζεύγων βάσεων, τα οποία

ονομάζονται siRNA (small interference RNA). Εν' συνεχεία, το siRNA αναδιπλώνεται και ο ένας του κλώνος αποικοδομείται (passenger strand), ενώ ο άλλος (guide strand) από κοινού με άλλες πρωτεΐνες συγκροτούν μια ριβονουκλεοπρωτεΐνη που ονομάζεται RISC (RNA-Induced Silencing Complex). Η RISC, λοιπόν, εντοπίζει τα mRNA στόχους καθώς αυτά εμφανίζουν συμπληρωματικότητα με τον κλώνο του siRNA που φέρει. Αφού εντοπιστεί κάποιος mRNA στόχος τότε η RISC δεσμεύεται πάνω του και μια πρωτεΐνη που αποτελεί μέρος του συμπλόκου, η Argonaute, κόβει το mRNA (για περισσότερα: Hannon, 2002).



Εικόνα 3.2. Σχηματική απεικόνιση του μηχανισμού RNAi, από την εισαγωγή του dsRNA έως την κοπή του mRNA και άρα την απενεργοποίηση του (Bellés, 2010)

Ο μηχανισμός του RNAi χρησιμοποιείται ευρέως σε πειράματα λειτουργικής ανάλυσης και αποσιώπησης γονιδίων μέσω της στοχευμένης εισαγωγής κάποιας αλληλουχίας dsRNA που στοχεύει σε συγκεκριμένα γονίδια και αξιοποίησης των υπόλοιπων συστατικών που φέρει φυσιολογικά ο οργανισμός. Για την εφαρμογή της παραπάνω τεχνολογίας σε έντομα-στόχους υπάρχουν τρεις τρόποι εισαγωγής του dsRNA: 1) μέσω της τροφής, 2) με μικροέγχυση, 3) με διαγονιδιακά βακτήρια που θα την εκφράσουν εντός του εντόμου.

Στην παρούσα εργασία η αποσιώπηση των γονιδίων πραγματοποιήθηκε μέσω μικροέγχυσης του dsRNA σε ενήλικα έντομα με χρήση του μηχανήματος Nanoject II.

Υλικά:

- Υδατικό διάλυμα dsRNA
- Αιθανόλη 70%
- Mineral oil

Μέθοδος:

1. Καθαρισμός όλων των εξαρτημάτων του Nanoject II με αιθανόλη 70%.
2. Επιλογή γυάλινης βελόνας, τύπου quartz, και κατάλληλη κοπή του άνω-άκρου της για τη δημιουργία μικρής οπής, ώστε να χρησιμοποιηθεί στη μικροέγχυση.

3. Γέμισμα της βελόνας με mineral oil με ιδιαίτερη προσοχή στη μη-δημιουργία φυσαλίδων.
4. Τοποθέτηση της βελόνας στο μηχάνημα.
5. Εισαγωγή ~5μL από το διάλυμα dsRNA στη βελόνα.
6. Αναισθητοποίηση των εντόμων σε πάγο και τοποθέτηση τους σε στερεοσκόπιο.
7. Απευθείας έγχυση 138nL dsRNA στην αιμολέμφο τους με εισαγωγή της βελόνας στην ελαστική περιοχή του θώρακα, κάτω από το φτερό τους.
8. Επιβεβαίωση πως τα έντομα επιβίωσαν της διαδικασίας και εισαγωγή τους σε ειδικά κλουβιά για την παρακολούθηση της εξέλιξης τους.

3.11 *In silico* ανάλυση

Η ανάλυση μέσω βιοπληροφορικών προγραμμάτων αποτελεί ένα αναγκαίο στάδιο για την ουσιαστικότερη ανάλυση και εξήγηση των πειραματικών αποτελεσμάτων. Η αρχή των προγραμμάτων και ο τρόπος με τον οποίο χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη θα αναφερθούν, παρακάτω, χωριστά.

3.11.1 Omiga

Το πρόγραμμα Omiga (Kramer, 2001) αποτελεί ένα εργαλείο ανάλυσης νουκλεοτιδικών και πρωτεϊνικών αλληλουχιών. Το πρόγραμμα αυτό παρέχει μια σειρά από δυνατότητες, όπως η δημιουργία, ανάλυση και επεξεργασία αλληλουχιών, ενώ μέσω αυτού είναι δυνατό να προσδιοριστεί η ύπαρξη θέσεων περιορισμού, δομικών μοτίβων, αναγνωστικών πλαισίων και άλλων χαρακτηριστικών μίας αλληλουχίας.

Κατά την παρούσα μεθοδολογία, το πρόγραμμα χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό του αναγνωστικού πλαισίου των διαθέσιμων mRNA αλληλουχιών και περαιτέρω τον καθορισμό των αντίστοιχων αμινοξικών αλληλουχιών που κωδικοποιούνται από αυτές. Επίσης, στο συγκεκριμένο λογισμικό βασίστηκε ο σχεδιασμός των ομόλογων εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην Real-Time PCR.

3.11.2 E-RNAi

Το E-RNAi¹ (Arziman et al, 2005) είναι ένα εργαλείο που χρησιμοποιείται για το σχεδιασμό και την αξιολόγηση των συστατικών αντιδράσεων RNAi, σε πολλά διαφορετικά είδη. Στην παρούσα μεθοδολογία χρησιμοποιήθηκε για τον σχεδιασμό δίκλωνων τμημάτων RNA (dsRNA) με σκοπό την ειδική στόχευση σε mRNA προερχόμενα από τα γονίδια-στόχους μας. Μέσα από την πλατφόρμα του E-RNAi σχεδιάζονται οι εκκινητές της αντίδρασης, από τους οποίους τελικά θα προκύψει το dsRNA.

3.11.3 Blast (Basic Local Allignment Search Tool)

Το πρόγραμμα Blast² (Altschul et al, 1990) αποτελεί ένα εργαλείο σύγκρισης και στοίχισης νουκλεοτιδικών και πρωτεϊνικών αλληλουχιών, βάσει ομολογίας. Το πρόγραμμα αναζητά και εντοπίζει ομόλογες περιοχές, κατατεθειμένες στις βάσεις δεδομένων, που εμφανίζουν τοπική

¹ <http://www.dkfz.de/signaling/e-rnai3/>

² <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

ομοιότητα με μέρος ή ολόκληρη την αλληλουχία που έχει εισαχθεί από το χρήστη. Το πρόγραμμα χωρίζεται σε επιμέρους κατηγορίες ανάλογα με το είδος της αναζήτησης, π.χ. Blastn (σύγκριση νουκλεοτιδικών αλληλουχιών), Blastx (σύγκριση μεταγραφόμενων νουκλεοτιδικών αλληλουχιών με πρωτεϊνικές αλληλουχίες), Blastp (σύγκριση πρωτεϊνικών αλληλουχιών) κ.α.

Στην ανάλυση που πραγματοποιήσαμε η αναζήτηση επικεντρώθηκε στον εντοπισμό πρωτεϊνών σε άλλα έντομα που να εμφανίζουν ομολογία με τις μεταγραφόμενες αλληλουχίες του δάκου. Για την αναζήτηση αυτή χρησιμοποιήθηκε το Blastx.

3.11.4 Clustal

Το Clustal Omega³ (Sievers *et al*, 2011) αποτελεί ένα πρόγραμμα στοίχισης πολλαπλών νουκλεοτιδικών ή πρωτεϊνικών αλληλουχιών. Σκοπός του προγράμματος είναι ο υπολογισμός της βέλτιστης αντιστοίχισης μεταξύ των αλληλουχιών που εισάγει ο χρήστης και η παράθεση τους με τρόπο που να απεικονίζονται τα χαρακτηριστικά, οι ομοιότητες και οι διαφορές τους.

Στην παρούσα μεθοδολογία χρησιμοποιήθηκε το Clustal για τη στοίχιση πρωτεϊνικών αλληλουχιών του δάκου με ομόλογες άλλων εντόμων. Οι αλληλουχίες αυτές προσδιορίστηκαν μέσω του Omiga, ενώ οι ομόλογές τους ανακτήθηκαν από τις βάσεις δεδομένων.

3.11.5 InterProScan

Το InterProScan⁴ (Zdobnov & Arweiler, 2001) αποτελεί ένα πρόγραμμα λειτουργικής ανάλυσης πρωτεϊνών. Σκοπός του είναι η ανίχνευση των δομικών και λειτουργικών περιοχών μιας πρωτεΐνης, βάσει της αλληλουχίας της, συγκεντρώνοντας και συνδυάζοντας τα διαθέσιμα στοιχεία από άλλες μεθόδους πρωτεϊνικής ανάλυσης.

Στη συγκεκριμένη προσέγγιση υποβλήθηκαν οι αμινοξικές αλληλουχίες του δάκου, όπως προσδιορίστηκαν με το Omiga, προς αναζήτηση του ρόλου των συντηρημένων περιοχών τους.

3.11.6 STRING (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins)

Η STRING⁵ (Szklarczyk *et al*, 2014) είναι ένα πρόγραμμα αποτύπωσης γνωστών ή υποθετικών δικτύων αλληλεπίδρασης μεταξύ των πρωτεϊνών (protein-protein interactions). Η βάση δεδομένων της STRING περιλαμβάνει πληροφορίες από διαφορετικές πηγές μεταξύ των οποίων πειραματικά δεδομένα, υπολογιστικές μεθόδους πρόβλεψης και απλές αναφορές στην βιβλιογραφία. Η τελευταία εκδοχή του προγράμματος (10.0) περιλαμβάνει πληροφορίες από περίπου 9,6 εκατομμύρια πρωτεΐνες προερχόμενες από περισσότερους από 2.000 οργανισμούς.

³ <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>

⁴ <http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan/>

⁵ <http://string-db.org/>

4. Αποτελέσματα

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Εντοπισμός γονιδίων από δεδομένα RNA sequencing

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν ο εντοπισμός και η ανάλυση γονιδίων που εμπλέκονται στην πρόσληψη των φερομονών από το οσφρητικό σύστημα του δάκου της ελιάς. Στοχεύσαμε στις οσμοδεσμευτικές πρωτεΐνες (OBPs) καθώς σύμφωνα με την υπάρχουσα βιβλιογραφία αυτές είναι οι πρώτες πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με τις φερομόνες όταν και τις υποδέχονται στα αισθητικά τριχίδια της κεραίας του εντόμου. Αξιοποιώντας πληροφορίες που προέκυψαν από τη σύγκριση τρανσκριπτομικής ανάλυσης των κεφαλιών (καθώς σε αυτά εδράζονται τα οσφρητικά του όργανα) ώριμων ατόμων δάκου και των δύο φύλων με την αντίστοιχη ανάλυση σε θώρακες ανώριμων ατόμων, εστιάσαμε σε OBPs που έχουν συνδεθεί πειραματικά με την πρόσληψη φερομονών στη φρουτόμυγα *Drosophila melanogaster* αλλά και σε άλλα είδη εντόμων.. Οι OBPs αυτές αναφέρονται στη βιβλιογραφία και ως PBP (Pheromone Binding Proteins), λόγω της συσχέτισης τους με την πρόσληψη των φερομονών. Πιο συγκεκριμένα, εστιάσαμε στις πρωτεΐνες OBP76a (LUSH), OBP19d (PBP2) και OBP83a (PBP3).

Τα παραπάνω διαφορικά εκφραζόμενα γονίδια (LUSH, PBP2, PBP3) ταυτοποιήθηκαν βάσει των ομόλογων αλληλουχιών στη *Drosophila melanogaster* μετά από σύγκριση στις βάσεις δεδομένων. Οι αλληλουχίες αυτές χρησιμοποιήθηκαν στη συνέχεια για να εξεταστούν τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων αυτών σε διαφορετικά στάδια της ζωής του εντόμου.

4.2 Ανάλυση των επιπέδων έκφρασης

Η μελέτη των επιπέδων έκφρασης των τριών γονιδίων πραγματοποιήθηκε μέσω ποσοτικής Real-Time PCR, σε ενήλικα αρσενικά και θηλυκά άτομα, διαφορετικών ηλικιών.

Αρχικά, απομονώθηκε RNA από τις κεραίες οκτώ ενήλικων αρσενικών και οκτώ θηλυκών ατόμων ηλικίας 4, 7 και 10 ημερών τα οποία είχαν διαχωριστεί βάσει φύλου τη στιγμή της μεταμόρφωσης τους από νύμφες σε ενήλικα έντομα και είχαν τοποθετηθεί σε γειτονικά κλουβιά έτσι ώστε να έχουν συνεχή προσυζευκτική επικοινωνία, χωρίς ωστόσο να συζευχθούν. Οι μέρες επιλέχθηκαν με κριτήριο τη σταδιακή σεξουαλική ωρίμανση του εντόμου η οποία στον εργαστηριακό πληθυσμό συμβαίνει μεταξύ της 5^{ης} και της 7^{ης} μέρας, μετά τη μεταμόρφωση. Ως εκ τούτου, τα έντομα της 4^{ης} μέρας θεωρούνται σεξουαλικά ανώριμα, ενώ αυτά της 7^{ης} και της 10^{ης} μέρας σεξουαλικά ώριμα και άρα ικανά να εκκρίνουν και να προσλάβουν σεξουαλικές φερομόνες.

Επιπλέον, απομονώθηκε RNA από τις κεραίες οκτώ ενήλικων αρσενικών και οκτώ θηλυκών ατόμων τα οποία αρχικά, μετά την μεταμόρφωση τους, είχαν διαχωριστεί σε διαφορετικά κλουβιά βάσει φύλου και τη 10^η μέρα τοποθετήθηκαν σε ειδικά κλουβιά ανά ζεύγη αντίθετου φύλου προκειμένου να συζευχθούν. Αφού διαπιστώθηκε η επιτυχής σύζευξη τους επαναδιαχωρίστηκαν και έπειτα από 12 ώρες απομονώθηκε το RNA από τις κεραίες τους. Το στάδιο αυτό ήταν απαραίτητο για να εξεταστεί η επίδραση της σύζευξης στα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων. Τα έντομα όταν απομονώθηκε το RNA τους βρίσκονταν στην 11^η μέρα, μετά τη μεταμόρφωση τους.



Εικόνα 4.1. Σχηματική αναπαράσταση των συνθηκών χειρισμού των εντόμων κατά τη διεξαγωγή της πειραματικής διαδικασίας

Το RNA στη συνέχεια υπέστη επεξεργασία με DNase για την αποικοδόμηση τυχόν τμημάτων DNA που ανακτήθηκαν ταυτόχρονα κατά τη διάρκεια απομόνωσης. Ακολούθως, συντέθηκε ο συμπληρωματικός του cDNA κλώνος με RT-PCR. Ως δίκλωνο πια είχε την απαιτούμενη σταθερότητα για περαιτέρω ανάλυση και στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα στην ποσοτική Real-Time PCR.

Για τη διενέργεια της ποσοτικής Real-Time PCR σχεδιάστηκαν ομόλογοι εκκινητές για τα γονίδια που επιλέχθηκαν, όπως επίσης και εκκινητές για την ενίσχυση του γονιδίου σταθερής έκφρασης Actin3, ενός γονιδίου που εντοπίζεται στον κυτταροσκελετό όλων των κυττάρων του εντόμου και χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων. 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.

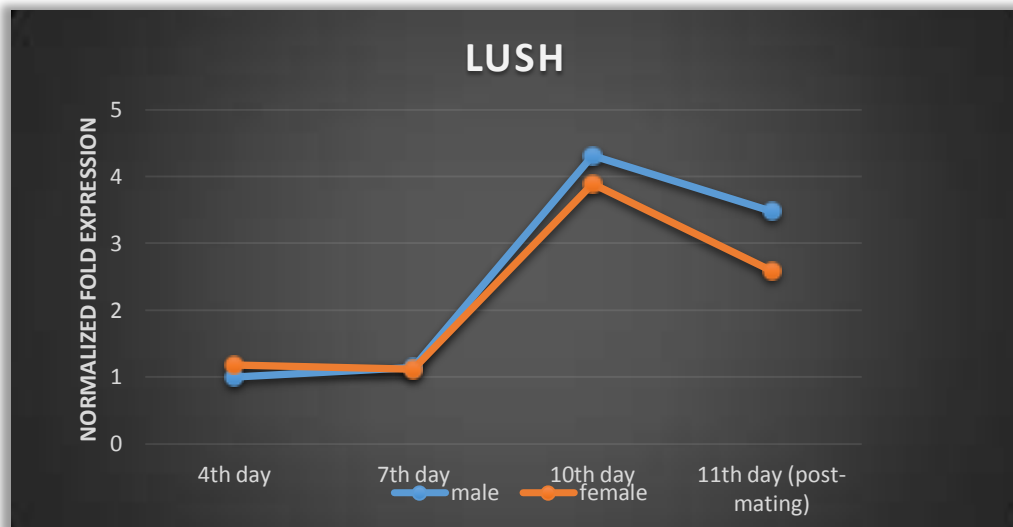
Να σημειωθεί, τέλος, πως η αποτύπωση των αποτελεσμάτων της Real-Time γίνεται μέσω της σύγκρισης των επιπέδων έκφρασης του εκάστοτε γονιδίου στα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν. Έτσι, ένα δείγμα χρησιμοποιείται ως control και λαμβάνει την τιμή 1 και τα υπόλοιπα λαμβάνουν τιμές ανάλογα με τις συγκριτικές διαφορές τους από το control δείγμα. Στην παρούσα ανάλυση επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθεί σε όλα τα πειράματα ως control το δείγμα που συλλέχθηκε από τα αρσενικά άτομα 4^{ης} μέρας (4th day-male) καθώς αυτό εμφάνιζε κατά κανόνα τις χαμηλότερες τιμές. Οπότε, οι τιμές των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων στα παρακάτω γραφήματα γίνονται σε σχέση με την αντίστοιχη τιμή του 4th day-male δείγματος.

