



ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ & ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΗΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ:

Ανάλυση έκφρασης γονιδίων οσφρητικών υποδοχέων στο δάκο της ελιάς μετά από έκθεση στην υδροξυτυροσώλη



Στεργίου Ελένη

Λάρισα 2018

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ & ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΗΣ

Ανάλυση έκφρασης γονιδίων οσφρητικών υποδοχέων στο δάκο
της ελιάς μετά από έκθεση στην υδροξυτυροσόλη

Expression analysis of olive fruit fly odorant receptor genes after
exposure to hydroxytyrosol

Στεργίου Ελένη

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας υπό την επίβλεψη του καθηγητή Μοριακής Βιολογίας, κ. Μαθιόπουλου Κωνσταντίνου.

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Μαθιόπουλος Κωνσταντίνος: Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Καρπούζας Δημήτριος: Αναπληρωτής καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Τσουμάνη Κωνσταντίνα: Διδάσκουσα Π.Δ. 407 του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Κλείνοντας αυτή την εργασία, τα συναισθήματα είναι ανάμεικτα: συναισθήματα χαράς για την ολοκλήρωση αυτής αλλά και της φοιτητικής μου ζωής στο Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας αλλά και λύπης που αυτό το όμορφο ταξίδι γνώσης και εμπειριών έφτασε στο τέλος του. Δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω όλους τους ανθρώπους που ήταν μαζί μου σε αυτό το ταξίδι.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Τριμελή Επιτροπή μου, τον κ. Μαθιόπουλο, την κ. Τσουμάνη και τον κ. Καρπούζα για τη συμβολή τους στην επίτευξη αυτής της εργασίας.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω:

Τον κ. Μαθιόπουλο που αποτελεί έναν επιστήμονα με άρτια γνώση του αντικείμενου του και πάντα ήταν εκεί για να λύσει τις απορίες μου, να επιβλέπει την εξέλιξη μου αλλά και για να συζητήσει μαζί μου πάνω στο θέμα της διπλωματικής μου αλλά και σε όλα τα άλλα θέματα που απασχολούν το εργαστήριο. Τα εβδομαδιαία lab meetings θα μου μείνουν αξέχαστα.

Την Κωνσταντίνα την Τσουμάνη, με την οποία είχα την χαρά και τύχη να συνεργαστώ καθ' όλη τη διάρκεια της εργασίας αυτής και παρ' όλες τις «γκάφες» μου ήταν πάντοτε εκεί για να με στηρίζει με υπομονή και να μου μεταλαμπαδεύει τις απίστευτες γνώσεις της. Ήταν για μένα μια δασκάλα με όλη την σημασία της λέξεως και η οξυδέρκεια, η ετοιμότητα, το ταπεραμέντο και η τελειομανία της δεν έπαψαν ποτέ να με εκπλήσσουν. Την ευχαριστώ για όλα!

Τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου, την Μαριλένα Γρηγορίου και τον Λευτέρη Ζορμπά, των οποίων η βοήθεια ήταν πολύτιμη και με την θετική ενέργεια και το αστείρευτο χιούμορ τους αποτέλεσαν έναν από τους σημαντικότερους παράγοντες της ευχάριστης παραμονής μου στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας & Γονιδιωματικής.

Τα κορίτσια που ξεκινήσαμε μαζί αυτόν τον κύκλο πορείας, την Ελευθερία, την Ευγενία, την Αρετή, την Σοφία, την Έλενα και από την κάθε μία αποκόμισα κάτι διαφορετικό.

Τους γονείς μου που στάθηκαν δίπλα μου όλο αυτό το διάστημα και με παρότρυναν να συνεχίζω με αισιοδοξία και αποφασιστικότητα.

Τον αδερφό μου, Γιώργο, που ως συγκάτοικος μου το τελευταίο διάστημα εκπόνησης και συγγραφής της εργασίας, ανέχτηκε όλες μου τις παραξενιές και ήταν πάντα πρόθυμος να κάνει πράγματα για να μου φτιάχνει τη διάθεση όταν ξενυχτούσα και έγραφα. Ακόμη, τον ευχαριστώ για τον υπέροχο δάκο, που σχεδίασε με μεγάλο ενθουσιασμό για το εξώφυλλο της εργασίας μου.

Τους φίλους μου και τον Αντώνη για την υποστήριξη και την ενθάρρυνση τους.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ένας από τους βασικότερους κινδύνους για τις αγροκαλλιέργειες είναι τα έντομα- παράσιτα. Η χρήση εναλλακτικών, φιλικών προς το περιβάλλον μεθόδων καταπολέμησής τους, ωστόσο, χρειάζεται βελτίωση προκειμένου να είναι ειδοειδικές για κάθε έντομο. Η στόχευση στο οσφρητικό σύστημα των εντόμων- παρασίτων μπορεί να συντελέσει σ' αυτή τη βελτίωση. Στην παρούσα εργασία ασχοληθήκαμε με τη μελέτη του οσφρητικού συστήματος του δάκου της ελιάς, *Bactrocera oleae*, που αποτελεί το πλέον καταστροφικό παράσιτο της ελιάς. Συγκεκριμένα, επικεντρωθήκαμε στη μελέτη των οσφρητικών υποδοχέων (ORs), που αποτελούν τα κύρια μόρια που μεταβιβάζουν τα οσφρητικά ερεθίσματα του περιβάλλοντος στον εγκέφαλο. Ο δάκος, του οποίου ο κύκλος ζωής συνδέεται άρρηκτα με το δένδρο της ελιάς, αποκρίνεται μέσω του οσφρητικού του συστήματος σε πτητικές ενώσεις που προέρχονται από την ελιά προκειμένου να την εντοπίσει. Μια από αυτές είναι και η υδροξυτυροσόλη, μια ημιπτητική ένωση, που αποτελεί παράγωγο της κυριότερης ένωσης της ελιάς της ολευρωπαΐνης. Στόχος, λοιπόν, της παρούσας εργασίας ήταν η ανάλυση της έκφρασης γονιδίων οσφρητικών υποδοχέων του δάκου μετά από έκθεση του εντόμου στην υδροξυτυροσόλη. Η επιλογή των γονιδίων ORs που μελετήθηκαν έγινε έπειτα από φυλογενετική ανάλυση με ομόλογους υποδοχείς σε άλλα είδη, με βάση δύο κριτήρια: την ειδοειδικότητα και την ομολογία με ORs της *Drosophila* που αποκρίνονται σε φαινολικές ενώσεις. Τα γονίδια που μελετήθηκαν ήταν: Or2, Or2ii, Or63ii, Or35, Or94ii. Οι ιστοί στους οποίους έγινε η ανάλυση της έκφρασης αυτών των γονιδίων ήταν κεφάλια-κεραίες, γναθικές προσακτρίδες και θώρακες του δάκου. Τα αποτελέσματα διαφοροποιήθηκαν ανάλογα με το γονίδιο και τον ιστό που αναλύθηκαν. Συγκεκριμένα, κανένα από τα γονίδια δεν εμφάνισε έκφραση στις γναθικές προσακτρίδες, εμφάνισαν σχεδόν όλα αυξημένη έκφραση παρουσία υδροξυτυροσόλης στα κεφάλια- κεραίες χωρίς ωστόσο στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στους ιστούς που εκτέθηκαν και σε αυτούς που δεν εκτέθηκαν στην οσμή, ενώ στους θώρακες άλλα γονίδια εμφάνισαν στατιστικά σημαντικά αυξημένη έκφραση παρουσία της υδροξυτυροσόλης, άλλα απλώς αυξημένη έκφραση και το γονίδιο του υποδοχέα Or63ii εμφάνισε στατιστικά σημαντικά μειωμένη έκφραση παρουσία υδροξυτυροσόλης. Τα παραπάνω αποτελέσματα μας οδήγησαν σε κάποια συμπεράσματα για την απόκριση των οσφρητικών υποδοχέων που μελετήθηκαν στην υδροξυτυροσόλη στα τρία είδη ιστών. Παρ' όλα αυτά κρίνεται απαραίτητη περαιτέρω έρευνα γύρω από τους ORs του δάκου και την απόκριση τους σε διάφορες πτητικές ενώσεις της ελιάς προκειμένου τα αποτελέσματα να αξιοποιηθούν για τη βελτίωση των μεθόδων καταπολέμησης του.

ABSTRACT

Agroforestry trees are attacked by a wide spectrum of insect pests. However alternative, environmentally friendly control methods against insect pests need to be improved so that they can be species-specific for the various pests. Targeting the olfactory system of insects can contribute to this improvement. This thesis is focused on the study of the olfactory system of the olive fruit fly, *Bactrocera oleae*, the major insect pest of olive trees. Specifically, we focused on the study of the most important molecular component of the *Bactrocera oleae*'s olfactory system, odorant receptors (ORs). As the olive fruit fly is the only pest that attacks olive trees, it detects its host by recognizing volatile compounds of the olive. Hydroxytyrosol, a semi-volatile, phenolic compound is a metabolite of the most common compound of olive, oleuropein. Given that, the aim of this project was the expression analysis of certain olfactory receptor genes after exposure to hydroxytyrosol. Genes were selected after phylogenetic analysis with homologous genes in other species, based on the premise that the genes should be species-specific or homologous to *Drosophila melanogaster*'s genes that encode ORs, which respond to phenolic compounds. The selected genes were: Or2, Or2ii, Or63ii, Or35, Or94ii. The isolated tissues for this expression analysis were: heads-antennae, maxillary palps and thoraces. Results differed according to the gene and the tissue studied. None of the five genes was expressed in maxillary palps. In heads-antennae, all five genes presented a non-statistically significant higher expression in the presence of hydroxytyrosol. In thoraces, some genes were significantly overexpressed in the presence of hydroxytyrosol, others were non-significantly overexpressed, while Or63ii was significantly under-expressed in the presence of hydroxytyrosol. The above results offer a first indication of the role of these genes in hydroxytyrosol response. However, further research on *B. oleae*'s ORs is necessary so it can be determined how they respond to different volatile compounds of the olive. The results from this research can be used for the improvement of the existent control methods.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

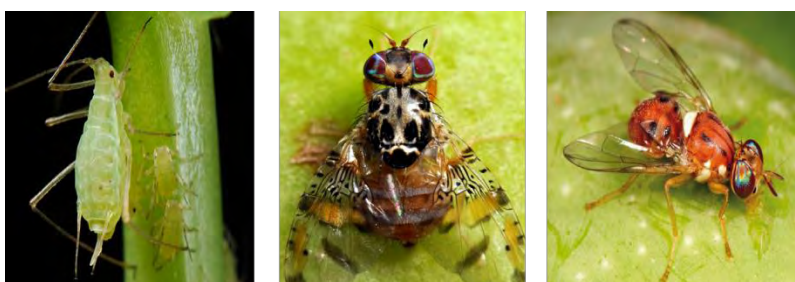
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8
1.1 Αγροτικές καλλιέργειες δέντρων και έντομα- παράσιτα	9
1.1.1 Παρασιτική δράση και τρόποι αντιμετώπισης των καρποφάγων εντόμων- παρασίτων	9
1.1.2 Ανάγκη για στόχευση στο οσφρητικό σύστημα των εντόμων	12
1.2 Οσφρητικό σύστημα εντόμων	12
1.2.1 Οσφρητικά όργανα και νευρώνες στη <i>D. Melanogaster</i>	12
1.2.2 Οσφρητικό μονοπάτι στη <i>Drosophila</i>	13
1.2.3 Μοριακά συστατικά του οσφρητικού μονοπατιού	15
1.2.4 ORs και εξέλιξη	18
1.3 Ο δάκος της ελιάς , <i>B. oleae</i>	20
1.3.1 Γενικές πληροφορίες για το δάκο της ελιάς	20
1.3.2 Οσφρητικό σύστημα και οσφρητικοί υποδοχείς στο δάκο	22
1.4 Ελιά και ενώσεις	23
1.4.1 Φαινολικές ενώσεις στην ελιά και ιδιότητες	24
1.4.2 Ολευρωπαΐνη και Υδροξυτυροσόλη	25
1.5 Σκοπός	26
2. ΥΛΙΚΑ- ΜΕΘΟΔΟΙ	28
2.1 Βιοπληροφορική ανάλυση	28
2.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	31
2.3 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης	34
2.4 Έκθεση των εντόμων στην υδροξυτυροσόλη- Απομόνωση ιστών	35
2.5 Απομόνωση RNA από τα δείγματα ιστών που απομονώθηκαν	37
2.6 Πέψη των RNAs που απομονώθηκαν με Dνάση	38
2.7 Σύνθεση cDNA από το RNA που απομονώθηκε	39
2.8 Ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (quantitative Real-time PCR)	40
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	44
3.1 Επιλογή των προς μελέτη γονιδίων οσφρητικών υποδοχέων του δάκου της ελιάς, <i>B. oleae</i>	44

3.1.1 BLASTp των οσφρητικών υποδοχέων της <i>D. melanogaster</i> για τον εντοπισμό των ομόλογων υποδοχέων στο δάκο	45
3.1.2 Φυλογενετικές σχέσεις.....	47
3.1.3 Επιλογή των οσφρητικών υποδοχέων	47
3.2 Σχεδιασμός των PRIMERS.....	51
3.3 Απομόνωση ιστών από θηλυκά γονιμοποιημένα έντομα και ανάλυση της έκφρασης των 5 γονιδίων	52
4.ΣΥΖΗΤΗΣΗ	58
4.1 Πιθανός ρόλος των γονιδίων Or2, Or2ii, Or63ii στους θώρακες - ορθόλογα σε άλλα είδη εντόμων ...	61
4.2 Στόχοι – μελλοντικές προσεγγίσεις.....	62
5.ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	64
6.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	71

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Αγροτικές καλλιέργειες δέντρων και έντομα- παράσιτα

Οι αγροκαλλιέργειες πλήττονται από ένα τεράστιο φάσμα εντόμων, η παρασιτική δράση των οποίων σε συνδυασμό με τις κλιματικές αλλαγές, την υπογονιμότητα του εδάφους και τις ασθένειες, συναποτελεί έναν από τους βασικότερους παράγοντες που επηρεάζουν την φυτική παραγωγικότητα. Ανάμεσα στα ασπόνδυλα, τα έντομα αποτελούν την κυριότερη ομοταξία φυτοφάγων οργανισμών που επιτίθενται στα φυτά (Rao et al., 2000). Συγκεκριμένα, όσον αφορά τις καλλιέργειες δέντρων, κύρια παράσιτα αποτελούν τόσο έντομα που τρέφονται δευτερογενώς από το φύλλωμα και δεν προκαλούν άμεση ζημιά στον καρπό, όπως οι αφίδες, όσο και έντομα που τρέφονται άμεσα από τον καρπό του δέντρου, όπως η μεσογειακή μύγα *Ceratitis capitata* που προσβάλλει μια τεράστια ποικιλία καρποφόρων δέντρων και εσπεριδοειδών και ο δάκος της ελιάς *Bactrocera oleae* που προσβάλλει την ελιά (Εικόνα 1). Μεγαλύτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα έντομα-παράσιτα της δεύτερης κατηγορίας τα οποία αποτελούν και θέμα συζήτησης στην παρούσα εργασία, λόγω της παρασιτικής δράσης τους και της μη αποτελεσματικής εύρεσης κάποιας βιολογικής λύσης για την καθολική και εξειδικευμένη αντιμετώπισή τους.



Εικόνα 1 Παρασιτικά έντομα (από αριστερά προς τα δεξιά): αφίδα του μπιζελιού, μεσογειακή μύγα *Ceratitis capitata*, δάκος της ελιάς *Bactrocera oleae* (<http://www.growweedeasy.com/cannabis-aphids>, <https://www.flickr.com/photos/bodorjanos40/5497697736>, <https://www.sciencedaily.com/releases/2015/09/150922115827.htm>)

1.1.1 Παρασιτική δράση και τρόποι αντιμετώπισης των καρποφάγων εντόμων- παρασίτων

Η ζημιά που προκαλείται στα δέντρα από τα έντομα-παράσιτα οφείλεται στη διατροφή τους από τον καρπό του δέντρου το οποίο προσβάλλουν. Συγκεκριμένα μετά τη διαδικασία της ωοαπόθεσης οι αναπτυσσόμενες προνύμφες κατατρώγουν τον καρπό δημιουργώντας στοές στο εσωτερικό του, καταστρέφοντας την σάρκα του και επιτρέποντας την είσοδο άλλων μολυσματικών στοιχείων όπως βακτήρια και μύκητες. Από τη διαδικασία αυτή μειώνεται τελικά τόσο η ποιότητα όσο και η ποσότητα της παραγωγής.

Τα τελευταία 40 χρόνια και παραπάνω, για την καταπολέμηση των παρασίτων χρησιμοποιούνταν ευρέως συμβατικά χημικά εντομοκτόνα με υψηλό κόστος που υποβάθμιζαν την ποιότητα των προϊόντων τα οποία προέρχονταν από τα οπωροφόρα δέντρα. Κάποιες από τις επιπτώσεις της αλόγιστης χρήσης τους αποτέλεσαν και αποτελούν: η οικολογική καταστροφή που έχουν επιφέρει, η ανάπτυξη ανθεκτικότητας έναντι αυτών των εντομοκτόνων από τα έντομα καθώς και οι βλαβερές τοξικές επιδράσεις τους στην υγεία του ανθρώπου (Pimentel 1995). Για το λόγο αυτό, η επιστημονική κοινότητα έχει στραφεί πλέον σε νέες

οικονομικές και πρωτίστως φιλικές προς το περιβάλλον μεθόδους για την αντιμετώπιση των παρασίτων. Παρακάτω παρουσιάζονται οι κυριότερες από αυτές:

-Η μέθοδος στείρων εντόμων (Sterile Insect Technique –SIT):

Η μέθοδος αυτή περιλαμβάνει την μαζική παραγωγή και στείρωση μέσω ακτινοβολίας αρσενικών εντόμων στο εργαστήριο και την επακόλουθη απελευθέρωσή τους στη φύση όπου προορίζονται να ζευγαρώσουν με άγρια θηλυκά. Από τη σύζευξη αυτή, τα αυγά των άγριων θηλυκών καθ' ότι μη γονιμοποιημένα δεν θα εκκολαφθούν, μειώνοντας έτσι τον αριθμό των επόμενων γενεών εντόμων (*Knipling 1955*). Θεωρητικά αν γίνονται συνεχώς τέτοιες απελευθερώσεις αρσενικών στείρων εντόμων ο πληθυσμός των εντόμων προοδευτικά θα μειωθεί και τελικά θα εξαφανισθεί εντελώς.

Ωστόσο, κατά την εφαρμογή της μεθόδου παρουσιάστηκαν πολλά μειονεκτήματα, τα κυριότερα εκ των οποίων ήταν:

Α) Το διαφοροποιημένο γενετικό προφίλ των εργαστηριακών εντόμων από του αγρίου τύπου, προκειμένου να προσαρμοστούν στο τεχνητό εργαστηριακό περιβάλλον (*Loukas et al. 1985, Economopoulos and Loukas, 1986*)

Β) Η εξασθένιση των αρσενικών εντόμων λόγω της ακτινοβολίας που εφαρμόζεται για την στείρωση τους (*Economopoulos 1972*)

Γ) Η διατροφή των εργαστηριακών εντόμων, η οποία περιέχει αντιβιοτικά με αποτέλεσμα να μην μπορούν να αναπτυχθούν ενδοσυμβιωτικά βακτήρια, σημαντικά για την αντοχή των εντόμων στο φυσικό περιβάλλον (*Capuzzo et al. 2005, Sacchetti et al. 2008, Estes et al. 2009, Ben-Yosef et al. 2010, Kounatidis et al. 2009*)

-Η μέθοδος απελευθέρωσης εντόμων που φέρουν επικρατές θνησιγόνο γονίδιο (Release of Insects carrying a Dominant Lethal – RIDL):

Η μέθοδος αυτή αφορά την εισαγωγή στα έντομα μέσω τεχνικών ανασυνδυασμένου DNA ενός επικρατούς θνησιγόνου γονιδίου που εκφράζεται υπό τη ρύθμιση ενός διαδικού συστήματος ελεγχόμενου από την τετρακυκλίνη. Το γονίδιο αυτό είναι δυνατόν να εκφραστεί μόνο στα θηλυκά έντομα καθώς διαθέτει θηλεοειδικό υποκινητή. Κατά τη διάρκεια στην οποία τα θηλυκά έντομα βρίσκονται στο εργαστήριο και τους χορηγείται τετρακυκλίνη μέσω της τροφής τους, το θνησιγόνο γονίδιο δεν εκφράζεται. Όταν όμως αυξηθεί λίγο ο πληθυσμός τους και απελευθερωθούν στη φύση, όπου δεν τους χορηγείται τετρακυκλίνη, το θνησιγόνο γονίδιο εκφράζεται και πεθαίνουν. Το ίδιο συμβαίνει και με ένα μεγάλο ποσοστό θηλυκών απογόνων που θα προκύψουν μετά το ζευγάρωμα των εργαστηριακών θηλυκών εντόμων που φέρουν το επικρατές θνησιγόνο γονίδιο (*Alphey and Andreasen 2002, Alphey et al. 2002, Heinrich and Scott 2000, Thomas et al. 2000, Gong et al. 2005*).

Το μειονέκτημα της μεθόδου αυτής είναι η μη πλήρης εξάλειψη των θηλυκών εντόμων που ευθύνονται για τη ζημιά που προκαλείται (*Alphey and Andreasen 2002, Alphey et al. 2002, Heinrich and Scott 2000, Thomas et al. 2000, Gong et al. 2005*).

-Η χρήση εντόμων ως παράγοντες για τον βιολογικό έλεγχο των εντόμων-παρασίτων αποτελεί επίσης έναν αποτελεσματικό τρόπο που καταπολέμησης. Τα έντομα-παρασίτα γίνονται ξενιστές άλλων εντόμων-παρασίτων με αποτέλεσμα να πλήττεται ο πληθυσμός τους. Για τον δάκο της ελιάς παραδείγματος χάριν, είδη εντόμων που αποτελούν παράσιτα του είναι είδη σφηκών της οικογένειας Braconidae όπως τα:

Psytalia lounsburyi, *Psytalia concolor*, *Psytalia ponerophaga*, *Utetes africanus*, και *Bracon celer* (Daane and Johnson, 2010).

Το κύριο μειονέκτημα της συγκεκριμένης μεθόδου αποτελεί η μεγάλη μείωση των επιπέδων του πληθυσμού των εντόμων που μπορεί να προκαλέσει ανισορροπία στο οικοσύστημα (Daane and Johnson, 2010).

-Η εξυγίανση των αγρών και η πρόωρη συγκομιδή των καρπών μπορούν ακόμη να αποτελέσουν σημαντικά βήματα για την αποφυγή των δυσμενών επιπτώσεων της ζημιάς που προκαλούν τα έντομα-παράσιτα (Rojnic et al., 2014) καθ' όσον η ύπαρξη μολυσμένων καρπών σε μη καθαρισμένες καλλιέργειες μπορεί να οδηγήσει σε έξαρση του πληθυσμού του εντόμου. Η ποιότητα των παραγόμενων καρπών επηρεάζεται περισσότερο όσο πιο πολύς χρόνος περνά και διατρέφονται οι προνύμφες από τους καρπούς για να αναπτυχθούν (Rice 2000, Kyriakidis et al. 2002, Koprivnjak et al. 2010, Angerosa et al. 1992, Bendini et al. 2008).

-Προσελκυστικά sprays/βιολογικά εντομοκτόνα & εντομοπαθογόνοι μικροοργανισμοί:

Μια ακόμη αποτελεσματική μέθοδος για την αντιμετώπιση των παρασίτων είναι και τα προσελκυστικά sprays. Συγκεκριμένα για το δάκο της ελιάς, αυτά φέρουν πρωτεΐνες με αμμωνιακά παράγωγα που αποτελούν πόλο έλξης για τα θηλυκά έντομα ιδιαίτερα κατά την περίοδο της ωοαπόθεσης με αποτέλεσμα να μην προλαβαίνουν να προσβάλλουν την ελιά (Varikou et al. 2014). Στον αντίποδα με απωθητική δράση για τον δάκο βρίσκονται τα βιολογικά εντομοκτόνα καθώς και τα εντομοκτόνα που φέρουν εντομοπαθογόνους μικροοργανισμούς όπως ιούς, μύκητες και βακτήρια, οι οποίοι προσβάλλουν τον δάκο εμποδίζοντας την παρασιτική του δράση (Bueno and Jones, 2002).

-Παγίδες εντόμων:

Οι παγίδες εντόμων είναι μία μέθοδος που χρησιμοποιείται τόσο για τον έλεγχο του πληθυσμού των εντόμων- παρασίτων όσο και για την παγίδευσή τους. Η λειτουργία των παγίδων βασίζεται στη χρήση χημικών ή βιολογικών ουσιών, όπως οι φερομόνες, με αποτέλεσμα ο ενήλικος αρσενικός πληθυσμός κυρίως να συγκεντρώνεται σε αυτές και να θανατώνεται.

Μειονεκτήματα της μαζικής παγίδευσης αποτελούν:

α) Η έλλειψη ικανοποιητικής προσέλκυσης για τα θηλυκά έντομα από μια προσελκυστική πηγή όπως είναι η σεξουαλική φερομόνη που χρησιμοποιείται για την προσέλκυση των αρσενικών εντόμων

β) Η έλλειψη παγίδων υψηλής αποτελεσματικότητας

γ) Το πρόβλημα του μεγάλου μεγέθους του πληθυσμού και του κορεσμού των παγίδων

δ) Η καταστροφή του φυσικών πληθυσμών άλλων εντόμων που προσελκύονται στις ίδιες παγίδες (Bueno and Jones, 2002)

ε) Η τοποθέτηση παγίδων σε μεγάλη πυκνότητα (5 παγίδες ανά δέντρο) με αποτέλεσμα το μεγάλο κόστος της τεχνικής (Economidou 1979; 1980).

1.1.2 Ανάγκη για στόχευση στο οσφρητικό σύστημα των εντόμων

Για τη σταδιακή εξάλειψη των παραπάνω παραγόντων που συμβάλλουν στη μειωμένη αποτελεσματικότητα των μεθόδων αντιμετώπισης των εντόμων- παρασίτων, κρίνεται απαραίτητη πρωτίστως η στόχευση στο οσφρητικό σύστημα των εντόμων προκειμένου να αξιοποιηθούν οσμές προσελκυστικές ή απωθητικές για τα έντομα σε παγίδες ή απωθητικά sprays. Η κατασκευή ειδοειδικών παγίδων θα έχει ως αποτέλεσμα την έλξη μόνο του επιθυμητού είδους εντόμου και επομένως την μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα. Αυτό είναι δυνατόν να επιτευχθεί αν προσαρμοστούν οσφρητικά προσελκυστικά μόρια στις παγίδες, που θα έλκουν μόνο το συγκεκριμένο έντομο και κυρίως τα θηλυκά ενήλικα έντομα που είναι υπεύθυνα για τη ζημιά που προκαλείται στους καρπούς. Έτσι και τα δύο φύλα του εντόμου θα έλκονται από τις παγίδες καθ' ότι για τα αρσενικά έντομα η προσέλκυση γίνεται μέσω των σεξουαλικών φερομονών, όπως προαναφέρθηκε. Τα οσφρητικά μόρια ωστόσο, θα μπορούσαν να είναι και απωθητικά για τα έντομα και να χρησιμοποιηθούν για την παρασκευή βιολογικών απωθητικών sprays που θα αντικαταστήσουν τα συμβατικά εντομοκτόνα.

1.2 Οσφρητικό σύστημα εντόμων

Τα ζώα έχουν αναπτύξει μια μεγάλη ποικιλία αισθητικών συστημάτων προκειμένου να ανταποκρίνονται στις ανάγκες της καθημερινότητας και να μπορούν να εντοπίζουν και να αξιολογούν την τροφή, το καταφύγιο, τον σύντροφο τους καθώς επίσης να αποφεύγουν κινηγούς και άλλους κινδύνους. Ένα από αυτά τα αισθητικά συστήματα είναι και αυτό της όσφρησης. Πιο συγκεκριμένα, τα έντομα φαίνεται να εντοπίζουν οσμές μέσω ενός συστήματος- μηχανισμού ανίχνευσης στοιχείων σχετικών με το έντομο, όπου κάθε χημειούποδοχέας του συστήματος έχει μια άμεση οικολογική συσχέτιση με ένα συγκεκριμένο στοιχείο (Hansson and Stensmyr, 2011). Το οσφρητικό σύστημα των εντόμων ποικίλει σε μεγάλο βαθμό (Semaniuk, 2015). Η ποικιλομορφία αυτή οφείλεται σε παράγοντες όπως η πολυπλοκότητα του περιβάλλοντος καθώς και η επιλογή της τροφής (Stensmyr et al. 2003). Κάποια είδη διαθέτουν υψηλά εξειδικευμένα οσφρητικά συστήματα που ανταποκρίνονται σε συγκεκριμένα οσφρητικά ερεθίσματα όπως το παράσιτο του καρότου *Triosa apicalis* με μόνο 50 οσφρητικά κύτταρα υποδοχείς. Από την άλλη μεριά, υπάρχουν και κάποια είδη εντόμων που διαθέτουν πιο διευρυμένο οσφρητικό σύστημα, όπως οι μέλισσες που επισκέπτονται όποιο λουλούδι φέρει νέκταρ και το οσφρητικό τους σύστημα μπορεί να αναγνωρίζει και να διαχωρίζει εκατοντάδες διαφορετικές οσμές από λουλούδια. Τέτοιο έντομο είναι και η *Drosophila melanogaster* που αποτέλεσε τον οργανισμό μοντέλο για τη μελέτη της δομής και λειτουργίας του οσφρητικού συστήματος των εντόμων (Semaniuk, 2015). Η δομή και η λειτουργία του οσφρητικού συστήματος της *Drosophila* θα αναλυθούν περαιτέρω παρακάτω.

1.2.1 Οσφρητικά όργανα και νευρώνες στη *D. melanogaster*

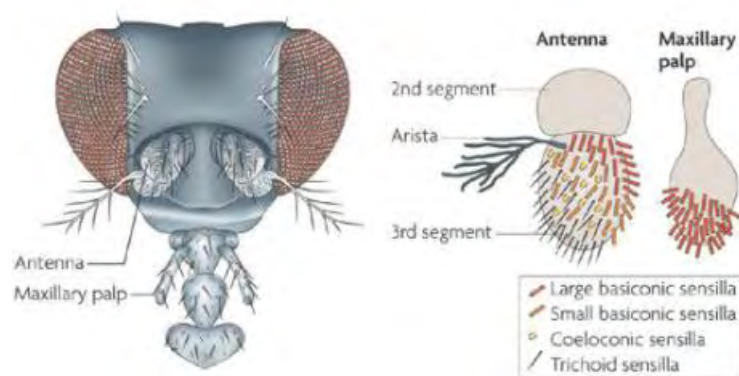
Οι μύγες των φρούτων εντοπίζουν τις οσμές μέσω δύο κυρίως οσφρητικών οργάνων στο κεφάλι: την κεραία και τις γναθικές προσακτρίδες. Τα δύο οσφρητικά όργανα καλύπτονται από ένα μεγάλο αριθμό αισθητικών τριχιδίων που ονομάζονται sensilla, ο ρόλος των οποίων έγκειται στη στέγαση και στην προστασία των οσφρητικών νευρώνων, OSNs, που εξειδικεύονται στον εντοπισμό των οσμών. Τα αισθητικά τριχίδια μπορούν να διακριθούν μορφολογικά από τα θερμοευαίσθητα και υγροευαίσθητα τριχίδια που απαντώνται στα έντομα, μέσω της ύπαρξης μικρών πόρων στην επιφάνειά τους, οι οποίοι επιτρέπουν και την είσοδο των οσμών. Συνολικά, στην κεραία υπάρχουν 410 αισθητικά τριχίδια που περιέχουν 1200 OSNs,

ενώ στις γναθικές προσακτρίδες περίπου 60 τριχίδια που περιέχουν 120 OSNs . Με βάση μορφολογικές και λειτουργικές διαφορές μεταξύ τους, τα αισθητικά τριχίδια μπορούν να διακριθούν σε:

α) βασικωνικά (basiconic), που έχουν σχήμα ροπαλού και βρίσκονται στην κεραία και στις γναθικές προσακτρίδες,

β) τριχοειδή (trichoid), που είναι μακρυά και αιχμηρά και βρίσκονται κυρίως στην κεραία,

γ) κοιλοκωνικά (coelonic), που έχουν σχήμα πασσάλου και βρίσκονται επίσης στην κεραία αν και υπάρχουν και διάσπαρτα με άλλα sensilla (Laissue and Vosshall, 2008) (Εικόνα 2).



Εικόνα 2: Οσφρητικά όργανα στη *D. melanogaster* και αισθητικά τριχίδια που απαντώνται κυρίως σε αυτά (Kaupp 2010)

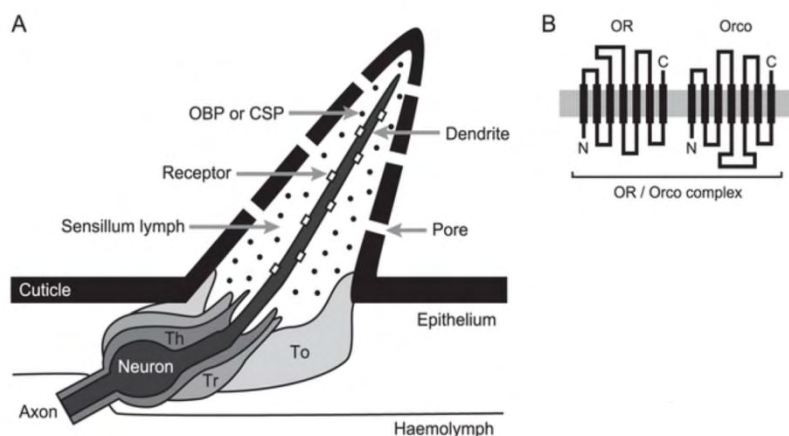
Τα βασικωνικά sensilla, τα οποία στεγάζουν δύο έως τέσσερις νευρώνες (Couto et al. 2005, Stocker 1994, Shanbhag et al. 1999), παρουσιάζουν μεγαλύτερη εξειδίκευση στον εντοπισμό της τροφής ενώ τα τριχοειδή sensilla, που στεγάζουν έναν έως τρεις νευρώνες, φέρουν OSNs που είναι ευαίσθητοι σε φερομόνες. Γι' αυτό το λόγο τα αρσενικά έντομα διαθέτουν περισσότερα τριχοειδή sensilla απ' ότι τα θηλυκά αλλά λιγότερα βασικωνικά από αυτά (Laissue and Vosshall, 2008).

Οι δενδρίτες των οσφρητικών νευρώνων που βρίσκονται στον ίδιο αισθητικό τριχίδιο και εκφράζουν τους ίδιους οσφρητικούς υποδοχείς, συγκλίνουν σε σφαιρικές δομές που ονομάζονται σπειράματα (glomeruli) στο λοβό του εγκεφάλου (Hansson and Stensmyr 2011, Hildebrand and Shepherd 1997, Strausfeld and Hildebrand 1999), μεταφέροντας έτσι μέσω συνάψεων με άλλους νευρώνες το οσφρητικό ερέθισμα στο κεντρικό τμήμα του εγκεφάλου (Gao et al. 2000, Mombaerts et al. 1996, Ressler et al. 1994, Vassar et al. 1994, Vosshall et al. 2000). Στον λοβό της κεραίας της *D. melanogaster* βρίσκονται περισσότερα από 40 μορφολογικά ίδια glomeruli, το μέγεθος, το σχήμα και οι θέσεις των οποίων εμφανίζουν μεγάλο βαθμό συντήρησης ανάμεσα στα διαφορετικά έντομα (Laissue and Vosshall, 2008).

1.2.2 Οσφρητικό μονοπάτι στη *Drosophila*

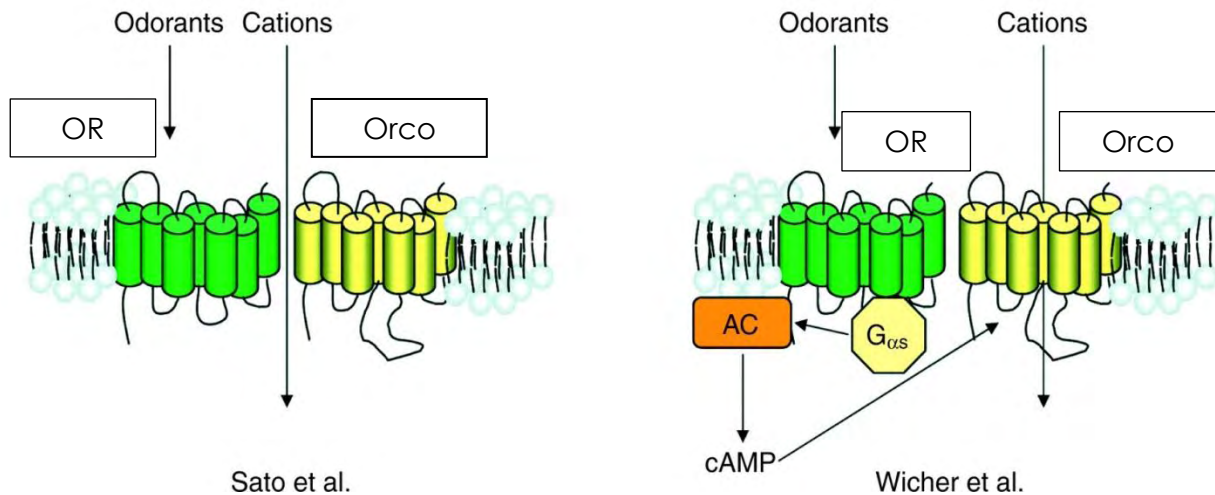
Κάθε οσφρητικός νευρώνας OSN στην *Drosophila* εκφράζει συνήθως έναν οσφρητικό υποδοχέα OR. Ωστόσο υπάρχουν και εξαιρέσεις νευρώνων που εκφράζουν περισσότερους από έναν ORs (Dobritsa et al. 2003, Hallem et al. 2004, Couto et al., 2005). Όταν η οσμή εισέλθει από τους πόρους των αισθητικών τριχιδίων, μεταφέρεται και προσδένεται στους υποδοχείς που βρίσκονται στους δενδρίτες του οσφρητικού νευρώνα είτε μέσω βοηθητικών οσμοδεσμευτικών πρωτεϊνών (Odorant Binding Proteins, OBPs) ή χημειοδεκτικών πρωτεϊνών (Chemosensory Proteins, CSPs) (Laissue and Vosshall, 2008), είτε χωρίς τη συμβολή αυτών,

καθώς έχουν παρατηρηθεί αρκετές περιπτώσεις οσφρητικών υποδοχέων στους οποίους η οσμή περνά μέσα από τους ORs χωρίς τη συμβολή κάποιας πρωτεΐνης. Οι υποδοχείς ORs έχουν δομή “ανάποδου” υποδοχέα GPCR των σπονδυλωτών και αποτελούνται από επτά διαμεμβρανικές περιοχές με το N-τελικό άκρο τους να βρίσκεται εσωκυτταρικά και το C-τελικό άκρο τους εξωκυτταρικά (Benton *et al.* 2006, Lundin *et al.* 2007). Αποτελούν διάλυτους κατιόντων Ca^{2+} και προκειμένου να ενεργοποιηθούν και να γίνει μεταγωγή σήματος σχηματίζουν ετεροδιμερή σύμπλοκα με τον συντηρημένο σε όλα τα έντομα οσφρητικό συνυποδοχέα, Orco (Odorant co-receptor, OR83b) (Benton *et al.* 2006) (Εικόνα 3).



Εικόνα 3 A: Αναπαράσταση της δομής και οργάνωσης ενός οσφρητικού αισθητικού τριχιδίου καθώς και των μοριακών συστατικών OBPs, CSPs και ORs, B: Δομή συμπλόκου οσφρητικού υποδοχέα OR και συνυποδοχέα Orco (Mitaka *et al.* 2016)

Μετά την πρόσδεση της οσμής σε ένα σύμπλοκο OR-Orco αυξάνεται η εισροή ιόντων Ca^{2+} (Sato *et al.* 2008). Η εμπλοκή ωστόσο των G πρωτεϊνών στο σηματοδοτικό μονοπάτι παραμένει αμφιλεγόμενη (Kain *et al.* 2008, Yao and Carlson 2010). Αν και η ενεργοποίηση των ORs, μετά από ηλεκτροφυσιολογικό έλεγχο αυτών των καναλιών δεν φάνηκε να εξαρτάται από δεύτερα μηνύματα μεταγωγής σήματος, όπως το cAMP και το cGMP (Sato *et al.* 2008), η ετερόλογη έκφραση των υποδοχέων και η εφαρμογή οσμής είχαν ως αποτέλεσμα την αύξηση της συγκέντρωσης του cAMP και την ενεργοποίηση της έκφρασης ενός καναλιού ιόντων ελεγχόμενου από το συνυποδοχέα Orco (Wicher *et al.* 2008) (Εικόνα 4). Το μονοπάτι αυτό βρέθηκε να ενεργοποιείται και σε περιπτώσεις όπου η συγκέντρωση της οσμής ήταν σε πολύ χαμηλά επίπεδα με αποτέλεσμα να μην μπορεί να ενεργοποιηθεί απευθείας ο OR (Progress in Molecular Biology and Translational Science, edited by Claude Bouchard, 2015). Έχει ακόμη αποδειχθεί ότι η ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης C (PLC) ή της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC) μπορεί να διεγείρει την δραστηριότητα του Orco ενώ η αναστολή των ενζύμων αυτών καταργεί την ευαισθησία του Orco στο cAMP (Sargsyan *et al.* 2011). Μετά την πρόσδεση της οσμής και την ενεργοποίηση του υποδοχέα, προκειμένου να μην υπάρξει συσσώρευση της οσμής στο κύτταρο, αυτή διασπάται από ειδικά ένζυμα αποικοδόμησης (Odorant Degrating Enzymes, ODEs (Vogt and Riddiford, 1981).



Εικόνα 4: Απεικόνιση των δύο εναλλακτικών μονοπατιών μετά την ενεργοποίηση των οσφρητικών υποδοχέων στα έντομα με βάση τα πειράματα των Sato et al. και Wicher et al. Με πράσινο χρώμα παριστάνονται οι ORs και με κίτρινο τα κανάλια του συνυποδοχέα Orco (Pellegrino and Nakagawa, 2009)

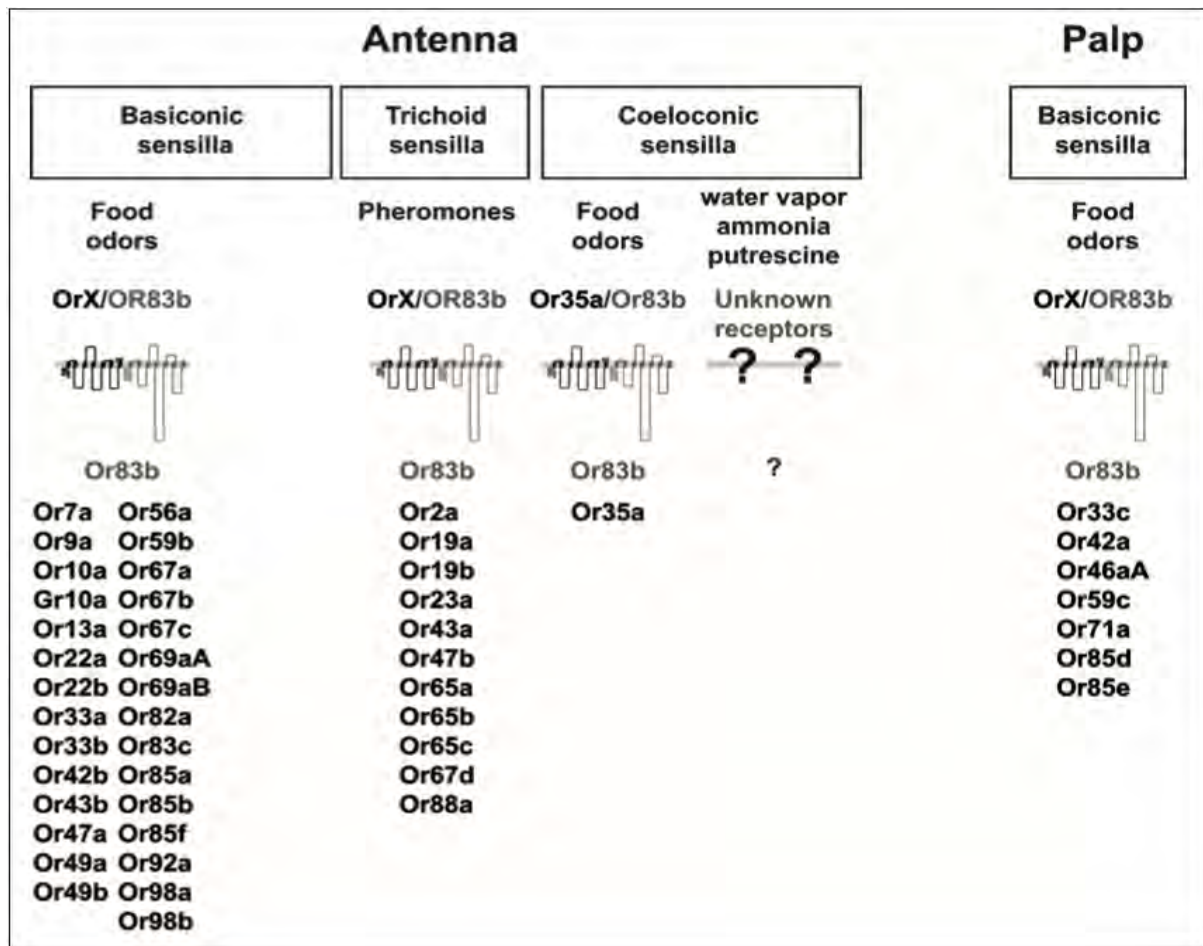
1.2.3 Μοριακά συστατικά του οσφρητικού μονοπατιού

Όπως είδαμε παραπάνω τα μοριακά συστατικά του οσφρητικού μονοπατιού στη *D. melanogaster* είναι τα εξής:

Οι οσφρητικοί υποδοχείς ORs (Odorant Receptors): Ο ρόλος τους έγκειται στην πρόσδεση της οσμής και η δομή τους αναφέρθηκε παραπάνω. Κάθε οσφρητικός υποδοχέας ενεργοποιείται από πολλαπλούς προσδέτες- οσμές και κάθε οσμή ενεργοποιεί πολλαπλούς υποδοχείς (Laissue and Vosshall, 2008). Η ολοκλήρωση της αλληλούχησης του γονιδιώματος της *Drosophila* αποκάλυψε την ύπαρξη 62 οσφρητικών υποδοχέων που έχουν προκύψει από το εναλλακτικό μάτισμα 60 γονιδίων τα οποία πήραν το όνομα τους από την χρωματοσωμική θέση στην οποία βρίσκονται (Robertson et al 2003). Τα γονίδια των οσφρητικών υποδοχέων που εκφράζονται ειδικά στην κεραία είναι 40 ενώ αυτά που εκφράζονται στις γναθικές προσακτρίδες μόλις 7 (Couto et al. 2005, Fishilevich and Vosshall 2005) (Εικόνα 5). Τα γονίδια των υποδοχέων που εκφράζονται στην κεραία δεν εκφράζονται στις γναθικές προσακτρίδες και αντίστροφα (Laissue and Vosshall, 2008). Τα υπόλοιπα γονίδια που κωδικοποιούν οσφρητικούς υποδοχείς στη *Drosophila* εκφράζονται στο στάδιο της προνύμφης και όχι του ενήλικου εντόμου (Fishilevich et al. 2005, Kreher et al. 2005).

Οι οσφρητικοί υποδοχείς αναγνωρίζουν μικρά πτητικά μόρια, τα οποία διαφέρουν πολύ στη χημική τους δομή και τις φυσικές τους ιδιότητες, μέσω συγκεκριμένων λειτουργικών ομάδων (Hallem et al. 2004). Συγκεκριμένα βρέθηκε ότι η πρόσδεση της οσμής όταν πρόκειται για φαινολικές ενώσεις γίνεται μετά την αλληλεπίδραση της ένωσης με το N- τελικό άκρο του υποδοχέα. Η αμινοξική αυτή περιοχή αναγνωρίζει μια μεγάλη ποικιλία φαινολικών ενώσεων και γι' αυτό το λόγο εμφανίζει πολλά διαφορετικά μοτίβα ανάλογα με τον τύπο ένωσης που αναγνωρίζει ο εκάστοτε υποδοχέας, τα οποία εμφανίζουν μικρό βαθμό συντήρησης (Ray et al. 2014). Το C- τελικό άκρο του υποδοχέα, αντίθετα, παρατηρήθηκε ότι εμφανίζει μοτίβα τρυπτοφάνης, που παρουσιάζουν μεγάλο βαθμό συντήρησης, (Clyne et al. 1999, Scott et al. 2001, Vosshall 2003) και αποτελεί το σημείο σχηματισμού ετεροδιμερών ανάμεσα στους υποδοχείς (Benton et al. 2006).

Κάποιοι ORS ανταποκρίνονται σε έναν μικρό αριθμό οσμών ενώ άλλοι έχουν πιο ευρεία δράση και ανταποκρίνονται σε έναν μεγάλο αριθμό οσμών (Laissue and Vosshall, 2008). Οι πρώτοι είναι κυρίως υποδοχείς που αναγνωρίζουν οσμές οι οποίες σχετίζονται με το φιλόξενο ή αφιλόξενο περιβάλλον για το έντομο και γι' αυτό εμφανίζουν μεγαλύτερη ειδικότητα ενώ οι δεύτεροι είναι υποδοχείς που ανταποκρίνονται σε οσμές γενικής φύσης (Hansson and Stensmyr, 2011).



Εικόνα 5: Μοριακή οργάνωση του οσφρητικού συστήματος της *Drosophila*. Καταγραφή των γονιδίων των οσφρητικών υποδοχέων που εκφράζονται στην κεραία και τις γναθικές προσακτρίδες ενήλικων εντόμων με βάση την οσμή που αναγνωρίζουν και το είδος των αισθητικών τριχιδίων στα οποία απαντώνται. Οι συνυποδοχείς αναπαριστώνται με γκρι χρώμα. Με εξαίρεση τον υποδοχέα OR35/OR83b, οι υποδοχείς που εκφράζονται στα κοιλοκωνικά sensilla παραμένουν άγνωστοι (Fishilevich and Vosshall 2005, Larsson et al. 2004, Goldman et al. 2005, de Bruyne et al. 2001, Yao et al. 2005, Ha and Smith 2006, Suh et al. 2004, Scott et al. 2001, Jones et al. 2007)

Οι οσμοδεσμευτικές πρωτεΐνες OBPs (Odorant Binding Proteins): Αποτελούν μια ομάδα υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών που πρωτοανακαλύφθηκαν το 1981 από τους Vogt and Riddiford. Εκκρίνονται από τα βοηθητικά κύτταρα που περιβάλλουν τους οσφρητικούς νευρώνες OSNs και εμφανίζουν ειδικές ιδιότητες προσδέτη (Swarup et al. 2011). Αν και η ακριβής τους λειτουργία μένει να διευκρινιστεί περαιτέρω, μετά και από την ανακάλυψη του ρόλου τους στην πρόσδεση φερομονών (Laughlin et al. 2008) έχει προταθεί ότι εμπλέκονται στην μεταφορά των λιποδιαλυτών οσμών στους οσφρητικούς υποδοχείς ORs όπως αναφέρθηκε και παραπάνω. Η οικογένεια των OBPs εμφανίστηκε από πολύ νωρίς, πιθανόν από τότε που εμφανίστηκαν τα έντομα (Vieira and Rozas 2011, Forêt and Maleszka 2006) και η παρουσία τους για την όσφρηση στα έντομα είναι αναγκαία (Pelosi et al. 2017). Οι OBPs απαντώνται επίσης στα σπονδυλωτά αλλά

με πολύ διαφορετικό ρόλο και δομή (Hansson and Stensmyr, 2011). Οι OBPs που προσδέουν φερομόνες ονομάζονται PBPs (Vogt et al. 1991).

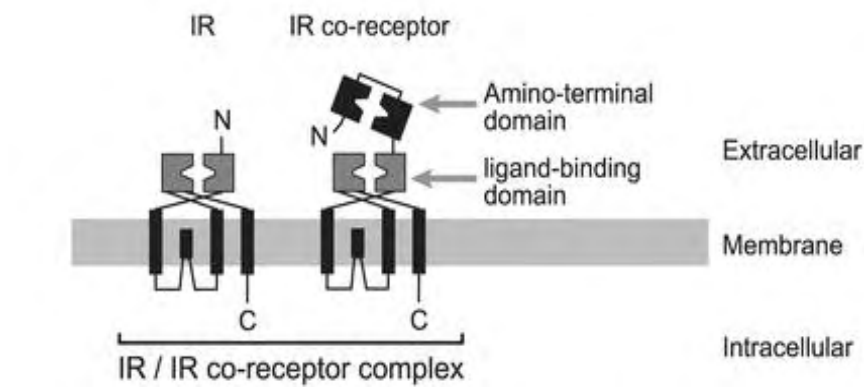
Οι χημειοδεκτικές πρωτεΐνες CSPs (Chemosensory Proteins): Έχουν παρόμοιο ρόλο και δομή με τις OBPs και εμπλέκονται στα αισθητικά σύστημα της όσφρησης και της γεύσης (McKenna et al. 1994, Pikielny et al. 1994, Angeli et al. 1999, Wanner et al. 2004, Pelosi et al. 2006, Vieira and Rozas 2011). Παρόλο που εμφανίζουν πολλαπλούς ρόλους, ένας από αυτούς είναι η συμβολή τους στην χημειοανίχνευση και κάποια μέλη της οικογένειας των CSPs θα μπορούσαν να θεωρηθούν ως μια δεύτερη οικογένεια οσμοδεσμευτικών πρωτεϊνών. Ωστόσο η παρουσία των CSPs στην όσφρηση δεν κρίνεται απαραίτητη όπως αυτή των OBPs, καθώς η απουσία τους βρέθηκε ότι δεν επηρεάζει τον εντοπισμό φερομονών και άλλων οσμών (Pelosi et al. 2017).

Τα ένζυμα αποικοδόμησης οσμών (ODEs, Odorant Degrading Enzymes): Τα ODEs ανήκουν σε μια τάξη ενζύμων αποτοξικοποίησης, κύριος ρόλος των οποίων είναι ο μεταβολισμός εξωγενών (π.χ. ξενοβιοτικά) και ενδογενών (π.χ. ορμόνες) στοιχείων (Li et al. 2007). Μετά το πέρας της ενεργοποίησης των οσφρητικών υποδοχέων από τα οσφρητικά ερεθίσματα, τα ODEs απενεργοποιούν ταχέως το μονοπάτι σηματοδότησης στους οσφρητικούς νευρώνες (Younus et al. 2014). Αυτό επιτυγχάνεται μέσω του μεταβολισμού των οσφρητικών ερεθισμάτων από τα ODEs, αποτρέποντας έτσι την συσσώρευση τους (Vogt and Riddiford, 1981). Παράλληλα δημιουργείται μια αισθητηριακή προσαρμογή στα οσφρητικά ερεθίσματα που μεταβολίστηκαν (Vogt and Riddiford, 1981) έτσι ώστε το οσφρητικό σύστημα του εντόμου να μπορέσει να ανταποκριθεί πιο γρήγορα όταν ξαναέρθει σε επαφή με αυτά (Younus et al. 2014).

Οι Sensory Neuronal Membrane Proteins (SNMPs): Οι SNMPs είναι μεμβρανικές πρωτεΐνες που απαντώνται στους οσφρητικούς νευρώνες των εντόμων που αποκρίνονται σε φερομόνες στα Lepidoptera και στα Diptera (Rogers et al. 1997, 2001a,b, Vogt 2003, Benton et al. 2007, Forstner et al. 2008, Jin et al. 2008). Οι SNMPs αποτελούν έναν υποκλάδο γονιδίων εντόμων που σχετίζονται με την ανθρώπινη πρωτεΐνη μεταφοράς λιπαρών οξέων CD36 (Nichols and Vogt, 2008). Στη *D. melanogaster* οι SNMPs που απαντώνται στην κεραία εμπλέκονται στον εντοπισμό της φερομόνης cis-vaccenyl acetate (cVA) (Jin et al, 2008). Ωστόσο, ο μηχανισμός δράσης των SNMPs στους οσφρητικούς νευρώνες δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως (Progress in Molecular Biology and Translational Science, edited by Claude Bouchard, 2015).

Οι οσφρητικοί ιονοτροπικοί υποδοχείς (IRs): Οι οσφρητικοί υποδοχείς IRs για τους οποίους δεν έγινε προηγούμενη αναφορά αποτελούν ίσως τον αρχαιότερο τύπο οσφρητικών υποδοχέων στα έντομα (Missbach et al. 2014). Ανήκουν στην οικογένεια των υποδοχέων του γλουταμινικού οξέος (iGluR) των σπονδυλωτών και των ασπόνδυλων και παίζουν ρόλο στη μετάδοση του σήματος κατά τη διαδικασία της όσφρησης (Progress in Molecular Biology and Translational Science, edited by Claude Bouchard, 2015). Στη *D. melanogaster* τα γονίδια των IRs εκφράζονται αποκλειστικά στα κοιλοκωνικά τριχίδια της κεραίας και είναι 61 γονίδια και 1 ψευδογονίδιο (Benton et al. 2009). Οι IRs εκφράζονται στους δενδρίτες των OSNs που δεν εκφράζουν ORs ή τον Orco (OR83b) με εξαίρεση τους νευρώνες των κοιλοκωνικών τριχιδίων που εκφράζουν το διμερές OR35/ OR83b (Yao et al. 2005). Η ανακάλυψη των IRs προήλθε έπειτα από

ηλεκτροφυσιολογική ανάλυση που έδειξε την απόκριση των κοιλιοκωνικών τριχιδίων σε οξέα, στην αμμωνία και στην υγρασία, υποδεικνύοντας έτσι και την ύπαρξη άλλων τύπων χημειούποδών (Scott et al. 2001, Couto et al. 2005, Yao et al. 2005). Δομικά, αποτελούνται από ένα διμερή τομέα πρόσδεσης του ερεθίσματος, του οποίου οι δύο λοβοί διαχωρίζονται από ένα κανάλι ιόντων, ένα εξωκυτταρικό αμινοτελικό άκρο και ένα ενδοκυτταρικό, μικρό καρβοξυτελικό άκρο (Mayer, 2006) (Εικόνα 6). Οι τομείς πρόσδεσης των ερεθισμάτων ποικίλουν ανάμεσα στους IRs και υποδεικνύουν ότι αναγνωρίζουν συγκεκριμένους προσδέτες. Ενώ κάθε OSN εκφράζει έναν OR, μπορεί να συνεκφράζει έως και πέντε διαφορετικούς IRs υποδεικνύοντας έτσι ότι πιθανώς σχηματίζουν πολυπρωτεϊνικά συμπλέγματα. Από τους IRs μεγαλύτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι IR8a και IR25a που παρουσιάζουν κοινές υπομονάδες σε πολλά διαφορετικά σύμπλοκα IRs. Η λειτουργία τους παραμένει ασαφής αλλά είναι πιθανόν να αποτελούν συνυποδοχείς των IRs με ανάλογη λειτουργία με το συνυποδοχέα Orco στους ORs (Larsson et al. 2004, Nakagawa et al. 2005, Benton et al. 2006, Sato et al. 2008). Οι IRs, επίσης, ίσως παίζουν κάποιον ρόλο σε άλλα χημειοερεθίσματα καθώς έχουν εντοπιστεί εκτός από τις κεραίες και στην προβοσκίδα των εντόμων. Τέλος επειδή εμφανίζουν ομολογία με βακτηριακά κανάλια ασβεστίου και τις βακτηριακές περιπλασμικές πρωτεΐνες πρόσδεσης (PBPs) υποδεικνύεται ότι έχουν προκαρυωτικές καταβολές και πιθανόν παίζουν ρόλο και στην διακυτταρική επικοινωνία και στην χημική αντίληψη των περιβαλλοντικών ερεθισμάτων (Benton et al. 2009).



Εικόνα 6: Δομή συμπλόκου υποδοχέα-συνυποδοχέα IR (Mitaka et al. 2016)

1.2.4 ORs και εξέλιξη

Δεβόνια περίοδος:

Η εμφάνιση της οικογένειας των ORs υπολογίζεται ότι έχει τις ρίζες της στην πρώιμη Δεβόνια περίοδο της παλαιοζωικής εποχής, όπου υπολογίζεται και η εμφάνιση των πρώτων εντόμων. Η εξέλιξη των ORs αποτελεί πιθανή προσαρμογή στη γήινη ζωή (Robertson et al. 2003) καθώς κατά τη μετάβαση από την θάλασσα στη στεριά τα οσφρητικά μόρια θα έπρεπε με κάποιον τρόπο να εντοπίζονται σε αέρια και όχι σε υδατοδιαλυτή μορφή (Missbach et al. 2014). Οι ORs φαίνεται να είναι σίγουρα παρόντες στον τελευταίο κοινό πρόγονο

ημι- και ολο-μετάβολων εντόμων τουλάχιστον 318-300 εκατομμύρια χρόνια πριν, με τον συνυποδοχέα Orco να είναι παρών και στις δύο ομάδες εντόμων (Krieger et al. 2003, Pitts et al. 2004, Smadja et al. 2009, Yang et al. 2012).

Οι πρώτες έρευνες:

Στα σπονδυλωτά, οι οσφρητικοί υποδοχείς ORs αναγνωρίστηκαν πρώτη φορά το 1991 ως μια πολύ μεγάλη οικογένεια γονιδίων που κωδικοποιούσαν μέλη της υπερικογένειας των υποδοχέων GPCRs (Buck and Axel, 1991). Κατά τη διάρκεια των 90s έγιναν προσπάθειες από πολλούς ερευνητές προκειμένου να βρεθούν ομόλογα γονίδια των ORs των σπονδυλωτών σε γονιδιώματα εντόμων αλλά όλες απέτυχαν. Τελικά, το 1999 τρία ερευνητικά groups χρησιμοποίησαν ένα συνδυασμό μεθόδων κλωνοποίησης (Vosshall et al. 1999) και πληροφοριών από βάσεις δεδομένων για πρωτεΐνες με πολυ-διαμεμβρανικές περιοχές προκειμένου να αναγνωρίσουν υποψήφιους ORs (Clyne et al. 1999, Gao and Chess 1999, Vosshall et al. 1999) στη *D. melanogaster*.

Εξελικτικό μοντέλο «γέννησης- θανάτου»:

Οι ORs ανταποκρίνονται σε ένα εξελικτικό μοντέλο «γέννησης- θανάτου» στο οποίο οι γονιδιακοί διπλασιασμοί αναπαριστούν τις «γεννήσεις» και οι ψευδογενέσεις και οι διαγραφές γονιδίων τους «θανάτους» (Nei et al. 2008, Sánchez-Gracia et al. 2009, Ramdya and Benton 2010, Cande et al. 2013). Μεταξύ ειδών εντόμων με διαφορετική καταγωγή, υπάρχουν περιπτώσεις όπου ομάδες γονιδίων οσφρητικών υποδοχέων έχουν επεκταθεί και άλλες που έχουν συρρικνωθεί ενώ επίσης υπάρχουν και γονίδια που έχουν απλά εξαφανιστεί από μια συγκεκριμένη ομάδα εντόμων. Όλες αυτές οι διαδικασίες οδήγησαν στη φυσική επιλογή των ORs που έμειναν στο γονιδίωμα των εντόμων λόγω προσαρμογών στο φυσικό περιβάλλον και τον εκάστοτε οργανισμό ξενιστή, και στην εξαφάνιση των υποδοχέων που δεν εμφάνιζαν κάποιο λειτουργικό σκοπό (Gardiner et al. 2008). Εξάιρεση αποτελούν οι συντηρημένοι υποδοχείς IRs των οποίων ορθόλογα γονίδια απαντώνται σε όλα τα έντομα (Croset et al. 2010) καθώς και ο συνυποδοχέας Orco (Or83b στην *D. melanogaster*), που είναι συντηρημένος σε όλα τα έντομα με φτερά (Vosshall and Hansson 2011, Missbach et al. 2014). Η ανάλυση των γονιδίων ORs των πέντε πιο στενών συγγενών εντόμων της *D. melanogaster* αποκάλυψε για τα έντομα που αναγνωρίζουν μια συγκεκριμένη πηγή τροφής ότι τα γονίδια των ORs που κωδικοποιούν υποδοχείς, οι οποίοι αναγνωρίζουν αυτή την πηγή τροφής, παρουσίαζαν μεγαλύτερη εξέλιξη και εμφάνισαν μεγαλύτερο ποσοστό ψευδογένεσης από έντομα τα οποία είναι γενικού ενδιαφέροντος (McBride et al. 2007). Ωστόσο, επεκτείνοντας την ανάλυση σε 12 αλληλουχημένα γονιδιώματα ειδών, συγγενικών με τη *Drosophila*, βρέθηκε ότι το ποσοστό των ψευδογονιδίων στους ORs δεν διέφερε ανάμεσα στα είδη εντόμων που αναγνώριζαν μια συγκεκριμένη πηγή τροφής και στα είδη γενικού ενδιαφέροντος (Gardiner et al. 2008). Επίσης, φάνηκε ότι τα ενδημικά είδη εμφάνιζαν πολύ περισσότερες απώλειες σε γονίδια απ' ό,τι τα είδη που ζούσαν σε ένα σταθερό περιβάλλον (Hansson and Stensmyr 2011).