Η σημασία των αποτελεσμάτων και οι πιθανοί ρόλοι των υπό-μελέτη γονιδίων στη συμπεριφορά του δάκου, αναπτύσσονται εκτενώς στο κεφάλαιο της συζήτησης.

4.2.1 Επίπεδα έκφρασης της LUSH

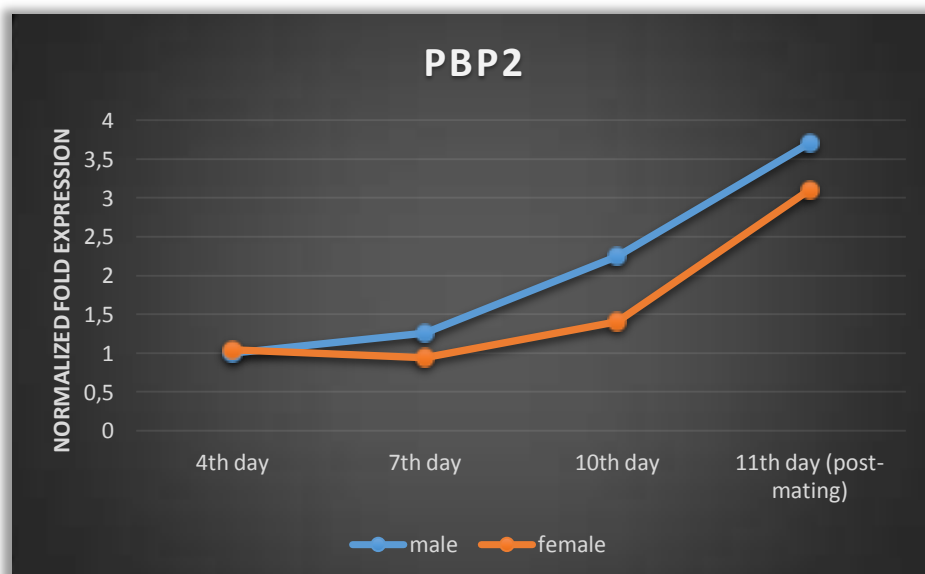
Το πρώτο γονίδιο που εξετάστηκε, το OBP76 ή LUSH εμφάνισε παρόμοιο πρότυπο έκφρασης στα αρσενικά και τα θηλυκά άτομα. Η έκφραση του στα έντομα της 4^{ης} και της 7^{ης} μέρας κινείται

σε χαμηλά επίπεδα, παρουσιάζει ωστόσο μια ραγδαία αύξηση της 10^η μέρα, γεγονός που υποδηλώνει τη συσχέτιση του με τη σεξουαλική ωρίμανση του εντόμου. Τέλος, στα συζευγμένα 11^ης μέρας η έκφραση βλέπουμε να μειώνεται και στα δύο φύλα, με μεγαλύτερο ποσοστό να συμβαίνει στα θηλυκά. Η μείωση της έκφρασης του γονιδίου μετασυζευκτικά επιβεβαιώνει τη σημασία του κυρίως στη σύζευξη και την ενδεχόμενη εμπλοκή του στην πρόσληψη των φερομονών.



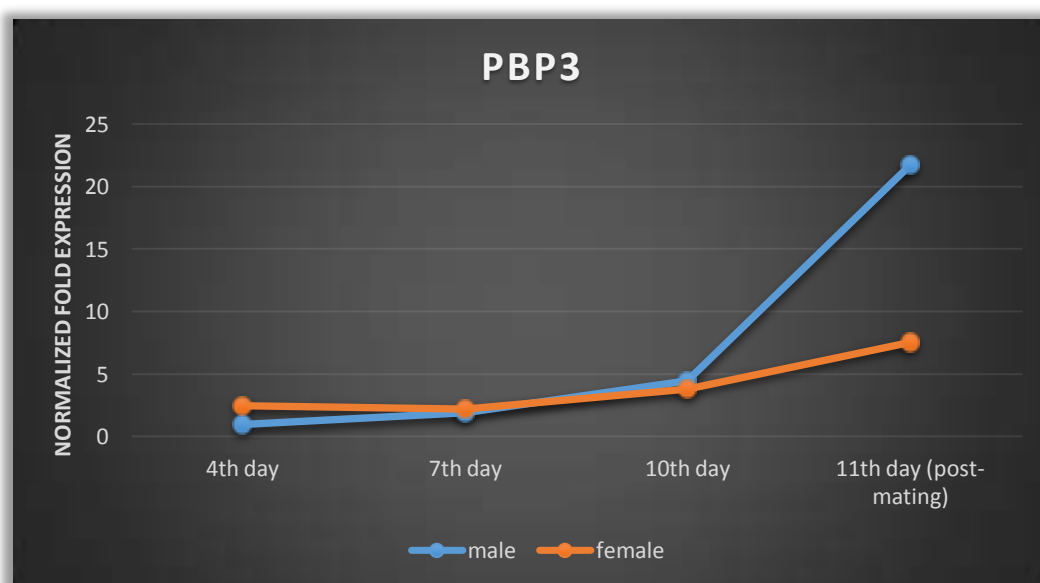
4.2.2 Επίπεδα έκφρασης του PBP2

Το δεύτερο γονίδιο που εξετάστηκε, το OBP19d ή PBP2 εμφάνισε παρόμοιο προφίλ έκφρασης στα αρσενικά και τα θηλυκά άτομα, διαφορετικό ωστόσο από το αντίστοιχο της LUSH. Βλέπουμε και εδώ μία αύξηση της έκφρασης του γονιδίου ανάλογης της σεξουαλικής ωρίμανσης του εντόμου, η οποία εμφανίζεται πιο έντονα στα αρσενικά άτομα. Το ενδιαφέρον στοιχείο εντοπίζεται στο γεγονός πως η αύξηση αυτή συνεχίζεται και αφού τα έντομα συζευχθούν. Από τα αποτελέσματα προκύπτει πως είτε το γονίδιο αυτό έχει εμπλοκή και σε άλλες διεργασίες σχετικές με την αναπαραγωγή είτε εμπλοκή σε μετασυζευκτικές διεργασίες.



4.2.3 Επίπεδα έκφρασης του PBP3

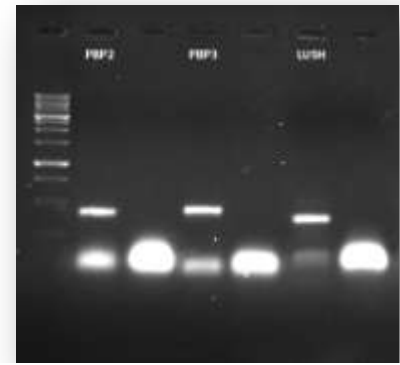
Το τρίτο γονίδιο που εξετάστηκε, το OBP83a ή PBP3, εμφάνισε διαφορετικό προφίλ έκφρασης μεταξύ των αρσενικών και των θηλυκών ατόμων. Στα αρσενικά άτομα παρατηρείται μια σταδιακή αύξηση της έκφρασης του γονιδίου, ανάλογη με την ηλικία των εντόμων και άρα τη σεξουαλική τους ωρίμανση, η οποία εμφανίζει μία έντονη κορυφή στα άτομα που έχουν συζευχθεί. Απ' την άλλη στα θηλυκά άτομα παρατηρούνται αντίστοιχα επίπεδα έκφρασης την 4^η και την 7^η μέρα με μια ελαφριά αύξηση την 10^η. Έντονη αύξηση παρατηρείται την 11^η μέρα, μετά την σύζευξη, γεγονός που είτε σχετίζεται με τη σύζευξη αυτή καθ' αυτή, είτε με την ηλικιακή και άρα σεξουαλική ωρίμανση των θηλυκών εντόμων.



4.3 Παροδική σίγηση γονιδίων

Αφού πραγματοποιήθηκε η ανάλυση του προφίλ έκφρασης των γονιδίων επόμενο βήμα της λειτουργικής ανάλυσης ήταν να επιχειρηθεί η στοχευμένη αποσιώπηση των παραπάνω γονιδίων, με σκοπό να μελετηθεί σε επόμενη φάση η επίδραση της σίγησης ορισμένων γονιδίων στη σεξουαλική και αναπαραγωγική συμπεριφορά του εντόμου. Για να επιτευχθεί αυτό χρησιμοποιήθηκε η τεχνολογία RNAi, για πρώτη φορά σε άτομα δάκου. Δημιουργήθηκαν, λοιπόν, δίκλωνα τμήματα RNA (dsRNA) με σκοπό να πυροδοτήσουν το μονοπάτι δημιουργίας του συμπλόκου RISC και άρα να μπλοκάρουν τη μετάφραση των mRNA που προέρχονται από τα γονίδια-στόχους μας, αξιοποιώντας τις υπόλοιπες πρωτεΐνες του μονοπατιού που φυσιολογικά παράγει το έντομο, ως ευκαρυωτικός οργανισμός. Για τη δημιουργία των dsRNA χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα cDNA δάκου, που είχε προέλθει από κεφάλια ώριμων σεξουαλικά αρσενικών και θηλυκών ατόμων 10^{ης} μέρας. Το cDNA ενισχύθηκε με χρήση εκκινητών που σχεδιάστηκαν στο E-RNAi, οι οποίοι στο 5' άκρο τους έφεραν την αλληλουχία του υποκινητή RNA πολυμεράσης, προερχόμενης από τον βακτηριοφάγο T7. Η πολυμεράση αυτή θα αναγνωρίσει τον υποκινητή της και θα μεταγράψει το προϊόν της ενίσχυσης του cDNA σε RNA.

Τα προϊόντα της PCR ηλεκτροφορήθηκαν με σκοπό την εκτίμηση της συγκέντρωσης τους και την επιβεβαίωση της απουσίας παραπροϊόντων. Η παραπάνω διαδικασία ακολουθήθηκε για τα, προς εξέταση, γονίδια LUSH, PBP2 και PBP3, όπου αφού παράχθηκαν τα dsRNA του εκάστοτε γονιδίου έγινε εισαγωγή τους εντός των εντόμων με μικροέγχυση. Η μικροέγχυση πραγματοποιήθηκε στην περιοχή του θώρακα, με στόχο να εισαχθεί το dsRNA απευθείας στην αιμολέμφο των εντόμων. Τα έντομα στα οποία πραγματοποιήθηκε η ένεση βρίσκονταν στην 6^η μέρα μετά τη μεταμόρφωση τους σε ενήλικα. Για τα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν ομάδες (pool) των 8 εντόμων στα οποία πραγματοποιήθηκε η εισαγωγή του dsRNA. Για να εξεταστεί η επιτυχία της μεθόδου απομονώθηκε το ολικό RNA από τις κεραίες τους την 7^η και τη 10^η μέρα, τις μέρες δηλαδή που παρατηρήσαμε στις αναλύσεις των προφίλ έκφρασης πως ξεκινάει γενικά η αύξηση της έκφρασης των γονιδίων λόγω της σεξουαλικής τους ωρίμανσης. Παράλληλα με τα dsRNA που αντιστοιχούσαν στα γονίδια στόχους σε άλλα έντομα ίδιας ηλικίας έγινε εισαγωγή dsRNA το οποίο στόχευε στο γονίδιο GFP, ούτως ώστε να λειτουργήσει ως δείγμα ελέγχου (control) καθώς από την εισαγωγή του δεν περιμένουμε να υπάρξει κάποια αλλαγή στα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων. Στη συνέχεια, αφού απομονώθηκε RNA από τις κεραίες όλων των εντόμων στο εκάστοτε στάδιο, εξετάστηκαν τα επίπεδα έκφρασης των 3^{ων} γονιδίων με Real-Time PCR την 7^η και τη 10^η μέρα, πάντα σε σύγκριση με το control τους. Για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς (reference gene) το ριβοσωμικό γονίδιο σταθερής έκφρασης Rpl19.

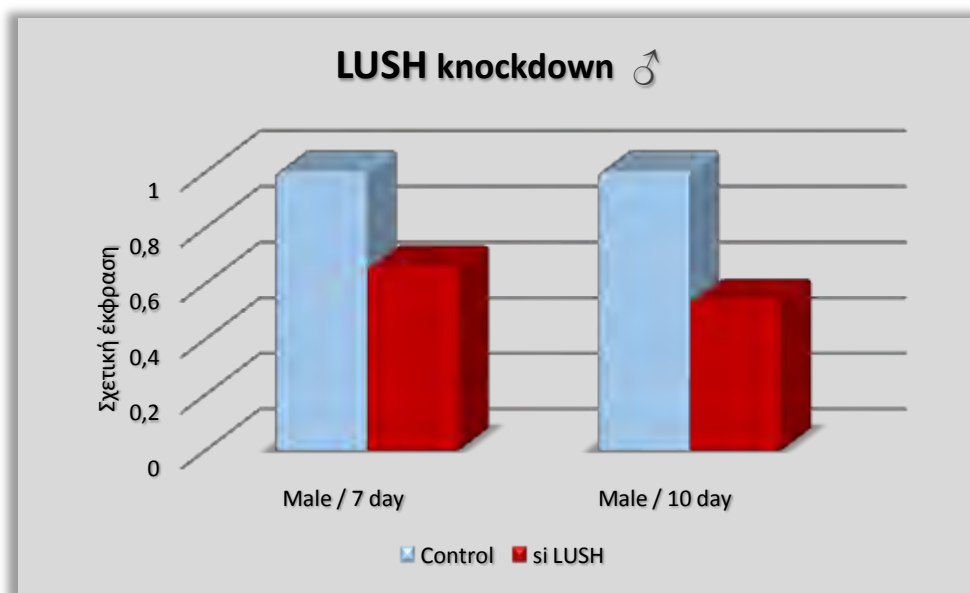


Εικόνα 4.2. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης των PCR προϊόντων dsPBP2, dsPBP3, dsLUSH

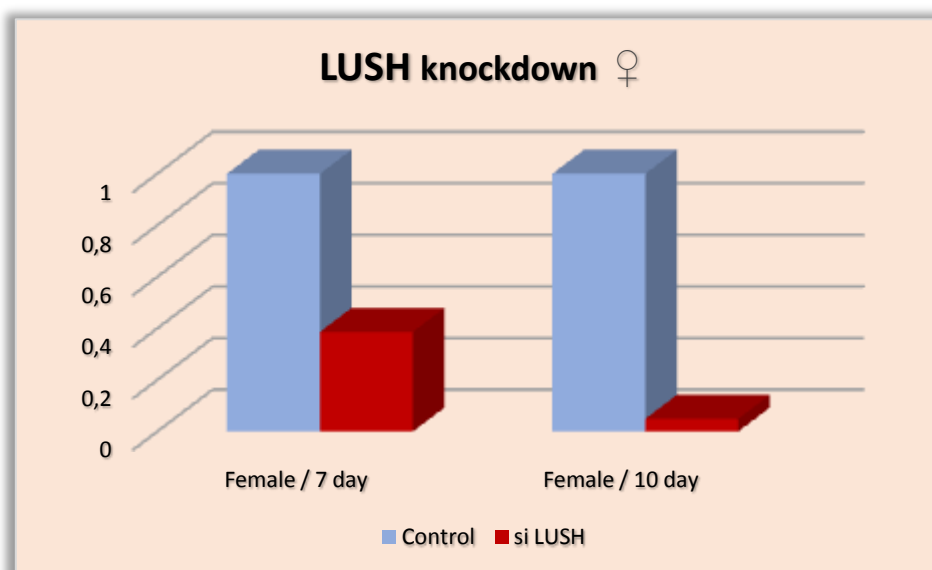
4.3.1 Αποσιώπηση γονιδίου LUSH

Στο γονίδιο της LUSH φαίνεται πως η μικροέγχυση είχε επιτυχία, καθώς παρατηρούμε πως και στα δύο φύλα υπάρχει αξιοσημείωτη μείωση της έκφρασης του γονιδίου.

Αρσενικά άτομα: Στα μεν αρσενικά η μείωση της έκφρασης την 7^η μέρα είναι της τάξης του 35%, με το ποσοστό να αυξάνεται την 10^η και να φτάνει το 50%.