Όταν ένα γεγονός διπλασιασμού οδηγεί στην εμφάνιση ενός καινούργιου γονιδίου OR, η αρνητική επιλογή στα πλαίσια της φυσικής επιλογής είναι πιο χαλαρή στο ένα από τα δύο αντίγραφα του διπλασιασμένου γονιδίου, με αποτέλεσμα να διατηρηθεί η λειτουργικότητα και των δύο παράλογων γονιδίων (Ramdya and Benton 2010). Συχνά, ένα από τα αντίγραφα θα μετατραπεί σε ψευδογονίδιο λόγω λειτουργικής υπεραφθονίας των δύο αντιγράφων. Ωστόσο σε κάποιες περιπτώσεις το νέο αντίγραφο θα αποκτήσει ένα νέο λειτουργικό ρόλο ή θα διατηρήσει τον ρόλο του γονιδίου από τον διπλασιασμό του οποίου πρόεκυψε.

Όλες αυτές οι διαδικασίες σχετίζονται άμεσα και σε μεγάλο βαθμό με την μεγάλη ποικιλομορφία και την ραγδαία διαφοροποίηση των γονιδίων των οσφρητικών υποδοχέων (Nei et al. 2008).

Γενικά, κάθε μετάλλαξη που αλλάζει την ειδικότητα ενός προϋπάρχοντος ή νεοεμφανιζόμενου υποδοχέα OR δεν θα υποστεί αρνητική επιλογή αν δεν αλλάξει η αρμοστικότητα των ατόμων, που φέρουν τη μετάλλαξη, στο περιβάλλον τους. Για παράδειγμα σε κάποιο έντομο, αν η μετάλλαξη έχει ως αποτέλεσμα την διεύρυνση της λειτουργίας ενός ειδικού υποδοχέα για κάποια οσμή, και σε άλλες οσμές, αλλά το έντομο δεν έρθει ποτέ σε επαφή με κάποια από αυτές τις άλλες οσμές, τότε η αρμοστικότητά του στο περιβάλλον δεν θα αλλάξει και άρα η μετάλλαξη δεν θα υποστεί αρνητική επιλογή. Έτσι η συχνότητα εμφάνισης αυτού του μεταλλαγμένου αλληλομόρφου του υποδοχέα στον πληθυσμό μπορεί να επηρεαστεί μόνο από τυχαίες γενετικές αλλαγές με αποτέλεσμα ο πληθυσμός να παραμείνει πολυμορφικός στην περιοχή της μετάλλαξης, γεγονός που εμφανίζεται στους ORs στους φυσικούς πληθυσμούς της *Drosophila* (Rollmann et al. 2010, Pellegrino et al. 2011). Τέτοιες τυχαίες γενετικές αλλαγές μπορούν όμως επίσης να οδηγήσουν σε εξάλειψη της μετάλλαξης ή ακόμα και σε εξαφάνιση του μεταλλαγμένου υποδοχέα (Walker et al. 2016).

1.3 Ο δάκος της ελιάς, *B. oleae*

Ο οργανισμός με τον οποίο ασχοληθήκαμε στην παρούσα εργασία είναι ο δάκος της ελιάς, *B. oleae*. Αποτελεί ένα δίπτερο, μονοφάγο, ολομετάβολο έντομο που ανήκει στην οικογένεια Tephritidae και είναι το κυριότερο παράσιτο της ελιάς.



Εικόνα 7 Ενήλικα έντομα δάκου. Αριστερά: αρσενικός δάκος (www.flickr.com), δεξιά: θηλυκός δάκος (www.biodiversidadvirtual.org). Ξεχωρίζουν από τη δομή του ωσθέτη που το θηλυκό έντομο φέρει στο πίσω μέρος του σώματος του

1.3.1 Γενικές πληροφορίες για το δάκο της ελιάς

Ιστορία:

Η ιστορία της ελιάς ξεκινά στην περιοχή της Μεσογείου όπου ακόμα και σήμερα εντοπίζεται το μεγαλύτερο ποσοστό ελαιόδεντρων στον πλανήτη (95%). Απολιθώματα ελαιόδεντρων χρονολογούνται μέχρι και πριν από 20-40 εκατομμύρια χρόνια στην περιοχή της Μεσογείου όπου πρωτοεμφανίστηκε η ελιά σε άγρια μορφή. Υποστηρίζεται, επίσης, ότι το ελαιόδεντρο καλλιεργήθηκε για πρώτη φορά, σύμφωνα με την ιστορία, σε μεσογειακό έδαφος πριν από 7000 χρόνια περίπου ενώ αξιοποιήθηκε εμπορικά κατά την περίοδο του Μινωικού πολιτισμού περί το 3000 π.Χ. (**Εικόνα 8**) (Therios 2009). Όπως αναφέρεται στη μυθολογία, η ελιά ήταν το δέντρο το οποίο προσέφερε η θεά Αθηνά στους κάτοικους της Αθήνας για να διαλέξουν το όνομα της για την ονομασία της πόλης και όχι το όνομα του αδερφού της, Ποσειδώνα.



Εικόνα 8: Συγκομιδή ελαιόκαρπου κατά την περίοδο του Μινωικού πολιτισμού (Therios,2009)

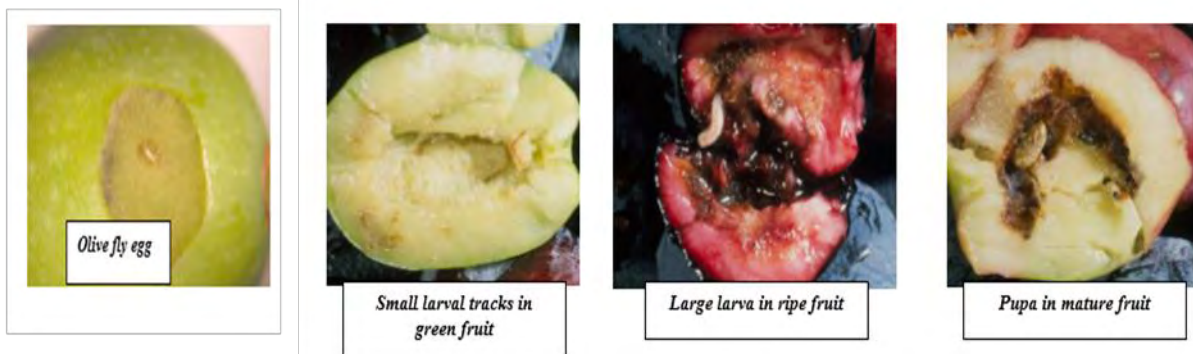
Η ιστορία, ωστόσο, του σημαντικότερου παρασίτου της ελιάς, του δάκου, ξεκινά πιο μετά. Συγκεκριμένα, πιστεύεται ότι ο δάκος της ελιάς πρωτοεμφανίστηκε τον 3ο αιώνα π. Χ. στην περιοχή της Μεσογείου και στην ανατολική και νότια Αφρική από όπου υπάρχουν και αναφορές για την παρασιτική του δράση στον καρπό της ελιάς (Rice 2000). Ο βοτανολόγος Θεόφραστος στην αρχαία Αθήνα τον περιέγραψε ως το “σκουλήκι το οποίο καταστρέφει την ελιά κάτω από το δέρμα της” λόγω της παρασιτικής του δράσης που θα αναφερθεί παρακάτω (Theophrastus 1916).

Που εντοπίζεται σήμερα ο δάκος της ελιάς:

Στις περιοχές που πλήττονται από τον δάκο σήμερα, περιλαμβάνεται κάθε περιοχή όπου εντοπίζονται καλλιεργήσιμες ή άγριες ελιές. Αυτές είναι: οι χώρες που βρέχονται από τη Μεσόγειο θάλασσα, η νότια και κεντρική Αφρική, το Πακιστάν, η Μέση Ανατολή ενώ πρόσφατα ο δάκος εντοπίστηκε στην Καλιφόρνια, στις Η.Π.Α. και στο Μεξικό (Nardi et al. 2005).

Κύκλος ζωής του δάκου:

Ο κύκλος ζωής του δάκου ξεκινά από τη στιγμή που τα θηλυκά και αρσενικά έντομα συζευχθούν και ακολούθως τα θηλυκά αποθέσουν τα αυγά τους στον καρπό της ελιάς. Συνήθως κάθε θηλυκό έντομο αφήνει ένα αυγό σε κάθε καρπό τρυπώντας τον με μια μυτερή δομή που βρίσκεται στο πίσω μέρος του σώματος του και ονομάζεται ωοθέτης (Ant et al. 2012). Τα αυγά (eggs) στους καρπούς εκκολάπτονται μετά από δύο με τρεις ημέρες σε μικρά σκουλήκια ,που ονομάζονται προνύμφες (larvae), τα οποία διατρέφονται από τον καρπό της ελιάς και μετά από δέκα ημέρες δίνουν τις νύμφες (pupa) από τις οποίες στη συνέχεια θα προκύψουν τα ενήλικα έντομα (Rice 2000, Nardi et al. 2003) (**Εικόνα 9**). Οι νύμφες μπορούν να αναπτυχθούν μέσα στον καρπό ή ακόμα και στο έδαφος κατά τους χειμερινούς μήνες στους οποίους η ανάπτυξη σε ενήλικα επιβραδύνεται σημαντικά (Byron and Gillett-Kaufman 1999). Τα ενήλικα έντομα τρέφονται με νέκταρ, μέλι και άλλες ρευστές ή ημι-ρευστές πηγές τροφής (Rice 2000).



Εικόνα 9: Παρασιτική δράση του δάκου στο πέρασμα του κύκλου ζωής του από το αυγό στη νύμφη (Rice 2000)

Παρασιτική δράση:

Η παρασιτική δράση του δάκου οφείλεται στη διαδικασία της ωαπόθεσης και στην ανάπτυξη των προνυμφών οι οποίες κατατρώγουν τον καρπό της ελιάς δημιουργώντας στοές στο εσωτερικό του καταστρέφοντας έτσι την σάρκα της ελιάς και επιτρέποντας την είσοδο άλλων μολυσματικών στοιχείων όπως βακτήρια και μύκητες. Η ανάπτυξη τέτοιου είδους μικροοργανισμών έχει ως αποτέλεσμα το σάπισμα της ελιάς και την σημαντική αύξηση των επιπέδων ελεύθερων λιπαρών οξέων (οξύτητα) στο ελαιόλαδο μειώνοντας σε μεγάλο βαθμό την ποιότητα του. Επιπρόσθετα η ζημιά που προκαλείται από την θρέψη των προνυμφών από την ελιά έχει ως αποτέλεσμα να πέφτουν οι καρποί στο έδαφος ενώ ακόμα δεν έχουν ωριμάσει μειώνοντας έτσι σε μεγάλο βαθμό την παραγωγή (> 30 % μείωση της παραγωγής ελαιολάδου ετησίως). Τέλος τα σημάδια που αφήνουν τα θηλυκά μετά το τρύπημα του καρπού με τον ωαποθέτη καταστρέφουν την ποιότητα της επιτραπέζιας ελιάς (Rice 2000).

Οικονομική σημασία:

Αν σκεφτούμε ότι από ένα μόνο θηλυκό έντομο μπορούν να καταστραφούν περισσότερα από 300 ελαιόδεντρα σε μερικούς μόνο μήνες, διάστημα το οποίο αποτελεί και τη διάρκεια ζωής του δάκου, σε συνδυασμό με το ότι ο δάκος παρουσιάζει τρεις με πέντε γενιές το χρόνο, ανάλογα με τις εκάστοτε καιρικές συνθήκες, μπορούμε να φανταστούμε το μέγεθος της καταστροφής που προκαλείται στην ελιά από το συγκεκριμένο παράσιτο. Αυτό το γεγονός το καθιστά ως είδος τεράστιας οικονομικής σημασίας και δικαιολογεί το πλήθος των ερευνών που γίνονται στο δάκο στις μέρες μας (Daane and Johnson 2010).

1.3.2 Οσφρητικό σύστημα και οσφρητικοί υποδοχείς στο δάκο

Μέσω του οσφρητικού του συστήματος, ο δάκος της ελιάς αναγνωρίζει πηγές τροφής και αποκρίνεται σε πτητικές ενώσεις του περιβάλλοντός του και πιο συγκεκριμένα σε ενώσεις που απελευθερώνονται από την ελιά, η οποία αποτελεί και το μοναδικό φυτό ξενιστή που προσβάλλει (Scarpati et al. 1993). Μέσω των ενώσεων αυτών, οι θηλυκοί δάκοι μπορούν να εντοπίζουν την ελιά και να ωαποθέτουν σε αυτήν (Rotundo et al. 2001). Ωστόσο, οι πτητικές ενώσεις που απελευθερώνονται από τα φύλλα ή τους καρπούς της ελιάς μπορεί να έχουν εκτός από προσελκυστική και απωθητική δράση για τον δάκο (Scarpati et al. 1993). Τέτοιες ενώσεις εκτός από την ελιά, απελευθερώνονται και από άλλα έντομα ή βακτήρια της ελιάς, όπως το επιφυτικό είδος *Pseudomonas putida* το οποίο εκκρίνει ενώσεις που έλκουν τους ενήλικους δάκους στην ελιά (Sacchetti et al. 2007, 2008).

Τα οσφρητικά αισθητικά τριχίδια στον δάκο αναλογικά με άλλα είδη εντόμων, όπως η μεσογειακή μύγα *C. capitata* (Mayo et al. 1987, Dickens et al. 1988) και κάποια τροπικά είδη του γένους *Bactrocera*, απαντώνται στις κεραίες και στις γναθικές προσακτρίδες, με κυριότερο οσφρητικό όργανο τις κεραίες του εντόμου όπου εδράζονται 4 είδη αισθητικών τριχιδίων: τα μακρυά βασικονικά αισθητικά τριχίδια, τα τριχοειδή αισθητικά τριχίδια, τα κοντά ραβδωτά αισθητικά τριχίδια και τα στυλοκονικά τριχίδια. Ηλεκτροαντενογραφήματα με χρήση εκχυλισμάτων ελαιολάδου έδειξαν ότι η αναγνώριση των πτητικών στοιχείων του ελαιολάδου γίνεται κυρίως από τους οσφρητικούς υποδοχείς των βασικονικών τριχιδίων της κεραίας. Οι ηλεκτροφυσιολογικές αναλύσεις έδειξαν επίσης ότι αν και οι οσφρητικοί υποδοχείς που βρίσκονται στις γναθικές προσακτρίδες εμπλέκονται επίσης στην αναγνώριση των ενώσεων της ελιάς, κύριος ρόλος τους είναι ο εντοπισμός ενώσεων που εκκρίνονται από βακτήρια. Μένει ωστόσο ακόμα να διευκρινιστεί αν οι γναθικές προσακτρίδες εμφανίζουν διακριτό ρόλο στην οσφρητική διαδικασία ή αποτελούν βοηθητικό στοιχείο και η οσφρητική διαδικασία γίνεται κυρίως από τις κεραίες (Liscia et al. 2013).

Όσον αφορά τις διαφορές στην απόκριση του δάκου στα στοιχεία της ελιάς ανάμεσα σε συζευγμένους ή μη δάκους, παρατηρήθηκε ότι η απόκριση στο α-πινένιο, μια χημική ένωση που εμπλέκεται στην συζευκτική συμπεριφορά του εντόμου καθώς αποτελεί συστατικό της σεξουαλικής φερομόνης του δάκου (Mazomenos and Haniotakis, 1985) και εκκρίνεται από τα φύλλα και τους καρπούς της ελιάς, ήταν πιο έντονη για τα συζευγμένα αρσενικά και θηλυκά έντομα απ' ό,τι για τα μη συζευγμένα. Ωστόσο τα συζευγμένα αρσενικά εμφάνισαν μειωμένη απόκριση σε υψηλές συγκεντρώσεις ενώ η απόκριση των θηλυκών ήταν αμείωτη ανεξάρτητα από τη συγκέντρωση. Από το γεγονός αυτό συμπεραίνουμε ότι τα συζευγμένα έντομα και κυρίως τα θηλυκά εμφανίζουν και τη μεγαλύτερη απόκριση σε πτητικές ενώσεις που απελευθερώνονται από την ελιά καθώς αυτά είναι που επιτελούν την ωοαπόθεση (Liscia et al. 2013).

Τα μοριακά στοιχεία του οσφρητικού συστήματος του δάκου και τα γονίδια που τα κωδικοποιούν βρίσκονται σε πρώιμο στάδιο ανάλυσης, εμφανίζουν αναλογία με τα μοριακά στοιχεία της *D. melanogaster* που αναφέρθηκαν παραπάνω. Μεγαλύτερη ανάλυση έχει γίνει για τις οσμοδεσμευτικές πρωτεΐνες (OBPs) και τον συνυποδοχέα Orco ενώ το επόμενο βήμα είναι η μελέτη των οσφρητικών υποδοχέων (ORs).

1.4 Ελιά και ενώσεις

Ο ελαιόκαρπος ζυγίζει από 2 μέχρι 12 γραμμάρια και σε μερικές περιπτώσεις ακόμα και 20 γραμμάρια (Boskou et al. 2006, Niaounakis and Halvadakis 2006). Η μέση σύσταση ενός ελαιοκάρπου περιλαμβάνει νερό (50%), πρωτεΐνες (1.6%), λάδι (22%), υδατάνθρακες (19.1%), κυτταρίνη (5.8%), ανόργανες ενώσεις (1.5%) και φαινολικές ενώσεις (1–3%). Άλλα σημαντικά στοιχεία της ελιάς είναι η πηκτίνη, τα οργανικά οξέα και οι χρωστικές ουσίες (Boskou 1996). Η κατανομή των παραπάνω συστατικών, ωστόσο, ποικίλλει ανάλογα με την ποικιλία της ελιάς, τον τρόπο καλλιέργειας, τη γεωγραφική προέλευση και το επίπεδο ωρίμανσης (Ghanbari et al. 2012).

Όσον αφορά τις πτητικές ενώσεις που απελευθερώνονται από την ελιά υπάρχουν αυτές που βρίσκονται στον άθικτο ιστό του καρπού και αυτές που παράγονται κατά τη διαδικασία παραγωγής του ελαιολάδου λόγω ενζυμικών αντιδράσεων παρουσία οξυγόνου (Ghanbari et al. 2012). Ο δάκος αναγνωρίζει τις πρώτες ενώσεις προκειμένου να εντοπίσει την ελιά με την όσφρηση και να ωαποθέσει. Αυτές είναι κυρίως φαινολικές ενώσεις οι οποίες αν και βρίσκονται σε μικρό ποσοστό στην ελιά, αποτελούν τα δραστικότερα συστατικά της και της προσδίδουν το χαρακτηριστικό άρωμα και την πικρή γεύση ενώ επίσης παρουσιάζουν έντονο φαρμακολογικό ενδιαφέρον.

1.4.1 Φαινολικές ενώσεις στην ελιά και ιδιότητες

Η ελιά και το ελαιόλαδο αποτελούν αναπόσπαστα στοιχεία της μεσογειακής διατροφής με πολλές ευεργετικές επιδράσεις στην υγεία του ανθρώπου. Τα συστατικά της ελιάς στα οποία οφείλονται και οι ευεργετικές της ιδιότητες είναι οι φαινολικές ενώσεις της ελιάς. Αυτές αποτελούν δευτερογενείς μεταβολίτες που παράγονται αυθόρμητα από το φυτό κάτω από συνθήκες stress (π.χ. μόλυνση, ακτινοβολία UV) (Naczk and Shahidib 2004) και μπορεί να είναι υδρόφιλες (φαινολικά οξέα, φαινολικές αλκοόλες, флаβονοειδή και σεκοϊρινοειδή) και λιπόφιλες (κρεσόλες) ενώσεις. Οι φαινολικές ενώσεις εμφανίζουν αντιοξειδωτικές, αντικαρκινικές, αντιφλεγμονώδεις, αντιμικροβιακές, αντιυπερτασικές, αντιδιδυλιπιδαιμικές, καρδιοτονωτικές, καθαρτικές και αντιαιμοπεταλιακές ιδιότητες (Ghanbari et al. 2012).

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι υδρόφιλες φαινολικές ενώσεις, ο αριθμός των οποίων στο ελαιόλαδο φτάνει τουλάχιστον τις 30 (Tuck and Hayball, 2002). Η σύστασή τους στην ελιά και στο ελαιόλαδο είναι πολύ πολύπλοκη και η μέση συγκέντρωσή τους εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως το στάδιο ωρίμανσης της ελιάς, το μέρος του καρπού από το οποίο προέρχονται, η ποικιλία της ελιάς, η εποχή συγκομιδής της ελιάς, το πακετάρισμα και η αποθήκευση της ελιάς, οι κλιματολογικές συνθήκες στην καλλιέργεια και ο βαθμό της τεχνολογίας που χρησιμοποιείται για την παραγωγή της ελιάς (Boskou et al. 2005).

Πιο συγκεκριμένα στα φύλλα της ελιάς, από τα οποία κυρίως γίνεται και η εκχύλιση των φαινολικών ενώσεων (Walker 1997, Pooley and Peterson 1997), έχουν εντοπιστεί οι εξής πολυφαινολικές ενώσεις: υδροξυτυροσόλη, γλυκοσίδη της υδροξυτυροσόλης, τυροσόλη, παράγωγα ελενολικού οξέος, καφεϊκό οξύ, ολευρωπαΐνη, varbascoside*, ρουτίνη, 7-O-γλυκοσίδιο της λουτεολίνης, 4-O-γλυκοσίδιο της λουτεολίνης, απιγενίνη-7-O-ρουτινοσίδη, 7-O-γλυκοσίδιο της απιγενίνης (Pinelli et al. 1999, Benavente- Garcia et al. 2000). Αν και η ολευρωπαΐνη αποτελεί την ένωση που βρίσκεται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση και είναι περισσότερο μελετημένη από τις άλλες ενώσεις, ο συνδυασμός όλων των παραπάνω ενώσεων είναι υπεύθυνος για την αντιμικροβιακή δράση της ελιάς (Le Tutour and Guedon 1992).

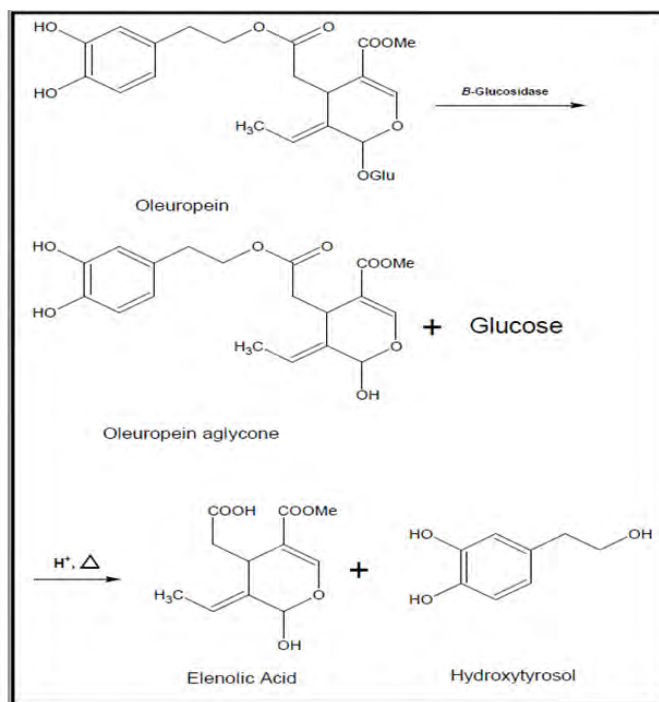
Όσον αφορά τις φαινολικές ενώσεις στο ελαιόλαδο, τα φαινολικά οξέα ήταν η πρώτη ομάδα φαινολικών ενώσεων που βρέθηκε στο ελαιόλαδο. Οι ενώσεις αυτές μαζί με τις φαινυλ-αλκοόλες, τις υδροξυ-ισοχρωμάνες και τα флаβονοειδή (Bianco et al. 2001) είναι παρούσες σε μικρές ποσότητες στο ελαιόλαδο (Montedoro 1972). Αντίθετα τα σεκοϊρινοειδή και οι λιγνάνες είναι οι πιο επικρατούσες ενώσεις στο ελαιόλαδο.

Τα σεκοϊρινοειδή είναι παράγωγα της ολευρωπαΐνης, της διμεθυλο-ολευρωπαΐνης και του ligstroside* (Ghanbari et al. 2012). Βρίσκονται σε όλα σχεδόν τα μέρη του φυτού αλλά η συγκέντρωσή τους ποικίλλει ανάμεσα στους διαφορετικούς ιστούς (Boskou 1996, Covas et al. 2006).



1.4.2 Ολευρωπαΐνη και Υδροξυτυροσόλη

Η ολευρωπαΐνη αποτελεί την κυριότερη δραστική ουσία της ελιάς που της προσδίδει και την χαρακτηριστική πικρή γεύση. Ανακαλύφθηκε στις αρχές του 1900 ως συστατικό που καθιστά την ελιά ανθεκτική σε ασθένειες (Walker 1997). Ανήκει στην οικογένεια των σεκοΐρινοειδών και αποτελεί έναν εστέρα που αποτελείται από ελενολικό οξύ, υδροξυτυροσόλη (3,4 διυδροξυφαιθυλεθανόλη) και ένα μόριο γλυκόζης. Συνεπώς η υδρόλυση της ολευρωπαΐνης οδηγεί στην παραγωγή ελενολικού οξέος και υδροξυτυροσόλης (Visioli and Galli 1998) (Εικόνα 10).



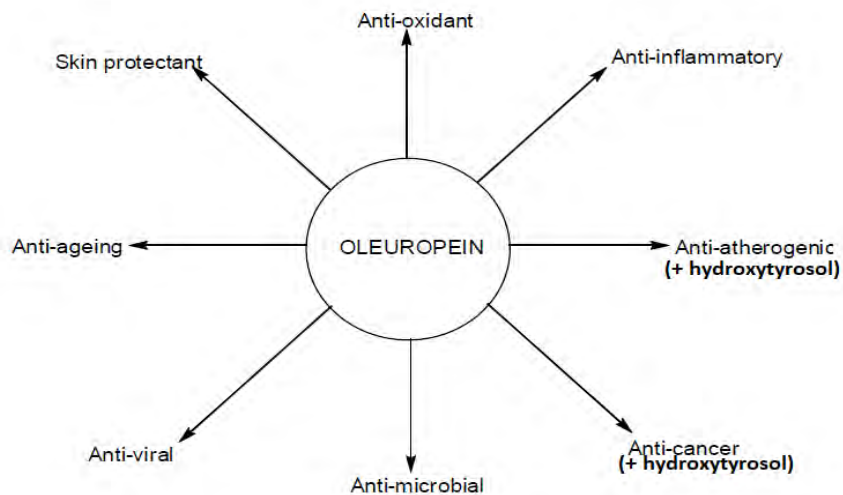
Εικόνα 10: Τα προϊόντα αποικοδόμησης που προκύπτουν από την ενζυμική και όξινη υδρόλυση της ολευρωπαΐνης (Fredkinson 2000)

Η ολευρωπαΐνη και η υδροξυτυροσόλη είναι τα πιο αντιπροσωπευτικά κατεχολικά στοιχεία της ελιάς και των παραγώγων της, συμπεριλαμβανομένων του ελαιολάδου, των εκχυλισμάτων από τα φύλλα της ελιάς και των απόβλητων των ελαιοτριβείων (Visioli and Galli 1998, Bliedkas et al. 2002). Η ολευρωπαΐνη μπορεί να φτάσει σε συγκεντρώσεις μέχρι 140 mg/g σε άγουρες ελιές ενώ η περιεκτικότητά της στα φύλλα της ελιάς είναι 60-90 mg/g (Zarzuelo et al. 1991). Η υδροξυτυροσόλη μπορεί να φτάσει μέχρι και τα 76,73 mg/100 g ελιών (Kountouri et al. 2007).

Η συγκέντρωση της ολευρωπαΐνης είναι μεγαλύτερη στα αρχικά στάδια της ελιάς όταν είναι ακόμα κιτρινοπράσινη πριν αρχίσει η φάση ωρίμανσης της (Amiot et al. 1989). Κατά την ωρίμανση της ελιάς η ολευρωπαΐνη υδρολύεται από εστεράσες και μειώνεται η συγκέντρωσή της (Amiot et al. 1986). Σε μερικά είδη ελιάς μάλιστα μπορεί να φτάσει και το μηδέν όταν οι ελιές γίνουν εντελώς μαύρες (Bianchi 2003). Η πτώση της συγκέντρωσης της ολευρωπαΐνης συνοδεύεται από την αύξηση της συγκέντρωσης της διμεθυλοολευρωπαΐνης, του γλυκοσιδίου του ελενολικού οξέος και της υδροξυτυροσόλης τα οποία

παράγονται από την υδρόλυση της ολευρωπαϊνης (Ryan et al. 1999). Το ελενολικό οξύ και η υδροξυτυροσόλη θεωρούνται ως παράγοντες ένδειξης της ωρίμανσης της ελιάς (Esti et al. 1998). Ωστόσο εκτός από το στάδιο ωρίμανσης, τα επίπεδα ολευρωπαϊνης και της υδροξυτυροσόλης στην ελιά σχετίζονται και με το μέγεθός της. Συγκεκριμένα, όσο πιο μικρό είναι το μέγεθος της ελιάς τόσο μεγαλύτερη συγκέντρωση ολευρωπαϊνης και μικρότερη συγκέντρωση υδροξυτυροσόλης θα υπάρχει σε αυτή και το αντίστροφο (Ghanbari et al. 2012). Απ' όλα τα παραπάνω και δεδομένου ότι ο δάκος της ελιάς παρασιτεί σε ελιές με μεγάλο καρπό και στο στάδιο της ωρίμανσης τους, συμπεραίνουμε ότι ο δάκος θα πρέπει λογικά να έλκεται από πτητικές ενώσεις όπως η υδροξυτυροσόλη και να απωθείται από την ολευρωπαϊνη.

Τα επίπεδα τοξικότητας της ολευρωπαϊνης και υδροξυτυροσόλης για τον δάκο δεν είναι γνωστά. Επειδή, ωστόσο οι δύο αυτές ενώσεις είναι και αυτές που καθιστούν την ελιά ένα φυτό με έντονο φαρμακευτικό και ιατρικό ενδιαφέρον, είναι γνωστά τα επίπεδα τοξικότητας των δύο ενώσεων μετά από χορήγηση τους σε ζώα όπως ο ποντικός, τα οποία ωστόσο δεν μπορούν να αποτελέσουν μέτρο σύγκρισης για το δάκο. Συνεπώς μόνο από την συγκέντρωση των δύο αυτών ενώσεων στην ελιά μπορούμε να συμπεράνουμε πιθανά επίπεδα τοξικότητας για το δάκο.



Εικόνα 11: Ευεργετικές επιδράσεις της ολευρωπαϊνης και της υδροξυτυροσόλης στην υγεία του ανθρώπου (Visioli et al. 2002, Visioli et al. 1998, Carluccio et al. 2003, Owen et al. 2000, Tripoli et al. 2005, Fredrickson 2000, Omar 2010)

Συγκεκριμένα η υδροξυτυροσόλη ($C_8H_{10}O_3$) είναι μια φαινολική ένωση με σημείο τήξεως $56^{\circ}C$ και σημείο βρασμού $265^{\circ}C$ που την καθιστά ημιπτητική και επομένως εντοπίζεται από το οσφρητικό σύστημα του δάκου. Έχει μοριακό βάρος 154,16 και η συνήθης μορφή της είναι ένα ελαφρώς κίτρινο υγρό. Είναι διαλυτή στο νερό αλλά εμφανίζει μεγαλύτερη διαλυτότητα σε πολικούς οργανικούς διαλύτες (Seprox - Biotech).

1.5 Σκοπός

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η ανάλυση της έκφρασης γονιδίων υποψήφιων οσφρητικών υποδοχέων στο δάκο της ελιάς, *B. oleae* μετά από έκθεση στην υδροξυτυροσόλη (hydroxytyrosol), μια φαινολική ημιπτητική ένωση της ελιάς. Η επιλογή των προς ανάλυση υποδοχέων έγινε ύστερα από

φυλογενετική ανάλυση με τους οσφρητικούς υποδοχείς συγγενικών προς το δάκο ειδών: *Drosophila melanogaster*, *Ceratitis capitata*, *Musca domestica*, *Bactrocera dorsalis*, με βάση την ειδοειδικότητα τους και την ομολογία τους με υποδοχείς της *Drosophila* που αποκρίνονται σε φαινολικές ενώσεις. Για τη μελέτη της έκφρασης των γονιδίων που επιλέχθηκαν απομονώθηκαν δείγματα ιστών (κεφάλια- κεραίες, θώρακες, γναθικές προσακτρίδες) από θηλυκά συζευγμένα έντομα που είχαν εκτεθεί στην υδροξυτυροσόλη. Ακόμη απομονώθηκαν και δείγματα ιστών control από θηλυκά συζευγμένα έντομα που είχαν εκτεθεί σε ακετόνη αντί για υδροξυτυροσόλη. Από τα δείγματα ιστών απομονώθηκε το RNA το οποίο μετατράπηκε σε cDNA, μέσω RT-PCR, για την πραγματοποίηση ποσοτικής Real Time PCR, προκειμένου να προσδιοριστεί η σχετική έκφραση των γονιδίων, που μελετήθηκαν, στους ιστούς που εκτέθηκαν και δεν εκτέθηκαν στην υδροξυτυροσόλη.