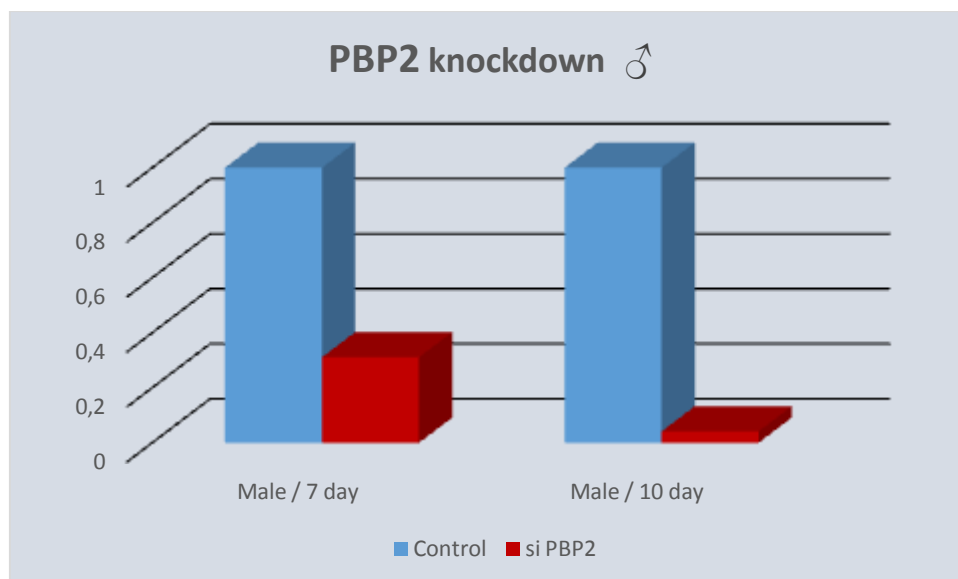


Θηλυκά άτομα: Στα θηλυκά τα επίπεδα μείωσης στην έκφρασης του γονιδίου την 7^η μέρα κυμαίνονται στο 60% με το ποσοστό να αυξάνεται εντυπωσιακά τη 10^η προσεγγίζοντας το 90%.



4.3.2 Αποσιώπηση γονιδίου PBP2

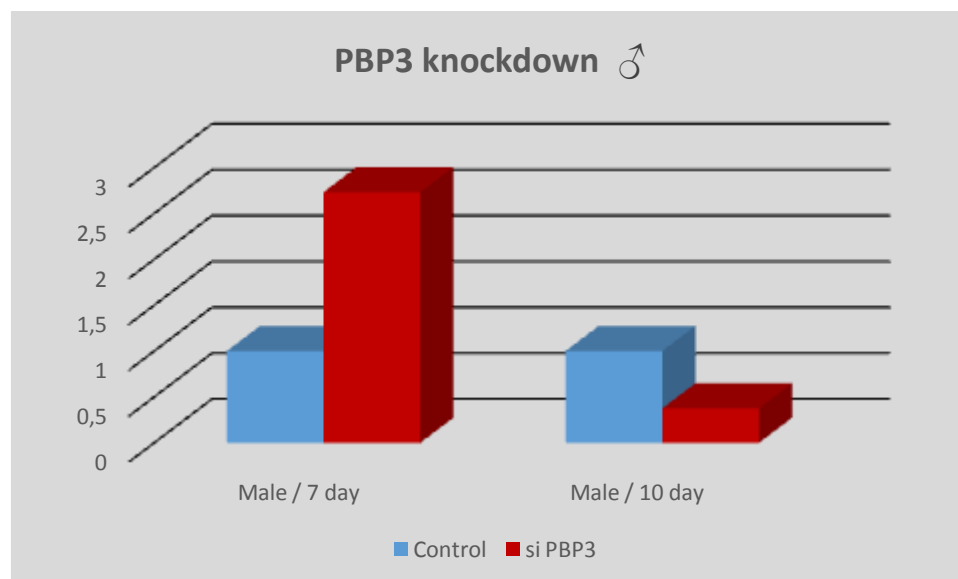
Το δεύτερο γονίδιο που εξετάστηκε ήταν το PBP2. Η αποσιώπηση του γονιδίου εξετάστηκε μόνο σε αρσενικά άτομα, λόγω θνησιμότητας των υπό εξέταση θηλυκών ατόμων πριν τη διενέργεια του πειράματος. Από τα αποτελέσματα των πειραμάτων παρατηρούμε πως υπάρχει εμφανής αποσιώπηση της έκφρασης του την 7^η και τη 10^η μέρα. Την 7^η το γονίδιο αποσιωπάται σε ποσοστό 70%, ενώ τη 10^η μέρα τα επίπεδα αποσιώπησης φτάνουν το 90%.



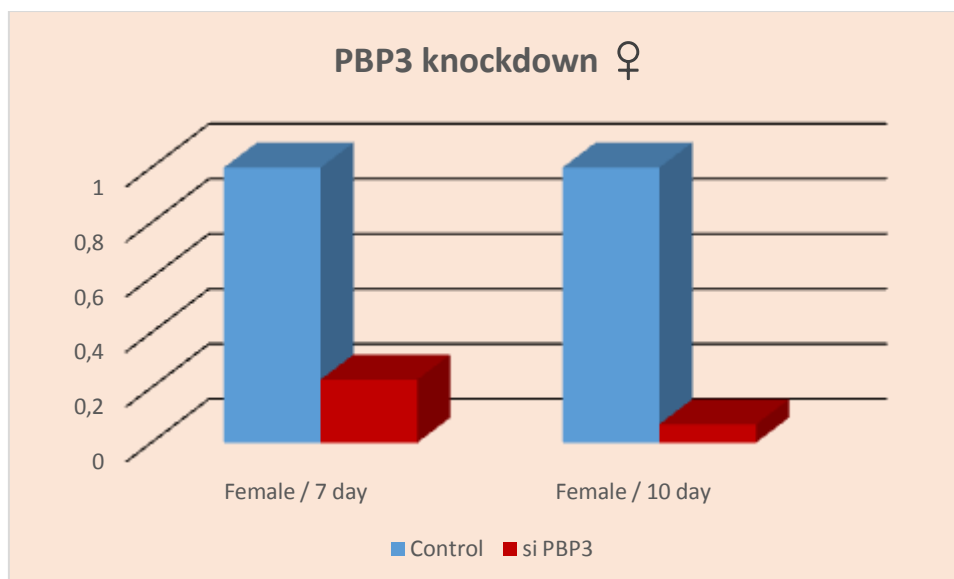
4.3.3 Αποσιώπηση γονιδίου PBP3

Το τρίτο και τελευταίο γονίδιο στο οποίο επιχειρήθηκε αποσιώπηση ήταν το PBP3, του οποίου τα επίπεδα έκφρασης εξετάστηκαν σε αρσενικά και θηλυκά άτομα, 7^{ης} και 10^{ης} μέρας.

Αρσενικά: Στα αρσενικά άτομα, την 7^η μέρα το γονίδιο δε φαίνεται να αποσιωπάται αλλά αντιθέτως να αυξάνεται η έκφραση του 2,5 φορές, γεγονός που υποδηλώνει πως η αποσιώπηση δεν επετεύχθη. Τη 10^η μέρα, αντιθέτως, η αποσιώπηση ήταν επιτυχημένη με την έκφραση του γονιδίου να σημειώνει μείωση κατά περίπου 65%.

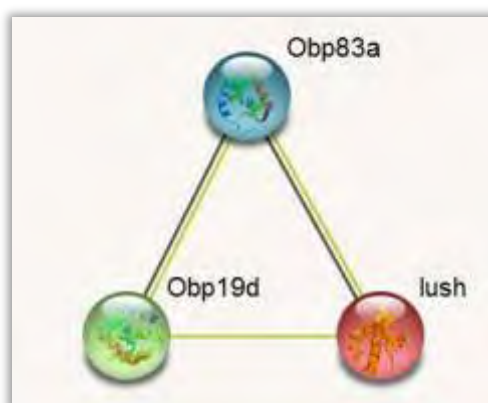


Θηλυκά: Στα θηλυκά άτομα παρατηρήθηκε αξιοσημείωτη και σταδιακή μείωση της έκφρασης του γονιδίου ως απόρροια του RNAi. Την 7^η μέρα το γονίδιο παρουσίασε μείωση της τάξης του 75%, ενώ τη 10^η η μείωση ήταν ακόμα μεγαλύτερη προσεγγίζοντας το 90%.



4.4 Βιοπληροφορική ανάλυση

Για τα τρία γονίδια, των οποίων εξετάστηκαν πειραματικά τα επίπεδα έκφρασης, ακολούθως επιχειρήθηκε η βιοπληροφορική τους ανάλυση μέσα από τα διαθέσιμα ηλεκτρονικά εργαλεία και τις βάσεις δεδομένων. Η ανάλυση έγινε στο πρωτεϊνικό επίπεδο, αρχικά, μέσω του εντοπισμού και την ανάλυση των συντηρημένων επικρατειών, με χρήση του προγράμματος InterProScan⁶. Στη συνέχεια αναζητήθηκαν μέσω του blastp⁷ ομόλογες πρωτεΐνες σε άλλους οργανισμούς και τέλος οι πρωτεΐνες του δάκου και των συγγενικών του εντόμων στοιχήθηκαν με χρήση του προγράμματος Clustal Omega⁸ προκειμένου να εντοπιστούν τα συντηρημένα τμήματα, αλλά και οι ιδιαιτερότητες των πρωτεϊνών αυτών στο δάκο. Όλες οι αλληλουχίες που χρησιμοποιήθηκαν παρατίθενται στο παράρτημα.



Εικόνα 4.3. Συσχέτιση των τριών πρωτεϊνών μέσω του προγράμματος String

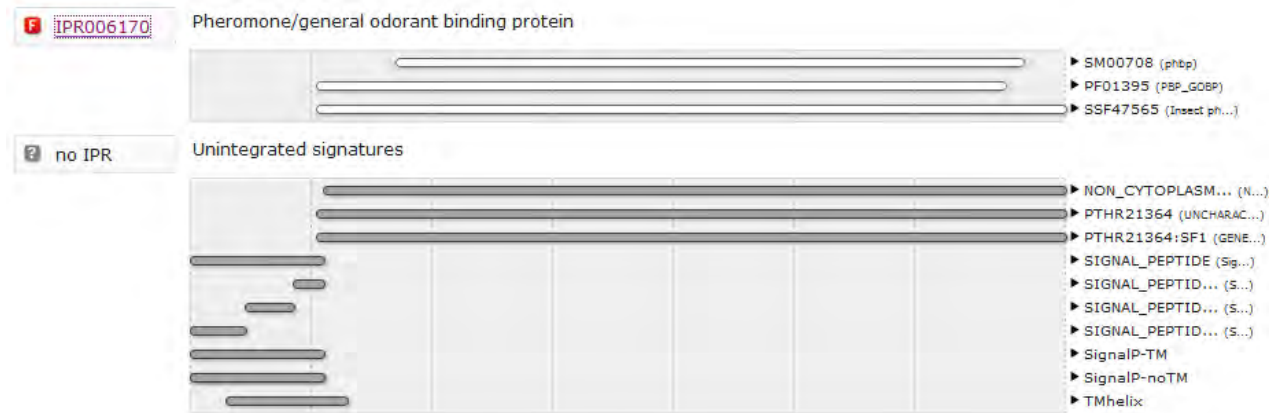
⁶ <http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan/>

⁷ <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>

⁸ <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>

4.4.1 LUSH

Το μήκος της αλληλουχίας της πρωτεΐνης LUSH στο δάκο, είναι 145 αμινοξέα. Τα δομικά της μοτίβα, όπως προέκυψαν από την ανάλυση με το InterPro είναι τα παρακάτω:



Τα πιο σημαντικά είναι ο εντοπισμός της λειτουργικής της επικράτειας (Pheromone/General odorant binding protein domain) στην περιοχή ανάμεσα στα αμινοξέα 23-135. Το δε πεπτιδικό σινιάλο, χαρακτηριστικό γνώρισμα των OBPs, εντοπίζεται στην περιοχή μεταξύ των αμινοξέων 1-22.

Έπειτα κατά την αναζήτηση ομολογιών μέσω του Blast, τα σημαντικότερα ομόλογα γονίδια που εντοπίστηκαν ήταν τα:

- Odorant binding protein lush [Bactrocera dorsalis], E value: 1e-93
- General odorant-binding protein lush isoform X1 [Bactrocera cucurbitae], E value: 1e-94
- General odorant-binding protein lush [Ceratitis capitata], E value: 6e-87
- Lush, isoform A [Drosophila melanogaster], E value: 1e-40

Οι παραπάνω πρωτεϊνικές αλληλουχίες στοιχήθηκαν μεταξύ τους προκειμένου να εντοπιστούν τα συντηρημένα κατάλοιπα και μοτίβα, μέσω του Clustal Omega:

CLUSTAL O(1.2.1) multiple sequence alignment

```

D.melanogaster  -MKHWKRRSSAVFAIVLQVLVLLLPDAVAMTEQFLTSLDMIRSGCAPKFKLTEDLDR
C.capitata     MQEKYKAMILN-TNGIKYFFTLACASVGAVTMQQFEASLDMMRNGCAPKFKVSDILDK
B.cucurbitae   -----MLVK-INAFKYFTLLACTGVNAITMQQFEASLDMMRNGCAPKFKVATEILDN
B.oleae        -----MCLK-INALKYFTLLACTGVSAITMQQFEISLDMMRNGCTPKFKVPIEILDN
B.dorsalis     -----MYLK-INALKYFTLLACTAVSAVTMQQFETSLDMMRNGCAPKFKIATEILDN
               .  .:.**      .  *:*:*:*  :*****:*:*:*:*:  :  **.

D.melanogaster  LRVGDFNFPPSQDLMCYTKCVSLMAGIVNKKGEFNAPKALAQLPHLVPPMEMMSRKSV
C.capitata     LRAGEFTE-NMNDLRCYTRCIAQLAGITLTKKGFDSVQKALAQIPIILPPEMQDAAKEALN
B.cucurbitae   LRAGEFIE-NNGELKCYTRCVAQLAGITVTKKGEFSVQKALAQIPIILPPEMQEAAKAALN
B.oleae        LRAGEFIE-NNGELKCYTRCIAQLAGITVTKKGEFSVQKALAQIPIILPPEMQNAAKEALI
B.dorsalis     LRAGEFIE-NNGDLKCYTRCIAQLAGITVTKKGFDSVQKALAQIPIILPPEMQDPAKEALN
               **.***      .  :*  ***:..  :***:***:..  *****:  :*****  :  :  :

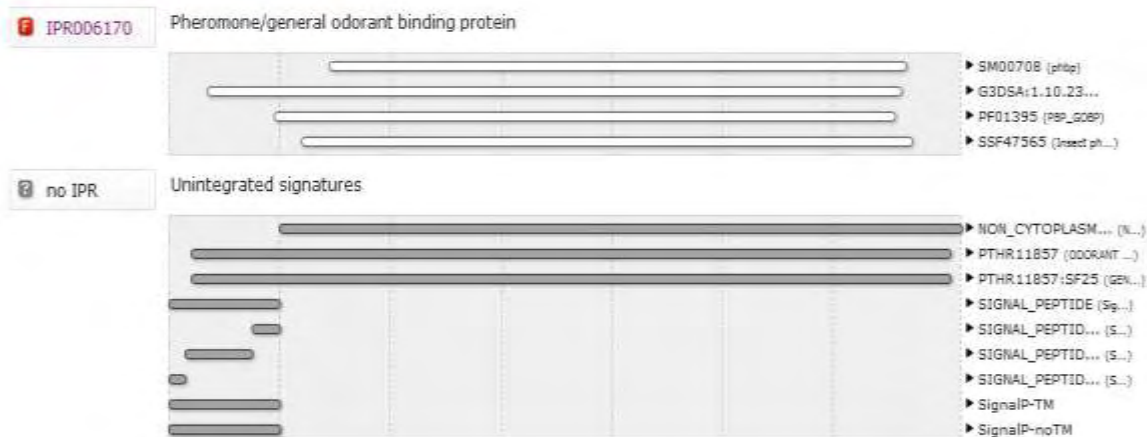
D.melanogaster  ACRDTHKQFKESCERVYQTAKCFSENADGQFMWP
C.capitata     ACKDVQKNYKESCDRVFYTTKCVRDYDPTTFKFP
B.cucurbitae   ACKDVRKKKL-----
B.oleae        ACKDVQKAYKDSCKRVFYTTKCVRDYDPTTFKFP
B.dorsalis     ACKDVQKNYKESCDKVFYTTKCVRDYDPTTFKFP
               **.***:

```

4.4.2 PBP2

Το μήκος της αλληλουχίας της πρωτεΐνης PBP2 στο δάκο, είναι 143 αμινοξέα. Τα δομικά της μοτίβα, όπως προέκυψαν από την ανάλυση με το InterPro είναι τα παρακάτω:

Detailed signature matches



Τα πιο σημαντικά στοιχεία της ανάλυσης είναι ο εντοπισμός της λειτουργικής της επικράτειας (Pheromone/General odorant binding protein domain) στην περιοχή ανάμεσα στα αμινοξέα 30-133. Το δε πεπτιδικό σινιάλο, χαρακτηριστικό γνώρισμα των OBPs, εντοπίζεται στην περιοχή μεταξύ των αμινοξέων 1-20.