2.ΥΛΙΚΑ- ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Βιοπληροφορική ανάλυση

Τα προγράμματα που χρησιμοποιήθηκαν για την βιοπληροφορική ανάλυση των γονιδίων οσφρητικών υποδοχέων του δάκου προκειμένου να γίνει η επιλογή σε ποια από τα γονίδια θα γινόταν η ανάλυση έκφρασης ήταν τα παρακάτω:

- **BLAST (Basic Local Alignment Search Tool):** Το πρόγραμμα BLAST (*Altschul et al, 1990*) είναι ένα εργαλείο σύγκρισης βιολογικών αλληλουχιών. Ο χρήστης μπορεί να εισάγει μια αλληλουχία επερώτησης και να αναζητήσει μέσω του προγράμματος ομόλογες αλληλουχίες που επιλέγονται από μια βάση δεδομένων ή βιβλιοθήκη αλληλουχιών. Η ομολογία της αλληλουχίας επερώτησης με αυτές που βρίσκονται από το πρόγραμμα μπορεί να είναι μερική ή ολική και στο πρόγραμμα καταγράφεται και η στατιστική σημαντικότητα κάθε αποτελέσματος σύγκρισης. Η αλληλουχία επερώτησης υπάρχει περίπτωση να είναι αμινοξική όταν πρόκειται για πρωτεΐνη ή νουκλεοτιδική όταν πρόκειται για DNA. Σύμφωνα με το είδος της αλληλουχίας επερώτησης καθώς και τις ομόλογες αλληλουχίες που καλείται να αναζητήσει το πρόγραμμα υπάρχουν διαφορετικά είδη BLAST. Αυτά είναι:
 - Το BLASTn, στο οποίο η αλληλουχία επερώτησης που εισάγεται όπως και οι αναζητούμενες ομόλογες αλληλουχίες είναι νουκλεοτιδικές.
 - Το BLASTx, στο οποίο η αλληλουχία επερώτησης που εισάγεται είναι μεταγραφόμενη νουκλεοτιδική και οι αναζητούμενες ομόλογες αλληλουχίες είναι αμινοξικές.
 - Το BLASTp, στο οποίο και η αλληλουχία επερώτησης και οι αναζητούμενες ομόλογες αλληλουχίες είναι αμινοξικές.
 - Το tBLASTn, που είναι το αντίστροφο από το BLASTx, στο οποίο η αλληλουχία επερώτησης είναι αμινοξική και οι αναζητούμενες ομόλογες αλληλουχίες είναι μεταγραφόμενες νουκλεοτιδικές.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το BLASTp προκειμένου να βρεθούν ομόλογες αλληλουχίες των γονιδίων των οσφρητικών υποδοχέων της *D. melanogaster* στο δάκο.

- **MEGA:** Το πρόγραμμα MEGA (*Kumar et al. 1994*) είναι ένα εργαλείο κατασκευής φυλογενετικών δέντρων. Στις λειτουργίες του προγράμματος περιλαμβάνεται και η στοιχίση των εισαχθέντων αλληλουχιών πριν την κατασκευή του φυλογενετικού δέντρου με δύο τρόπους: ClustalW και MUSCLE. Η κατασκευή του φυλογενετικού δέντρου μπορεί να γίνει με όλους τους πιθανούς τρόπους (neighbor joining, maximum likelihood, UPGMA κ.α.) ενώ όλες οι αλληλουχίες των οργανισμών που εισάγονται στο πρόγραμμα είτε είναι νουκλεοτιδικές είτε αμινοξικές πρέπει να είναι σε μορφή FASTA.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το MEGA7 προκειμένου να κατασκευαστούν φυλογενετικά δέντρα για την μελέτη των εξελικτικών σχέσεων των οσφρητικών υποδοχέων ανάμεσα στα είδη *D. melanogaster*, *C. capitata*, *M. domestica*, *B. dorsalis*, *B. oleae*.

- **TMHMM:** Το πρόγραμμα TMHMM (*Krogh et al. 2001*) αποτελεί ένα εργαλείο εύρεσης της τοπολογίας μεμβρανικών πρωτεϊνών βασισμένο σε ένα μοντέλο hidden Markov. Μέσω αυτού του προγράμματος μπορούν να βρεθούν οι εξωμεμβρανικές, διαμεμβρανικές και ενδομεμβρανικές περιοχές μιας πρωτεΐνης με επιτυχία 97-98%. Ακόμη μπορεί να διαπιστωθεί με πολλή μεγάλη ακρίβεια αν μια πρωτεΐνη είναι διαλυτή στο κυτταρόπλασμα ή βρίσκεται τοποθετημένη στη μεμβράνη.

Στην παρούσα εργασία το TMHMM χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να βρεθούν οι ενδομεμβρανικές, διαμεμβρανικές και εξωμεμβρανικές περιοχές στους οσφρητικούς υποδοχείς ORs του δάκου και να γίνει στη συνέχεια σχεδίαση των primers.

- **MAFFT:** Το πρόγραμμα MAFFT (*Katoh et al. 2002*) είναι ένα εργαλείο στοίχισης πολλαπλών νουκλεοτιδικών ή αμινοξικών αλληλουχιών. Χρησιμοποιεί δύο καινούργιες τεχνικές: α) τη γρήγορη αναγνώριση των ομόλογων περιοχών μέσω του μετασχηματισμού Fourier (FFT) β) τη γρήγορη στοίχιση μέσω ενός απλοποιημένου συστήματος scoring ακόμα και για απομακρυσμένες περιοχές ή περιοχές που φέρουν ενθέσεις ή επεκτάσεις. Μέσω του προγράμματος αυτού εντοπίζονται οι συντηρημένες περιοχές μεταξύ των αλληλουχιών που στοιχίζονται καθώς και υδρόφοβες και υδρόφιλες περιοχές.

Στην παρούσα εργασία, το πρόγραμμα MAFFT χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να εντοπιστούν οι συντηρημένες περιοχές μεταξύ των αμινοξικών αλληλουχιών των οσφρητικών υποδοχέων του δάκου της ελιάς ώστε να επιλεγούν περιοχές για τον σχεδιασμό των primers εκτός αυτών των περιοχών. Ακόμη ελέγχθηκαν οι υδρόφοβες και υδρόφιλες περιοχές ώστε να διαπιστωθεί σε σύγκριση και με το πρόγραμμα TMHMM ποιες αμινοξικές περιοχές των υποδοχέων που αναλύθηκαν είναι εξωκυτταρικές και άρα υδροφιλικές και ποιες διαμεμβρανικές και άρα υδροφοβικές. Στις εσωτερικές περιοχές δεν σχεδιάστηκαν primers.

- **OMIGA:** Το πρόγραμμα OMIGA (*Kramer 2001*) είναι ένα εργαλείο ανάλυσης νουκλεοτιδικών και αμινοξικών αλληλουχιών. Επιτρέπει την εισαγωγή αλληλουχιών σε κάποιες κοινές μορφές (π.χ. FASTA) και ο χρήστης έχει τη δυνατότητα να αναλύσει, να παράγει ή ακόμα και να τροποποιήσει τις εισαγόμενες αλληλουχίες. Μέσω του OMIGA είναι δυνατή η μετάφραση μιας νουκλεοτιδικής αλληλουχίας και η εμφάνιση της αντίστοιχη πρωτεΐνης ενώ η νεότερη έκδοση του OMIGA επιτρέπει την αλληλούχηση αλλά και την εμφάνιση ενός προϊόντος PCR μιας αλληλουχίας.

Στην παρούσα εργασία, το πρόγραμμα OMIGA χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των αλληλουχιών των υποδοχέων του δάκου που επιλέχθηκαν προκειμένου να βρεθούν σε ποιες νουκλεοτιδικές περιοχές αντιστοιχούν οι επιθυμητές αμινοξικές περιοχές για τον σχεδιασμό primers.

- **Primer- BLAST:** Το πρόγραμμα Primer- BLAST (*Ye et al. 2012*) αποτελεί το εργαλείο του NCBI για τον σχεδιασμό primers σε μία συγκεκριμένη αλληλουχία στόχο προκειμένου να ενισχυθεί με PCR. Συνδυάζει τις ιδιότητες του BLAST με έναν παγκόσμιο αλγόριθμο στοίχισης ώστε να υπάρχει πλήρης στοίχιση ανάμεσα στους primers που θα σχεδιαστούν και στην αλληλουχία στόχο. Επιτρέπει επίσης τον έλεγχο ύπαρξης προϋπάρχοντων ζευγών primers που ενισχύουν την αλληλουχία στόχο αλλά και τον έλεγχο ενίσχυσης άλλης αλληλουχίας στόχου από το ίδιο ζεύγος primers.

Στην παρούσα εργασία, το πρόγραμμα Primer- BLAST χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο των ζευγών primers προκειμένου να διαπιστωθεί αν ενισχύουν άλλες αλληλουχίες στόχους εκτός από αυτήν για την οποία σχεδιάστηκαν.

- **IDT (Integrated DNA Technologies Inc.):** Η IDT (*Owczarzy et al. 2008*) αποτελεί μια εταιρία που κυρίως παράγει ολιγονουκλεοτίδια για μοριακές εφαρμογές όπως είναι οι primers. Η σελίδα της εταιρίας διαθέτει διάφορα εργαλεία μέσω των οποίων διευκολύνεται η παραγγελία των σωστών ζευγών primers για κάθε αλληλουχία στόχο. Κάποια από αυτά είναι το εργαλείο Primer Quest Tool μέσω του οποίου γίνεται ο σχεδιασμός των primers και το εργαλείο OligoAnalyser 3.1 μέσω του

οποίου γίνεται η ανάλυση των διμερών και των «θηλιών» που σχηματίζουν οι primers και απορρίπτονται οι περιπτώσεις στις οποίες τόσο η παρουσία των διμερών όσο και των θηλιών δυσχεραίνουν την πρόσδεση στην αλληλουχία στόχο και την πραγματοποίηση της αντίδρασης PCR.

Στην παρούσα εργασία, η σελίδα της εταιρίας IDT χρησιμοποιήθηκε τόσο για τον σχεδιασμό των primers των γονιδίων που μελετήθηκαν μέσω του εργαλείου Primer Quest Tool όσο και για τον έλεγχο της καταλληλότητας τους μέσω του εργαλείου OligoAnalyser 3.1.

Συγκεκριμένα:

- Οι παράμετροι που χρησιμοποιήθηκαν για το σχεδιασμό των primers στο Primer Quest Tool ήταν:

A) προϊόν ενίσχυσης : 90-130 bp

B) μέγεθος primers :18-24bp

Γ) primers για qPCR Intercalating Dyes

- Κατάλληλα κρίθηκαν τα ζεύγη primers:

- Που δεν εμφάνιζαν θηλιές (ειδικά στο 3' άκρο γιατί εκεί είναι που θα προσδεθεί και η πολυμεράση για την qPCR)

- $\Delta G \leq -7$ για ομοδιμερή & ετεροδιμερή

- **Apollo:** Το Apollo (*Lewis et al. 2002*) αποτελεί μια πλατφόρμα αυτόματου σχολιασμού κάθε γενετικής πληροφορίας από οργανισμούς που έχουν αλληλουχηθεί και βρίσκονται στις βάσεις δεδομένων. Χρησιμοποιείται σε πολύ μεγάλο βαθμό από τους μοριακούς βιολόγους και σε αυτό βρίσκονται αναρτημένα όλα τα scaffolds με τα contigs των κωδικών και μη κωδικών περιοχών των γονιδίων κάθε αλληλουχημένου γονιδιώματος. Ο σχολιασμός των scaffolds και των γονιδίων έχει γίνει αυτόματα από το πρόγραμμα Apollo.

Στην παρούσα εργασία, το Apollo χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να διαπιστωθεί αν όντως οι primers που σχεδιάστηκαν προσδένονται πάνω στο επιθυμητό γονίδιο.

2.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

ΥΛΙΚΑ:

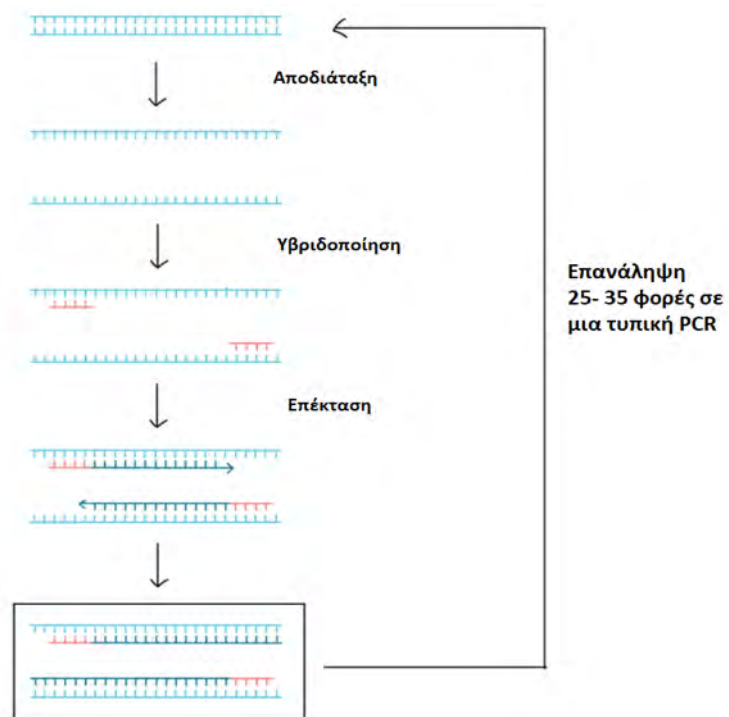
- DNA/ cDNA
- Εκκινητές (Forward, Reverse)
- Taq DNA πολυμεράση
- Buffer ενζύμου
- DNTPs
- Νερό
- MgCl₂ (προαιρετικά, σε περιπτώσεις όπου το ένζυμο για να δράσει χρειάζεται ενίσχυση)

ΜΕΘΟΔΟΣ:

Χρησιμοποιείται ευρέως και αποτελεί μια μέθοδο πολλαπλασιασμού μιας συγκεκριμένης περιοχής DNA ή cDNA in vitro. Παρουσιάστηκε πρώτη φορά από τον Kary Mullis στη δεκαετία του 80 και βασίζεται στην ικανότητα της DNA πολυμεράσης να συνθέτει μια νέα αλυσίδα DNA χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο την συμπληρωματική της. Επειδή η DNA πολυμεράση μπορεί να προσθέσει νουκλεοτίδια μόνο στην 3-υδροξυλομάδα του προηγούμενου νουκλεοτιδίου, προκειμένου να αρχίσει η αντίδραση απαιτείται η ύπαρξη ενός εκκινητή που θα είναι συμπληρωματικός της αλυσίδας η οποία χρησιμοποιείται ως εκμαγείο κάθε φορά και θα προσθέσει το πρώτο νουκλεοτίδιο. Η προϋπόθεση αυτή καθιστά δυνατή την ενίσχυση ενός συγκεκριμένου τμήματος ή γονιδίου μιας αλληλουχίας. Στο τέλος της αντίδρασης PCR, η αλληλουχία στόχος θα βρίσκεται σε δισεκατομμύρια αντίγραφα. Το ένζυμο που κυρίως χρησιμοποιείται για την πραγματοποίηση της PCR είναι η Taq πολυμεράση, ένα ένζυμο που έχει απομονωθεί από το θερμόφιλο βακτήριο, *Thermus aquaticus* και ο λόγος που χρησιμοποιείται αυτή και όχι κάποια άλλη πολυμεράση είναι επειδή εμφανίζει αντοχή σε υψηλές θερμοκρασίες και δεν χάνει τη δραστηριότητα της παρά τις μεγάλες μεταβολές θερμοκρασίας στην PCR.

Ένας κύκλος PCR περιλαμβάνει τα παρακάτω στάδια (**Εικόνα 12**):

1. Στάδιο αποδιάταξης (96°C): Σε αυτό το στάδιο η υψηλή θερμοκρασία συμβάλει στην αποδιάταξη των δύο μονόκλωνων αλυσίδων του DNA ή cDNA. Έτσι οι δύο μονόκλωνες αλυσίδες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως εκμαγείο για τη σύνθεση νέων στο επόμενο στάδιο.
2. Στάδιο υβριδοποίησης: Σε αυτό το στάδιο, η θερμοκρασία μειώνεται και οι εκκινητές προσδένονται στις αποδιαταγμένες μονόκλωνες αλυσίδες. Η θερμοκρασία υβριδοποίησης εξαρτάται από τη θερμοκρασία τήξης των εκκινητών και είναι διαφορετική για κάθε ζευγάρι εκκινητών. Συνήθως κυμαίνεται μεταξύ 55 και 65°C.
3. Στάδιο επιμήκυνσης (72°C): Στο στάδιο αυτό δρα η Taq πολυμεράση που είναι και το ένζυμο που χρησιμοποιείται για την PCR και επεκτείνει τους primers συνθέτοντας τις νέες αλυσίδες DNA που είναι συμπληρωματικές στις παλιές.



Εικόνα 12: Στάδια μιας τυπικής PCR

Συγκεκριμένα η διαδικασία που ακολουθήθηκε στην παρούσα εργασία για τελικό όγκο αντίδρασης 20 μl ήταν η εξής:

- Αρχικά προστέθηκαν στα PCR tubes, στον πάγο, τα παρακάτω:

Συστατικό	Όγκος ανά αντίδραση
DNA/ cDNA	2 μl
εκκινητής Forward (10 $\mu\text{mol}/\mu\text{l}$)	0,7 μl
εκκινητής Reverse (10 $\mu\text{mol}/\mu\text{l}$)	0,7 μl
Buffer (10x)	2 μl (1x)
Taq πολυμεράση (5u/ μl)	0,2 μl (1 u/ μl)
Ολιγονουκλεοτίδια (DNTPs) (40 mM)	0,4 μl
Νερό	14 μl
Τελικός όγκος	20 μl

- Στη συνέχεια τα PCR tubes τοποθετήθηκαν στο μηχάνημα της PCR, που αποτελεί έναν θερμοκυκλοποιητή, με το κατάλληλο πρόγραμμα θερμοκρασιών και έμειναν για επώαση. Μετά από ν κύκλους τα αντίγραφα που αναμένεται να παραληφθούν είναι 2ⁿ.

2.3 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

ΥΛΙΚΑ:

- TBE (0,5x)- Για 5x (1L): 54g Tris-base, 20mL EDTA 0,5M (pH:8), 27,5g Boric acid)
- Αγαρόζη
- Βρωμιούχο Αιθίδιο
- Ladder
- Διάλυμμα φόρτωσης (Loading Buffer)- περιέχει μια ουσία υψηλής πυκνότητας (όπως γλυκερόλη) και 1 ή 2 χρωστικές που μετακινούνται με ταχύτητα περίπου ίδια με του DNA (μπλε της βρωμοφαινόλης και κυανό του ξυλενίου)

ΜΕΘΟΔΟΣ:

Η ηλεκτροφόρηση αποτελεί μια μέθοδο διαχωρισμού μορίων DNA, RNA και πρωτεϊνών σύμφωνα με το μέγεθος τους και το φορτίο τους. Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα (gel) αγαρόζης συγκεκριμένα χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό μεγάλων μορίων νουκλεϊκών οξέων (> 100 bp) που έχουν προκύψει συνήθως από PCR. Η αγαρόζη απομονώνεται από το άγαρ που είναι συστατικό των φυκών και αποτελεί ένα πολύ καλό διαχωριστικό υλικό λόγω του ουδέτερου φορτίου της και της χαμηλού βαθμού πολυπλοκότητας της. Η περιεκτικότητα της αγαρόζης στο πήκτωμα κυμαίνεται συνήθως από 0.7% (καλός διαχωρισμός μεγάλων τμημάτων DNA 5–10kb) μέχρι 2% (καλός διαχωρισμός μικρών τμημάτων DNA 0.2–1kb). Όσο χαμηλότερη είναι η περιεκτικότητα σε αγαρόζη τόσο μεγαλύτερα μόρια διαπερνούν το πήκτωμα καθώς οι πόροι του πηκτώματος είναι μεγαλύτεροι. Το αντίστροφο συμβαίνει όταν η περιεκτικότητα σε αγαρόζη είναι υψηλή. Τα μόρια στο πήκτωμα αγαρόζης διαχωρίζονται μέσω της επίδρασης ηλεκτρικού πεδίου. Έτσι τα αρνητικά φορτισμένα νουκλεϊκά οξέα έλκονται προς τον θετικό πόλο και αυτά που έχουν μικρότερο μοριακό βάρος διαπερνούν πιο γρήγορα τους πόρους και καταλήγουν πιο χαμηλά στο gel από αυτά που έχουν μεγάλο μοριακό βάρος. Προκειμένου να διατηρείται το PH σταθερό αλλά και να παρέχονται τα απαραίτητα ιόντα για τη μεταφορά ρεύματος στο πήκτωμα, στη συσκευή ηλεκτροφόρησης αλλά και στο πήκτωμα προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα TBE (0,5x). Προκειμένου να φαίνεται μέχρι ποιο σημείο του πηκτώματος «τρέχουν» τα μόρια, προστίθεται διάλυμα φόρτωσης το οποίο περιέχει και μια ουσία υψηλής πυκνότητας για να μην διαχυθεί το DNA ή το RNA από το gel. Τέλος το DNA ή το RNA μπορεί να γίνει ορατό με τη χρήση βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr) το οποίο παρεμβάλλεται στη μεγάλη αύλακα του DNA (ή στο RNA) και μπορεί να φθορίζει στο υπεριώδες φως.

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ (GEL) ΠΗΚΤΩΜΑΤΟΣ ΑΓΑΡΟΖΗΣ (40 ml, 2%):

- Ζύγιση 0,8 g αγαρόζης και προσθήκη σε κωνική φιάλη
- Ζύγιση 40 ml TBE σε ογκομετρικό σωλήνα και προσθήκη στην ίδια κωνική φιάλη
- Ζύγιση της κωνικής φιάλης με το περιεχόμενο και καταγραφή του όγκου
- Θέρμανση της κωνικής φιάλης και παράλληλη ανάδευση μέχρις ότου διαλυθεί πλήρως η αγαρόζη

- Ζύγιση της κωνικής φιάλης ξανά και προσθήκη απιονισμένου νερού για όσο όγκο λείπει από την τελευταία ζύγιση πριν την θέρμανση
- Προσθήκη 1μl βρωμιούχου αιθιδίου στο περιεχόμενο της φιάλης και ανάδευση
- Τοποθέτηση του περιεχομένου στο ειδικό καλούπι αφού πρώτα έχουν μπει τα χτενάκια και το καλούπι έχει σφραγιστεί με χαρτοταινία περιμετρικά
- Προσοχή ώστε το υγρό να μην σχηματίζει φουσκάλες
- Αναμονή έως ώτου πήξει το gel

ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ:

- Αφαίρεση του πηκτώματος από το καλούπι και προσθήκη στη συσκευή ηλεκτροφόρησης
- Προσθήκη TBE 0,5x ώστε να καλυφθούν πλήρως τα πηγαδάκια του gel
- Προσθήκη διαλύματος φόρτωσης σε κάθε δείγμα με αναλογία 10 μl όγκου δείγματος: 1 μl διαλύματος φόρτωσης
- Φόρτωση των δειγμάτων αλλά και του ladder που αποτελεί έναν μάρτυρα γνωστού μοριακού βάρους, τρέχει μαζί με τα δείγματα και δείχνει το μέγεθος του DNA/ RNA που βρίσκεται σε κάθε δείγμα. Ανάλογα με το επίπεδο του ladder που βρίσκεται η ζώνη του δείγματος θα έχει και το ανάλογο μοριακό βάρος.

2.4 Έκθεση των εντόμων στην υδροξυτυροσόλη- Απομόνωση ιστών

ΥΛΙΚΑ:

- Υδροξυτυροσόλη
- Ακετόνη
- Tri-reagent
- 20 έντομα

ΜΕΘΟΔΟΣ:

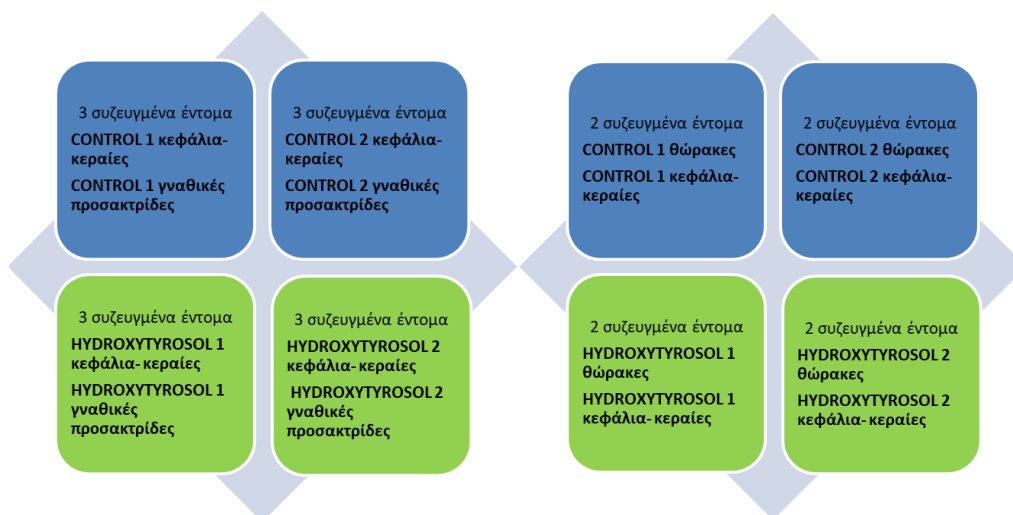
Προκειμένου να γίνει η έκθεση των εντόμων στην υδροξυτυροσόλη, έπρεπε η ένωση να βρίσκεται σε υγρή μορφή. Ωστόσο, επειδή η υδροξυτυροσόλη που παραλήφθηκε ήταν σε στερεή μορφή έγινε διάλυση 25 mg της ένωσης σε νερό και αιθανόλη με αποτέλεσμα η αρχική συγκέντρωση να φτάσει τα 25 mg/ml και στην συνέχεια διαδοχικές αραιώσεις με ακετόνη προκειμένου η τελική συγκέντρωση της υδροξυτυροσόλης που χρησιμοποιήθηκε για την έκθεση να είναι 7, 7 ng/μl.

Η απομόνωση των ιστών έγινε από γονιμοποιημένα θηλυκά έντομα την 13η ημέρα από την ημέρα που «έσκασαν» και οι ιστοί που απομονώθηκαν ήταν κεφάλια και κεραίες, γναθικές προσακτρίδες και θώρακες. Τα κεφάλια με τις κεραίες και οι γναθικές προσακτρίδες απομονώθηκαν από τα ίδια έντομα στα οποία η ένωση τοποθετήθηκε σε υγρή μορφή στα κεφάλια των εντόμων, ενώ οι θώρακες απομονώθηκαν από διαφορετικά έντομα στα οποία η ένωση τοποθετήθηκε στη μαλακή επιφάνεια του θώρακα των εντόμων.

Αρχικά έγινε απομόνωση δύο βιολογικών δειγμάτων control από έντομα που δεν είχαν εκτεθεί στην υδροξυτυροσόλη και δύο βιολογικών δειγμάτων hydroxytyrosol από έντομα που εκτέθηκαν στην υδροξυτυροσόλη.

Για την απομόνωση αυτών των βιολογικών δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν 4 pools των 3 εντόμων για την απομόνωση των 2 δειγμάτων control και 2 δειγμάτων hydroxytyrosol κεφαλιών- κεραιών και 2 δειγμάτων control και 2 δειγμάτων hydroxytyrosol γναθικών προσακτρίδων και 4 pools των 2 εντόμων για την απομόνωση 2 δειγμάτων control και 2 δειγμάτων hydroxytyrosol θωράκων. Ακόμη από τα pools από τα οποία έγινε η απομόνωση των θωράκων απομονώθηκαν και τα κεφάλια των εντόμων τα οποία ωστόσο δεν χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία. Τα pools και τα δείγματα ιστών που παραλήφθηκαν παριστάνονται σχηματικά παρακάτω:

Κεφάλια – κεραιές / Γναθικές προσακτρίδες: Θώρακες/ κεφάλια:



Συγκεκριμένα η διαδικασία απομόνωσης ιστών έγινε ως εξής:

ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ:

- Αρχικά, τα έντομα τοποθετήθηκαν σε ειδικά γυάλινα μπουκαλάκια και μπήκαν στον πάγο προκειμένου να αναισθητοποιηθούν
- Προετοιμάστηκαν tubes στα οποία εισήχθησαν 20 μl Tri-reagent προκειμένου να εισαχθούν σε αυτά τα δείγματα ιστών από την έκθεση των κεφαλιών των εντόμων στην υδροξυτυροσόλη και tubes στα οποία εισήχθησαν 40 μl Tri-reagent προκειμένου να εισαχθούν σε αυτά τα δείγματα ιστών από την έκθεση των θωράκων των εντόμων στην υδροξυτυροσόλη.
- Τοποθετήθηκε κάτω από το στερεοσκόπιο μια παγοκύστη στην οποία πάνω στην οποία πραγματοποιήθηκε η διαδικασία της έκθεσης στην οσμή και η απομόνωση των ιστών.

ΕΚΘΕΣΗ ΣΤΗΝ ΟΣΜΗ:

- Στο κεφάλι καθενός από τα έντομα των control pools για τους ιστούς : κεφάλια- κεραιές και γναθικές προσακτρίδες τοποθετήθηκε 1μl ακετόνη ενώ αντίστοιχα στα κεφάλια των εντόμων των hydroxytyrosol pools τοποθετήθηκε 1 μl υδροξυτυροσόλη (7,7 ng/μl)

- Στη μαλακή επιφάνεια του θώρακα καθενός από τα έντομα των control pools για τους ιστούς: θώρακες και κεφάλια- κεραίες τοποθετήθηκε 1 μl ακετόνη και αντίστοιχα στους θώρακες των εντόμων των hydroxytyrosol pools τοποθετήθηκε 1 μl υδροξυτυροσόλη (7,7 ng/μl)
- Στη συνέχεια και τα control και τα hydroxytyrosol pools τοποθετήθηκαν σε τρυβλία για 20 λεπτά
- Μετά το πέρας των 20 λεπτών, τα τρυβλία με τα έντομα μπήκαν για 2 λεπτά στην κατάψυξη προκειμένου να αναισθητοποιηθούν για να παραληφθούν οι ιστοί

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΙΣΤΩΝ:

- Με τη χρήση του στερεοσκοπίου πάνω στην παγοκύστη κόπηκαν με ιδιαίτερη προσοχή το κεφάλι και οι κεραίες από τα control 1,2 και hydroxytyrosol 1,2 έντομα και τοποθετήθηκαν σε 4 tubes που περιείχαν 20 μl Tri-reagent ενώ από τα ίδια έντομα απομονώθηκαν ξεχωριστά οι γναθικές προσοκτρίδες και τοποθετήθηκαν σε άλλα 4 tubes (20 μl Tri-reagent)
- Αντίστοιχα κόπηκαν και οι θώρακες από τα control 1,2 και hydroxytyrosol 1,2 έντομα και τοποθετήθηκαν σε 4 tubes (40 μl Tri-reagent) και τα κεφάλια με τις κεραίες από τα ίδια έντομα τοποθετήθηκαν σε άλλα 4 tubes (40 μl Tri-reagent)
- Αντίστοιχη διαδικασία ακολουθήθηκε και για την απομόνωση του 3ου βιολογικού δείγματος από κεφάλια-κεραίες (3 control και 3 hydroxytyrosol) και θώρακες (3 control και 3 hydroxytyrosol)

2.5 Απομόνωση RNA από τα δείγματα ιστών που απομονώθηκαν

Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε για την απομόνωση RNA από τα δείγματα ιστών που απομονώθηκαν παραπάνω ήταν:

ΥΛΙΚΑ:

- Tri-reagent
- 1-Βρωμο 3-χλωροπροπανόνη (BCP)
- Ισοπροπανόλη
- 75% αιθανόλη
- Νερό

ΜΕΘΟΔΟΣ:

1.Ομογενοποίηση:

- Στα tubes που περιέχονταν 20 μl Tri-reagent και το αντίστοιχο δείγμα ιστού που απομονώθηκε, προστέθηκαν ακόμη 30 μl Tri-reagent ώστε ο όγκος να φτάσει τα 50 μl ενώ αντίστοιχα στα tubes που περιέχονταν 40 μl Tri-reagent και το αντίστοιχο δείγμα ιστού που απομονώθηκε, προστέθηκαν ακόμη 110 μl Tri-reagent ώστε ο όγκος να φτάσει τα 150 μl.
- Στη συνέχεια τα δείγματα ιστών και το Tri-reagent ομογενοποιήθηκαν με pestles τα οποία ξεπλύθηκαν αμέσως μετά με 250 μl Tri-reagent για τα tubes των οποίων ο όγκος ήταν 50 μl κατά την ομογενοποίηση και με 150 μl Tri-reagent για τα tubes των οποίων ο όγκος 150 μl έτσι ώστε ο τελικός όγκος σε κάθε tube να φτάσει τα 300 μl. Το ξέπλυμα των pestles έγινε προκειμένου να μην

μείνουν τυχόν υπολείμματα ιστού πάνω στην επιφάνεια τους που πιθανότατα προέκυψε κατά την ομογενοποίηση.

2. Διαχωρισμός φάσης:

- Τα tubes με τα δείγματα των ιστών επώαστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.
- Στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν στις 12,000 g για 5 λεπτά στους 4 °C.
- Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέα tubes και σε κάθε ένα προστέθηκαν 30 μl BCP (0,1 ml BCP ανά 1 ml Tri- reagent). Ακολούθησε χειροκίνητο έντονο κούνημα των tubes για 15 δευτερόλεπτα.
- Ακολούθως επώαστηκαν για 3 λεπτά.
- Φυγοκεντρήθηκαν στις 12,000 g για 15 λεπτά στους 4 °C και η πάνω φάση από τα δείγματα μεταφέρθηκε σε νέα tubes.

3. Κατακρήμνιση RNA:

- Σε κάθε ένα από τα νέα tubes που περιείχαν την πάνω φάση από τα δείγματα προστέθηκαν 150 μl ισοπροπανόλη (0,5 ml ισοπροπανόλη ανά 1 ml Tri- reagent) και ακολούθησε έντονο κούνημα των tubes.
- Στη συνέχεια επώαστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά προκειμένου να γίνει η κατακρήμνιση.
- Αμέσως μετά ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 12,000 g για 5 λεπτά στους 4 °C.

4. Πλύση του RNA:

- Το υπερκείμενο των tubes αφαιρέθηκε πολύ προσεκτικά προκειμένου να μην χαθεί το ίζημα και στη συνέχεια προστέθηκαν 300 μl 75% αιθανόλης σε κάθε tube.
- Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 7,500 g για 5 λεπτά στους 4 °C.
- Τα βήματα αυτά επαναλήφθηκαν άλλη μία φορά.
- Αμέσως μετά η αιθανόλη αφαιρέθηκε πολύ προσεκτικά με πιπέτα και έγινε στέγνωμα του ιζήματος σε δυνατό αέρα για 10 – 15 λεπτά.
- Στη συνέχεια σε κάθε ένα tube προστέθηκαν 8 μl H₂O και τα RNAs μπήκαν στο μηχάνημα του vortex για περισσότερο από 45 λεπτά.

2.6 Πέψη των RNAs που απομονώθηκαν με Dνάση

Προκειμένου να «καθαριστούν» τα δείγματα RNAs που απομονώθηκαν από οποιαδήποτε κατάλοιπα DNA ακολουθήθηκε πέψη με το ένζυμο Dνάση και συγκεκριμένα ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο του TURBO DNA-free™ Kit.

ΥΛΙΚΑ:

- TURBO DNase Buffer
- Dνάση (1 μl για όγκο αντίδρασης 50 μl)
- Buffer αδρανοποίησης του ενζύμου (10 μl αντίδρασης: 1 μl buffer αδρανοποίησης)
- RNA

- Νερό

ΜΕΘΟΔΟΣ:

- Για τελικό όγκο αντίδρασης 10 µl αρχικά προστέθηκαν σε PCR tubes τα παρακάτω:

Συστατικό	Όγκος ανά αντίδραση
TURBO DNase Buffer (10x)	1 µl
Διάση	0,2 µl
RNA	8 µl
Νερό	0,8 µl
Τελικός όγκος	10 µl

- Στη συνέχεια ακολούθησε επώαση για 25 λεπτά στους 37 °C
- Αμέσως μετά προστέθηκε σε κάθε tube 1 µl buffer αδρανοποίησης του ενζύμου και ακολούθησε επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.
- Έπειτα πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στις 11,000 g για 2 λεπτά.
- Το υπερκείμενο αφαιρέθηκε πολύ προσεκτικά σε νέα tubes και προστέθηκε ίσος όγκος νερού ώστε να χρησιμοποιηθούν για την μετατροπή του RNA σε cDNA

2.7 Σύνθεση cDNA από το RNA που απομονώθηκε

Η σύνθεση cDNA από το RNA που απομονώθηκε έγινε προκειμένου να μπορεί να αξιοποιηθεί στην qPCR ώστε να γίνει η ανάλυση της έκφρασης των γονιδίων που μελετήθηκαν. Το πρωτόκολλο με το οποίο έγινε η σύνθεση του cDNA ήταν αυτό του ενζύμου M-MLV RT (αντίστροφη μεταγραφάση).

ΥΛΙΚΑ:

- Τυχάιοι εκκινητές
- dNTP mix
- 5x First strand Buffer (20 mM Tris-HCL, 375 KCl, 15 mM MgCl₂)
- DTT
- Αναστολέας ενζύμου
- M-MLV RT (αντίστροφη μεταγραφάση)
- RNA
- Νερό (ανάλογα με την ποσότητα RNA που χρησιμοποιείται)

ΜΕΘΟΔΟΣ:

- Για τελικό όγκο αντίδρασης= 20 µl προετοιμασία των δύο παρακάτω mix ανάλογα με τον αριθμό των αντιδράσεων:

1° MIX:

Συστατικό	Όγκος ανά αντίδραση
Τυχαίοι εκκινητές (300ng/μl)	1 μl
dNTP mix (40 mM)	0,3μl
Νερό	Ανάλογα με την ποσότητα RNA

2° MIX:

Συστατικό	Όγκος ανά αντίδραση
5x First strand Buffer	5 μl (1x)
DTT (0,1M)	2,5 (0,01 M)
Αναστολέας ενζύμου (40 u/μl)	1 μl (2 u/μl)
M-MLV RT	1 μl

- Προσθήκη της ποσότητας RNA που απομονώθηκε σε PCR tubes και μοίρασμα του 1ου mix στα tubes.
- Τοποθέτηση των PCR tubes στο μηχάνημα της PCR που αποτελεί έναν θερμοκυκλοποιητή και ρύθμιση του παρακάτω προγράμματος θερμοκρασιών:

65 °C (5 λεπτά)

37 °C (8 λεπτά)- Τοποθέτηση του 2ου mix στα PCR tubes

37 °C (2 λεπτά)

25 °C (10 λεπτά)

37 °C (50 λεπτά)

70 °C (15 λεπτά)

2.8 Ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (quantitative Real-time PCR)

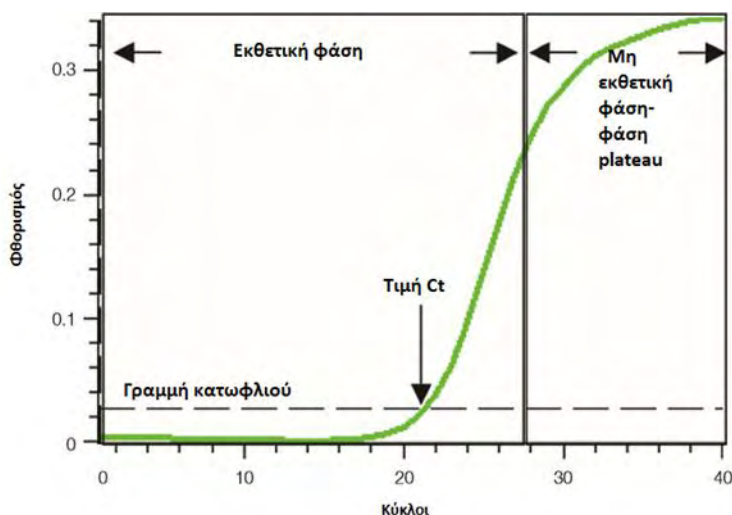
ΥΛΙΚΑ:

- DNA/cDNA
- Supermix (περιέχει SYBR GREEN, Taq πολυμεράση, MgCl₂, DNTPs)
- Εκκινητές (Forward, Reverse)
- Νερό

ΜΕΘΟΔΟΣ:

Στην Real-time PCR ακολουθούνται τα βήματα της PCR προκειμένου να ενισχυθεί μια αλληλουχία στόχος και να παραχθούν πολλαπλά αντίγραφα αυτής. Ωστόσο, σε αντίθεση με την συμβατική PCR στην οποία το ενισχυμένο προϊόν εντοπίζεται μετά από ηλεκτροφόρησή του σε πήκτωμα, στην Real-time PCR η συγκέντρωση του ενισχυμένου προϊόντος εντοπίζεται και μετριέται καθώς η αντίδραση βρίσκεται σε εξέλιξη, δηλαδή η συγκέντρωση του ενισχυμένου προϊόντος μετριέται σε πραγματικό χρόνο γι' αυτό και η αντίδραση ονομάζεται PCR πραγματικού χρόνου (Real-time PCR). Αυτό γίνεται δυνατό μέσω της ύπαρξης φθορίζοντων μορίων που προσδένονται στο DNA/cDNA και μπορούν να εντοπίζουν την αύξηση στη συγκέντρωση του DNA ενώ ανάλογη αύξηση παρατηρείται και στο σήμα φθορισμού που εκπέμπουν. Τέτοια φθορίζοντα μόρια είναι οι φθορίζουσες χρωστικές που προσδένονται στο DNA/cDNA όπως το SYBR GREEN ,που χρησιμοποιήθηκε και στην παρούσα εργασία, ή σημασμένα φθορίζοντα μόρια εκκινητών και probes που προσδένονται στην αλληλουχία στόχο. Το σήμα φθορισμού που εκπέμπει το SYBR GREEN καταγράφεται από εξειδικευμένους θερμοκυκλοποιητές, τα μηχανήματα Real Time PCR, καθώς εξελίσσεται η αντίδραση. Επειδή, ωστόσο, το SYBR GREEN προσδένεται στα διμερή DNA ή cDNA, αν οι primers σχηματίζουν διμερή θα προσδεθεί και σε αυτά. Τετοιες περιπτώσεις φαίνονται στην καμπύλη αποδιάταξης (melting curve analysis) όπου απεικονίζονται διαγραμματικά οι θερμοκρασίες στις οποίες εμφανίζονται τα επιθυμητά προϊόντα κάθε φορά αλλά και τα παραπροϊόντα όπως τα διμερή των primers.

Το μετρούμενο σήμα φθορισμού αντανακλά την προσότητα του ενισχυμένου προϊόντος σε κάθε κύκλο της αντίδρασης. Αρχικά το σήμα φθορισμού παραμένει σε πολύ χαμηλά επίπεδα και η αύξηση του προϊόντος δεν εντοπίζεται από το μηχανήμα ακόμα και αν το ενισχυμένο προϊόν αυξάνεται εκθετικά. Το σήμα αρχίζει να φαίνεται αφού συσσωρευθεί αρκετή ποσότητα ενισχυμένου προϊόντος. Ο αριθμός του κύκλου της αντίδρασης στον οποίον συμβαίνει αυτό ονομάζεται κατώφλι της αντίδρασης ή Ct (Εικόνα 13). Μέσω του Ct μπορεί να προσδιοριστεί η αρχική ποσότητα της αλληλουχίας στόχου στην αντίδραση. Όσο πιο μικρή είναι η τιμή Ct σε τόσο μικρότερο κύκλο αρχίζει να φαίνεται το σήμα φθορισμού και άρα τόσο περισσότερη ποσότητα DNA/cDNA υπάρχει αρχικά και το αντίστροφο. Αυτή η σχέση αποτελεί και τη βάση για την ποσοτική Real Time PCR (qPCR), η οποία χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία.



Εικόνα 13: Η τιμή Ct (Biorad CFX Manager)

Παράλληλα με την ενίσχυση των γονιδίων στα δείγματα ιστών που απομονώθηκαν που μελετήθηκαν, ενισχύθηκαν και γονίδια τα οποία εκφράζονται σταθερά σε όλους τους ιστούς του εντόμου, τα

housekeeping (hsk) γονίδια rpl19 και GAPDH τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ως γονίδια αναφοράς για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων της qPCR. Αυτό έγινε προκειμένου να μην προκύψουν εσφαλμένα αποτελέσματα όσον αφορά την έκφραση των γονιδίων που μελετήθηκαν που μπορεί να οφείλονταν σε πειραματικά σφάλματα λόγω του χειρισμού όπως η απομόνωση μεγαλύτερης ποσότητας ιστού ή η προσθήκη μεγαλύτερης ποσότητας cDNA από την προβλεπόμενη στην Real Time PCR. Η σχετική ποσοτικοποίηση της έκφρασης των γονιδίων που μελετήθηκαν και κανονικοποιήθηκαν με τα παραπάνω hsk γονίδια έγινε με τη μέθοδο Livak 2- $\Delta\Delta C_t$.

Το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε για την διεξαγωγή των Real Time PCR αντιδράσεων ήταν το Biorad CFX Manager Software, ο τελικός όγκος κάθε αντίδρασης ήταν 15 μ l και η διαδικασία που ακολουθήθηκε περιγράφεται παρακάτω:

- Προσθήκη σε ειδικά Real Time PCR strips για κάθε αντίδραση στον πάγο των παρακάτω:

Συστατικό	Όγκος ανά αντίδραση
Supermix (2 x)	7,5 μ l
εκκινητής Forward (10 μ mol/ μ l)	0,45 μ l
εκκινητής Reverse (10 μ mol/ μ l)	0,45 μ l
cDNA	2 μ l
Νερό	4,6 μ l
Τελικός όγκος	15 μ l

- Τοποθέτηση στο μηχάνημα της Real Time PCR με το κατάλληλο πρόγραμμα και διαρκεί έως ώτου πραγματοποιηθούν 50 κύκλοι PCR. Η ποσότητες cDNA που χρησιμοποιήθηκαν προήλθαν από αραιώσεις 1:20 των αρχικών cDNA που απομονώθηκαν παραπάνω.

Κάθε δείγμα ιστού για κάθε ζεύγος primers των γονιδίων που αναλύθηκαν καθώς και των hsk γονιδίων σε κάθε run μπήκε σε δύο τεχνικές επαναλήψεις ενώ για κάθε ξεχωριστό γονίδιο που υπήρχε χρησιμοποιήθηκε και ένα control (NTC) το οποίο αντί για cDNA περιείχε νερό. Τα αποτελέσματα που έδειξαν έκφραση στο NTC υποδείκνυαν μόλυνση στην αντίδραση για το συγκεκριμένο γονίδιο που πιθανώς οφειλόταν σε κάποιο από τα συστατικά της αντίδρασης και επαναλήφθηκαν. Ακόμη για κάθε γονίδιο χρησιμοποιήθηκε ένα δείγμα κανονικοποίησης που ονομάζεται interrun και αποτελεί ένα θετικό control το οποίο περιείχε cDNA γνωστής προέλευσης και αναμενόταν να δώσει μια συγκεκριμένη τιμή σε κάθε αντίδραση. Αυτό χρησιμοποιήθηκε κυρίως προκειμένου να αντιστοιχιστούν τεχνικές επαναλήψεις που δεν βγήκαν στο ίδιο run αλλά σε διαφορετικά. Οι τεχνικές επαναλήψεις που επαναλήφθηκαν ήταν εκείνες που το $\Delta C_t > 0,5$ ενώ το baseline threshold για τις αντιδράσεις ήταν 50.

Ακόμη εκτός από τα δείγματα ιστού τα ζεύγη των primers των γονιδίων που μελετήθηκαν χρησιμοποιήθηκαν και για αντίδραση με κάποια δείγματα γνωστής συγκέντρωσης και αυξανόμενης αραίωσης (1:5, 1:10, 1:50, 1:100) προκειμένου από τις τιμές έκφρασης τους να προκύψει μια πρότυπη καμπύλη (standard curve). Η κλίση της καμπύλης αυτής υποδεικνύει και την αποτελεσματικότητα του ζεύγους των primers η οποία γινόταν δεκτή μόνο αν ήταν στα πλαίσια του 95-110 %.

- Graphpad Prism: Το πρόγραμμα Graphpad Prism αποτελεί ένα εργαλείο βιοστατιστικών αναλύσεων που χρησιμοποιείται ευρέως από τους εργαστηριακούς ερευνητές και ιδιαίτερα τους βιολόγους για την ανάλυση των αποτελεσμάτων τους.

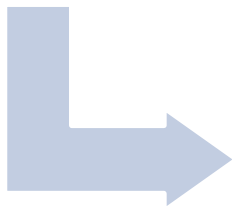
Στην παρούσα εργασία, το Graphpad Prism χρησιμοποιήθηκε για την εύρεση των στατιστικά σημαντικών ή μη διαφορών ανάμεσα στα αποτελέσματα έκφρασης των γονιδίων που μελετήθηκαν στους ιστούς control και στους ιστούς που εκτέθηκαν στην υδροξυτυροσόλη, με p value < 0,05 ώστε να υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

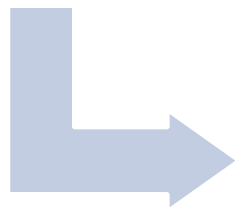
3.1 Επιλογή των προς μελέτη γονιδίων οσφρητικών υποδοχέων του δάκου της ελιάς, *B. oleae*

Οι αλληλουχίες των 75 υποψήφιων γονιδίων οσφρητικών υποδοχέων (ORs) του δάκου βρίσκονται κατατεθειμένες στη βάση δεδομένων NCBI με έναν ξεχωριστό κωδικό ΧΜ (**Παράρτημα-πίνακας 1**). Από τις αλληλουχίες αυτές, οι 7 είναι αλληλουχίες πιθανών οσφρητικών και γευστικών υποδοχέων. Οι αλληλουχίες αυτές προέκυψαν από την αλληλούχηση του γονιδιώματος του δάκου από το εργαστήριο μας σε συνεργασία με το εργαστήριο του κ. Ραγκούση στο McGill University και στο Genome Quebec και το annotation έγινε αυτόματα από την NCBI. Η επιλογή των προς ανάλυση γονιδίων από τα 75 υποψήφια γονίδια, ως προς την απόκριση τους στην υδροξυτυροσόλη, έγινε μέσω της παρακάτω διαδικασίας:

Εύρεση αμινοξικών αλληλουχιών οσφρητικών υποδοχέων από συγγενικά είδη του δάκου (*Drosophila melanogaster*, *Ceratitis capitata*, *Musca domestica*, *Bactrocera dorsalis*)



Κατασκευή φυλογενετικών δέντρων που απεικονίζουν τις εξελικτικές σχέσεις μεταξύ των υποδοχέων ανάμεσα στα διαφορετικά είδη



Επιλογή των 5 υποδοχέων που τελικά μελετήθηκαν μέσα από συγκεκριμένα κριτήρια όπως η ειδοειδικότητα στο δάκο και η ομολογία με ORs της *Drosophila* που εμφανίζουν απόκριση σε φαινολικές ενώσεις

Εικόνα 14: Συνοπτική παρουσίαση της βιοπληροφορικής ανάλυσης για την επιλογή των 5 γονιδίων οσφρητικών υποδοχέων που μελετήθηκαν

Πιο αναλυτικά τα βήματα που ακολουθήθηκαν έως την επιλογή των 5 προς μελέτη γονιδίων καταγράφονται παρακάτω.

3.1.1 BLASTp των οσφρητικών υποδοχέων της *D. melanogaster* για τον εντοπισμό των ομόλογων υποδοχέων στο δάκο

Καθώς το γονιδίωμα της *Drosophila* αποτελεί το πιο καλά μελετημένο γονιδίωμα εντόμου και οι οσφρητικοί υποδοχείς της *D. melanogaster* έχουν αναγνωριστεί και σχολιαστεί, αρχικά, αναζητήθηκαν οι ομόλογοι υποδοχείς τους στο δάκο. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε προκειμένου να ελεγχθεί η εγκυρότητα των πιθανών οσφρητικών υποδοχέων που έχουν αναφερθεί στο δάκο καθώς και να αποκαλυφθούν εξελικτικές σχέσεις ανάμεσα στους ORs της *D. melanogaster* και του δάκου.

Με το μοναδικό κωδικό XM κάθε υποψήφιου γονιδίου οσφρητικού υποδοχέα στο δάκο, αναζητήθηκε στην NCBI η αντίστοιχη πρωτεΐνη – υποδοχέας. Οι υποψήφιοι οσφρητικοί υποδοχείς έφεραν ένα μοναδικό κωδικό XP (**Παράρτημα- πίνακας 1**).

Από την Flybase έγινε η ανάκτηση των αμινοξικών αλληλουχιών των οσφρητικών υποδοχέων της *Drosophila* οι οποίες ανέρχονται στις 65 και με την χρήση του προγράμματος BLASTp για κάθε μία αλληλουχία από αυτές βρέθηκε η ομόλογη της στο δάκο με το μικρότερο e- value. Τα αποτελέσματα του BLASTp παρουσιάζονται στην **Εικόνα 15**.

Query-	name	length	B.oleae ref	B.oleae hit	E-value
FBpp0079371	Or30a-PA	377	XP_014102906.1	PREDICTED: odorant receptor 49b-like	2,00E-103
FBpp0085388	Or42a-PA	406	XP_014100883.1	PREDICTED: odorant receptor 7a-like, partial	1,00E-082
FBpp0085387	Or42b-PA	399	XP_014100883.1	PREDICTED: odorant receptor 7a-like, partial	5,00E-084
FBpp0087587	Or45a-PA	378	XP_014098074.1	PREDICTED: odorant receptor 45a-like	8,00E-051
FBpp0087602	Or45b-PA	396	XP_014103094.1	PREDICTED: odorant receptor 24a	9,00E-098
FBpp0087029	Or49a-PA	396	XP_014095510.1	PREDICTED: odorant receptor 49a-like	3,00E-068
FBpp0085645	Or56a-PA	419	XP_014088559.1	PREDICTED: odorant receptor 43a	4,00E-012
FBpp0071930	Or59b-PA	398	XP_014100883.1	PREDICTED: odorant receptor 7a-like, partial	1,00E-079
FBpp0071929	Or59c-PA	411	XP_014100884.1	PREDICTED: odorant receptor 7a-like	3,00E-073
FBpp0072847	Or63a-PA	420	XP_014094224.1	PREDICTED: odorant receptor 63a-like	2,00E-141
FBpp0290712	Or63a-PB	191	XP_014094224.1	PREDICTED: odorant receptor 63a-like	3,00E-045
FBpp0076104	Or67a-PA	407	XP_014093775.1	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: odorant receptor 67a-like	3,00E-072
FBpp0076149	Or67b-PB	421	XP_014094224.1	PREDICTED: odorant receptor 63a-like	1,00E-048
FBpp0076029	Or67c-PA	404	XP_014094968.1	PREDICTED: odorant receptor 67c	3,00E-175
FBpp0076026	Or67d-PA	391	XP_014091792.1	PREDICTED: odorant receptor 67d-like	3,00E-064
FBpp0075412	Or71a-PB	378	XP_014095326.1	PREDICTED: odorant receptor 94a-like	2,00E-075
FBpp00301961	Or71a-PD	363	XP_014095326.1	PREDICTED: odorant receptor 94a-like	9,00E-066
FBpp0075008	Or74a-PA	404	XP_014091648.1	PREDICTED: odorant receptor 74a	1,00E-115
FBpp0078441	Or83a-PA	453	XP_014092452.1	PREDICTED: odorant receptor 83a	6,00E-132
FBpp0078438	Orco-PA	486	XP_014092453.1	PREDICTED: odorant receptor coreceptor	0.0
FBpp0112105	Orco-PB	486	XP_014092453.1	PREDICTED: odorant receptor coreceptor	0.0
FBpp0082699	Or83c-PA	397	XP_014091805.1	PREDICTED: odorant receptor 67d-like	6,00E-056
FBpp0081326	Or85a-PA	397	XP_014092042.1	PREDICTED: odorant receptor 7a-like	4,00E-062
FBpp0081383	Or85b-PA	390	XP_014093775.1	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: odorant receptor 85b-like	2,00E-107
FBpp0081382	Or85c-PA	389	XP_014093775.1	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: odorant receptor 85c-like	5,00E-107
FBpp0081361	Or85d-PA	412	XP_014093772.1	PREDICTED: putative odorant receptor 85d	4,00E-105
FBpp0081506	Or85f-PA	392	XP_014095510.1	PREDICTED: odorant receptor 49a-like	9,00E-046
FBpp0082351	Or88a-PA	401	XP_014099351.1	PREDICTED: odorant receptor 88a-like	6,00E-044
FBpp0083295	Or92a-PA	408	XP_014094968.1	PREDICTED: odorant receptor 67c	3,00E-166
FBpp0083734	Or94a-PA	387	XP_014094548.1	PREDICTED: odorant receptor 94a-like	1,00E-128
FBpp0083735	Or94b-PA	383	XP_014094548.1	PREDICTED: odorant receptor 94a-like	4,00E-118
FBpp0084595	Or98a-PA	397	XP_014100884.1	PREDICTED: odorant receptor 7a-like	1,00E-066
FBpp0312615	Or98b-PB	383	XP_014098074.1	PREDICTED: odorant receptor 45a-like	6,00E-033
FBpp0078616	Or82a-PA	385	XP_014091900.1	PREDICTED: odorant receptor 82a	2,00E-106
FBpp0089412	Or69a-PA	393	XP_014088528.1	PREDICTED: putative odorant receptor 69a, isoform B	3,00E-066
FBpp0089413	Or69a-PB	393	XP_014088528.1	PREDICTED: putative odorant receptor 69a, isoform B	2,00E-082
FBpp0076714	Or65c-PA	410	XP_014096040.1	PREDICTED: odorant receptor 41b	7,00E-036
FBpp0076713	Or65b-PA	406	XP_014096040.1	PREDICTED: odorant receptor 41b	5,00E-034
FBpp0076712	Or65a-PA	417	XP_014096040.1	PREDICTED: odorant receptor 41b	7,00E-042
FBpp0070028	Or19a-PB	387	XP_014088938.1	PREDICTED: odorant receptor 2a-like	6,00E-061
FBpp0070002	Or19b-PB	387	XP_014088938.1	PREDICTED: odorant receptor 2a-like	5,00E-060
FBpp0070381	Or2a-PA	397	XP_014088938.1	PREDICTED: odorant receptor 2a-like	1,00E-086
FBpp0071932	Or59a-PA	379	XP_014097365.1	PREDICTED: odorant receptor 59a-like	1,00E-127
FBpp0087262	Or47b-PA	412	XP_014096040.1	PREDICTED: odorant receptor 47b	2,00E-052
FBpp0087212	Or47a-PA	385	XP_014098074.1	PREDICTED: odorant receptor 45a-like	2,00E-034
FBpp0089407	Or46a-PA	381	XP_014095654.1	PREDICTED: odorant receptor 46a, isoform A	1,00E-072
FBpp0089408	Or46a-PB	384	XP_014095654.1	PREDICTED: odorant receptor 46a, isoform A	2,00E-069
FBpp0088122	Or43a-PA	376	XP_014088559.1	PREDICTED: odorant receptor 43a	1,00E-132
FBpp0079864	Or33c-PA	384	XP_014097127.1	PREDICTED: odorant receptor 33b-like	2,00E-080
FBpp0079863	Or33b-PA	379	XP_014097127.1	PREDICTED: odorant receptor 33b-like	9,00E-106
FBpp0079862	Or33a-PA	378	XP_014097127.1	PREDICTED: odorant receptor 33b-like	2,00E-094
FBpp0087962	Or43b-PA	403	XP_014100883.1	PREDICTED: odorant receptor 7a-like, partial	7,00E-067
FBpp0288403	Or24a-PB	398	XP_014103094.1	PREDICTED: odorant receptor 24a	2,00E-142
FBpp0077382	Or23a-PA	379	XP_014097365.1	PREDICTED: odorant receptor 59a-like	6,00E-080
FBpp0077499	Or22c-PA	402	XP_014103181.1	PREDICTED: odorant receptor 22c	2,00E-140
FBpp0077542	Or22b-PA	397	XP_014100883.1	PREDICTED: odorant receptor 7a-like, partial	5,00E-055
FBpp0077541	Or22a-PA	397	XP_014100883.1	PREDICTED: odorant receptor 7a-like, partial	8,00E-058
FBpp0301983	Or85e-PB	467	XP_014094455.1	PREDICTED: putative odorant receptor 85e	4,00E-157
FBpp0080339	Or35a-PB	409	XP_014091648.1	PREDICTED: odorant receptor 74a	2,00E-107
FBpp0086894	Or49b-PA	375	XP_014102906.1	PREDICTED: odorant receptor 49b-like	2,00E-164
FBpp0070069	Or1a-PA	392	XP_014098069.1	PREDICTED: odorant receptor 1a-like	4,00E-034
FBpp0071134	Or7a-PA	413	XP_014100883.1	PREDICTED: odorant receptor 7a-like, partial	6,00E-098
FBpp0071396	Or9a-PA	392	XP_014098074.1	PREDICTED: odorant receptor 45a-like	2,00E-036
FBpp0312370	Or10a-PB	406	XP_014091911.1	PREDICTED: odorant receptor 10a	7,00E-144
FBpp0073938	Or13a-PA	418	XP_014094420.1	PREDICTED: odorant receptor 13a	4,00E-136

Εικόνα 15: Πίνακας με τα αποτελέσματα BLASTp των αμινοξικών αλληλουχιών των υποδοχέων της *D. melanogaster* (query) σε σχέση με τις αντίστοιχες αλληλουχίες των υποδοχέων του *B. oleae* (B. oleae ref). Η στήλη query περιλαμβάνει τις αλληλουχίες των υποδοχέων της *D. melanogaster*, η στήλη name περιλαμβάνει την αντίστοιχη ονοματολογία των υποδοχέων της *D. melanogaster*, η στήλη length περιλαμβάνει το μήκος των αμινοξικών αλληλουχιών των υποδοχέων της *D. melanogaster*, η στήλη B. oleae ref. περιλαμβάνει τα XPs των ομόλογων οσφρητικών υποδοχέων στο δάκο, η στήλη B. oleae hit περιλαμβάνει τα προτεινόμενα ονόματα των ομόλογων οσφρητικών υποδοχέων στο δάκο και η στήλη E-value περιλαμβάνει τις τιμές e-value που

προέκυψαν από το BLASTp. Με διαφορετικά χρώματα εκτός του μαύρου παρουσιάζονται οι υποδοχείς του δάκου που είναι ομόλογοι για περισσότερους από έναν υποδοχείς στη *Drosophila*.

Όπως παρατηρήθηκε, οι περισσότεροι οσφρητικοί υποδοχείς στη *Drosophila* εμφανίζουν κοινούς ομόλογους υποδοχείς στο δάκο. Το γεγονός αυτό αποδεικνύει ότι τα περισσότερα γονίδια οσφρητικών υποδοχέων της *Drosophila* έχουν προκύψει από ειδοειδικές επεκτάσεις.

Εκτός όμως από την εύρεση των ομόλογων οσφρητικών υποδοχέων της *Drosophila* στο δάκο, προκειμένου να επιλεγούν τα προς ανάλυση γονίδια οσφρητικών υποδοχέων του δάκου, αναζητήθηκαν οι εξελικτικές σχέσεις και με άλλα συγγενικά είδη εντόμων τα οποία αναφέρονται παρακάτω.

3.1.2 Φυλογενετικές σχέσεις

Προκειμένου να εξεταστούν οι ορθόλογοι οσφρητικοί υποδοχείς του δάκου (*B. oleae*) με αυτούς των ειδών: *C. capitata* (Papanicolaou et al. 2016), *D. melanogaster*, *M. domestica* (Scott et al. 2014) και *B. dorsalis* (Zhongzhen et al. 2015) και να μελετηθούν οι εξελικτικές σχέσεις ανάμεσα στα είδη αυτά όσον αφορά τους ORs, πραγματοποιήθηκε κατασκευή φυλογενετικών δέντρων. Αυτή έγινε μέσω της χρήσης του προγράμματος MEGA. Η στοίχιση όλων των αμινοξικών αλληλουχιών έγινε μέσω του MUSCLE και επιλέχθηκε ο αλγόριθμος UPGMA με Bootstrap value 100 για τον τρόπο εμφάνισης των δέντρων. Τα δέντρα που κατασκευάστηκαν ήταν δύο και καθένα από αυτά συνέβαλε στην αποκάλυψη των εξελικτικών σχέσεων μεταξύ των 5 ειδών. Ακόμη πριν την κατασκευή των δέντρων αφαιρέθηκαν οι αλληλουχίες του δάκου που ανήκαν σε υποδοχείς που είχαν χαρακτηριστεί και ως πιθανοί γευστικοί υποδοχείς εκτός από οσφρητικοί καθώς, μετά από ανάλυση BLASTp των αλληλουχιών αυτών με σκοπό την εύρεση ομολόγων σε άλλα είδη, όλοι οι ομόλογοι υποδοχείς που βρέθηκαν σε συγγενικά είδη ήταν γευστικοί. Στον **πίνακα 2** του **Παραρτήματος** παρουσιάζονται τα καλύτερα hits του BLASTp για τους οσφρητικούς- γευστικούς υποδοχείς του δάκου σε άλλα είδη.

Το πρώτο φυλογενετικό δέντρο κατασκευάστηκε με τις αμινοξικές αλληλουχίες των ειδών: *B. oleae*, *C. capitata*, *D. melanogaster* και *M. domestica* ώστε να διαπιστωθούν οι φυλογενετικές σχέσεις των οσφρητικών υποδοχέων του δάκου σε σχέση με τα άλλα τρία είδη σε επίπεδο τάξης και οικογένειας (**Εικόνα 17**).