Έπειτα κατά την αναζήτηση ομολογιών μέσω του Blast, τα σημαντικότερα ομόλογα γονίδια που εντοπίστηκαν ήταν τα:

- General odorant-binding protein 19d-like [Bactrocera dorsalis], E value: 1e-76
- General odorant-binding protein 19d-like [Bactrocera cucurbitae], E value: 1e-70

- General odorant-binding protein 19d-like [*Ceratitis capitata*], E value: 2e-27
- Odorant-binding protein 19d-like [*Drosophila melanogaster*], E value: 1e-16

Οι παραπάνω πρωτεϊνικές αλληλουχίες στοιχήθηκαν μεταξύ τους προκειμένου να εντοπιστούν τα συντηρημένα κατάλοιπα και μοτίβα, μέσω του Clustal Omega:

```

CLUSTAL O(1.2.1) multiple sequence alignment

D.melanogaster  MSHLVHLTVLLMVGILCLGATSAPKPEEINRDHAAELANECKAETGATDEDEVEQLMSHDL
C.capitata     -----MKFLNICLIVCAALIANIKCDD-F-EGVKLTAQECKDEVGATDEDEVETMFKEHP
B.cucurbitae   -----MKYFVVCLAICSLVISHTAEQE-LLEKIKQIAEECKGQVGASDDDVTRMLKYEP
B.oleae        -----MKYFLVFLAICSLVISFSEAE-ELEKVKKIAEECKVQVGASDEDVAGVFKYEP
B.dorsalis     -----MKYFVVFLAICSFATSFSEADE-FGEKVKKIAEECKGQVGASDDDDVARLFKYEP
               ..  :  :  :  *  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :

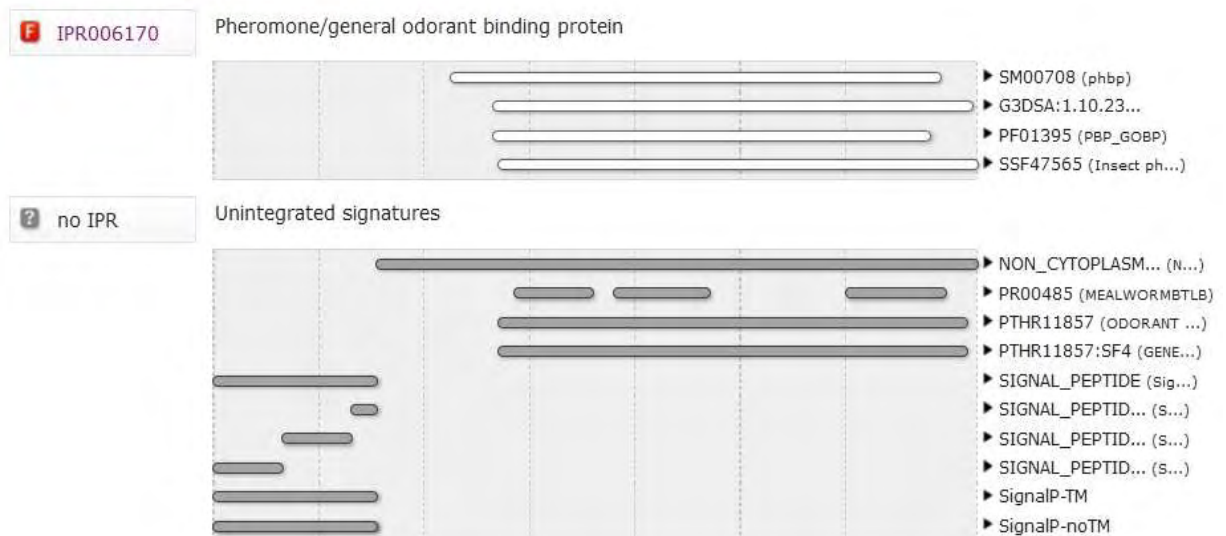
D.melanogaster  PERHEAKCLRACVMKKLQIMDESGKLNKEHAIELVKVMSKHDAEKEDAPAEVVAKEAIE
C.capitata     AGSAEAKCLHACVMKRFGLMNDGKMDKEKATDILKIIASGNEEQESLGLVLETCVDID
B.cucurbitae   ATNDKAKCLQACIMKQFGILDDNNKLVEAGAMAYIKSLAAGDAELEKLSLEYNECKNTP
B.oleae        AANDKAKCLNACCMQKLGLDENHKLVEAGAIEYIKQVAAGDAEYEQSMSEVLNECKNTP
B.dorsalis     AANDKAKCLTACTMKKLGTMDENNKVVEAGAIAYIKQLSGGDAEFELSLLEYNECKSTP
               :**** *  *:::  :..  *  :  *  :  :  :  :  :  :  :  :

D.melanogaster  TPDDHCDAAFAYEECIYEQMKHEGLELEEH-
C.capitata     VDEDHCEAAEDYRVCMTKAAENGFTMARV-
B.cucurbitae   ANSNECEYAEAVRACTIENSKSKGIKILPQ-
B.oleae        ESSNECEYAEAFRVCVIESSKSKGIKILPQ-
B.dorsalis     ESSNECEYAEAFRQCVLESAKSKGLKILPQV
               .:.*: *  .  *  .  .*: :
    
```

4.4.3 PBP3

Το μήκος της αλληλουχίας της πρωτεΐνης PBP3 στο δάκο, είναι 145 αμινοξέα. Στο σημείο αυτό χρειάζεται να αναφερθεί πως ενδέχεται η συγκεκριμένη αλληλουχία να μην είναι η μοναδική που να εμφανίζει ομολογία με την πρωτεΐνη PBP3 (ή OBP83a) της *Drosophila melanogaster* που στις συγκεκριμένες μελέτες λειτουργεί ως οργανισμός-μοντέλο. Το συμπέρασμα αυτό προκύπτει από το γεγονός πως σε συγγενικά με το δάκο έντομα, όπως το *Bactrocera dorsalis* (Wu et al, 2015) και η *Ceratitis capitata* (Siciliano et al, 2014a; 2014b) έχουν εντοπιστεί από δύο ομόλογες πρωτεΐνες. Τα δομικά μοτίβα της PBP3 του δάκου, όπως προέκυψαν από την ανάλυση με το InterPro είναι τα παρακάτω:

Detailed signature matches



Τα πιο σημαντικά στοιχεία της ανάλυσης είναι ο εντοπισμός της λειτουργικής της επικράτειας (Pheromone/General odorant binding protein domain) στην περιοχή ανάμεσα στα αμινοξέα 46-138. Το δε πεπτιδικό σινιάλο, χαρακτηριστικό γνώρισμα των OBPs, εντοπίζεται στην περιοχή μεταξύ των αμινοξέων 1-31.

Έπειτα κατά την αναζήτηση ομολογιών μέσω του Blast, τα σημαντικότερα ομόλογα γονίδια που εντοπίστηκαν ήταν τα:

- Pheromone-binding protein-related protein 6 [*Bactrocera dorsalis*], E value: 7e-85
- Pheromone-binding protein-related protein 6 [*Bactrocera cucurbitae*], E value: 5e-80
- Pheromone-binding protein-related protein 6 [*Ceratitis capitata*], E value: 7e-76
- Odorant-binding protein 83a, isoform C [*Drosophila melanogaster*], E value: 2e-52

Οι παραπάνω πρωτεϊνικές αλληλουχίες στοιχήθηκαν μεταξύ τους προκειμένου να εντοπιστούν τα συντηρημένα κατάλοιπα και μοτίβα, μέσω του Clustal Omega:

CLUSTAL O(1.2.1) multiple sequence alignment

```

D.melanogaster MDQEGPRSSGKERNGKSHIKMALNGFGRVSAVLLI-ALSLLSGA--LILPPAAAQRDE
B.oleae -----MALIGIWRCQAFHAFLIVALSS--SLTLMHVQAQEP RRDD
C.capitata -----MALNGSRRSQAFNAFLIVALALSSILLMHVVQAQEP RRDD
B.dorsalis -----MVLITGIRRGQAFHAFLIVALSS--SLTLMHVQAQEP RRDD
B.cucurbitae -----MVLNGILRGHPLSAFLIVALAS--SLTLVHVRAQEP RRDD
               * . * * . : * * * : : : * * :

D.melanogaster NYPPPGILKMAKPFHDACVEKTGVTEAAIKEFSDGEIHEDEKLKCYMNCFFHEIEVVDN
B.oleae KVRNIKHLKNI-----STFXSEAIKEFSDGQIHEDEALKCYMNCLEFHEIDVVDN
C.capitata KWPPPAVLKMAKIFHDICVEKTGVSEEAIKEFSDGQIHDEDEALKCYMNCLEFHEIDVVDN
B.dorsalis KWPPPAVLKMAKIFHDICVEKTGVTEAAIKEFSDGQIHEDEALKCYMNCLEFHEIDVVDN
B.cucurbitae KWPPPAVLKMAKIFHDICVEKTGVSEEAIKEFSDGQIHEDEALKCYMNCLEFHEIDVVDN
:          ** : . . *****: *: * *****: *****: *****

D.melanogaster GDVHLEKLFATVPLSMRDKIMEMSGCVHPEGDTLCHKAWWFHQWKKADPKHYFLP
B.oleae GDVHLETLENTVPGTVRNQLINMAKDCEHPEGDTLCHKAWWFHQWKKADPVHYFLP
C.capitata GDVHLETLENTVPGTVRDKLINMAKGCEHPEGDTLCHKAWWFHQWKKADPVHYFLP
B.dorsalis GDVHLETLENTVPGTVRNQLINMAKECEHPEGDTLCHKAWWFHQWKKADPVHYFLP
B.cucurbitae GDVHLETLENTVPGTVRNQLINMAKECEHPEGDTLCHKAWWFHQWKKADPVHYFLP
*****.: * * : : : : : * * *****: ***** *****

```

5. Συζήτηση

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο δάκος αποτελεί το σημαντικότερο παράσιτο της ελιάς. Οι μέθοδοι αντιμετώπισής του όμως έχουν αναδείξει μια σειρά από πολύ σημαντικά ζητήματα σε σχέση με το περιβάλλον, τα οικοσυστήματα και τη δημόσια υγεία. Τα ζητήματα αυτά αφορούν κυρίως την αλόγιστη χρήση ορισμένων εντομοκτόνων, με δυσμενείς συνέπειες για την ανθρώπινη υγεία, καθώς και την ανάπτυξη τεχνικών οι οποίες δεν έχουν την απαραίτητη εξειδίκευση στο δάκο, επιδρώντας έτσι σε κοινωφελή έντομα και διαταράσσοντας καίρια τις ισορροπίες των οικοσυστημάτων.

Η διεύρυνση των μοριακών μας γνώσεων σε σχέση με το οσφρητικό σύστημα του δάκου αποτελεί ένα αξιοσημείωτο πεδίο έρευνας λόγω της σημασίας του σε βασικές λειτουργίες του εντόμου, όπως η σύζευξη, η ωοαπόθεση και η εύρεση της τροφής. Η ανάλυση των γονιδίων και των πρωτεϊνών που εμπλέκονται στο σύστημα αυτό μπορεί να συντελέσει καθοριστικά στη βελτίωση των υπάρχουσών τεχνικών ελέγχου και καταπολέμησης του, καθώς και στην ανάπτυξη εναλλακτικών παρεμβατικών μεθόδων ελέγχου.

Η παρούσα διπλωματική εργασία αποτέλεσε μέρος μιας ευρύτερης προσπάθειας εντοπισμού και ανάλυσης γονιδίων τα οποία κωδικοποιούν πρωτεΐνες με ρόλο στις οσφρητικές διαδικασίες του δάκου. Στα πλαίσια της εργασίας αυτής πραγματοποιήθηκε λειτουργική ανάλυση τριών διαφορετικών γονιδίων τα οποία έχουν συνδεθεί με την αναγνώριση και τη μεταφορά των φερομονών, των κύριων δηλαδή σημάτων σεξουαλικής επικοινωνίας, σε άλλα είδη εντόμων. Τα γονίδια εντοπίστηκαν με χρήση δεδομένων RNA seq που έχουν προκύψει από το τρανσκρίπτομα του δάκου και ταυτοποιήθηκαν βάσει ομολογίας με τα αντίστοιχα της φρουτόμυγας *Drosophila melanogaster*. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ανάλυση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων αυτών στους οσφρητικούς ιστούς αρσενικών και θηλυκών ατόμων, σε διαφορετικά στάδια της ζωής τους και τέλος επιχειρήθηκε η παροδική αποσιώπηση της έκφρασης τους με χρήση της τεχνολογίας RNAi. Στις επόμενες ενότητες θα αναπτυχθούν τα συμπεράσματα που προέκυψαν από τις παραπάνω πειραματικές διαδικασίες, μια εκτίμηση για τον πιθανό ρόλο των γονιδίων αυτών στο δάκο βάσει των υπάρχόντων δεδομένων καθώς και δεδομένων που έχουν προκύψει σε συγγενικά είδη και τέλος θα παρουσιαστούν ζητήματα προς περαιτέρω διερεύνηση.

5.1 Λειτουργική ανάλυση γονιδίων

Το πρώτο βήμα της λειτουργικής ανάλυσης είναι η μελέτη των προτύπων έκφρασης των διαφορετικών γονιδίων που προέκυψε από τα αποτελέσματα των Real-Time PCR, στα διαφορετικά στάδια της ζωής του εντόμου. Ως δείγματα χρησιμοποιήθηκαν αποκλειστικά ενήλικα έντομα, αρσενικού και θηλυκού φύλου, ηλικίας 4, 7, 10 και 11 ημερών. Τα άτομα 4^{ων} ημερών θεωρούνται σεξουαλικά ανώριμα, ενώ τα έντομα ηλικίας 7, 10 και 11 ημερών θεωρούνται σεξουαλικά ώριμα και άρα ικανά να εκλύσουν και να προσλάβουν φερομόνες. Τα άτομα 11^{ης} ημέρας είχαν συζευχθεί 12 ώρες πριν απομονωθεί το RNA τους, ενώ όλα τα έντομα είχαν διαχωριστεί την ημέρα της μεταμόρφωσής τους από νύμφη σε ενήλικο άτομο βάσει φύλου έχοντας τη δυνατότητα συνεχούς προσυζευκτικής επικοινωνίας, χωρίς να μπορούν να συζευχθούν.

Τα γονίδια που εξετάστηκαν ήταν οι οσμοδεσμευτικές πρωτεΐνες OBP76a, OBP19d και OBP83a οι οποίες έχουν συνδεθεί με την πρόσληψη των φερομονών σε μελέτες που έχουν διενεργηθεί

σε άλλα έντομα και γι' αυτό έχουν πάρει και τα ονόματα LUSH, PBP2 και PBP3 αντίστοιχα. Από τα αποτελέσματα των πειραμάτων, επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη και έκφραση των τριών αυτών γονιδίων στις κεραίες των εντόμων, ενώ από τα διαφορετικά πρότυπα έκφρασης που εμφάνισαν τα γονίδια μπορούν να προκύψουν ορισμένα συμπεράσματα.

5.1.1 LUSH

Επίπεδα έκφρασης γονιδίου: Το γονίδιο της πρωτεΐνης LUSH παρουσίασε παρόμοιο προφίλ έκφρασης στα άτομα αρσενικού και θηλυκού φύλου. Τα επίπεδα έκφρασης της είχαν μια αξιοσημείωτη αύξηση παράλληλη της σεξουαλικής ωρίμανσης των εντόμων. Τα ενήλικα άτομα δάκου που ανήκουν στον εργαστηριακό πληθυσμό θεωρείται πως ξεκινάνε να είναι σεξουαλικά ώριμα μεταξύ της 5^{ης} και της 7^{ης} μέρας, από τη μεταμόρφωσή τους. Από τη στιγμή που ωριμάζουν σεξουαλικά είναι σε θέση να συνθέσουν και να προσλάβουν τις σεξουαλικές φερομόνες, που θα συμβάλλουν στη σύζευξη και την αναπαραγωγή τους. Το γονίδιο της LUSH αυξάνεται το διάστημα εκείνο και συγκεκριμένα, από την 7^η έως τη 10^η μέρα ενήλικης ζωής του εντόμου η έκφραση της αυξάνεται 4 φορές στα θηλυκά άτομα και 4,5 φορές στα αρσενικά. Την 11^η μέρα, δε, αφού τα έντομα έχουν συζευχθεί για πρώτη φορά η έκφραση παρουσιάζει εμφανή μείωση. Τα δύο αυτά στοιχεία υποδηλώνουν πως η LUSH έχει ρόλο στην πρόσληψη των φερομονών του δάκου και στα δύο φύλα. Υπενθυμίζεται, πως το κάθε φύλο εκκρίνει διαφορετική φερομόνη για να προσελκύσει το ταιρί του. Τα θηλυκά έντομα εκκρίνουν την *Olean*, ενώ τα αρσενικά τη *Muscalure*. (για περισσότερα, βλέπε: ενότητα 1.4).