Ακόμη κατασκευάστηκε άλλο ένα φυλογενετικό δέντρο το οποίο συνέβαλε στην επιβεβαίωση της επιλογής των προς μελέτη γονιδίων από το πρώτο δέντρο. Το δεύτερο δέντρο περιείχε τις αμινοξικές αλληλουχίες των ειδών του πρώτου δέντρου, στο οποίο προστέθηκαν και οι αλληλουχίες του *B. dorsalis*, που είναι πιο συγγενικό είδος για το δάκο από τα άλλα τρία είδη, καθώς ανήκει στο ίδιο γένος. Η εισαγωγή των αλληλουχιών του *B. dorsalis* στο δέντρο υπέδειξε τους οσφρητικούς υποδοχείς του δάκου που έχουν εξελιχθεί και σε επίπεδο γένους.

3.1.3 Επιλογή των οσφρητικών υποδοχέων

Η επιλογή των οσφρητικών υποδοχέων του δάκου που τέθηκαν προς μελέτη έγινε με βάση δύο βασικά κριτήρια όπως αναφέρθηκε στην **εικόνα 14**:

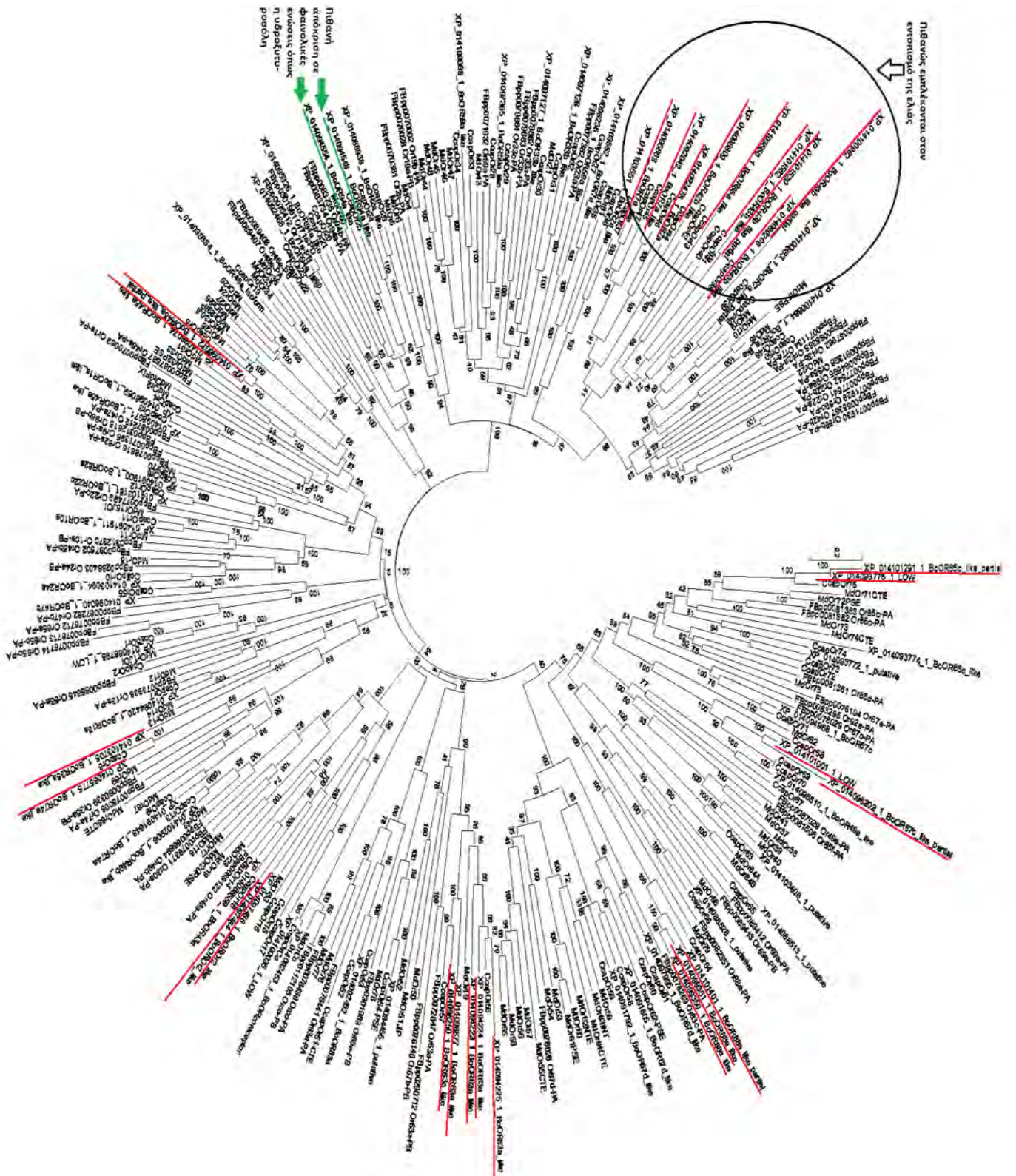
- Την ειδοειδικότητα των οσφρητικών υποδοχέων του δάκου, η οποία διαπιστώθηκε με βάση τα φυλογενετικά δέντρα που κατασκευάστηκαν. Η ειδοειδικότητα αποτέλεσε ένα από τα κριτήρια επιλογής καθώς, η υδροξυτυροσόλη αποτελεί μια συγκεκριμένη οσμή της ελιάς και ανήκει στις ενώσεις στις οποίες αποκρίνεται μόνο ο δάκος αφού είναι και το μοναδικό έντομο- παράσιτο της ελιάς. Προκειμένου, λοιπόν, να βρεθούν οσφρητικοί υποδοχείς του δάκου οι οποίοι θα είχαν κάποια απόκριση στην υδροξυτυροσόλη, θα έπρεπε αυτοί οι υποδοχείς να είναι κατά προτίμηση ειδοειδικοί. Η επιλογή έγινε ανάμεσα στους υποδοχείς του δάκου του πρώτου δέντρου που είχαν τη μεγαλύτερη απόσταση από τους αντίστοιχους ομόλογους υποδοχείς των άλλων ειδών ή τουλάχιστον είχαν κοντινή απόσταση με ομόλογους υποδοχείς κυρίως της *C. capitata* που ανήκει στην ίδια οικογένεια με το δάκο σε αντίθεση με την *M. domestica* και την *D. melanogaster* που είναι πιο γενετικά απομακρυσμένα είδη από το δάκο (**Εικόνα 17**).

Η επιλογή των γονιδίων επιβεβαιώθηκε και από το δεύτερο δέντρο καθώς από τους υποδοχείς του πρώτου δέντρου που πληρούσαν τις παραπάνω προϋποθέσεις, επιλέχθηκαν αρχικά για ανάλυση οι υποδοχείς του δάκου που στο δεύτερο δέντρο εμφάνιζαν την μεγαλύτερη απόσταση από τους ομόλογους υποδοχείς τους στο *B. dorsalis*. Αυτό είναι κατανοητό διότι το *B. dorsalis* ανήκει στο ίδιο γένος με το δάκο και επομένως οι πιο απομακρυσμένοι υποδοχείς του δάκου σε σχέση με τους υποδοχείς του *B. dorsalis* θα είναι και πιο ειδοειδικοί.

- Την ομολογία των οσφρητικών υποδοχέων του δάκου με οσφρητικούς υποδοχείς της *D. melanogaster* που εμφανίζουν απόκριση σε φαινολικές ενώσεις. Εφόσον η υδροξυτυροσόλη αποτελεί μια φαινολική ημιπτητική ένωση, αναζητήθηκαν οι οσφρητικοί υποδοχείς της *Drosophila* που εμφανίζουν απόκριση σε φαινολικές ενώσεις (**Εικόνα 16**). Υποτέθηκε, λοιπόν, ότι οι υποδοχείς του δάκου που είναι συγγενικοί με υποδοχείς της *Drosophila* που αποκρίνονται σε φαινολικές ενώσεις, ενδέχεται να αποκρίνονται επίσης και στην υδροξυτυροσόλη (**Εικόνα 17**).

Or name MP Response Expression

<u>Or name</u>	<u>MP Response</u>	<u>Expression</u>	
Or10a	+	adult	Εικόνα 16: Οσφρητικοί υποδοχείς της <i>D. melanogaster</i> που αποκρίνονται σε φαινολικές ενώσεις είτε στο στάδιο του ενήλικου εντόμου (adult) είτε της προνύμφης (larval). Το + αναπαριστά την θετική απόκριση των υποδοχέων σε φαινολικές ενώσεις δηλαδή την αύξηση των επιπέδων της έκφρασης τους μετά από έκθεση του εντόμου σε αυτές ενώ το – την αρνητική απόκριση των υποδοχέων σε φαινολικές ενώσεις δηλαδή τη μείωση των επιπέδων της έκφρασης τους μετά από έκθεση του εντόμου σε αυτές. Το ? στον υποδοχέα Or46aB δηλώνει ότι δεν είναι γνωστό για το συγκεκριμένο υποδοχέα αν αποκρίνεται θετικά ή αρνητικά σε φαινολικές ενώσεις. Σε όποιους υποδοχείς υπάρχει η ένδειξη (aromatic) υποδεικνύεται ότι αποκρίνονται σε αρωματικές ενώσεις (<i>Ray et al. 2014</i>).
Or85b	+	adult	
Or49b	+	adult	
Or46aA	+	adult	
Or71a	+	adult	
Or85c	-	larval	
Or85d	-	adult	
Or94a	+	larval	
Or45b	+	larval	
Or24a	(aromatic)	larval	
Or94b	+	larval	
Or30a	+	larval	
Or46aB	?	adult	
Or43a	+	adult	
Or22c	(aromatic)	larval	



Εικόνα 17: Φυλογενετικό δέντρο με τις αμινοξικές αλληλουχίες των ειδών: *B. oleae*, *C. capitata*, *M. domestica*, *D. melanogaster*. Με κόκκινο χρώμα είναι υπογραμμισμένοι οι οσφρητικοί υποδοχείς του δάκου που επιλέχθηκαν για ανάλυση με βάση την μεγαλύτερη απόστασή τους στο δέντρο από τους ομόλογους υποδοχείς των άλλων ειδών, γεγονός που υποδηλώνει την ειδοειδικότητά τους. Οι κυκλωμένοι υποδοχείς αποτελούν ίσως υποδοχείς που εμπλέκονται στον εντοπισμό της ελιάς καθώς βρίσκονται σε έναν κλάδο στο δέντρο όπου υπάρχουν σχεδόν μόνο υποδοχείς της μεσογειακής μύγας, *C. capitata* και ο υποδοχέας της *D. melanogaster*, Or7a που έχει βρεθεί ότι εμπλέκεται στην ανίχνευση οσμών φρούτων (Papanicolaou et al.

2016). Από αυτό συμπεραίνεται ότι οι υποδοχείς της μεσογειακής μύγας εκείνου του κλάδου πιθανόν είναι αποτέλεσμα ειδοειδικής επέκτασης και εμπλέκονται στον εντοπισμό των φρούτων που προσβάλλει η μεσογειακή μύγα. Το ίδιο μπορεί να συμπεραστεί και για το δάκο που μας ενδιαφέρει, συνεπώς οι υποδοχείς αυτοί είναι μια καλή επιλογή για ανάλυση. Με πράσινο χρώμα είναι υπογραμμισμένοι οι οσφρητικοί υποδοχείς του δάκου που επιλέχθηκαν για ανάλυση με βάση την ομολογία τους με τον υποδοχέα της *D. melanogaster* Or94a που αποκρίνεται σε φαινολικές ενώσεις (Εικόνα 14). Υποτέθηκε λοιπόν ότι και οι ομόλογοι υποδοχείς του δάκου με τον Or94a θα αποκρίνονται επίσης σε φαινολικές ενώσεις και ίσως στην υδροξυτυροσώλη.

Από τη μελέτη του φυλογενετικού δέντρου, λοιπόν, με βάση το κριτήριο της ειδοειδικότητας επιλέχθηκαν οι οσφρητικοί υποδοχείς του δάκου που καταγράφονται στην εικόνα 18.

clade	ID	P NAME	locus	scaffold	
1	XP_014101291	BoOR85c_like_partial	LOC106626008	NW_013589685.1 (1585..4006, complement)	Διαφορετικά scaffolds
1	XP_014093775	LOW Q.BoOR85c_like_partial	LOC106619952	NW_013581464.1 (193106..197725)	
2	XP_014101001	LOW Q.BoOR67c_like_partial	LOC106625697	NW_013580614.1 (8773..10831, complement)	
2	XP_014096202	BoOR67c_like_partial	LOC106621753	NW_013581740.1 (123144..123848)	Διαφορετικά scaffolds
3	XP_014101401	BoOR88a_like_partial	LOC106626119	NW_013592004.1 (4..1399, complement)	
3	XP_014099351	BoOR88a_like	LOC106624189	NW_013582790.1 (534..7533, complement)	Ίδιο scaffold, καμία επικάλυψη
3	XP_014099350	BoOR88a_like	LOC106624188	NW_013582790.1 (15,283..16,701)	
4	XP_014094225	BoOR63a_like	LOC106620291	NW_013581504..109,077..110,667	
4	XP_014094224	BoOR63a_like	LOC106620290	NW_013581504..102,802..108,204	Ίδιο scaffold, καμία επικάλυψη
4	XP_014094223	BoOR63a_like	LOC106620289	NW_013581504..97,439..100,945	
5	XP_014096877	BoOR63a_like	LOC106622271	NW_013581862.1 complement(65,815..79,788)	Διαφορετικά scaffolds
5	XP_014098250	BoOR63a_like	LOC106623316	NW_013582247.1 complement(43,697..51,194)	
6	XP_014103705	BoOR35a_like			
7	XP_014085775	BoOR74a_like			
8	XP_014098074	BoOR45a_like	LOC106623179	NW_013582182..147,130..48,497	Ίδιο scaffold, καμία επικάλυψη
8	XP_014098072	BoOR45a_like_partial	LOC106623177	NW_013582182..48,776..49,506	
9	XP_014101582	BoOR43b_like	LOC106626293	NW_013595040.1 (454..1221, complement)	Διαφορετικά scaffolds
9	XP_014101520	BoOR43b_like_partial	LOC106626234	NW_013593763.1 (5..2034)	
9	XP_014100962	BoOR43b_like_partial	LOC106625659	NW_013585606.1 (9..638, complement)	
9	XP_014086206	BoOR43b_like	LOC106614819	NW_013581239.1 (967348..968480, complement)	
10	XP_014103550	BoOR85a_like			
11	XP_014098809	BoOR42b_like			
12	XP_014092478	BoOR7a	LOC106619040	NW_013581374.1 (130438..131790, complement)	Διαφορετικά scaffolds
12	XP_014092042	BoOR7a_like	LOC106618716	NW_013581355.1 (373488..374787)	
12	XP_014095883	BoOR7a_like	LOC106621513	NW_013581685.1 (11227..12547, complement)	Ίδιο scaffold, καμία επικάλυψη
13	XP_014097484	BoOROr2_like	LOC106622741	NW_013582023.1 44,554..46,740	
13	XP_014097486	BoOROr2_like	LOC106622743	NW_013582023.1 37,201..38,940	

Εικόνα 18: Οι οσφρητικοί υποδοχείς του *B. oleae* που επιλέχθηκαν για ανάλυση με βάση το κριτήριο της ειδοειδικότητας. Η στήλη clade περιλαμβάνει τους κλάδους του φυλογενετικού δέντρου στους οποίους ανήκουν οι οσφρητικοί υποδοχείς που επιλέχθηκαν. Το ίδιο νούμερο αντιστοιχεί στον ίδιο κλάδο στο φυλογενετικό δέντρο. Η στήλη ID περιλαμβάνει τους κωδικούς XP των υποδοχέων. Η στήλη P NAME περιλαμβάνει τα υποψήφια (predicted) ονόματα των υποδοχέων που έχουν προκύψει από αυτόματο annotation στην NCBI. Η στήλη locus περιλαμβάνει τις τοποθεσίες των γονιδίων των υποδοχέων στα scaffolds και στη στήλη scaffolds καταγράφονται τα ονόματα των scaffolds. Δίπλα από τη στήλη scaffolds καταγράφεται αν οι υποδοχείς με κοινό όνομα (π.χ. OR63a_like) βρίσκονται στο ίδιο ή σε διαφορετικά scaffolds και στην περίπτωση που βρίσκονται στο ίδιο scaffold αν εμφανίζουν αλληλεπικάλυψη.

Οι υποδοχείς που εμφανίζουν κοινό όνομα βρίσκονται στον ίδιο κλάδο του φυλογενετικού δέντρου και υποτέθηκε ότι είτε κωδικοποιούνται από το ίδιο γονίδιο αλλά διαφορετικές περιοχές του και έτσι εξηγείται το ότι έχουν διαφορετικά XPs, είτε κωδικοποιούνται από διαφορετικά γονίδια τα οποία έχουν προκύψει μετά από διπλασιασμό-επέκταση. Με LOW Q. αναπαριστάται η αλληλουχία κάθε υποδοχέα που δεν εμφανίζεται ολοκληρωμένη στα scaffolds. Η αλληλουχία αυτή είτε θα αποτελεί τμήμα μιας ευρύτερης αλληλουχίας που φέρει και το ίδιο όνομα, είτε θα αποτελεί τμήμα ενός ξεχωριστού υποδοχέα του οποίου το υπόλοιπο τμήμα πιθανώς βρίσκεται σε άλλο scaffold.

Προκειμένου να εξακριβωθεί ποια από τις δύο υποθέσεις ισχύει, ώστε να μη επιλεγθεί δύο φορές το ίδιο γονίδιο, ελέγχθηκε στην πλατφόρμα Apollo η θέση των γονιδίων, που εμφανίζουν κοινό όνομα, στα scaffolds.

Όπως καταγράφεται και στην **εικόνα 18**, τα γονίδια των παραπάνω οσφρητικών υποδοχέων είτε βρίσκονται σε διαφορετικά scaffolds και άρα αποτελούν διαφορετικά γονίδια είτε στο ίδιο scaffold αλλά χωρίς καμία επικάλυψη, γεγονός που μπορεί να σημαίνει ότι είναι αποτέλεσμα επέκτασης κάποιου προγονικού γονιδίου, η οποία οδήγησε στη δημιουργία δύο ή παραπάνω γονιδίων με νέα λειτουργία. Εξάιρεση αποτελούν οι υποδοχείς OR35a_like και OR74a_like που απαντώνται μόνο μια φορά στο δέντρο. Από τους παραπάνω οσφρητικούς υποδοχείς για τον σχεδιασμό εκκινητών (primers) επιλέχθηκαν αρχικά αυτοί που είναι σημασμένοι με μπλε χρώμα και αυτοί είναι:

XP_014099350: BoOR88a_like1 (XM_014243875)

XP_014094225: BoOR63a_like (XM_014238750)

XP_014094224: BoOR63a_like (XM_014238749)

XP_014094223: BoOR63a_like (XM_014238748)

XP_014096877: BoOR63a_like (XM_014241402)

XP_014103705: BoOR35a_like (XM_014248230)

XP_014097484: BoOROr2_like (XM_014242009)

XP_014097486: BoOROr2_like (XM_014242011)

Όσον αφορά το κριτήριο της ομολογίας με υποδοχείς της *Drosophila* που αποκρίνονται σε φαινολικές ενώσεις, έγινε η επιλογή των υποδοχέων του δάκου:

XP_014094548: BoOr94a_like (XM_014239073)

XP_014094554: BoOr94a_like (XM_014239079)

Τα γονίδια των υποδοχέων αυτών βρίσκονται στο ίδιο scaffold αλλά δεν εμφανίζουν καμία επικάλυψη και άρα υπήρξε η δυνατότητα ανάλυσης ως δύο ξεχωριστών γονιδίων που ίσως είναι αποτέλεσμα επέκτασης ενός προγονικού γονιδίου κατά τη διάρκεια της εξέλιξης.

3.2 Σχεδιασμός των PRIMERS

Ο σχεδιασμός των primers έγινε για τα 5 από τα 10 γονίδια που επιλέχθηκαν παραπάνω. Αυτά ήταν τα γονίδια με κωδικούς:

1. XM_014242009, που κωδικοποιεί τον υποψήφιο οσφρητικό υποδοχέα Or2
2. XM_014242011, που κωδικοποιεί έναν ακόμη υποψήφιο οσφρητικό υποδοχέα Or2 ο οποίος για λόγους διάκρισης από τον πρώτο ονομάστηκε συμβατικά Or2ii
3. XM_014248230, που κωδικοποιεί τον υποψήφιο οσφρητικό υποδοχέα Or35
4. XM_014238748, που κωδικοποιεί ένα από τους υποψήφιους οσφρητικούς υποδοχείς Or63 που ονομάστηκε συμβατικά Or63ii

5. XM_014239079, που κωδικοποιεί έναν από τους υποψήφιους οσφρητικούς υποδοχείς Or94 που ονομάστηκε συμβατικά Or94ii

Η περιοχή που θα γινόταν ο σχεδιασμός των primers στα γονίδια έπρεπε να μην είναι συντηρημένη ώστε οι primers να ενισχύουν κάθε φορά τον μοναδικό υποδοχέα για τον οποίο θα σχεδιάζονταν. Η προϋπόθεση αυτή βασίστηκε στο ότι αν η περιοχή που σχεδιάζονταν οι primers ήταν συντηρημένη, από ένα ζευγάρι primers πιθανώς να ενισχύονταν περισσότερα από ένα γονίδια υποδοχέων. Άρα για τον σχεδιασμό των primers αποκλείστηκαν οι περιοχές των γονιδίων που κωδικοποιούν το C-τελικό και το N-τελικό άκρο των υποδοχέων, που όπως αναφέρθηκε στην **ΕΙΣΑΓΩΓΗ** εμφανίζουν υψηλό βαθμό συντήρησης (1.2.3).

Συγκεκριμένα, επιλέχθηκαν εξωκυτταρικές περιοχές, μακριά από το C-τελικό άκρο, που είναι και οι περιοχές που αλληλεπιδρούν με τις ενώσεις- οσμές και άρα και οι πρώτες που θα αλληλεπιδράσουν με την υδροξυτυροσόλη. Σε περιπτώσεις που δεν γινόταν η περιοχή σχεδιασμού των primers να είναι εξ' ολοκλήρου εξωκυτταρική, επιλέχθηκαν και διαμεμβρανικές περιοχές αλλά όχι ενδοκυτταρικές.

Η εύρεση των συντηρημένων και μη περιοχών των υποδοχέων έγινε με το πρόγραμμα **MAFFT**. Στον **πίνακα 3** του **Παραρτήματος** παρουσιάζεται τμήμα της στοίχισης όλων των αμινοξικών αλληλουχιών των ORs του δάκου. Οι οσφρητικοί υποδοχείς που επιλέχθηκαν για ανάλυση περικλείονται στις κόκκινες οριζόντιες υπογραμμίσεις, οι περιοχές με κοινό χρώμα αναπαριστούν συντηρημένες περιοχές ανάμεσα στους υποδοχείς ενώ οι οι περιοχές με διαφορετικό χρώμα είναι οι μη συντηρημένες περιοχές. Ο προσδιορισμός των εξωκυτταρικών, ενδοκυτταρικών και διακυτταρικών περιοχών έγινε με το πρόγραμμα **TMHMM (Παράρτημα- πίνακας 4)**. Στην επεξεργασία των αλληλουχιών και στην αντιστοίχιση των αμινοξικών με νουκλεοτιδικές αλληλουχίες χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα **OMIGA**. Οι primers σχεδιάστηκαν με το εργαλείο **Primer Quest Tool (IDT- Integrated DNA Technologies Inc.)**.

Οι primers κρίθηκαν κατάλληλοι ύστερα από αναζήτηση τους σε κάθε ένα από τα γονίδια και στο Apollo προκειμένου να διαπιστωθεί ότι όντως υβριδοποιούνται στις περιοχές που σχεδιάστηκαν. Η διαδικασία αυτή έγινε γιατί τα mRNAs και οι πρωτεϊνικές αλληλουχίες των υποδοχέων που ανακτήθηκαν από την NCBI έχουν προκύψει αυτόματα από τα γονίδια. Επομένως δεν ήταν βέβαιο αν η περιοχή που επιλέχθηκε για σχεδιασμό των primers βρίσκεται όντως στο εκάστοτε γονίδιο ή γύρω από αυτό σε περιοχή ιντρονίου και λόγω της αυτόματης διαδικασίας εντάχθηκε εσφαλμένα στο mRNA και άρα στην πρωτεΐνη- υποδοχέα. Άρα αυτή αποτέλεσε μια διαδικασία επαλήθευσης ότι οι primers που σχεδιάστηκαν ήταν και οι σωστοί.

Προκειμένου να διαπιστωθεί αν οι primers υβριδοποιούνται και σε άλλο γονίδιο εκτός από το επιθυμητό για το οποίο σχεδιάστηκαν χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα **Primer Blast**. Όσα ζεύγη primers υβριδοποιούνταν και σε ομόλογες περιοχές άλλων γονιδίων αποσύρθηκαν και σχεδιάστηκαν νέοι.

Οι αλληλουχίες των εκκινητών παρατίθενται στον **πίνακα 5** του **Παραρτήματος**.

3.3 Απομόνωση ιστών από θηλυκά γονιμοποιημένα έντομα και ανάλυση της έκφρασης των 5 γονιδίων

Οι ιστοί που απομονώθηκαν για να γίνει ανάλυση της έκφρασης των 5 οσφρητικών γονιδίων μετά την έκθεση στην υδροξυτυροσόλη ήταν ιστοί θηλυκών εντόμων 13^{ης} ημέρας, που είχαν συζευχθεί. Η επιλογή των γονιμοποιημένων θηλυκών εντόμων δεν ήταν τυχαία καθώς αυτά είναι που επιτελούν την ωοαπώθηση

στην ελιά και ευθύνονται για την ζημιά που προκαλείται, και αυτά είναι όπως αναφέρεται και στην **ΕΙΣΑΓΩΓΗ** που εμφανίζουν την μεγαλύτερη απόκριση στις πτητικές ενώσεις της ελιάς. Μια από τις πτητικές ενώσεις της ελιάς είναι και η υδροξυτυροσόλη όπως προειπώθηκε, άρα οι οσφρητικοί υποδοχείς των γονιμοποιημένων θηλυκών αναμένεται να εμφανίζουν απόκριση στην υδροξυτυροσόλη. Οι ιστοί που απομονώθηκαν είναι **το κεφάλι και οι κεραίες, οι γναθικές προσακτρίδες και οι θώρακες των εντόμων.**

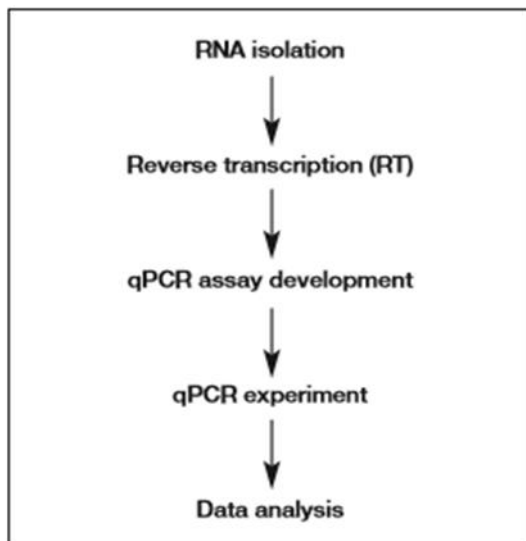
Οι κεραίες και οι γναθικές προσακτρίδες αποτελούν τα κύρια οσφρητικά όργανα των εντόμων όπως είδαμε και στην **ΕΙΣΑΓΩΓΗ**. Επίσης στους θώρακες της *D. melanogaster* έχει παρατηρηθεί η ύπαρξη αισθητικών τριχιδίων που μοιάζουν με τα τριχοειδή οσφρητικά τριχίδια (*Goulding et al. 2000*) γεγονός που σημαίνει ότι ίσως εκεί υπάρχουν οσφρητικά αισθητικά τριχίδια και οσφρητικοί υποδοχείς και γι' αυτό οι θώρακες του δάκου επιλέχθηκαν ως ιστός για την ανάλυση της έκφρασης των 5 γονιδίων.

Αρχικά απομονώθηκαν 2 βιολογικά δείγματα από κάθε ιστό πριν και μετά την έκθεση στην υδροξυτυροσόλη. Ωστόσο, για τη βελτίωση των αποτελεσμάτων της ποσοτικής Real Time PCR μερικών από τα γονίδια που μελετήσαμε, απομονώθηκε άλλο ένα βιολογικό δείγμα για κάθε ιστό πριν και μετά την έκθεση στην οσμή.

Έτσι συνολικά προέκυψαν:

- Τρία βιολογικά δείγματα για τα κεφάλια και τις κεραίες πριν την έκθεση στην υδροξυτυροσόλη που ονομάστηκαν headh_C1 , headh_C2 και headh_C3 και τρία μετά την έκθεση στην οσμή που ονομάστηκαν headh_H1 , headh_H2 και headh_H3
- Τρία βιολογικά δείγματα για τους θώρακες πριν την έκθεση στην υδροξυτυροσόλη που ονομάστηκαν thxh_C1 , thxh_C2 και thxh_C3 και τρία μετά την έκθεση στην οσμή που ονομάστηκαν thxh_H1 , thxh_H2 και thxh_H3
- Δύο βιολογικά δείγματα για τις γναθικές προσακτρίδες πριν την έκθεση στην υδροξυτυροσόλη που ονομάστηκαν mprh_C1 και mprh_C2 και δύο μετά την έκθεση στην οσμή που ονομάστηκαν mprh_H1 και mprh_H2

Στη συνέχεια για την ανάλυση της έκφρασης των 5 οσφρητικών γονιδίων ακολουθήθηκε συνοπτικά για κάθε βιολογικό δείγμα η παρακάτω διαδικασία:



Εικόνα 19: Bio-rad Laboratories, 2006

Πριν την πραγματοποίηση των Real Time PCRs ελέγχθηκε η αποτελεσματικότητα των primers με απλή PCR και ηλεκτροφόρηση.

Για κάθε δείγμα cDNA που προέκυψε από την RT-PCR, πραγματοποιήθηκαν 2 τεχνικές επαναλήψεις ποσοτικής Real Time PCR (qPCR), για κάθε γονίδιο υπό ανάλυση. Παράλληλα για κάθε δείγμα cDNA πραγματοποιήθηκαν 2 τεχνικές επαναλήψεις qPCR με ένα housekeeping (hsk) γονίδιο, δηλαδή ένα γονίδιο του οποίου η έκφραση παραμένει σταθερή καθ' όλη τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας, προκειμένου να γίνει η κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων της έκφρασης των 5 γονιδίων. Καθώς δεν υπάρχουν hsk γονίδια τα οποία να εμφανίζουν σταθερή έκφραση σε όλους τους ιστούς, τα κατάλληλα hsk γονίδια για τους ιστούς που απομονώθηκαν, επιλέχθηκαν με βάση τη μελέτη που πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο μας και αφορούσε την επιλογή του ιδανικότερου hsk γονιδίου σε αναλύσεις έκφρασης γονιδίων στη μεσογειακή μύγα, *C. capitata* και στο δάκο της ελιάς, *B. oleae* (Sagri et al. 2017).

Τα hsk γονίδια που επιλέχθηκαν ήταν το rpl19 (E= 97,3 %) για τα κεφάλια- κεραίες και το GAPDH (E= 98,8 %) για τους θώρακες.

Αμέσως μετά την πραγματοποίηση των αντιδράσεων Real Time για κάθε ένα από τα 5 οσφρητικά γονίδια και τα γονίδια housekeeping, έγινε η ανάλυση της έκφρασης των γονιδίων που παριστάνεται με τα παρακάτω διαγράμματα για κάθε τύπο ιστού που απομονώθηκε. Η εύρεση των στατιστικά σημαντικών ή μη σημαντικών διαφορών που παρατηρήθηκαν έγινε με το πρόγραμμα Graphpad Prism 7.04 και στατιστικά σημαντική θεωρήθηκε κάθε διαφορά με p value < 0,05.

- **Γναθικές προσακτρίδες:**

Στις γναθικές δεν εμφανίστηκε καμία έκφραση πριν ή μετά την έκθεση στην οσμή σε κανένα από τα 5 γονίδια που εξετάστηκαν για τα πρώτα δύο βιολογικά δείγματα και γι' αυτό δεν απομονώθηκε τρίτο βιολογικό δείγμα. **Αποδεικνύεται, λοιπόν, ότι κανένας από τους 5 Ors που μελετήθηκαν δεν εκφράζεται στις γναθικές προσακτρίδες.**

- **Κεφάλια-Κεραίες:**

Η μεταβολή της σχετικής έκφρασης των γονιδίων των οσφρητικών υποδοχέων που μελετήθηκαν στα κεφάλια-κεραίες παριστάνεται στο παρακάτω γράφημα (**Εικόνα 18**). Τα αποτελέσματα της έκφρασης παρουσιάζονται για κάθε βιολογικό set, η σχετική έκφραση του οποίου περιλαμβάνει την κανονικοποιημένη συνολική έκφραση των βιολογικών δειγμάτων που έχουν προκύψει από τους ιστούς control (heads control) και τους ιστούς που εκτέθηκαν στην υδροξυτυροσώλη (heads hydroxy). Ως γονίδιο κανονικοποίησης έχει χρησιμοποιηθεί το *gr119*, ενώ η μεταβολή της έκφρασης των γονιδίων παρουσιάζεται ως προς το 0.