Δεδομένα από άλλα έντομα: Αντίστοιχα συμπεράσματα έχουν προκύψει για άλλα είδη εντόμων, καθώς η LUSH είναι η πλέον διαδεδομένη πρωτεΐνη που έχει συνδεθεί με την πρόσληψη των φερομονών στα έντομα. Η πρώτη αναφορά για το ρόλο της LUSH έγινε πάνω σε μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στη *Drosophila melanogaster*, όπου και ταυτοποιήθηκε πως η LUSH είναι η πρωτεΐνη η οποία προσδένεται και μεταφέρει τη φερομόνη cVA που προσλαμβάνουν τα αρσενικά άτομα, στο σύμπλεγμα του υποδοχέα OR67d και του συνυποδοχέα Orco (Xu et al, 2005). Επόμενες μελέτες, δε, προσδιόρισαν με μεγαλύτερη λεπτομέρεια το μηχανισμό δράσης της στη *Drosophila* (Laughlin et al, 2008; Ronderos & Smith, 2010). Σε πιο συγγενικά στο δάκο έντομα, όπως αυτά της οικογένειας των Tephritidae έχουν εντοπιστεί ομόλογα γονίδια της LUSH, όπως π.χ. στη μύγα του πεπονιού, *Bactrocera cucurbitae* (Elfekih et al, 2016). Στο δε έντομο *Bactrocera dorsalis*, το οποίο επίσης ανήκει στην οικογένεια των Tephritidae το γονίδιο της LUSH εντοπίστηκε να εκφράζεται αποκλειστικά στις κεραίες, ενώ παρουσίαζε υψηλότερες τιμές έκφρασης στα αρσενικά έντομα, υποδηλώνοντας πιθανή συσχέτιση του με την πρόσληψη των θηλυκών φερομονών (Wu et al, 2015).

Πιθανός ρόλος γονιδίου: Από τα αποτελέσματα μας και τα δεδομένα από άλλα έντομα προκύπτει πως πιθανώς η LUSH στο δάκο έχει ρόλο στην πρόσληψη των φερομονών και στα αρσενικά και στα θηλυκά άτομα.

5.1.2 PBP2

Επίπεδα έκφρασης γονιδίου: Το γονίδιο της πρωτεΐνης PBP2 (ή OBP19d) παρουσίασε παρόμοιο προφίλ έκφρασης στα αρσενικά και τα θηλυκά άτομα. Παρατηρείται μια αύξηση των

επιπέδων έκφρασης παράλληλη της σεξουαλικής ωρίμανσης του εντόμου, η οποία είναι πιο έντονη στα αρσενικά άτομα. Η αύξηση αυτή συνεχίζει και μετά τη σύζευξη και στα αρσενικά και στα θηλυκά άτομα, με τα επίπεδα έκφρασης να φτάνουν στις υψηλότερες τιμές τους. Στα αρσενικά άτομα η έκφραση την 11^η μέρα είναι περίπου 4 φορές υψηλότερη σε σχέση με την 4^η, ενώ στα θηλυκά περίπου 3 φορές. Η αύξηση της έκφρασης μετά από τη σύζευξη υποδηλώνει πως ο PBP2 ενδεχομένως έχει ρόλο μετασυζευκτικό. Στα μεν αρσενικά είναι γνωστό πως ορισμένες πρωτεΐνες μεταδίδονται κατά τη σύζευξη στα θηλυκά μαζί με το σπέρμα προκειμένου, ενδεχομένως, να καταστείλουν επόμενη σύζευξη των θηλυκών ατόμων. Στα θηλυκά παρατηρείται πως τα επίπεδα έκφρασης μεταξύ της 4^{ης} και της 10^{ης} ημέρας έχουν μικρή αύξηση, περίπου 1,5 φορά, ωστόσο από τη 10^η στην 11^η μέρα, μετά τη σύζευξη των θηλυκών, τα επίπεδα αυξάνονται περίπου 2 φορές. Το παραπάνω ενδεχομένως να υποδηλώνει πως το γονίδιο έχει ρόλο στην ωοαπόθεση, στον εντοπισμό δηλαδή του κατάλληλου υποστρώματος στο οποίο θα εναποθέσει το έντομο τα αυγά του. Δεν αποκλείεται βέβαια το γονίδιο να έχει ρόλο και στη σεξουαλική επικοινωνία των εντόμων, μέσω της ανταλλαγής φερομονών, να έχει δηλαδή πλειοτροπική δράση.

Δεδομένα από άλλα έντομα: Ο PBP2 έχει μελετηθεί εκτενώς στη *Drosophila melanogaster* και βάσει ορισμένων πειραματικών παρατηρήσεων του έχουν αποδοθεί πιθανοί ρόλοι. Αρχικά, έχει προταθεί πως εμπλέκεται στην απενεργοποίηση, απομάκρυνση των οσμών, τον καθαρισμό και την αποτοξικοποίηση (detoxification) της λέμφου στις κεραίες αλλά και σε άλλους ιστούς, αφού πραγματοποιήσουν τη μεταγωγή του σήματος. Το παραπάνω συμπέρασμα προκύπτει αφενός λόγω της παραγωγής και παρουσίας του PBP2, όχι μόνο σε τριχίδια που σχετίζονται με την όσφρηση αλλά και σε άλλα τα οποία δεν έχουν σχέση, όπως τα γευστικά τριχίδια του κεφαλιού και των ποδιών (Pikielny et al, 1994), ενώ ακόμα και στα αισθητικά τριχίδια της όσφρησης έχει παρατηρηθεί πως ο PBP2 δεν προσεγγίζει την επιφάνεια των αισθητικών δενδριτών και άρα δεν μεταφέρει οσμές και φερομόνες προς αυτούς (Shanbhag et al, 2001). Αντίστοιχα συμπεράσματα έχουν προκύψει και στη μύγα (black blowfly) *Phormia regina* (Ozaki et al, 1993). Επιπλέον, στη *Drosophila melanogaster* έχει παρατηρηθεί αύξηση της έκφρασης του PBP2 σε θηλυκά άτομα μετά τη σύζευξη, υποδηλώνοντας ρόλο στην ωοαπόθεση ή σε μετασυζευκτικές αλλαγές στην ελκυστικότητα και τη δεκτικότητα της στα αρσενικά (McGraw et al, 2004; Zhou et al, 2009). Σε άλλη μελέτη, πολυμορφισμοί στο γονίδιο του PBP2 έχουν συνδεθεί με τη διάρκεια ζωής του εντόμου, ενδεχομένως λόγω σημασίας που του έχει αποδοθεί στην ανίχνευση θρεπτικών συστατικών και στις φυσιολογικές διαδικασίες μεταγωγής σήματος (synaptic transmission) (Arya et al, 2010).

Πέρα από τη *Drosophila* το γονίδιο PBP2 έχει μελετηθεί και στο έντομο *Bactrocera dorsalis*, όπου εντοπίστηκε πως η έκφραση του δεν περιορίζεται στις κεραίες, αλλά παρατηρείται σε αρκετούς μη-αισθητικούς ιστούς και άρα ενδεχομένως ο ρόλος του είναι ευρύτερος από τη συμβολή του στην οσφρητική διαδικασία (Wu et al, 2015). Στη μεσογειακή μύγα, *Ceratitis capitata*, η οποία επίσης ανήκει στην οικογένεια των Tephritidae, λειτουργική ανάλυση του γονιδίου PBP2 έδειξε πως το γονίδιο εκφράζεται στις κεραίες και τις γναθικές προσακτρίδες των ώριμων σεξουαλικά ατόμων και των δύο φύλων, με τα θηλυκά να εμφανίζουν υψηλότερες τιμές έκφρασης. Επιπλέον, στα θηλυκά η έκφραση του αυξάνεται σταδιακά κατά την ωρίμανση του εντόμου, χωρίς να αλλάζει κάτι μετά τη σύζευξη. Στα αρσενικά, τα επίπεδα έκφρασης δεν επηρεάζονται ιδιαίτερα κατά τη σεξουαλική ωρίμανση του εντόμου, ενώ μετά τη σύζευξη παρατηρείται μια ελαφριά μείωση (Siciliano et al, 2014a).

Πιθανός ρόλος γονιδίου: Από τα αποτελέσματα μας και τα δεδομένα από άλλα έντομα προκύπτει πως πιθανώς ο PBP2 έχει πλειοτροπικό ρόλο στο δάκο, με δράση κυρίως μετά τη σύζευξη στην εύρεση των απαραίτητων θρεπτικών, στον καθορισμό της ελκυστικότητας των εντόμων ή στην εύρεση υποστρώματος για των ωοαπόθεση.

5.1.3 PBP3

Επίπεδα έκφρασης γονιδίου: Το τελευταίο γονίδιο του οποίου η έκφραση εξετάστηκε σε αρσενικά και θηλυκά άτομα δάκου ήταν το PBP3 (ή OBP83a). Το γονίδιο αυτό παρουσίασε διαφορές στα αρσενικά και τα θηλυκά άτομα. Στα θηλυκά η έκφραση του φαίνεται σταθερή μεταξύ της 4^{ης} και της 7^{ης} μέρας, ενώ από τη 10^η ξεκινάει μια αύξηση η οποία συνεχίζεται και μετά την σύζευξη του εντόμου την 11^η μέρα. Τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου την 11^η μέρα είναι περίπου 3 φορές υψηλότερα σε σχέση με την 4^η. Στα αρσενικά άτομα το γονίδιο έχει μια συνεχή αύξηση της έκφρασης του παράλληλη με την σεξουαλική του ωρίμανση. Την 7^η μέρα το γονίδιο εκφράζεται 2,5 φορές και τη 10^η 4 φορές περισσότερο σε σχέση με την 4^η μέρα. Το εντυπωσιακό στοιχείο, ωστόσο, είναι η κατακόρυφη αύξηση που εμφανίζεται μετά τη σύζευξη των αρσενικών, με την έκφραση τους να αυξάνεται μεταξύ 10^{ης} και 11^{ης} μέρας 7 φορές. Η έντονη αυτή διαφορά υποδηλώνει πως το γονίδιο PBP3 παίζει έντονο ρόλο στη μετασυζευκτική συμπεριφορά των αρσενικών ατόμων. Εξάλλου, το γονίδιο βλέπουμε πως και στα δύο φύλα έχει μια συνεχή αύξηση ανάλογη της σεξουαλικής του ωρίμανσης.

Δεδομένα από άλλα έντομα: Το γονίδιο PBP3 έχει αναλυθεί σε διάφορες εργασίες στη φρουτόμυγα *Drosophila melanogaster*, όπως και στα συγγενικά είδη του δάκου *Bactrocera dorsalis* και *Ceratitis capitata*. Στη *Drosophila* έχει εντοπιστεί πως το γονίδιο αυξάνει τα επίπεδα έκφρασης του στα θηλυκά άτομα μετά τη σύζευξη, πιθανώς ως αποτέλεσμα της μεταφοράς σπέρματος (McGraw et al, 2004). Επίσης, έχει βρεθεί πως κατά τη διάρκεια της φάσης της επαφής, ενός σταδίου πριν τη σύζευξη κατά το οποίο τα δυο έντομα ανταλλάσσουν σιναάλα και παρατηρούν τις αντιδράσεις (courtship song) στα θηλυκά αυξάνεται η έκφραση του γονιδίου PBP3 (Immonen & Ritchie, 2012).

Στη μεσογειακή μύγα *Ceratitis capitata* εντοπίζονται δύο ομόλογα γονίδια στο αντίστοιχο της *Drosophila* πιθανώς λόγω διπλασιασμού του γονιδίου. Τα δύο γονίδια ονομάζονται CcapOBP83a-1 και CcapOBP83a-2. Και τα δύο είναι παρόντα μόνο στα οσφρητικά όργανα, τις κεραίες και τις γναθικές προσακτρίδες με μεγαλύτερα επίπεδα έκφρασης να παρατηρούνται στις κεραίες, και στα δύο φύλα. Στη συνέχεια σε σύγκριση ανώριμων σεξουαλικά ατόμων 1^{ης} μέρας σε σύγκριση με ώριμα σεξουαλικά άτομα 4^{ης} μέρας διαπιστώθηκε πως στα θηλυκά άτομα η σεξουαλική ωρίμανση οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου, με την αύξηση του OBP83a-1 να είναι 2 φορές, ενώ η αντίστοιχη του OBP83a-2 είναι 3 φορές. Αντίστοιχα, στο αρσενικό η σεξουαλική ωρίμανση οδηγεί σε μια μικρή αύξηση 1,5 φορές στην έκφραση του OBP83a-1 και μια μεγαλύτερη αύξηση περίπου 3 φορές στο OBP83a-2. Επιπλέον, στα άτομα 4^{ων} ημερών μετά από σύζευξη παρατηρείται μικρή μείωση της έκφρασης στα αρσενικά και για τα δύο γονίδια, ενώ τα επίπεδα έκφρασης των θηλυκών παραμένουν ίδια (Siciliano et al, 2014a). Σε περαιτέρω έρευνα ο CcapOBP83a-2 συνδέθηκε με την πρόσληψη της (E,E)-α-farnesene, ενός από τα 5 συστατικά της φερομόνης που εκκρίνουν τα αρσενικά άτομα της μεσογειακής μύγας, όπως επίσης και της συνθετικής οσμής που ελκύει το έντομο, Trimedlure (Siciliano et al, 2014b). Από τα παραπάνω προκύπτει πως πιθανός ρόλος των

CcarOBP83a-1 και CcarOBP83a-2 είναι η αναγνώριση φερομονών ή οσμών που προέρχονται από φυτά ξενιστές. Τέλος, στο *Bactrocera dorsalis* εντοπίστηκαν επίσης 2 ομόλογα γονίδια, τα BdorOBP83a-1 και BdorOBP83a-2, όπου σε ενήλικα ώριμα άτομα 6^{ης} μέρας το BdorOBP83a-2 παρουσιάζει αυξημένα επίπεδα έκφρασης στις κεραίες των αρσενικών ατόμων, έναντι του BdorOBP83a-1 που εμφάνιζε αντίστοιχες τιμές μεταξύ θηλυκών και αρσενικών (Wu et al, 2015).

Πιθανός ρόλος γονιδίου: Από τα αποτελέσματα μας και τα δεδομένα από άλλα έντομα προκύπτει πως πιθανώς ο PBP3 έχει ρόλο σχετικό με τη σεξουαλική ωρίμανση του δάκου. Αυτός μπορεί να είναι η πρόσληψη των φερομονών ή των άλλων σημάτων που οδηγούν στη σύζευξη, όπως επίσης και στη μετασυζευκτική συμπεριφορά των εντόμων.

5.2 Παροδική αποσιώπηση γονιδίων

Για την περαιτέρω μελέτη των τριών προς εξέταση γονιδίων (LUSH, PBP2, PBP3) διενεργήθηκαν πειράματα παροδικής αποσιώπησης της έκφρασης τους με χρήση της τεχνολογίας RNAi. Το dsRNA του εκάστοτε γονιδίου εισήχθη με μικροέγχυση σε αρσενικά και θηλυκά έντομα 6^{ης} μέρας και η επίδραση του στο γονίδιο-στόχο εξετάστηκε την 7^η και τη 10^η μέρα, ημέρες που είχε γενικά παρατηρηθεί αύξηση της έκφρασης των γονιδίων λόγω σεξουαλικής ωρίμανσης των εντόμων. Η μικροέγχυση (microinjection) αποτελεί την πιο διαδεδομένη μέθοδο εισαγωγής του dsRNA στη μοριακή εντομολογία, καθώς το dsRNA εισχωρεί απευθείας στη λέμφο του εντόμου. Εφαρμόστηκε αρχικά στη *Drosophila melanogaster* με σκοπό την αποσιώπηση του γονιδίου *frizzled* (Kennerdell & Carthew, 1998) και έκτοτε έχει εφαρμοστεί σε πληθώρα εντόμων όλων των τάξεων, όπως π.χ. το σκαθάρι *Triboleum castaneum* (Brown et al, 1999), το κουνούπι *Anopheles gambiae* (Blandin et al, 2002) και άλλα. Οι άλλες κύριες μέθοδοι εισαγωγής του dsRNA στα έντομα είναι δια της στοματικής οδού μέσω της τροφής και μέσω εμβάπτισης (soaking) του εντόμου με διάλυμα που να περιλαμβάνει το dsRNA, ενώ έχουν αναπτυχθεί και πληθώρα εναλλακτικών προσεγγίσεων (για επισκόπηση: Yu et al, 2013).