Τα αποτελέσματα της έκφρασης για κάθε γονίδιο ξεχωριστά είναι:

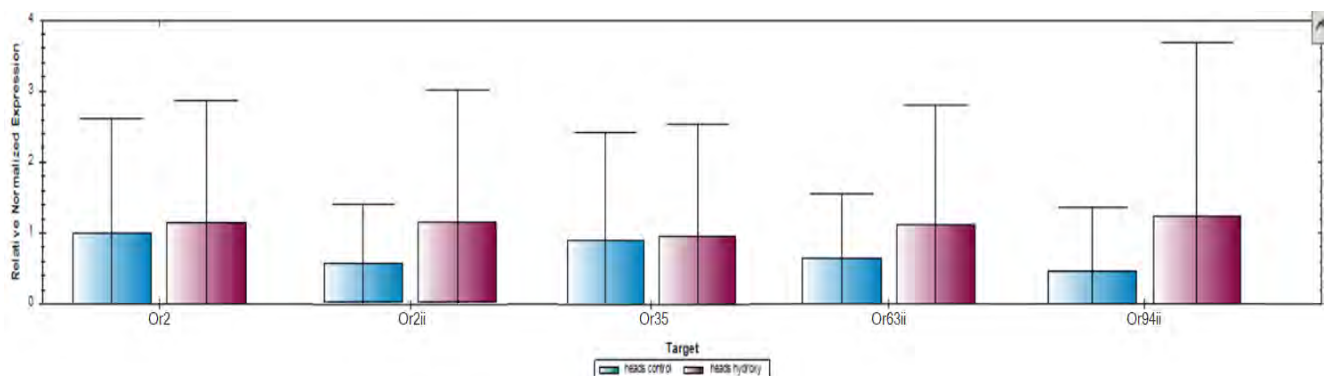
Or2: Παρατηρείται αύξηση της έκφρασης στους ιστούς που εκτέθηκαν στην υδροξυτυροσώλη σε σχέση με τους ιστούς που δεν εκτέθηκαν. Ωστόσο η διαφορά που παρατηρείται ανάμεσα στα heads control και heads hydroxy δεν είναι στατιστικά σημαντική.

Or2ii: Παρατηρείται αύξηση της έκφρασης στους ιστούς που εκτέθηκαν στην υδροξυτυροσώλη σε σχέση με τους ιστούς που δεν εκτέθηκαν. Η διαφορά ανάμεσα στην έκφραση των δύο βιολογικών sets δεν είναι στατιστικά σημαντική.

Or35: Παρατηρείται σχεδόν ίδια έκφραση στους ιστούς που εκτέθηκαν στην οσμή σε σχέση με τους ιστούς control.

Or63ii: Παρατηρείται αυξημένη έκφραση στα heads hydroxy σε σχέση με τα heads control αλλά η διαφορά αυτή δεν είναι στατιστικά σημαντική.

Or94ii: Παρατηρείται αυξημένη έκφραση στα heads hydroxy σε σχέση με τα heads control αλλά η διαφορά αυτή δεν είναι στατιστικά σημαντική.



Εικόνα 20: Γράφημα που παριστάνει τη μεταβολή της σχετικής έκφρασης των γονιδίων των οσφρητικών υποδοχέων που μελετήθηκαν. Με μπλε χρώμα αναπαριστώνται οι στήλες του γραφήματος που αντιστοιχούν στη σχετική έκφραση των γονιδίων στο βιολογικό set των ιστών control (heads control) ενώ με βυσσινί χρώμα αναπαριστώνται οι στήλες των γραφημάτων που αντιστοιχούν στη σχετική έκφραση των γονιδίων στο βιολογικό set των ιστών που προέκυψαν από έντομα που εκτέθηκαν στην υδροξυτυροσώλη.

Γενικά σε όλα τα γονίδια, εκτός αυτού που κωδικοποιεί τον Or35, εμφανίζεται αύξηση της έκφρασής τους μετά την έκθεση στην υδροξυτυροσώλη συνεπώς οι οσφρητικοί υποδοχείς του δάκου που μελετήθηκαν εκφράζονται στις κεραίες του εντόμου. Τα γονίδια που κωδικοποιούν τους υποδοχείς Or2ii, Or63ii και Or94ii εμφανίζουν μεγαλύτερη διαφορά ανάμεσα στην έκφρασή τους στους ιστούς control και στους ιστούς που προέκυψαν μετά από έκθεση στην υδροξυτυροσώλη. Αντίθετα το γονίδιο που κωδικοποιεί τον οσφρητικό υποδοχέα Or2 μικρότερη. **Καμία ωστόσο διαφορά στην έκφραση των 5 γονιδίων ανάμεσα στους ιστούς control και στους ιστούς που προέκυψαν μετά από έκθεση στην υδροξυτυροσώλη δεν είναι στατιστικά σημαντική.**

- **Θώρακες:**

Όσον αφορά την ανάλυση της έκφρασης των 5 γονιδίων που μελετήθηκαν στους θώρακες του δάκου στην εικόνα 18 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της έκφρασης των γονιδίων για κάθε βιολογικό set. Η έκφραση κάθε βιολογικού set thorax control και thorax hydroxy περιλαμβάνει τη κανονικοποιημένη συνολική έκφραση των βιολογικών δειγμάτων που έχουν προκύψει από τους ιστούς control και τους ιστούς που εκτέθηκαν στην υδροξυτυροσώλη αντίστοιχα. Ως γονίδιο κανονικοποίησης αυτή τη φορά έχει χρησιμοποιηθεί το GAPDH ενώ η μεταβολή της έκφρασης των γονιδίων παρουσιάζεται επίσης ως προς το 0. Τα αποτελέσματα που παρατηρήθηκαν για την έκφραση κάθε γονιδίου ήταν τα ακόλουθα:

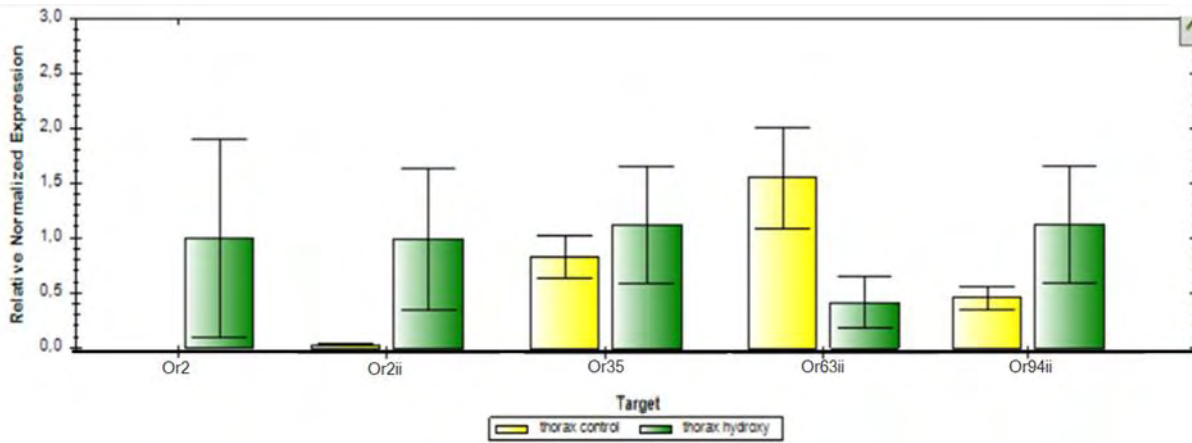
Or2: Εμφανίζει μηδενική έκφραση στους θώρακες control και αρκετά αυξημένη έκφραση στους θώρακες που εκτέθηκαν σε υδροξυτυροσώλη. Το γεγονός αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι ο Or2 εκφράζεται στους θώρακες μόνο παρουσία υδροξυτυροσώλης.

Or2ii: Εμφανίζει μεγάλη διαφορά στην έκφρασή του ανάμεσα στους ιστούς control και στους ιστούς που εκτέθηκαν στην υδροξυτυροσώλη παρουσιάζοντας μια ξεκάθαρη αύξηση έκφρασης μετά από την έκθεση στην οσμή. **Η διαφορά ανάμεσα στην έκφραση του στους θώρακες control και στους θώρακες hydroxytyrosol είναι στατιστικά σημαντική με p value =0,0131 (<0,05).** Συνεπώς ο υποδοχέας Or2ii εμφανίζει αυξημένη έκφραση παρουσία υδροξυτυροσώλης.

Or35: Παρατηρήθηκε αύξηση στην έκφρασή του μετά την έκθεση στην υδροξυτυροσώλη. Ωστόσο η διαφορά στην έκφραση ανάμεσα στους θώρακες control και στους θώρακες που εκτέθηκαν στην υδροξυτυροσώλη δεν είναι στατιστικά σημαντική.

Or94ii: Παρατηρήθηκε παρόμοιο πρότυπο έκφρασης με το γονίδιο που κωδικοποιεί τον Or35 με μη στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στο βιολογικό set thorax control και thorax hydroxy.

Or63ii: Φαίνεται να εμφανίζει εντελώς διαφορετικό πρότυπο έκφρασης από τα άλλα 4 γονίδια στους θώρακες. Συγκεκριμένα παρατηρείται μείωση της έκφρασης του στους ιστούς που εκτέθηκαν στην υδροξυτυροσώλη, ενώ η έκφραση παρουσιάζεται πιο αυξημένη στους ιστούς control. **Η διαφορά στην έκφραση του γονιδίου που παρατηρείται ανάμεσα στους θώρακες control και στους θώρακες hydroxytyrosol είναι στατιστικά σημαντική με p=0,0250 (< 0,05).** Συνεπώς ο υποδοχέας Or63ii εμφανίζει μειωμένη έκφραση παρουσία της υδροξυτυροσώλης.



Εικόνα 21: Με κίτρινο χρώμα αναπαριστώνται οι στήλες του γραφήματος που αντιστοιχούν στη σχετική έκφραση των γονιδίων στο βιολογικό set των ιστών control ενώ με πράσινο χρώμα αναπαριστώνται οι στήλες των γραφημάτων που αντιστοιχούν στη σχετική έκφραση των γονιδίων στο βιολογικό set των ιστών που προέκυψαν από έντομα που εκτέθηκαν στην υδροξυτυροσόλη.

4.ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα έντομα παράσιτα αποτελούν έναν από τους κυριότερους παράγοντες που έπλητταν και πλήττουν μέχρι και σήμερα τις αγροκαλλιέργειες. Οι προσπάθειες αντιμετώπισής τους έχουν οδηγήσει στην ανάπτυξη εναλλακτικών, φιλικών προς το περιβάλλον μεθόδων. Οι μέθοδοι αυτές, όμως, χρειάζονται βελτίωση προκειμένου να έχουν άμεση, αποτελεσματική αλλά πρωτίστως ειδική εφαρμογή για όποιο έντομο αποτελεί κάθε φορά τον κίνδυνο για μια αγροκαλλιέργεια ώστε να μην επιδρούν και στη βιωσιμότητα άλλων ειδών και διαταράσσεται η ισορροπία του οικοσυστήματος.

Το οσφρητικό σύστημα αποτελεί για τα έντομα το εργαλείο για τον εντοπισμό της τροφής, των συντρόφων και των κινδύνων που τα περιβάλλουν. Η στόχευση σε ένα τόσο σημαντικό εργαλείο και η εύρεση οσμών που έλκουν ή απωθούν ένα έντομο μπορεί να αποτελέσει το κλειδί για την μετέπειτα αντιμετώπισή του είτε ενισχύοντας τις ήδη υπάρχουσες μεθόδους αντιμετώπισης όπως η παγίδευση και η χρήση απωθητικών sprays είτε προωθώντας την ανάπτυξη νέων μεθόδων αντιμετώπισης που θα βασίζονται εξ ολοκλήρου στο οσφρητικό σύστημα του συγκεκριμένου εντόμου.

Για όλους τους παραπάνω λόγους, η παρούσα εργασία επικεντρώθηκε στη μελέτη του οσφρητικού συστήματος του δάκου της ελιάς, *Bactrocera oleae*, που αποτελεί το κυριότερο παράσιτο το οποίο πλήττει τις ελαιοκαλλιέργειες της Ελλάδας αλλά και ολόκληρης της γης. Συγκεκριμένα η μελέτη εστίασε στο κυριότερο μοριακό στοιχείο του οσφρητικού συστήματος του δάκου, των οσφρητικών υποδοχέων (ORs).

Οι οσφρητικοί υποδοχείς (ORs) του δάκου είναι μεμβρανικοί υποδοχείς και προσδέχουν τις διάφορες οσμές με τις οποίες έρχεται σε επαφή το έντομο, προκειμένου να μεταφερθούν μέσω των αισθητήριων νευρώνων τα απαραίτητα σήματα στον εγκέφαλο. Υπάρχουν δύο πιθανά μοντέλα για την πρόσδεση της οσμής σε έναν OR: α) είτε προσδέχεται απευθείας στον OR χωρίς την διαμεσολάβηση κάποιας πρωτεΐνης β) είτε μεταφέρεται μέσω μιας βοηθητικής οσμοδεσμευτικής πρωτεΐνης (OBP) ή μέσω μιας χημειοδεκτικής πρωτεΐνης (CSP) στον OR που την βοηθάει στην πρόσδεση της.

Ο δάκος αποτελεί ένα μονοφάγο έντομο που τρέφεται μόνο από την ελιά, συνεπώς οι οσμές που αναγνωρίζει μέσω των ORs για τον εντοπισμό της τροφής του αποτελούν πτητικές ενώσεις της ελιάς. Μια από τις σημαντικότερες ημπτυτικές ενώσεις της ελιάς που εμφανίζει μεγάλη αντιοξειδωτική δράση είναι η υδροξυτυροσόλη, ένας φαινολικός μεταβολίτης του σημαντικότερου συστατικού της ελιάς της ολευρωπαΐνης, που απαντάται σε μεγάλες συγκεντρώσεις όταν η ελιά ωριμάζει. Στόχος λοιπόν της παρούσας εργασίας ήταν να ελέγξουμε αν οι ORs του δάκου εμπλέκονται στην απόκριση στην υδροξυτυροσόλη.

Από τους 75 οσφρητικούς υποδοχείς του δάκου που έχουν χαρακτηριστεί βάσει ομολογίας, επιλέχθηκαν προς μελέτη οι 5 από αυτούς με κριτήρια την ειδοειδικότητά τους και την πιθανή απόκρισή τους σε φαινολικές ενώσεις όπως είναι και η υδροξυτυροσόλη. Έτσι λοιπόν κατασκευάστηκε ένα φυλογενετικό δέντρο με τις αλληλουχίες των οσφρητικών υποδοχέων του δάκου και άλλων συγγενικών ειδών όπως: *B. dorsalis*, *C. capitata*, *D. melanogaster*, *M. domestica*. Από τους υποδοχείς του δάκου που ήταν πιο απομονωμένοι στο δέντρο- και άρα πιο ειδοειδικοί- αλλά και από αυτούς που ήταν ομόλογοι με υποδοχείς της *Drosophila melanogaster* που αποκρίνονται σε φαινολικές ενώσεις, επιλέχθηκαν για περαιτέρω μελέτη οι υποδοχείς: Or2, Or2ii, Or35, Or63ii, Or94ii .

Για τον έλεγχο της έκφρασης τους, έγινε η έκθεση θηλυκών συζευγμένων εντόμων στην υδροξυτυροσόλη (7,7 ng/μl) και απομονώθηκαν δείγματα ιστών: κεφαλιών-κεραιών, θωράκων και γναθικών προσακτριδίων. Ως control χρησιμοποιήθηκαν έντομα τα οποία εκτέθηκαν στην ακετόνη αντί στην υδροξυτυροσόλη. Το RNA που απομονώθηκε από τα παραπάνω δείγματα ιστών μετατράπηκε σε cDNA και χρησιμοποιήθηκε για

την πραγματοποίηση qPCR προκειμένου να αναλυθεί η έκφραση των 5 υπό μελέτη γονιδίων πριν και μετά την έκθεση στην υδροξυτυροσόλη.

Τα 5 γονίδια δεν εμφάνισαν καμία έκφραση στις γναθικές προσακτρίδες γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι οι συγκεκριμένοι υποδοχείς δεν απαντώνται στις γναθικές προσακτρίδες. Το αποτέλεσμα αυτό συμβαδίζει με το γεγονός ότι η κύρια λειτουργία των οσφρητικών υποδοχέων που εκφράζονται στις γναθικές προσακτρίδες δεν είναι η αναγνώριση των πτητικών ενώσεων της ελιάς αλλά ο εντοπισμός ενώσεων που εκκρίνονται από βακτήρια. Άρα η μηδενική έκφραση των γονιδίων που παρατηρήθηκε στις γναθικές προσακτρίδες πιθανώς σχετίζεται με την πολύ χαμηλή έκφραση των γονιδίων που δεν εντοπίστηκε στην qPCR.

Επειδή, όπως ειπώθηκε, η υδροξυτυροσόλη εμφανίζεται στη μεγαλύτερη συγκέντρωση της κατά το στάδιο ωρίμανσης της ελιάς το οποίο είναι και το στάδιο που την προσβάλλει σε μεγαλύτερο βαθμό ο δάκος, αναμέναμε οι οσφρητικοί υποδοχείς του δάκου να αποκρίνονται θετικά στην οσμή και να αυξάνεται η έκφραση των 5 γονιδίων στα κεφάλια- κεραιές που εκτέθηκαν στην υδροξυτυροσόλη σε σχέση με τους ιστούς control.

Η ανάλυση της έκφρασης των γονιδίων στους ιστούς των **κεφαλιών-κεραιών** έδειξε το αναμενόμενο αυτό αποτέλεσμα δηλαδή την αύξηση της έκφρασης των 5 γονιδίων παρουσία υδροξυτυροσόλης εκτός από το γονίδιο που κωδικοποιεί τον υποδοχέα **Or35**. **Ωστόσο καμία διαφορά στην έκφραση ανάμεσα στους ιστούς control και στους ιστούς hydroxy δεν ήταν στατιστικά σημαντική και άρα δεν μπορεί να θεωρηθεί ότι τα 5 αυτά γονίδια όταν εκφράζονται στα κεφάλια- κεραιές αποκρίνονται στη συγκεκριμένη οσμή και εμπλέκονται στον εντοπισμό της καθώς οι διαφορές στην έκφραση που παρατηρήθηκαν μπορεί να είναι αποτέλεσμα πειραματικού χειρισμού.**

Όσον αφορά το γονίδιο που κωδικοποιεί τον υποδοχέα **Or35** εμφάνισε σχεδόν ίδια επίπεδα έκφρασης παρουσία και απουσία υδροξυτυροσόλης, γεγονός που σημαίνει ότι δεν αποκρίνεται στην υδροξυτυροσόλη. Ο Or35b στη *Drosophila*, όπως είδαμε, σχετίζεται με την αναγνώριση τροφής που είναι το φυτό-ξενιστής που προσβάλλει. Άρα, το γεγονός ότι στο δάκο ο Or35 δεν εμφανίζει απόκριση στην υδροξυτυροσόλη, που αποτελεί πτητική ένωση της ελιάς και επομένως σχετίζεται με την εύρεση του ξενιστή, μπορεί να σημαίνει ότι αποκρίνεται σε κάποια άλλη πτητική ένωση της ελιάς ή ότι έχει διαφορετικό λειτουργικό ρόλο απ' ότι το ομόλογο του στη *D. melanogaster*.

Αντίθετα η ανάλυση της έκφρασης των γονιδίων στους ιστούς των **θωράκων**, οι οποίοι από ανάλυση που έχει γίνει στη *D. melanogaster* έχουν βρεθεί να διαθέτουν αισθητικά τριχίδια που προσομοιάζουν σε οσφρητικά, οδήγησε σε πιο ξεκάθαρα συμπεράσματα για τα τρία από τα πέντε γονίδια τα οποία παρουσιάζονται παρακάτω. Τα άλλα δύο γονίδια Or35 και Or94ii εμφάνισαν αυξημένη έκφραση παρουσία υδροξυτυροσόλης στους θώρακες αλλά η **διαφορά της έκφρασης ανάμεσα στους ιστούς control και στους ιστούς hydroxy δεν είναι στατιστικά σημαντική. Συνεπώς, παρ' όλο που τα γονίδια αυτά εκφράζονται και στους θώρακες εκτός από τα κεφάλια και τις κεραιές, δεν είναι σίγουρο ότι εμπλέκονται στον εντοπισμό της υδροξυτυροσόλης καθώς η διαφορά στην έκφραση μπορεί να είναι αποτέλεσμα πειραματικού χειρισμού.**

4.1 Πιθανός ρόλος των γονιδίων Or2, Or2ii, Or63ii στους θώρακες - ορθόλογα σε άλλα είδη εντόμων

Or2: Το γονίδιο που κωδικοποιεί τον υποδοχέα Or2 εμφάνισε μηδενική έκφραση στους θώρακες που δεν είχαν εκτεθεί στην υδροξυτυροσόλη (control), ενώ εμφάνισε αυξημένη έκφραση στους θώρακες που είχαν εκτεθεί στην οσμή (hydroxytyrosol). Το γεγονός αυτό σημαίνει ότι πιθανότατα ο συγκεκριμένος υποδοχέας ενεργοποιείται στους θώρακες μόνο παρουσία υδροξυτυροσόλης και συνεπώς εμπλέκεται στον εντοπισμό της οσμής και ίσως στην πρόσδεση της αφού εμφανίζει τόσο μεγάλη ενεργοποίηση παρουσία υδροξυτυροσόλης. Ακόμα αποτελεί ένα παράδειγμα της έκφρασης οσφρητικών στοιχείων και πιο συγκεκριμένα οσφρητικών υποδοχέων στους θώρακες γεγονός που σημαίνει ότι τα αισθητικά τρίχια που προσομοιάζουν με τα οσφρητικά στη *Drosophila* ίσως τελικά να είναι οσφρητικά στο δάκο. Ο Or2 του δάκου στο δέντρο συνορεύει με τα ορθόλογους υποδοχείς Or15- Or18 στην *C. capitata*, Or83 στην *M. domestica* και Or7a-PA που εμπλέκεται στην αναγνώριση τροφής στην *D. melanogaster*.

Or2ii: Ομοίως με το γονίδιο που κωδικοποιεί τον Or2, το γονίδιο Or2ii εμφάνισε πολύ μειωμένη έκφραση στους θώρακες που δεν είχαν εκτεθεί στην υδροξυτυροσόλη ενώ αντίθετα εμφάνισε αρκετά αυξημένη έκφραση στους θώρακες που είχαν εκτεθεί. Η διαφορά στην έκφραση ανάμεσα στους θώρακες control και στους θώρακες hydroxy ήταν στατιστικά σημαντική και επομένως ο υποδοχέας Or2ii μπορεί να θεωρηθεί επίσης ένας υποδοχέας που εκφράζεται και στους θώρακες εκτός από τα κεφάλια- κεραίες και παίζει ρόλο στον εντοπισμό φαινολικών ενώσεων για το δάκο και συγκεκριμένα της υδροξυτυροσόλης.

Το αποτέλεσμα αυτό είναι αρκετά εύλογο αν αναλογιστούμε ότι τα δύο αυτά γονίδια: Or2 και Or2ii βρίσκονται δίπλα στο φυλογενετικό δέντρο, έχουν τα ίδια ορθόλογα γονίδια στα άλλα είδη και από την ανάλυση στο APOLLO βρέθηκε ότι βρίσκονται και στο ίδιο scaffold χωρίς όμως να παρουσιάζουν καμία επικάλυψη. Πιθανότατα τα δύο αυτά γονίδια αποτελούν διπλασιασμούς ενός προγονικού γονιδίου που εμπλεκόταν στον εντοπισμό της ελιάς από τον δάκο και γι' αυτό απαντώνται στο ίδιο scaffold και εμφανίζουν παρόμοια πρότυπα έκφρασης στους θώρακες. **Ο Or2ii όπως και ο Or2 λοιπόν εμπλέκεται στον εντοπισμό και πιθανότατα στην πρόσδεση της υδροξυτυροσόλης και γενικότερα των φαινολικών ενώσεων της ελιάς με τη διαφορά ότι εκφράζεται στους θώρακες ανεξάρτητα από την παρουσία ή μη της υδροξυτυροσόλης, σε αντίθεση με τον Or2.**

Or63ii: Το γονίδιο που κωδικοποιεί τον υποδοχέα Or63ii σε αντίθεση με τα δύο παραπάνω γονίδια, εμφανίζει αρκετά μειωμένη έκφραση στους θώρακες μετά την έκθεση στην υδροξυτυροσόλη σε σύγκριση με πριν την έκθεση. Η διαφορά αυτή που παρατηρείται στην έκφραση του γονιδίου είναι στατιστικά σημαντική και το γεγονός αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η έκφραση του συγκεκριμένου υποδοχέα αναστέλλεται παρουσία της υδροξυτυροσόλης. Αυτό μπορεί να σημαίνει ότι ο υποδοχέας Or63ii αποκρίνεται αρνητικά σε ελκτικές ενώσεις όπως αναμένουμε ότι είναι η υδροξυτυροσόλη, μια που εμφανίζει τη μέγιστη συγκέντρωσή της στο στάδιο ωρίμανσης της ελιάς κατά το οποίο η ελιά είναι και πιο επιθυμητή από το δάκο και ίσως να έλκεται από πτητικές ενώσεις που εκκρίνονται από αυτήν. Οι ορθόλογοι υποδοχείς του Or63ii του δάκου στα άλλα είδη του φυλογενετικού δέντρου είναι οι Or56-57 στην *C. capitata*, ο Or49 στην *M. domestica* και οι Or63a-PA,63a-PB στην *D. melanogaster*, ωστόσο σε κανέναν από τους ορθόλογους αυτούς υποδοχείς δεν έχει αναγνωριστεί κάποιος συγκεκριμένος λειτουργικός ρόλος.

Μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι όλα τα γονίδια που μελετήθηκαν παρουσίασαν έκφραση στους θώρακες σε ενήλικα έντομα ενώ στους θώρακες της *D. melanogaster* αναφέρεται μόνο η ύπαρξη αισθητικών τριχιδίων στους θώρακες που προσομοιάζουν στα οσφρητικά τριχοειδή τριχίδια. **Το γεγονός αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι εκτός από τις κεραιές και τις γναθικές προσακτρίδες, ο δάκος αντιλαμβάνεται οσμές και μέσω οσφρητικών υποδοχέων που βρίσκονται στο θώρακα.** Τα περισσότερα αποτελέσματα που προέκυψαν δεν ήταν στατιστικά σημαντικά και αυτό οφείλεται πιθανότατα στην χαμηλή συγκέντρωση της υδροξυτυροσόλης στην οποία εκτέθηκαν τα έντομα (7,7 ng/μl), καθότι η συγκέντρωση της υδροξυτυροσόλης μπορεί να φτάσει μέχρι και τα 76,73 mg/100 g ελιών. Ακόμη, ίσως οφείλεται και στην μικρή δειγματοληψία (2 ή 3 βιολογικά δείγματα).

Στα αποτελέσματα που προέκυψαν πιθανώς να έπαιξε ρόλο και ο σχεδιασμός των primers σε εξωμεμβρανικές ή διαμεμβρανικές περιοχές που δεν βρίσκονταν κοντά στο –COOH τελικό και –NH₂ τελικό άκρο των οσφρητικών υποδοχέων, και θεωρήθηκαν ως οι λιγότερο συντηρημένες περιοχές που έρχονται πρώτες σε επαφή με την οσμή. Όπως αναφέρεται όμως από τους Ray et al. 2014 οι αμινοτελικές εσωτερικές περιοχές των υποδοχέων είναι αυτές που εμπλέκονται στην αναγνώριση των φαινολικών ενώσεων και άρα πιθανότατα και της υδροξυτυροσόλης και αυτές οι περιοχές παρουσιάζουν πολύ μικρότερο βαθμό συντήρησης από τις καρβοξυτελικές περιοχές. Συνεπώς η επιλογή εσωκυτταρικών αντί για διαμεμβρανικές και εξωκυτταρικές περιοχές για το σχεδιασμό primers και άρα η ενίσχυση αυτών των περιοχών ίσως να έδιναν πιο ξεκάθαρα αποτελέσματα όσον αφορά την έκφραση των 5 γονιδίων, μετά την έκθεση στην υδροξυτυρόσολη.

4.2 Στόχοι – μελλοντικές προσεγγίσεις

Η μελέτη των παραπάνω οσφρητικών υποδοχέων αποτελεί το έναυσμα προκειμένου να ξεκινήσει περαιτέρω έρευνα γύρω από τους οσφρητικούς υποδοχείς των εντόμων- παρασίτων. Η στόχευση σε αυτούς τους υποδοχείς με συγκεκριμένες οσμές μπορεί να αποβεί ευεργετική για τον έλεγχο του πληθυσμού τους, χωρίς να κινδυνεύουν να αφανιστούν, συμπαρασύροντας και άλλα είδη εντόμων σε μη ειδοειδικές βλαβερές μεθόδους αντιμετώπισης.

Συγκεκριμένα για το δάκο, πολύ σημαντικά βήματα θα αποτελέσουν:

1. Η μελέτη της απόκρισης όλων των οσφρητικών του υποδοχέων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις πτητικών, φαινολικών ενώσεων της ελιάς που θα συνδυαστεί και με μεγάλη δειγματοληψία ιστών και η κατασκευή του προφίλ έκφρασής τους.
2. Η πραγματοποίηση των πειραμάτων και σε άγριο πληθυσμό από την οποία θα εξαχθούν πιο ειδικά αποτελέσματα και ίσως διαφορετικά από τα αποτελέσματα του εργαστηριακού πληθυσμού, λόγω του διαφορετικού γενετικού προφίλ του άγριου πληθυσμού σε σχέση με τον εργαστηριακό.
3. Ο σχεδιασμός primers και σε εσωκυτταρικές περιοχές των οσφρητικών υποδοχέων, καθώς αυτές φαίνεται ότι αλληλεπιδρούν με τις φαινολικές ενώσεις.
4. Η RNAi σίγηση των γονιδίων των οσφρητικών υποδοχέων και η επανέκθεση σε κάθε πιθανή οσμή της ελιάς στην οποία πιθανότατα αποκρίνεται ο δάκος, προκειμένου να διαπιστωθεί αν μπορεί να εντοπίσει τις οσμές και κατά συνέπεια την ελιά μετά τη σίγηση των γονιδίων των οσφρητικών του υποδοχέων.

5. Η κατασκευή συνθετικών μορίων οσμών που θα έχουν τη δυνατότητα να προσδένονται ειδοειδικά και να ενεργοποιούν τους οσφρητικούς υποδοχείς, που αναγνωρίζουν και τις κοινές δομικά ενώσεις τις ελιάς

Αυτά τα συνθετικά μόρια θα μπορούσαν να βρίσκονται προσδεδεμένα είτε σε κάποια παγίδα, είτε να απελευθερώνονται στους ελαιώνες μέσω ειδικών sprays, ώστε ο δάκος να έλκεται ή να απωθείται από αυτά και όχι από τις ενώσεις της ώριμης, μεγάλης ελιάς που τον έλκουν και της άγουρης, μικρής ελιάς που τον απωθεί.

Η προσέγγιση αυτή ωστόσο δεν περιορίζεται μόνο στο δάκο, αλλά μπορεί να βρει εφαρμογή σε ένα ευρύ φάσμα εντόμων παρασίτων ή ακόμα και εντόμων υγειονομικής σημασίας. Γι' αυτό κρίνεται απαραίτητη η συνέχεια της έρευνας πάνω σε αυτό το πεδίο.