Στο δάκο της ελιάς πραγματοποιήσαμε σε ομάδες (pool) 8 εντόμων την αποσιώπηση των τριών γονιδίων, μέσω μικροέγχυσης την 6^η μέρα ζωής του εντόμου, ενώ για κάθε δείγμα το οποίο είχε υποστεί RNAi υπήρχε και ένα control προκειμένου να συγκριθούν τα επίπεδα έκφρασης του εκάστοτε γονιδίου. Από τα πειράματα προκύπτουν ορισμένα συμπεράσματα, τα οποία θα αναπτυχθούν για κάθε γονίδιο χωριστά.

Αποσιώπηση LUSH: Το γονίδιο της LUSH παρουσίασε αξιόλογη μείωση της έκφρασης του ως αποτέλεσμα της εισαγωγής του dsRNA και στα αρσενικά και στα θηλυκά άτομα. Στα αρσενικά παρατηρείται μια μείωση η οποία μεγαλώνει σταδιακά, με τα επίπεδα του γονιδίου την 7^η ημέρα να είναι μειωμένα κατά 35% και την 10^η κατά 50%. Στα θηλυκά, όπου επίσης η έκφραση του γονιδίου μειώνεται, η επίδραση αποτυπώνεται πιο έντονα καθώς την 7^η μέρα η μείωση είναι της τάξης του 60% και την 10^η είναι περίπου 90%.

Η παρατηρούμενη μείωση των τιμών της έκφρασης της LUSH στα άτομα και των δύο φύλων υποδεικνύει την επιτυχία της μεθόδου για το γονίδιο αυτό. Ως εκ τούτου, διαπιστώνουμε πως η μικροέγχυση πέτυχε τη μεταφορά του dsRNA στον επιθυμητό ιστό της κεραίας και πως οι εκκινήτες και η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την παρασκευή του dsRNA ήταν

επιτυχημένα. Ως εκ τούτου, τα παραπάνω δύναται να χρησιμοποιηθούν σε πειράματα αντίστροφης γενετικής για την μελέτη της επίδρασης της καταστολής του γονιδίου LUSH στη σεξουαλική και αναπαραγωγική συμπεριφορά του δάκου.

Αποσιώπηση PBP2: Οι αλλαγές στην έκφραση του γονιδίου PBP2 εξετάστηκαν μόνο σε αρσενικά άτομα στα οποία και παρατηρήθηκε σημαντική μείωση. Στα άτομα 7^{ης} μέρας η αποσιώπηση ήταν στο 70%, ενώ στα άτομα 10^{ης} μέρας η αποσιώπηση έφτασε το 90%. Το αποτέλεσμα υποδηλώνει την επιτυχία της μεθόδου και τη δυνατότητα χρήσης της σε περαιτέρω πειράματα αποσιώπησης του PBP2.

Αποσιώπηση PBP3: Η αποσιώπηση του γονιδίου PBP3 εξετάστηκε σε αρσενικά και θηλυκά άτομα δάκου, χωρίς να παρατηρείται σε όλα τα δείγματα μείωση. Συγκεκριμένα, στα αρσενικά άτομα 7^{ης} μέρας το δείγμα με τα έντομα τα οποία είχαν ενεθεί με το dsRNA παρουσίασαν αύξηση στην έκφραση του γονιδίου σε σχέση με τα control στα οποία δεν υπήρχε dsRNA για το PBP3. Το αποτέλεσμα αυτό, ωστόσο, δεν επανελήφθη στα αρσενικά άτομα 10^{ης} μέρας, τα οποία παρουσίασαν αποσιώπηση του PBP3 της τάξης του 65%. Αντίστοιχα, στα θηλυκά άτομα στα οποία επιχειρήθηκε αποσιώπηση τα αποτελέσματα έδειξαν επιτυχία των πειραμάτων καθώς τα άτομα 7^{ης} ημέρας εμφάνισαν μειωμένη έκφραση του γονιδίου κατά 75% και τα άτομα 10^{ης} ημέρας κατά 90%.

Η μέθοδος σε γενικές γραμμές είχε επιτυχία στην περίπτωση της αποσιώπησης του PBP3, καθώς στην πλειοψηφία των δειγμάτων επετεύχθη η αποσιώπηση, ωστόσο το αποτέλεσμα του δείγματος με τα αρσενικά άτομα 7 ημερών δημιουργεί ορισμένους δισταγμούς. Το αποτέλεσμα αυτό μπορεί να οφείλεται σε τεχνικό λάθος κατά την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων της Real-Time PCR. Από την άλλη, μπορεί να οφείλεται σε βιολογικό παράγοντα, δηλαδή η εισαγωγή του dsRNA και η αρχική καταστολή στην έκφραση να οδήγησε τον οργανισμό σε υπερέκφραση του γονιδίου για να αντισταθμίσει τη μείωση, οπότε να οδήγησε τελικά σε επικράτηση επί του dsRNA, σε ένα μηχανισμό ανατροφοδότησης (feedback). Παρά το προαναφερθέν αρνητικό αποτέλεσμα συνολικά μπορούμε να θεωρήσουμε πως η μέθοδος ήταν επιτυχημένη και άρα μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε περαιτέρω πειράματα.

5.3 Συμπεράσματα από τη μικροέγχυση του dsRNA στο δάκο

Η εφαρμογή της τεχνικής RNAi στο δάκο με σκοπό την αποσιώπηση των γονιδίων LUSH, PBP2 και PBP3 κρίνεται επιτυχημένη. Στα περισσότερα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της έκφρασης και για τα τρία γονίδια, ενώ η μείωση αυτή σε γενικές γραμμές αυξανόταν με το πέρασμα των ημερών, υποδηλώνοντας πως τα dsRNA που συντέθηκαν ήταν αρκετά σταθερά και δεν αποικοδομήθηκαν από τα ένζυμα του οργανισμού. Επίσης, η παρατηρούμενη μείωση δείχνει πως η ποσότητα dsRNA που χρησιμοποιήθηκε ήταν αρκετή ώστε να μπλοκάρει να μετάγραφα των γονιδίων που είχαν εκφράσει τα έντομα. Επιπλέον, μετά τη διαδικασία της ένεσης για τη μικροέγχυση δεν υπήρξε αξιοσημείωτος αριθμός εντόμων που να αποβιώσουν, γεγονός που υποδηλώνει πως οι οπές που δημιουργούνται στο θώρακα των εντόμων δεν είναι επικίνδυνες για τη σωματική τους ακεραιότητα και επιβίωση.

Τέλος, με αφορμή την αποτυχία αποσιώπησης του γονιδίου PBP3 στο δείγμα αρσενικών ατόμων 7 ημερών, θα αναφερθούν πιθανές αιτίες αποτυχίας της μεθόδου, εξαιρουμένου του

τεχνικού λάθους. Τα αίτια αποτυχίας της μικροέγχυσης dsRNA ενδέχεται να οφείλονται σε παραμέτρους σχετικές με το είδος, τον τύπο του ιστού ή το ίδιο το γονίδιο. Κατ' αρχάς ορισμένα είδη είναι πιο δεκτικά σε "ξένα" dsRNA και άλλα λιγότερο, με αποτέλεσμα να τα αποικοδομούν σε διαφορετικό βαθμό. Τα, δε, πυρηνικά γονίδια που είναι απαραίτητο να εκφραστούν για την επεξεργασία του dsRNA και την ενεργοποίηση του μηχανισμού μπορεί να μην ανταποκρίνονται. Οι ιστοί από την άλλη δεν έχουν την ίδια διαπερατότητα σε κάθε οργανισμό, οπότε μια επιτυχημένη μικροέγχυση σε έναν οργανισμό μπορεί να μην καταστεί εφικτή σε έναν άλλο καθώς δε θα μπορεί να διαπεράσει τους ιστούς του το dsRNA. Το ίδιο μπορεί να συμβεί και μεταξύ των ιστών του ίδιου οργανισμού, να μπορεί δηλαδή το διάλυμα μέσω της λέμφου να προσεγγίσει έναν ιστό, αλλά όχι έναν άλλο. Ο κάθε ιστός, δε, ενδέχεται να εκφράζει σε διαφορετικά επίπεδα τα πυρηνικά γονίδια που εμπλέκονται στο RNAi, οπότε ακόμα και αν έχει εισαχθεί αρκετή ποσότητα και έχει φτάσει στον ιστό να μη μπορεί να δράσει καθώς δε θα μπορεί να σχηματίσει τα απαραίτητα σύμπλοκα, όπως το RISC. Σε ότι αφορά το γονίδιο, το πρώτο που χρειάζεται να αναφερθεί είναι πως ένα dsRNA, λόγω διαφορών στα δομικά του χαρακτηριστικά, μπορεί να είναι πιο εύκολο να αποικοδομηθεί σε σχέση με ένα άλλο. Το mRNA δε μπορεί να προστατεύεται από RNases και γι' αυτό να μην είναι εφικτό το dsRNA τελικά να οδηγήσει στην αποικοδόμηση του. Τελευταίο είναι το ενδεχόμενο η είσοδος του dsRNA και η έναρξη της αποσιώπησης να προκαλέσει ανατροφοδότηση των μηχανισμών μεταγραφής του κυττάρου και να ξεκινήσει να υπερεκφράζει το γονίδιο-στόχο σε βαθμό που να ξεπεράσει η υπερέκφραση τα επίπεδα της αποσιώπησης (για επισκόπηση: Bellés, 2010).

5.4 Επίλογος – Μελλοντικές προοπτικές

Τα παραπάνω πειραματικά δεδομένα αποτέλεσαν μια προσπάθεια για τον εντοπισμό των μοριακών στοιχείων που εμπλέκονται στην πρόσληψη των φερομονών στο δάκο της ελιάς καθορίζοντας έτσι τη σεξουαλική και αναπαραγωγική του συμπεριφορά. Οι αλληλουχίες που μελετήθηκαν πρέπει να εξεταστούν περαιτέρω σε επίπεδο τρανσκριπτόματος για να υπολογιστούν τα ποσοστά έκφρασης σε επιπλέον συνθήκες και άλλα στάδια του βιολογικού τους κύκλου, όπως π.χ. κατά την ωοαπόθεση. Η επιτυχία της αποσιώπησης των γονιδίων ανοίγει το δρόμο σε περαιτέρω πειράματα αντίστροφης γενετικής και μελέτης της επίδρασης της καταστολής της έκφρασης των γονιδίων στις αποκρίσεις του εντόμου. Αυτό μπορεί να συμβεί αρχικά μέσω πειραμάτων ηλεκτροφυσιολογίας όπως είναι το EAG (Electroantennography), κατά το οποίο μελετάται η διέγερση συγκεκριμένων νευρώνων από μια φερομόνη ή μια οσμή. Αναγκαία, δε, είναι η μελέτη και σε πρώιμο πρωτεϊνικό επίπεδο, μέσω του σχεδιασμού πιθανών τριτοταγών δομών για τις πρωτεΐνες-στόχο και μελέτη της αλληλεπίδρασης τους με τις φερομόνες, των οποίων η χημική σύσταση είναι γνωστή.

Περαιτέρω ανάλυση του οσφρητικού συστήματος του δάκου, σε συνδυασμό με πιο προηγμένες και στοχευμένες πειραματικές διαδικασίες (π.χ. ολική τρανσκριπτομική ανάλυση των οσφρητικών ιστών), είναι βέβαιο πως θα αναδείξουν στοιχεία χρήσιμα στην κατανόηση της ακριβούς λειτουργίας των γονιδίων που έχουν ήδη εντοπιστεί καθώς και στην ανακάλυψη νέων. Έτσι, θα μπορέσουμε να διαλευκάνουμε τον ακριβή ρόλο του συστήματος αυτού στις μοναδικές φυσιολογικές λειτουργίες του δάκου, όπως είναι η αναγνώρισης των δύο φερομονών (*Olean*, *Muscalure*) από τα αρσενικά και τα θηλυκά άτομα ή η απόθεση των αυγών

αποκλειστικά στον καρπό της ελιάς. Επιπλέον, η διαθεσιμότητα νέων μοριακών δεδομένων θα συμβάλει στην ουσιαστικότερη και φιλικότερη, προς το περιβάλλον και τον άνθρωπο, αντιμετώπιση του εντόμου είτε μέσω των κλασσικών μεθόδων (παγίδες), είτε μέσω των πιο προηγμένων μοριακών τεχνικών (SIT-RIDL).

6. Παράρτημα

6. Παράρτημα

6.1 Μέθοδος σύγκρισης των C_T

Η κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων των Real-Time PCR πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο Livak (Livak & Schmittgen, 2001). Για την πραγματοποίηση της μεθόδου είναι απαραίτητη η ύπαρξη τουλάχιστον δύο δειγμάτων καθώς και ενός γονιδίου αναφοράς, πέρα από τα γονίδια στόχους. Ο υπολογισμός των κανονικοποιημένων τιμών γίνεται από τις παρακάτω εξισώσεις:

$$\Delta C_{T(\text{test})} = C_{T(\text{target, test})} - C_{T(\text{ref, test})}$$

$$\Delta C_{T(\text{calibrator})} = C_{T(\text{target, calibrator})} - C_{T(\text{ref, calibrator})}$$

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T(\text{test})} - \Delta C_{T(\text{calibrator})}$$

$$2^{-\Delta\Delta C_T} = \text{Κανονικοποιημένος λόγος έκφρασης (Normalized expression ratio)}$$

[ως target αναφέρεται το γονίδιο-στόχος, ως ref το γονίδιο αναφοράς, ως test το προς εξέταση δείγμα, ως calibrator το δείγμα σε σχέση με το οποίο θα υπολογιστεί η έκφραση του test δείγματος]

6.2 Απόδοση των εκκινητών (efficiency)

Προτού πραγματοποιηθεί ένα πείραμα Real-Time PCR οι εκκινητές εξετάζονται για την απόδοση και την πιστότητα τους. Η εξέταση πραγματοποιείται μέσω ενίσχυσης με Real-Time PCR διαδοχικών αραιώσεων του ίδιου δείγματος με τους εκκινητές και δημιουργίας πρότυπης καμπύλης της μορφής $y=ax+\beta$.

Από την καμπύλη προκύπτει η κλίση (slope) και βάσει αυτής υπολογίζεται η τιμή του efficiency ως εξής:

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

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

Επίσης, από την πρότυπη καμπύλη προκύπτει η τιμή R^2 , η οποία προκύπτει από το πόσο αντιστοιχούν οι πραγματικές τιμές των σημείων στην πρότυπη καμπύλη.

Οι δύο αυτές τιμές, το %Efficiency και το R^2 είναι οι δύο τιμές βάσει των οποίων εξετάζεται η αξιοπιστία των εκκινητών. Η ιδανική τιμή για το %E είναι το 100%, ωστόσο αποδεκτές είναι οι τιμές στο εύρος 90%-105%. Αντίστοιχα η ιδανική τιμή για το R^2 είναι το 1, με αποδεκτές τις τιμές >0,980. Για τους primers των γονιδίων που χρησιμοποιήσαμε οι τιμές ήταν:

- **LUSH:** %E=92,3% και $R^2=0,992$
- **PBP2:** %E=98,3% και $R^2=0,985$
- **PBP3:** %E=97,6% και $R^2=0,994$

6.2 Αλληλουχίες εκκινητών της Real-Time PCR

Οι αλληλουχίες που σχεδιάστηκαν για τους εκκινητές των Real-Time PCR ήταν οι παρακάτω:

Γονίδιο	Αλληλουχία εκκινητή	Θερμοκρασία T _a	Αναμενόμενο προϊόν
LUSH	F: CATAGCACAACCTGGCAGGAACG	55 ⁰ C	111bp
	R: TCCTTAGCAGCGTTTGCATCTC		
PBP2	F: GTACTTCTTGGTCTTTCTGG	55 ⁰ C	147bp
	R: TATTTGAACACTCCTGCTAC		
PBP3	F: ACAGAGGAGGCAATTAAG	55 ⁰ C	114bp
	R: ATCACCGTTATCATCCAC		

6.3 Νουκλεοτιδικές και αμινοξικές αλληλουχίες LUSH, PBP2, PBP3

Οι μεταγραφόμενες αλληλουχίες του δάκου, για τα γονίδια LUSH, PBP2 και PBP3 όπως προέκυψαν από τα RNA seq δεδομένα είναι οι παρακάτω:

LUSH:

ATGTGTTTGAATAAATGCATTAAATATTTTTAACTTTATTAGCATGCACAGGTGTTAGTGCGATAAC
AATGCAGCAATTTGAAACCTCCTTAGACATGATGCGCAATGGCTGTACACCAAAATTCAAAGTCCCAATC
GAAATATTGGATAATTTACGAGCTGGCGAGTTTATAGAAAACAATGGCGAATTGAAGTGTTATACCAGGT
GCATAGCACAACCTGGCAGGAACGGTAACTAAAAAAGGAGAATTTAGCGTGCAAAAAGCATTAGCACAAA
TTCCAATTATATTACCACCTGAGATGCAAAACGCTGCTAAGGAAGCTTTGATTGCTTGTAAGGATGTTCAA
AAAGCTTATAAGGACTCATGCGATAAGGTCTTCTATACAACAAATGTGTGCGCGACTATGATCCAAGTA
CTTTTAAATTTCCATAA

PBP2:

ATGAAGTACTTCTTGGTCTTTCTGGCTATCTGCAGTTTAGTCATCTCCTTTAGTGAGGCAGAAGAATTTTG
GAGAAAAGTTAAGAAAATCGCTGAAGAATGTAAAGTCCAAGTTGGTGCAAGTGATGAGGATGTAGCAGG
AGTGTTCAAATATGAACCGGCAGCTAATGACAAAGCAAAGTGCTTAATGCCTGCTGCATGCAAAAACCTG
GGTATTTTGGATGAAAATCACAAGCTGGTCGAAGCTGGAGCTATAGAGTACATAAAGCAGGTAGCCGCT
GGGGATGCAGAGTATGAGAAGCAGAGCATGGAGGTTCTTAACGAATGCAAGAACAACCTCCGAAAGTAG
CAATGAATGTGAGTACGCTGAAGCTTTTCGTGTATGCGTTATCGAGAGTTCGAAGTCCAAAGGCATTAAG
ATTTTACCTCAA

PBP3:

AATTATGTCGCCCTGTCGTCATCGCTAACTCTGATGCACGTACAGGCACAGGAACCGCGACGTGACGACA
AATGGCCGCCACCAGCCGTCCTGAAAATGGCCAAAATATTCCACGATATATGCGTTGAGAAAACCTGGGGT

CACAGAGGAGGCAATTAAGGAATTCAGTGATGGCCAAATACACGAAGACGAGGCGCTCAAGTGCTACAT
GAATTGCTTGTTCATGAAATCGATGTGGTGGATGATAACGGTGATGTTCATCTGGAAACCCTCTTTAACA
CCGTACCGGGTACCGTACGGAACCAACTGATAAATATGGCAAAGGACTGTGAGCATCCAGAAGGTGACA
CGCTGTGCCACAAAGCATGGTGGTTCATCAATGTTGGAAGAAGGCCGATCCAGTTCATTATTTCTTACCA
TAG

Οι αντίστοιχες αμινοξικές αλληλουχίες των LUSH, PBP2 και PBP2 είναι οι παρακάτω:

LUSH:

MCLKINALKYFLTLLACTGVSAITMQQFETSLDMMRNGCTPKFKVPIEILDNLRAFEIENNGELKCYTRCIAQL
AGTVTKKGEFSVQKALAQIPILPPEMQNAAKEALICKDVQKAYKDSCDKVFYTTKCVRDYDPSTFKFP

PBP2:

MKYFLVFLAICSLVISFSEAEFLEKVKKIAEECKVQVGASDEDVAGVFKYEPAANDKAKCLNACCMQKLGILDE
NHLVEAGAIEYIKQVAAGDAEYEQSMLEVLNECKNTPESSNECEYAEAFRCVIESSKSKGIKILPQ

PBP3:

MALIGIWRCQAFHAFILVALSSSLTLMHVQAQEPRRDDKVRNIHLKNISTFXSEAIKEFSQGQIHEDEALKCY
MNCLEFHEIDVVDNDGVDHLETLFNTVPGTVRNQLINMAKDCEHPEGDTLCHKAWWFHQCWKKADPVHYF
LP

6.4 Αλληλουχίες amplicon και εκκινητών dsRNA

Οι αλληλουχίες (amplicon) βάσει των οποίων σχεδιάστηκαν οι εκκινητές του dsRNA είναι οι ακόλουθες:

LUSH (373nt)

ATGCACAGGTGTTAGTGCGATAACAATGCAGCAATTTGAAACCTCCTTAGACATGATGCGCAATGGCTGT
ACACCAAAATTCAAAGTCCCAATCGAAATATTGGATAATTTACGAGCTGGCGAGTTTATAGAAAACAATG
GCGAATTGAAGTGTTATACCAGGTGCATAGCACAACGGCAGGAACGGTAACTAAAAAAGGAGAATTTA
GCGTGCAAAAAGCATTAGCACAAATTCGAATTATATTACCACCTGAGATGCAAAACGCTGCTAAGGAAGC
TTTGATTGCTTGTAAGGATGTTCAAAAAGCTTATAAGGACTCATGCGATAAGGTCTTCTATACAACAAAT
GTGTGCGCGACTATGATCCAAGT

PBP2 (407nt)

TTGGTCTTTCTGGCTATCTGCAGTTTAGTCATCTCCTTAGTGAGGCAGAAGAATTTTGGAGAAAGTTAA
GAAAATCGCTGAAGAATGTAAAGTCCAAGTTGGTGCAAGTGATGAGGATGTAGCAGGAGTGTTCAAATA
TGAACCGGCAGCTAATGACAAAGCAAAGTGTCTTAATGCCTGCTGCATGCAAAAACCTGGGTATTTTGGAT
GAAAATCACAAGCTGGTCGAAGCTGGAGCTATAGAGTACATAAAGCAGGTAGCCGCTGGGGATGCAGA

GTATGAGAAGCAGAGCATGGAGGTTCTTAACGAATGCAAGAACACTCCGGAAAGTAGCAATGAATGTGA
GTACGCTGAAGCTTTTCGTGTATGCGTTATCGAGAGTTCAAGTCCAAAGGCATTAAGAT

PBP3 (450nt)

TCTTTTCGTCAACACGCTCATAAAGGCATTTGAAGCTCTATGGTAAGAAATAATGAACTGGATCGGCCTTC
TTCCAACATTGATGGAACCACCATGCTTTGTGGCACAGCGTGTACCTTCTGGATGCTCACAGTCCTTTGC
CATATTTATCAGTTGGTTCCGTACGGTACCCGGTACGGTGTTAAAGAGGGTTTCCAGATGAACATCACCG
TTATCATCCACCACATCGATTTTCATGGAACAAGCAATTCATGTAGCACTTGAGCGCCTCGTCTTCGTGTATT
TGGCCATCACTGAATTCCTTAATTGCCTCCTCTGTGACCCAGTTTTCTCAACGCATATATCGTGGAATATT
TTGGCCATTTTCAGGACGGCTGGTGGCGGCCATTTGTCGTACGTCGCGGTTCTGTGCCTGTACGTGCA
TCAGAGTTAGCGATGACGACAGGG

Αντίστοιχα οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία των dsRNA είναι οι παρακάτω:

Γονίδιο	Αλληλουχία εκκινητή	Θερμοκρασία T_a	Μήκος
LUSH	F: taatacgactcactatagggATGCACAGGTGTTAGTGCGA	55°C	20bp
	R: taatacgactcactatagggACTTGGATCATAGTCGCGCA		20bp
PBP2	F: taatacgactcactatagggTTGGTCTTTCTGGCTATCTGC	55°C	21bp
	R: taatacgactcactatagggATCTTAATGCCTTTGGACTTCG		22bp
PBP3	F: taatacgactcactatagggTCTTTTCGTCAACACGCTCA	55°C	20bp
	R: taatacgactcactatagggCCCTGTCGTACGCTAACT		20bp

7. Βιβλιογραφία

6. Βιβλιογραφία

- Ache, B. W., & Young, J. M. (2005). Olfaction: diverse species, conserved principles. *Neuron*, 48(3), 417-430.
- Alphey, L., Nimmo, D., O Connell, S., & Alphey, N. (2008). Insect population suppression using engineered insects. *Advances in experimental medicine and biology*, 627, 93.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*, 215(3), 403-410.
- Angeli, S., Ceron, F., Scaloni, A., Monti, M., Monteforti, G., Minnocci, A., ... & Pelosi, P. (1999). Purification, structural characterization, cloning and immunocytochemical localization of chemoreception proteins from *Schistocerca gregaria*. *European Journal of Biochemistry*, 262(3), 745-754.
- Arya, G. H., Weber, A. L., Wang, P., Magwire, M. M., Negron, Y. L. S., Mackay, T. F., & Anholt, R. R. (2010). Natural variation, functional pleiotropy and transcriptional contexts of odorant binding protein genes in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 186(4), 1475-1485.
- Arziman, Z., Horn, T., & Boutros, M. (2005). E-RNAi: a web application to design optimized RNAi constructs. *Nucleic acids research*, 33(suppl 2), W582-W588.
- Baker, R., Herbert, R., Howse, P. E., Jones, O. T., Francke, W., & Reith, W. (1980). Identification and synthesis of the major sex pheromone of the olive fly (*Dacus oleae*). *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, (2), 52-53.
- Ban, L., Napolitano, E., Serra, A., Zhou, X., Iovinella, I., & Pelosi, P. (2013). Identification of pheromone-like compounds in male reproductive organs of the oriental locust *Locusta migratoria*. *Biochemical and biophysical research communications*, 437(4), 620-624.
- Bellés, X. (2010). Beyond *Drosophila*: RNAi in vivo and functional genomics in insects. *Annual review of entomology*, 55, 111-128.
- Benelli, G. (2014). Aggressive behavior and territoriality in the olive fruit fly, *Bactrocera oleae* (Rossi)(Diptera: Tephritidae): role of residence and time of day. *Journal of insect behavior*, 27(2), 145-161.
- Benelli, G., Bonsignori, G., Stefanini, C., Raspi, A., & Canale, A. (2013). The production of female sex pheromone in *Bactrocera oleae* (Rossi) young males does not influence their mating chances. *Entomological Science*, 16(1), 47-53.
- Benelli, G., Canale, A., Bonsignori, G., Ragni, G., Stefanini, C., & Raspi, A. (2012). Male wing vibration in the mating behavior of the olive fruit fly *Bactrocera oleae* (Rossi)(Diptera: Tephritidae). *Journal of insect behavior*, 25(6), 590-603.
- Bengtsson, J. M., Trona, F., Montagné, N., Anfora, G., Ignell, R., Witzgall, P., & Jacquín-Joly, E. (2012). Putative chemosensory receptors of the codling moth, *Cydia pomonella*, identified by antennal transcriptome analysis. *PloS one*, 7(2), e31620.
- Benton, R., Sachse, S., Michnick, S. W., & Vosshall, L. B. (2006). Atypical membrane topology and heteromeric function of *Drosophila* odorant receptors in vivo. *PLoS Biol*, 4(2), e20.
- Benton, R., Vannice, K. S., Gomez-Diaz, C., & Vosshall, L. B. (2009). Variant Ionotropic Glutamate Receptors as Chemosensory Receptors in *Drosophila*. *Cell*, 136(1), 149-162.
- Blandin, S., Moita, L. F., Köcher, T., Wilm, M., Kafatos, F. C., & Levashina, E. A. (2002). Reverse genetics in the mosquito *Anopheles gambiae*: targeted disruption of the Defensin gene. *EMBO reports*, 3(9), 852-856.
- Blomquist, G. J., & Vogt, R. G. (Eds.). (2003). *Insect pheromone biochemistry and molecular biology: The biosynthesis and detection of pheromones and plant volatiles*. Academic press.
- Blomquist, G. J., Tillman, J. A., Mpuru, S., & Seybold, S. J. (1998). cuticle and cuticular hydrocarbons of insects: structure, function, and biochemistry. *Pheromone communication in social insects: ants, wasps, bees, and termites*.
- Bray, S., & Amrein, H. (2003). A Putative *Drosophila* Pheromone Receptor Expressed in Male-Specific Taste Neurons Is Required for Efficient Courtship. *Neuron*, 39(6), 1019-1029.
- Brown, S. J., Mahaffey, J. P., Lorenzen, M. D., Denell, R. E., & Mahaffey, J. W. (1999). Using RNAi to investigate orthologous homeotic gene function during development of distantly related insects. *Evolution & development*, 1(1), 11-15.
- Buck, L., & Axel, R. (1991). A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell*, 65(1), 175-187.

- Bueno, A. M., & Jones, O. (2002). Alternative methods for controlling the olive fly, *Bactrocera oleae*, involving semiochemicals. *IOBC wprs Bulletin*, 25(9), 147-156.
- Canale, A., Carpita, A., Conti, B., Canovai, R., & Raspi, A. (2012). Effect of age on 1, 7-dioxaspiro-[5.5]-undecane production in both sexes of olive fruit fly, *Bactrocera oleae* (Rossi)(Diptera Tephritidae). *IOBC Bull*, 72, 219-225.
- Canale, A., Germinara, S. G., Carpita, A., Benelli, G., Bonsignori, G., Stefanini, C., ... & Rotundo, G. (2013). Behavioural and electrophysiological responses of the olive fruit fly, *Bactrocera oleae* (Rossi)(Diptera: Tephritidae), to male-and female-borne sex attractants. *Chemoecology*, 23(3), 155-164.
- Carlson, D. A., Mayer, M. S., Silhacek, D. L., James, J. D., Beroza, M., & Bierl, B. A. (1971). Sex attractant pheromone of the house fly: isolation, identification and synthesis. *Science*, 174(4004), 76-78.
- Carpita, A., Canale, A., Raffaelli, A., Saba, A., Benelli, G., & Raspi, A. (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(1), 77-81.
- Cavalloro, R., & Delrio, G. (1970). Rilievi sul comportamento sessuale di *Dacus oleae* Gmelin (Diptera, Trypetidae) in laboratorio. *Redia*.
- Clyne, P. J., Warr, C. G., Freeman, M. R., Lessing, D., Kim, J., & Carlson, J. R. (1999). A novel family of divergent seven-transmembrane proteins: candidate odorant receptors in *Drosophila*. *Neuron*, 22(2), 327-338.
- Costa-da-Silva, A. L., Kojin, B. B., Marinotti, O., James, A. A., & Capurro, M. L. (2013). Expression and accumulation of the two-domain odorant-binding protein AaegOBP45 in the ovaries of blood-fed *Aedes aegypti*. *Parasites & vectors*, 6(1), 1-6.
- Couto, A., Alenius, M., & Dickson, B. J. (2005). Molecular, anatomical, and functional organization of the *Drosophila* olfactory system. *Current Biology*, 15(17), 1535-1547.
- Croset, V., Rytz, R., Cummins, S. F., Budd, A., Brawand, D., Kaessmann, H., Gibson, T.J., & Benton, R. (2010). Ancient protostome origin of chemosensory ionotropic glutamate receptors and the evolution of insect taste and olfaction. *PLoS genetics*, 6(8), e1001064
- Daane, K. M., & Johnson, M. W. (2010). Olive fruit fly: managing an ancient pest in modern times. *Annual review of entomology*, 55, 151-169.
- Dani, F. R., Michelucci, E., Francese, S., Mastrobuoni, G., Cappellozza, S., La Marca, G., ... & Pelosi, P. (2011). Odorant-binding proteins and chemosensory proteins in pheromone detection and release in the silkworm *Bombyx mori*. *Chemical senses*, 36(4), 335-344.
- Elfekih, S., Chen, C. Y., Hsu, J. C., Belcaid, M., & Haymer, D. (2016). Identification and preliminary characterization of chemosensory perception-associated proteins in the melon fly *Bactrocera cucurbitae* using RNA-seq. *Scientific reports*, 6.
- Elmore, T., Ignell, R., Carlson, J. R., & Smith, D. P. (2003). Targeted mutation of a *Drosophila* odor receptor defines receptor requirement in a novel class of sensillum. *The Journal of neuroscience*, 23(30), 9906-9912.
- Haniotakis, G., Francke, W., Mori, K., Redlich, H., & Schurig, V. (1986). Sex-specific activity of (R)-(-)- and (S)-(+)-1, 7-dioxaspiro [5.5] undecane, the major pheromone of *Dacus oleae*. *Journal of chemical ecology*, 12(6), 1559-1568.
- Hannon, G. J. (2002). RNA interference. *Nature*, 418(6894), 244-251.
- 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.
- Immonen, E., & Ritchie, M. G. (2012). The genomic response to courtship song stimulation in female *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 279(1732), 1359-1365.
- Ishida, Y., Ishibashi, J., & Leal, W. S. (2013). Fatty acid solubilizer from the oral disk of the blowfly. *PloS one*, 8(1), e51779.
- Jacquín-Joly, E., Vogt, R. G., François, M. C., & Nagnan-Le Meillour, P. (2001). Functional and expression pattern analysis of chemosensory proteins expressed in antennae and pheromonal gland of *Mamestra brassicae*. *Chemical senses*, 26(7), 833-844.

- Jefferis, G. S., Potter, C. J., Chan, A. M., Marin, E. C., Rohlffing, T., Maurer, C. R., & Luo, L. (2007). Comprehensive maps of *Drosophila* higher olfactory centers: spatially segregated fruit and pheromone representation. *Cell*, 128(6), 1187-1203.
- Jin, X., Ha, T. S., & Smith, D. P. (2008). SNMP is a signaling component required for pheromone sensitivity in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(31), 10996-11001.
- Kennerdell, J. R., & Carthew, R. W. (1998). Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that frizzled and frizzled 2 act in the wingless pathway. *Cell*, 95(7), 1017-1026.
- Kramer, J. A. (2001). Omiga™: a PC-based sequence analysis tool. *Molecular biotechnology*, 19(1), 97-106.
- Krieger, J., Klink, O., Mohl, C., Raming, K., & Breer, H. (2003). A candidate olfactory receptor subtype highly conserved across different insect orders. *Journal of Comparative Physiology A*, 189(7), 519-526.
- 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.
- Laughlin, J. D., Ha, T. S., Jones, D. N., & Smith, D. P. (2008). Activation of pheromone-sensitive neurons is mediated by conformational activation of pheromone-binding protein. *Cell*, 133(7), 1255-1265.
- Levi-Zada, A., Nestel, D., Fefer, D., Nemni-Lavy, E., Deloya-Kahane, I., & David, M. (2012). Analyzing diurnal and age-related pheromone emission of the olive fruit fly, *Bactrocera oleae* by sequential SPME-GCMS analysis. *Journal of chemical ecology*, 38(8), 1036-1041.
- Li, S., Picimbon, J. F., Ji, S., Kan, Y., Chuanling, Q., Zhou, J. J., & Pelosi, P. (2008). Multiple functions of an odorant-binding protein in the mosquito *Aedes aegypti*. *Biochemical and biophysical research communications*, 372(3), 464-468.
- Liu, C., Pitts, R. J., Bohbot, J. D., Jones, P. L., Wang, G., & Zwiebel, L. J. (2010). Distinct olfactory signaling mechanisms in the malaria vector mosquito *Anopheles gambiae*. *PLoS biology*, 8(8), e1000467.
- Liu, G. X., Xuan, N., Chu, D., Xie, H. Y., Fan, Z. X., Bi, Y. P., ... & Gao, Z. L. (2014). Biotype expression and insecticide response of *Bemisia tabaci* chemosensory protein-1. *Archives of insect biochemistry and physiology*, 85(3), 137-151.
- Liu, R., Lehane, S., He, X., Lehane, M., Hertz-Fowler, C., Berriman, M., Field, L., & Zhou, J. J. (2010). Characterisations of odorant-binding proteins in the tsetse fly *Glossina morsitans morsitans*. *Cellular and molecular life sciences*, 67(6), 919-929.
- Liu, Y. L., Guo, H., Huang, L. Q., Pelosi, P., & Wang, C. Z. (2014). Unique function of a chemosensory protein in the proboscis of two *Helicoverpa* species. *Journal of Experimental Biology*, 217(10), 1821-1826.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *methods*, 25(4), 402-408.
- Maleszka, J., Foret, S., Saint, R., & Maleszka, R. (2007). RNAi-induced phenotypes suggest a novel role for a chemosensory protein CSP5 in the development of embryonic integument in the honeybee (*Apis mellifera*). *Development genes and evolution*, 217(3), 189-196.
- Mavragani-Tsipidou, P. (2002). Genetic and cytogenetic analysis of the olive fruit fly *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae). *Genetica*, 116(1), 45-57.
- Mazomenos, B. E., & Haniotakis, G. E. (1981). A multicomponent female sex pheromone of *Dacus oleae* Gmelin: Isolation and bioassay. *Journal of chemical ecology*, 7(2), 437-444.
- Mazomenos, B. E., & Haniotakis, G. E. (1985). Male olive fruit fly attraction to synthetic sex pheromone components in laboratory and field tests. *Journal of chemical ecology*, 11(3), 397-405.
- Mazomenos, B. E., & Pomonis, J. G. (1983). Male olive fruit fly pheromone: isolation, identification and lab bioassays. In CEC/iOBC Symposium, Athens (Vol. 96103). "Fruit Flies of Economic Importance". Athens, Greece, 16-19 November 1982, pp. 96-103.
- McGraw, L. A., Gibson, G., Clark, A. G., & Wolfner, M. F. (2004). Genes regulated by mating, sperm, or seminal proteins in mated female *Drosophila melanogaster*. *Current Biology*, 14(16), 1509-1514.
- Mombaerts, P. (1999). Seven-transmembrane proteins as odorant and chemosensory receptors. *Science*, 286(5440), 707-711.
- Mullis, K. B., Faloona, F. A., Scharf, S. J., Saiki, R. K., Horn, G. T., & Erlich, H. (1992). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *BIOTECHNOLOGY SERIES*, 17-17.
- Nelson, D. R., & Blomquist, G. J. (1995). Insect waxes. *Waxes: chemistry, molecular biology and functions*, 1-90.

- Nomura, A., Kawasaki, K., Kubo, T., & Natori, S. (1992). Purification and localization of p10, a novel protein that increases in nymphal regenerating legs of *Periplaneta americana* (American cockroach). *The International journal of developmental biology*, 36(3), 391-398.
- Ozaki, M., Amakawa, T., Ozaki, K., & Tokunaga, F. (1993). Two types of sugar-binding protein in the labellum of the fly. Putative taste receptor molecules for sweetness. *The Journal of general physiology*, 102(2), 201-216.
- Pelosi, P., Mastrogiacomo, R., Iovinella, I., Tuccori, E., & Persaud, K. C. (2014). Structure and biotechnological applications of odorant-binding proteins. *Applied microbiology and biotechnology*, 98(1), 61-70.
- Pelosi, P., Zhou, J. J., Ban, L. P., & Calvello, M. (2006). Soluble proteins in insect chemical communication. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 63(14), 1658-1676
- Pikielny, C. W., Hasan, G., Rouyer, F., & Rosbash, M. (1994). Members of a family of *Drosophila* putative odorant-binding proteins are expressed in different subsets of olfactory hairs. *Neuron*, 12(1), 35-49.
- Rogers, M. E., Sun, M., Lerner, M. R., & Vogt, R. G. (1997). Snmp-1, a novel membrane protein of olfactory neurons of the silk moth *Antheraea polyphemus* with homology to the CD36 family of membrane proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 272(23), 14792-14799.
- Ronderos, D. S., & Smith, D. P. (2010). Activation of the T1 neuronal circuit is necessary and sufficient to induce sexually dimorphic mating behavior in *Drosophila melanogaster*. *The Journal of Neuroscience*, 30(7), 2595-2599.
- Rytz, R., Croset, V., & Benton, R. (2013). Ionotropic Receptors (IRs): Chemosensory Ionotropic Glutamate Receptors in *Drosophila* and beyond. *Insect biochemistry and molecular biology*, 1-10.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning*. New York: Cold spring harbor laboratory press.
- Sato, K., Pellegrino, M., Nakagawa, T., Nakagawa, T., Vosshall, L. B., & Touhara, K. (2008). Insect olfactory receptors are heteromeric ligand-gated ion channels. *Nature*, 452(7190), 1002-1006.
- Shanbhag, S. R., Hekmat-Scafe, D., Kim, M. S., Park, S. K., Carlson, J. R., Pikielny, C., ... & Steinbrecht, R. A. (2001). Expression mosaic of odorant-binding proteins in *Drosophila* olfactory organs. *Microscopy research and technique*, 55(5), 297-306.
- Siciliano, P., Scolari, F., Gomulski, L. M., Falchetto, M., Manni, M., Gabrieli, P., ... & Malacrida, A. R. (2014a). Sniffing out chemosensory genes from the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*. *PloS one*, 9(1), e85523.
- Siciliano, P., He, X. L., Woodcock, C., Pickett, J. A., Field, L. M., Birkett, M. A., ... & Malacrida, A. R. (2014b). Identification of pheromone components and their binding affinity to the odorant binding protein CcapOBP83a-2 of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*. *Insect biochemistry and molecular biology*, 48, 51-62.
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T. J., Karplus, K., Li, W., ... & Thompson, J. D. (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular systems biology*, 7(1), 539.
- Stocker, R. F. (2001). *Drosophila* as a focus in olfactory research: mapping of olfactory sensilla by fine structure, odor specificity, odorant receptor expression, and central connectivity. *Microscopy research and technique*, 55(5), 284-296.
- Sun, Y. L., Huang, L. Q., Pelosi, P., & Wang, C. Z. (2012). Expression in antennae and reproductive organs suggests a dual role of an odorant-binding protein in two sibling *Helicoverpa* species. *PloS one*, 7(1), e30040.
- Szklarczyk, D., Franceschini, A., Wyder, S., Forslund, K., Heller, D., Huerta-Cepas, J., ... & Kuhn, M. (2014). STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic acids research*, gku1003.
- Tegoni, M., Campanacci, V., & Cambillau, C. (2004). Structural aspects of sexual attraction and chemical communication in insects. *Trends in biochemical sciences*, 29(5), 257-264
- Thein, S. L., & Wallace, R. B. (1986). The use of synthetic oligonucleotides as specific hybridization probes in the diagnosis of genetic disorders. *Human genetic diseases: A practical approach*, 33-50.
- Tillman, J. A., Seybold, S. J., Jurenka, R. A., & Blomquist, G. J. (1999). Insect pheromones—an overview of biosynthesis and endocrine regulation. *Insect biochemistry and molecular biology*, 29(6), 481-514.
- Tomaselli, S., Crescenzi, O., Sanfelice, D., Ab, E., Wechselberger, R., Angeli, S., ... & Picone, D. (2006). Solution structure of a chemosensory protein from the desert locust *Schistocerca gregaria*. *Biochemistry*, 45(35), 10606-10613

- Vermeulen, A., & Rospars, J. P. (2004). Why are insect olfactory receptor neurons grouped into sensilla? The teachings of a model investigating the effects of the electrical interaction between neurons on the transepithelial potential and the neuronal transmembrane potential. *European Biophysics Journal*, 33(7), 633-643.
- Vogt, R. G. (2003). Biochemical diversity of odor detection: OBPs, ODEs and SNMPs. *Insect pheromone biochemistry and molecular biology*, 391-445
- Vogt, R. G., & Riddiford, L. M. (1981). Pheromone binding and inactivation by moth antennae. *Nature*, 293(5828), 161.
- Vosshall, L. B., & Hansson, B. S. (2011). A unified nomenclature system for the insect olfactory coreceptor. *Chemical senses*, bjr022.
- Vosshall, L. B., Amrein, H., Morozov, P. S., Rzhetsky, A., & Axel, R. (1999). A spatial map of olfactory receptor expression in the *Drosophila* antenna. *Cell*, 96(5), 725-736.
- Wicher, D., Schäfer, R., Bauernfeind, R., Stensmyr, M. C., Heller, R., Heinemann, S. H., & Hansson, B. S. (2008). *Drosophila* odorant receptors are both ligand-gated and cyclic-nucleotide-activated cation channels. *Nature*, 452(7190), 1007-1011.
- Wistrand, M., Käll, L., & Sonnhämmer, E. L. (2006). A general model of G protein-coupled receptor sequences and its application to detect remote homologs. *Protein science*, 15(3), 509-521.
- Wojtasek, H., & Leal, W.S. (1999). Conformational Change in the Pheromone-binding Protein from *Bombyx mori* Induced by pH and by Interaction with Membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 274(43), 30950-30956.
- Wu, Z., Zhang, H., Wang, Z., Bin, S., He, H., & Lin, J. (2015). Discovery of chemosensory genes in the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis*. *PLoS one*, 10(6), e0129794.
- Xu, P., Atkinson, R., Jones, D. N., & Smith, D. P. (2005). *Drosophila* OBP LUSH is required for activity of pheromone-sensitive neurons. *Neuron*, 45(2), 193-200.
- Xuan, N., Guo, X., Xie, H. Y., Lou, Q. N., Lu, X. B., Liu, G. X., & Picimbon, J. F. (2015). Increased expression of CSP and CYP genes in adult silkworm females exposed to avermectins. *Insect science*, 22(2), 203-219.
- Yu, N., Christiaens, O., Liu, J., Niu, J., Cappelle, K., Caccia, S., ... & Smagghe, G. (2013). Delivery of dsRNA for RNAi in insects: an overview and future directions. *Insect science*, 20(1), 4-14.
- Zalom, F. G., Van Steenwyk, R. A., Burrack, H. J., & Johnson, M. W. (2009). Olive fruit fly. Integrated pest management for home gardeners and landscape professionals. *Pest Notes*, Publication 74112.
- Zdobnov, E. M., & Apweiler, R. (2001). InterProScan—an integration platform for the signature-recognition methods in InterPro. *Bioinformatics*, 17(9), 847-848.
- Zervas, G.A. (1982). Reproductive physiology of *Dacus oleae* (Gmel.) (Diptera: Trypetidae). Comparison of wild and artificially reared flies. *Geoponica*, 282, 10–14.
- Zhou, S., Stone, E. A., Mackay, T. F., & Anholt, R. R. (2009). Plasticity of the chemoreceptor repertoire in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Genet*, 5(10), e1000681.
- Zouros, E., & Krimbas, C. B. (1970). Frequency of female digamy in a natural population of the olive fruit fly *Dacus oleae* as found by using enzyme polymorphism. *Entomologia experimentalis et applicata*, 13(1), 1-9.

6.1 Εικόνες

- Bellés, X. (2010). Beyond Drosophila: RNAi in vivo and functional genomics in insects. *Annual review of entomology*, 55, p. 113.
- Benton, R. (2006). On the ORigin of smell: odorant receptors in insects. *Cellular and molecular life sciences CMLS*, 63(14), p. 1581.
- Blomquist, G. J., & Vogt, R. G. (Eds.). (2003). *Insect pheromone biochemistry and molecular biology: The biosynthesis and detection of pheromones and plant volatiles*. Academic press, p. 7.
- Canale, A., Germinara, S. G., Carpita, A., Benelli, G., Bonsignori, G., Stefanini, C., ... & Rotundo, G. (2013). Behavioural and electrophysiological responses of the olive fruit fly, *Bactrocera oleae* (Rossi)(Diptera: Tephritidae), to male-and female-borne sex attractants. *Chemoecology*, 23(3), p. 160.
- Carraher, C., Dalziel, J., Jordan, M. D., Christie, D. L., Newcomb, R. D., & Kralicek, A. V. (2015). Towards an understanding of the structural basis for insect olfaction by odorant receptors. *Insect biochemistry and molecular biology*, 66, p. 32.
- <http://www.pherobase.com/database/synthesis/synthesis-detail-Z9-23Hy.php>
- Laissue, P. P., & Vosshall, L. B. (2008). The olfactory sensory map in Drosophila. In *Brain development in Drosophila melanogaster*. Springer New York, p. 104.
- Leal, W. S. (2013). Odorant reception in insects: roles of receptors, binding proteins, and degrading enzymes. *Annual review of entomology*, 58, p. 376.
- Levi-Zada, A., Nestel, D., Fefer, D., Nemni-Lavy, E., Deloya-Kahane, I., & David, M. (2012). Analyzing diurnal and age-related pheromone emission of the olive fruit fly, *Bactrocera oleae* by sequential SPME-GCMS analysis. *Journal of chemical ecology*, 38(8), p. 1038.
- Levi-Zada, A., Nestel, D., Fefer, D., Nemni-Lavy, E., Deloya-Kahane, I., & David, M. (2012). Analyzing diurnal and age-related pheromone emission of the olive fruit fly, *Bactrocera oleae* by sequential SPME-GCMS analysis. *Journal of chemical ecology*, 38(8), p. 1039.
- Malheiro, R., Casal, S., Baptista, P., & Pereira, J. A. (2015). A review of *Bactrocera oleae* (Rossi) impact in olive products: from the tree to the table. *Trends in Food Science & Technology*, p.227.
- Mazomenos, B. E., & Haniotakis, G. E. (1985). Male olive fruit fly attraction to synthetic sex pheromone components in laboratory and field tests. *Journal of chemical ecology*, 11(3), p. 398.
- Pelosi, P., Iovinella, I., Felicioli, A., & Dani, F. R. (2014). Soluble proteins of chemical communication: an overview across arthropods. *Front Physiol*, 5, p. 320.
- Sanchez-Gracia, A., Vieira, F. G., & Rozas, J. (2009). Molecular evolution of the major chemosensory gene families in insects. *Heredity*, 103(3), p. 209.
- Spletter, M. L., & Luo, L. (2009). A new family of odorant receptors in Drosophila. *Cell*, 136(1), p. 24.
- Tillman, J. A., Seybold, S. J., Jurenka, R. A., & Blomquist, G. J. (1999). Insect pheromones—an overview of biosynthesis and endocrine regulation. *Insect biochemistry and molecular biology*, 29(6), p. 492.
- Vosshall, L. B., & Stocker, R. F. (2007). Molecular architecture of smell and taste in Drosophila. *Annual review of neuroscience*, 30, p. 512.
- Zhou, J. J. (2010). Chapter ten-Odorant-binding proteins in insects. *Vitamins & Hormones*, 83, p. 253.