5.ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

ΠΙΝΑΚΑΣ 1:

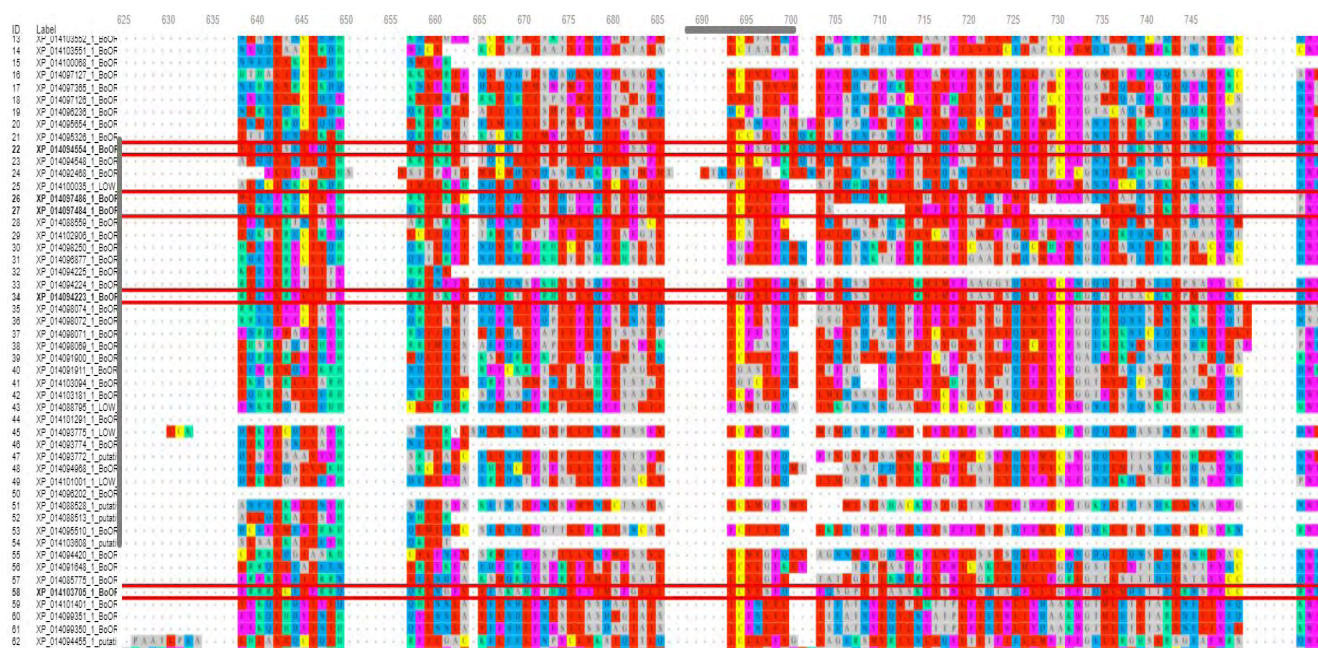
ΥΠΟΨΗΦΙΑ ΓΟΝΙΔΙΑ ΟΣΦΡΗΤΙΚΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ (Ors)	XM	XPs
1. PREDICTED: Bactrocera oleae odorant receptor 43b-like	XM_014246107.1	XP_014101582.1
2. PREDICTED: Bactrocera oleae odorant receptor 43b-like	XM_014246045.1	XP_014101520.1
3. PREDICTED: Bactrocera oleae odorant receptor 88a-like	XM_014245926.1	XP_014101401.1
4. PREDICTED: Bactrocera oleae odorant receptor 85c-like	XM_014245816.1	XP_014101291.1
5. PREDICTED: Bactrocera oleae gustatory and odorant receptor 21a-like	XM_014245747.1	XP_014101222.1
6. PREDICTED: Bactrocera oleae gustatory and odorant receptor 21a-like	XM_014245737.1	XP_014101212.1
7. PREDICTED: Bactrocera oleae gustatory and odorant receptor 21a-like	XM_014245698.1	XP_014101173.1
8. PREDICTED: Bactrocera oleae odorant receptor 67c-like	XM_014245526.1	XP_014101001.1
9. PREDICTED: Bactrocera oleae odorant receptor 43b-like	XM_014245487.1	XP_014100962.1
10. PREDICTED: Bactrocera oleae odorant receptor 7a-like	XM_014245409.1	XP_014100884.1
11. PREDICTED: Bactrocera oleae odorant receptor 7a-like	XM_014245408.1	XP_014100883.1
12. PREDICTED: Bactrocera oleae gustatory and odorant receptor 21a-like	XM_014245148.1	XP_014100623.1
13. PREDICTED: Bactrocera oleae odorant receptor 59a-like	XM_014244593.1	XP_014100068.1
14. PREDICTED: Bactrocera oleae odorant receptor 30a-like	XM_014244560.1	XP_014100035.1
15. PREDICTED: Bactrocera oleae odorant receptor 88a-like	XM_014243876.1	XP_014099351.1
16. PREDICTED: Bactrocera oleae odorant receptor 88a-like	XM_014243875.1	XP_014099350.1
17. PREDICTED: Bactrocera oleae odorant receptor 42b-like	XM_014243334.1	XP_014098809.1
18. PREDICTED: Bactrocera oleae odorant receptor 63a-like	XM_014242775.1	XP_014098250.1
19. PREDICTED: Bactrocera oleae odorant receptor 45a-like	XM_014242599.1	XP_014098074.1
20. PREDICTED: Bactrocera oleae odorant receptor 45a-like	XM_014242597.1	XP_014098072.1
21. PREDICTED: Bactrocera oleae odorant receptor 45a-like	XM_014242596.1	XP_014098071.1
22. PREDICTED: Bactrocera oleae odorant receptor 1a-like	XM_014242594.1	XP_014098069.1
23. PREDICTED: Bactrocera oleae odorant receptor 67d-like	XM_014242520.1	XP_014097995.1
24. PREDICTED: Bactrocera oleae gustatory and odorant receptor 21a	XM_014242324.1	XP_014097799.1
25. PREDICTED: Bactrocera oleae odorant receptor Or2-like	XM_014242011.1	XP_014097486.1
26. PREDICTED: Bactrocera oleae odorant receptor Or2-like	XM_014242009.1	XP_014097484.1
27. PREDICTED: Bactrocera oleae gustatory and odorant receptor 22-like	XM_014241851.1	XP_014097326.1
28. PREDICTED: Bactrocera oleae odorant receptor 33b-like	XM_014241652.1	XP_014097127.1
29. PREDICTED: Bactrocera oleae odorant receptor 33b-like	XM_014241651.1	XP_014097126.1
30. PREDICTED: Bactrocera oleae odorant receptor 63a-like	XM_014241402.1	XP_014096877.1
31. PREDICTED: Bactrocera oleae odorant receptor 67c-like	XM_014240727.1	XP_014096202.1
32. PREDICTED: Bactrocera oleae odorant receptor 7a-like	XM_014240408.1	XP_014095883.1
33. PREDICTED: Bactrocera oleae odorant receptor 46a, isoform A	XM_014240179.1	XP_014095654.1
34. PREDICTED: Bactrocera oleae odorant receptor 49a-like	XM_014240035.1	XP_014095510.1
35. PREDICTED: Bactrocera oleae odorant receptor 94a-like	XM_014239851.1	XP_014095326.1
36. PREDICTED: Bactrocera oleae odorant receptor 67c	XM_014239493.1	XP_014094968.1
37. PREDICTED: Bactrocera oleae odorant receptor 94a-like	XM_014239079.1	XP_014094554.1
38. PREDICTED: Bactrocera oleae odorant receptor 94a-like	XM_014239073.1	XP_014094548.1
39. PREDICTED: Bactrocera oleae putative odorant receptor 85e	XM_014238980.1	XP_014094455.1
40. PREDICTED: Bactrocera oleae odorant receptor 13a	XM_014238945.1	XP_014094420.1
41. PREDICTED: Bactrocera oleae odorant receptor 63a-like	XM_014238750.1	XP_014094225.1
42. PREDICTED: Bactrocera oleae odorant receptor 63a-like	XM_014238749.1	XP_014094224.1
43. PREDICTED: Bactrocera oleae odorant receptor 63a-like	XM_014238748.1	XP_014094223.1
44. PREDICTED: Bactrocera oleae odorant receptor 85c-like	XM_014238300.1	XP_014093775.1
45. PREDICTED: Bactrocera oleae odorant receptor 85c-like	XM_014238299.1	XP_014093774.1

46. PREDICTED: Bactrocera oleae putative odorant receptor 85d	XM_014238297.1	XP_014093772.1
47. PREDICTED: Bactrocera oleae odorant receptor 7a	XM_014237003.1	XP_014092478.1
48. PREDICTED: Bactrocera oleae odorant receptor 94a-like	XM_014236993.1	XP_014092468.1
49. PREDICTED: Bactrocera oleae odorant receptor coreceptor	XM_014236978.1	XP_014092453.1
50. PREDICTED: Bactrocera oleae odorant receptor 83a	XM_014236977.1	XP_014092452.1
51. PREDICTED: Bactrocera oleae odorant receptor 7a-like	XM_014236567.1	XP_014092042.1
52. PREDICTED: Bactrocera oleae odorant receptor 10a	XM_014236436.1	XP_014091911.1
53. PREDICTED: Bactrocera oleae odorant receptor 82a	XM_014236425.1	XP_014091900.1
54. PREDICTED: Bactrocera oleae odorant receptor 67d-like	XM_014236330.1	XP_014091805.1
55. PREDICTED: Bactrocera oleae odorant receptor 67d-like	XM_014236317.1	XP_014091792.1
56. PREDICTED: Bactrocera oleae odorant receptor 74a	XM_014236173.1	XP_014091648.1
57. PREDICTED: Bactrocera oleae odorant receptor 2a-like	XM_014233463.1	XP_014088938.1
58. PREDICTED: Bactrocera oleae odorant receptor 94b-like	XM_014233320.1	XP_014088795.1
59. PREDICTED: Bactrocera oleae odorant receptor 43a	XM_014233084.1	XP_014088559.1
60. PREDICTED: Bactrocera oleae putative odorant receptor 69a, isoform B	XM_014233053.1	XP_014088528.1
61. PREDICTED: Bactrocera oleae putative odorant receptor 69a, isoform A	XM_014233038.1	XP_014088513.1
62. PREDICTED: Bactrocera oleae odorant receptor 43b-like	XM_014230731.1	XP_014086206.1
63. PREDICTED: Bactrocera oleae odorant receptor 74a-like	XM_014230300.1	XP_014085775.1
64. PREDICTED: Bactrocera oleae odorant receptor 35a-like	XM_014248230.1	XP_014103705.1
65. PREDICTED: Bactrocera oleae putative odorant receptor 92a	XM_014248133.1	XP_014103608.1
66. PREDICTED: Bactrocera oleae odorant receptor 7a-like	XM_014248077.1	XP_014103552.1
67. PREDICTED: Bactrocera oleae odorant receptor 2a-like	XM_014248076.1	XP_014103551.1
68. PREDICTED: Bactrocera oleae odorant receptor 85a-like	XM_014248075.1	XP_014103550.1
69. PREDICTED: Bactrocera oleae odorant receptor 22c	XM_014247706.1	XP_014103181.1
70. PREDICTED: Bactrocera oleae odorant receptor 24a	XM_014247619.1	XP_014103094.1
71. PREDICTED: Bactrocera oleae gustatory and odorant receptor 63a	XM_014239629.1	XP_014095104.1
72. PREDICTED: Bactrocera oleae odorant receptor 49b-like	XM_014247431.1	XP_014102906.1
73. PREDICTED: Bactrocera oleae odorant receptor 47b	XM_014240565.1	XP_014096040.1
74. PREDICTED: Bactrocera oleae odorant receptor 59a-like	XM_014241890.1	XP_014097365.1
75. PREDICTED: Bactrocera oleae odorant receptor 59a-like	XM_014240761.1	XP_014096236.1

ΠΙΝΑΚΑΣ 2:

Query <i>B. oleae</i>	Name	<i>D. melanogaster</i> hit	<i>D. melanogaster</i> name	E-value
XP_014101222.1	PREDICTED: Bactrocera oleae gustatory and odorant receptor 21a-like	NP_523448.2	gustatory receptor 21a, isoform A (<i>D. melanogaster</i>)	2E-166
XP_014101212.1	PREDICTED: Bactrocera oleae gustatory and odorant receptor 21a-like	NP_523448.2	gustatory receptor 21a, isoform A (<i>D. melanogaster</i>)	0.0
XP_014101173.1	PREDICTED: Bactrocera oleae gustatory and odorant receptor 21a-like	NP_523448.2	gustatory receptor 21a, isoform A (<i>D. melanogaster</i>)	2E-152
XP_014100623.1	PREDICTED: Bactrocera oleae gustatory and odorant receptor 21a-like	NP_523448.2	gustatory receptor 21a, isoform A (<i>D. melanogaster</i>)	2E-87
XP_014097799.1	PREDICTED: Bactrocera oleae gustatory and odorant receptor 21a	AKI28980.1	gustatory receptor 21a (<i>Bactrocera dorsalis</i>)	0.0
XP_014097326.1	PREDICTED: Bactrocera oleae gustatory and odorant receptor 22-like	AID61262.1	gustatory receptor (<i>Calliphora stygia</i>)	2E-43
XP_014095104.1	PREDICTED: Bactrocera oleae gustatory and odorant receptor 63a	AKI28983.1	gustatory receptor 63a (<i>Bactrocera dorsalis</i>)	0.0

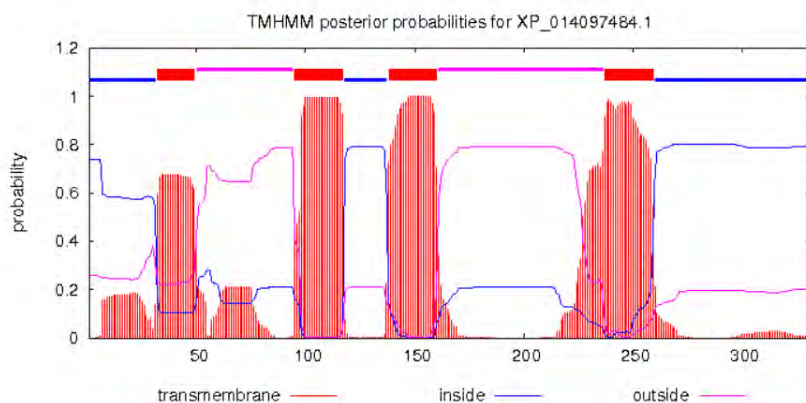
ΠΙΝΑΚΑΣ 3:



ΠΙΝΑΚΑΣ 4:

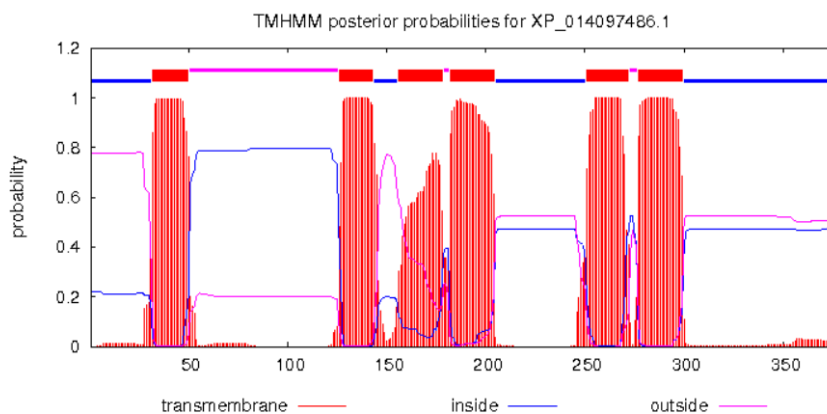
Or2:

```
# XP_014097484.1 Length: 331
# XP_014097484.1 Number of predicted TMs: 4
# XP_014097484.1 Exp number of AAs in TMs: 95.78859
# XP_014097484.1 Exp number, first 60 AAs: 17.29193
# XP_014097484.1 Total prob of N-in: 0.74061
# XP_014097484.1 POSSIBLE N-term signal sequence
XP_014097484.1 TMHMM2.0 inside 1 31
XP_014097484.1 TMHMM2.0 TMhelix 32 49
XP_014097484.1 TMHMM2.0 outside 50 94
XP_014097484.1 TMHMM2.0 TMhelix 95 117
XP_014097484.1 TMHMM2.0 inside 118 137
XP_014097484.1 TMHMM2.0 TMhelix 138 160
XP_014097484.1 TMHMM2.0 outside 161 236
XP_014097484.1 TMHMM2.0 TMhelix 237 259
XP_014097484.1 TMHMM2.0 inside 260 331
```



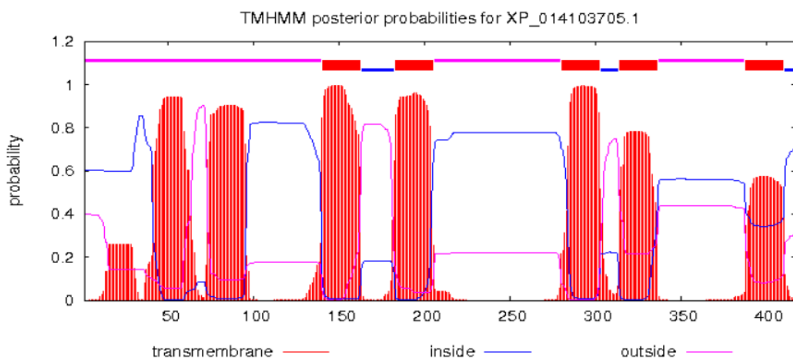
Or2ii:

```
# XP_014097486.1 Length: 375
# XP_014097486.1 Number of predicted TMs: 6
# XP_014097486.1 Exp number of AAs in TMs: 120.99335
# XP_014097486.1 Exp number, first 60 AAs: 20.02789
# XP_014097486.1 Total prob of N-in: 0.22146
# XP_014097486.1 POSSIBLE N-term signal sequence
XP_014097486.1 TMHMM2.0 inside 1 31
XP_014097486.1 TMHMM2.0 TMhelix 32 50
XP_014097486.1 TMHMM2.0 outside 51 125
XP_014097486.1 TMHMM2.0 TMhelix 126 143
XP_014097486.1 TMHMM2.0 inside 144 155
XP_014097486.1 TMHMM2.0 TMhelix 156 178
XP_014097486.1 TMHMM2.0 outside 179 181
XP_014097486.1 TMHMM2.0 TMhelix 182 204
XP_014097486.1 TMHMM2.0 inside 205 250
XP_014097486.1 TMHMM2.0 TMhelix 251 272
XP_014097486.1 TMHMM2.0 outside 273 276
XP_014097486.1 TMHMM2.0 TMhelix 277 299
XP_014097486.1 TMHMM2.0 inside 300 375
```



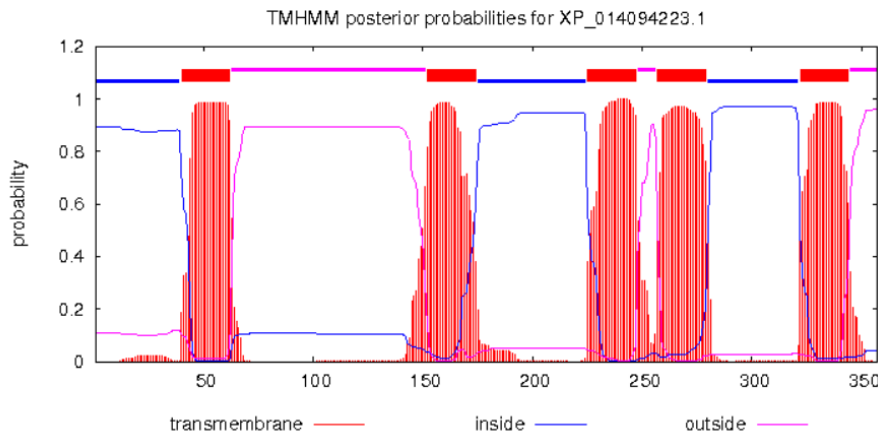
Or35:

```
# XP_014103705.1 Length: 417
# XP_014103705.1 Number of predicted TMs: 5
# XP_014103705.1 Exp number of AAs in TMs: 139.85793
# XP_014103705.1 Exp number, first 60 AAs: 22.73742
# XP_014103705.1 Total prob of N-in: 0.60219
# XP_014103705.1 POSSIBLE N-term signal sequence
XP_014103705.1 TMHMM2.0 outside 1 139
XP_014103705.1 TMHMM2.0 TMhelix 140 162
XP_014103705.1 TMHMM2.0 inside 163 182
XP_014103705.1 TMHMM2.0 TMhelix 183 205
XP_014103705.1 TMHMM2.0 outside 206 279
XP_014103705.1 TMHMM2.0 TMhelix 280 302
XP_014103705.1 TMHMM2.0 inside 303 313
XP_014103705.1 TMHMM2.0 TMhelix 314 336
XP_014103705.1 TMHMM2.0 outside 337 387
XP_014103705.1 TMHMM2.0 TMhelix 388 410
XP_014103705.1 TMHMM2.0 inside 411 417
```



Or63ii:

```
# XP_014094223.1 Length: 357
# XP_014094223.1 Number of predicted TMs: 5
# XP_014094223.1 Exp number of AAs in TMs: 110.14377
# XP_014094223.1 Exp number, first 60 AAs: 18.23086
# XP_014094223.1 Total prob of N-in: 0.89310
# XP_014094223.1 POSSIBLE N-term signal sequence
XP_014094223.1 TMHMM2.0 inside 1 39
XP_014094223.1 TMHMM2.0 TMhelix 40 62
XP_014094223.1 TMHMM2.0 outside 63 151
XP_014094223.1 TMHMM2.0 TMhelix 152 174
XP_014094223.1 TMHMM2.0 inside 175 224
XP_014094223.1 TMHMM2.0 TMhelix 225 247
XP_014094223.1 TMHMM2.0 outside 248 256
XP_014094223.1 TMHMM2.0 TMhelix 257 279
XP_014094223.1 TMHMM2.0 inside 280 321
XP_014094223.1 TMHMM2.0 TMhelix 322 344
XP_014094223.1 TMHMM2.0 outside 345 357
```

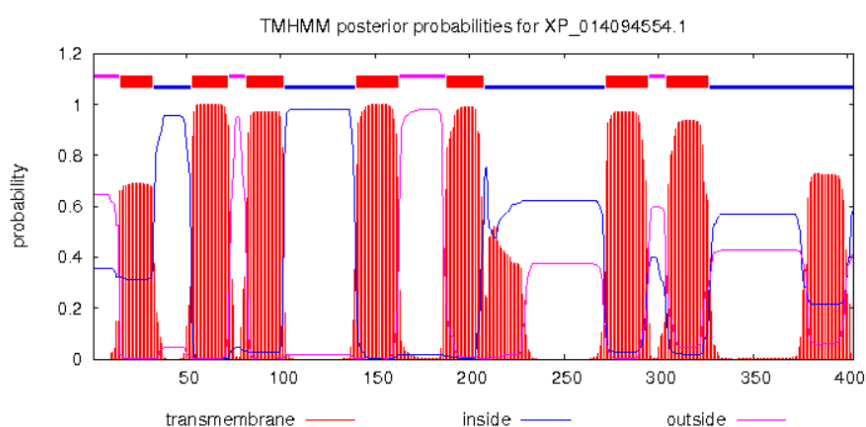


Or94ii:

```

# XP_014094554.1 Length: 403
# XP_014094554.1 Number of predicted TMHs: 7
# XP_014094554.1 Exp number of AAs in TMHs: 164.80468
# XP_014094554.1 Exp number, first 60 AAs: 22.01412
# XP_014094554.1 Total prob of N-in: 0.35555
# XP_014094554.1 POSSIBLE N-term signal sequence
XP_014094554.1 TMHMM2.0 outside 1 14
XP_014094554.1 TMHMM2.0 TMhelix 15 32
XP_014094554.1 TMHMM2.0 inside 33 52
XP_014094554.1 TMHMM2.0 TMhelix 53 72
XP_014094554.1 TMHMM2.0 outside 73 81
XP_014094554.1 TMHMM2.0 TMhelix 82 101
XP_014094554.1 TMHMM2.0 inside 102 139
XP_014094554.1 TMHMM2.0 TMhelix 140 162
XP_014094554.1 TMHMM2.0 outside 163 187
XP_014094554.1 TMHMM2.0 TMhelix 188 207
XP_014094554.1 TMHMM2.0 inside 208 271
XP_014094554.1 TMHMM2.0 TMhelix 272 294
XP_014094554.1 TMHMM2.0 outside 295 303
XP_014094554.1 TMHMM2.0 TMhelix 304 326
XP_014094554.1 TMHMM2.0 inside 327 403

```



ΠΙΝΑΚΑΣ 5:

XP	XM	Name	Forward Primer	Reverse Primer
XP_014097484	XM_014242009	Or2	GACATTGGTGAGACGGGCTT	CCGATGCGTGCACTTCT
XP_014097486	XM_014242011	Or2ii	CATTGGCGAGACGAGTATGAA	CACTGCTCGATGCTTTGAAATAA
XP_014103705	XM_014248230	Or35	CGAGACACCTTGACGAATCA	GACGACGAAGCCATTCAAAC
XP_014094223	XM_014238748	Or63ii	CCTCCTCGATCAGGCTTTAACA	CTTGCTTCAACTGCCGATTATT
XP_014094554	XM_014239079	Or94ii	ACCAACTGATGTCTATGTCTTACC	GCATGTCAGCAATATGCCAAG

6.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Alphey, L. & Andreasen, M. (2002): Dominant lethality and insect population control, *Molecular and Biochemical Parasitology* 121: p. 173-8
- Alphey, L., Beard, B., Billingsley, P. & Coetzee, M. et al. (2002) Malaria control with genetically modified vectors., *Science* 298
- Alphey, L., Beard, C. Ben., Billingsley, P., Coetzee, M., Crisanti, A., Curtis, C., Eggleston, P., Godfray, C., Hemingway, J., Jacobs-Lorena, M., James, AA., Kafatos, FC., Mukwaya, LG., Paton, M., Powell, JR., Schneider, W., Scott, TW., Sina, B., Sinden, R., Sinkins, S., Spielman, A., Touré, Y. & Collins, FH. (2002) Malaria control with genetically manipulated insect vectors, *Science* 298: p. 119-21
- Altschul, SF., Gish, W., Miller, W., Myers, EW. & Lipman, DJ. (1990) Basic local alignment search tool, *Journal of Molecular Biology* 215(3), p: 403-10
- Amiot, M.J., Fleuriet, A. & Macheix, J. (1986) Importance and evolution of phenolic compounds in olive during growth and maturation, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 34, p: 823–826
- Amiot, M.J., Fleuriet, A. & Macheix, J.J. (1989) Accumulation of oleuropein derivatives during olive maturation, *Phytochemistry* 28, p: 67–69
- Angeli, S., Ceron, F., Scaloni, A., Monti, M., Monteforti, G., Minnocci, A., Petacchi, R. & Pelosi, P. (1999) Purification, structural characterization, cloning and immunocytochemical localization of chemoreception proteins from *Schistocerca gregaria*, *European Journal of Biochemistry* 262, p: 745–754
- Angerosa, F., Di Giacinto, L. & Solinas, M. (1992) Influence of *Dacus oleae* infestation on flavor of oils, extracted from attacked olive fruits, by HPLC and HRGC analyses of volatile compounds, *Grasas Aceites* 43, p. 134–142
- Ant, T., Koukidou, M., Rempoulakis, P., Gong, HF., Economopoulos, A., Vontas, J. & Alphey, L. (2012) Control of the olive fruit fly using genetics-enhanced sterile insect technique, *BMC Biology* 10, p: 1-8
- Benavente –Garcia, O., Castillo, J., Lorente, J., Ortuna, A., Del Rio J.A.(2000) Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves. *Food Chemistry*, 68, p: 457-462
- Bendini, A., Cerretani, L., Cichelli, A. & Lercker, G. (2008) Effect of *Bactrocera oleae* infestation on the aromatic profile of virgin olive oils, *RISG Rivista Italiana Sostanze Grasse* 85, p. 167–177
- Benton, R., Sachse, S., Michnick, S.W. & Vosshall L.B. (2006) Atypical membrane topology and heteromeric function of *Drosophila* odorant receptors in vivo, *PLoS Biology*
- Benton, R., Vannice, K. S. & Vosshall, L. B. (2007) An essential role for a CD36-related receptor in pheromone detection in *Drosophila*, *Nature* 450, p: 289–293
- Benton, R., Vannice, K. S., Gomez-Diaz, C. & Vosshall L. B. (2009) Variant ionotropic glutamate receptors as chemosensory receptors in *Drosophila*, *Cell* 136(1), p: 149–162
- Ben-Yosef, M., Aharon, Y., Jurkevitch, E. & Yuval, B. (2010) Give us the tools and we will do the job: symbiotic bacteria affect olive fly fitness in a diet-dependent fashion, *Proceedings. Biological Sciences* 277: p. 1545-52.
- Bianchi, G. (2003) Lipids and phenols in table olives, *European Journal of Lipid Science and Technology* 105, p: 229–242
- Bianco, A., Coccioli, F., Guiso, M. & Marra, C. (2001) The occurrence in olive oil of a new class of phenolic compounds: Hydroxy- isochromans, *Food Chemistry* 77, p: 405–411
- Bliedkas, G., Vassilkis, C., Tisimidou, M. & Boskou, D. (2002) Biophenols in table olives, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, p: 3688-3692
- Boskou, D. (1996) History and characteristics of the olive tree, *American Oil Chemists Society Press*
- Boskou, D. (2000) Olive oil in Mediterranean Diets, *World Review of Nutrition and Dietetics Home* 87, p: 56–77

- Boskou, D., Blekas, G. & Tsimidou, M. (2005) Phenolic compounds in olive oil and olives, *Current Topics in Nutraceutical Research* 3, p: 125–136
- Buck, L. & Axel, R. (1991) A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition, *Cell* 65, p: 175–187
- Bueno, A. M. & Jones, O. (2002) Alternative methods for controlling the olive fly, *Bactrocera oleae*, involving semiochemicals, Use of pheromones and other semiochemicals in integrated production IOBC wprs Bulletin 25
- Byron, M. A. & Gillett-Kaufman, J. L. (1999) Olive Fruit Fly *Bactrocera oleae* (Rossi) (Insecta: Diptera: Tephritidae), Entomology and Nematology Department, UF/IFAS Extension
- Cande, J., Prud'homme, B. & Gompel, N. (2013) Smells like evolution: the role of chemoreceptor evolution in behavioral change, *Current Opinion in Neurobiology* 23, p: 152–158
- Capuzzo, C., Firrao, G., Mazzon, L., Squartini, A. & Girolami, V. (2005) “*Candidatus Erwinia dacicola*”, a coevolved symbiotic bacterium of the olive fly *Bactrocera oleae* (Gmelin), *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2005, 55(Pt 4): p. 1641-7
- 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), p: 327-38
- Couto, A., Alenius, M. & Dickson, B.J. (2005) Molecular, anatomical and functional organization of the *Drosophila* olfactory system, *Current Biology* 15 (17): p. 1535-1547
- Covas, M.I., Nyyssonen, K. & Poulsen, H.E. (2006) The effect of polyphenols in olive oil on heart disease risk factors, *Annals of Internal Medicine* 145, p: 333–431
- Croset, V., Rytz, R., Cummins, S.F., Budd, A., Brawand, D., Kaessmann, H. et al. (2010) Ancient protostome origin of chemosensory ionotropic glutamate receptors and the evolution of insect taste and olfaction, *PLoS Genetics* 6:e1001064
- Daane, K.M. & Johnson, M.W. (2010) Olive fruit fly: managing an ancient pest in modern times, *Annual Review of Entomology* 55: p. 151-69
- Dickens, J.C., Hart, W.G., Light, D.M., Jang, E.B. (1988) Tephritid olfaction: morphology of the antennae of four tropical species of economic importance (Diptera: Tephritidae), *Annals of the Entomological Society of America* 81, p: 325–331
- Dobritsa, A.A., van der Goes, van Naters, W., Warr, C.G., Steinbrecht, R.A. & Carlson J.R. (2003) Integrating the molecular and cellular basis of odor coding in the *Drosophila* antenna, *Neuron* 37, p: 827–4
- Economopoulos, A. & Loukas, M. (1986) ADH allele frequency changes in olive fruit flies shift from olives to artificial larval food and vice versa, effect of temperature, *Entomologia Experimentalis et Applicata*, p. 215-221
- Economopoulos, A. (1972) Sexual competitiveness of gamma-ray sterilized males of *Dacus oleae*. Mating frequency of artificially reared and wild females, *Environmental Entomology*, p: 490-497
- Economopoulos, A.P. (1979) Attraction of *Dacus oleae* (Gmelin) (Diptera Tephritidae) to odour and colour traps, *Zeitschrift fur Angewandte Entomologie* 88, p: 90-97
- Economopoulos, A.P. (1980) Application of colour traps for *Dacus oleae* control; olive groves with different degrees of isolation, tree size and canopy density, In: *Integrated Control in Agriculture and Forestry*, Russ, K. and Berger, H. (Eds) *Proceedings of an IOBC/WPRS International Symposium*, Vienna, 8-12 October, 1979, p: 552-559

- Estes, AM., Hearn, DJ., Bronstein, JL. & Pierson, EA. (2009), The olive fly endosymbiont, “*Candidatus Erwinia dacicola*,” switches from an intracellular existence to an extracellular existence during host insect development, *Applied and Environmental Microbiology* 75: p. 7097-106
- Esti, M., Cinquanta, L. & La Notte, E. (1998) Phenolic compounds in different olive varieties, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46, p: 32–35
- Fishilevich, E. & Vosshall, L.B. (2005) Genetic and functional subdivision of the *Drosophila* antennal lobe, *Current Biology* 15, p: 1548–53
- Fishilevich, E., Domingos, A.I., Asahina, K., Naef, F., Vosshall, L.B. & Louis, M. (2005), Chemotaxis behavior mediated by single larval olfactory neurons in *Drosophila*, *Current Biology* 15, p: 2086–2096
- Foret, S. & Maleszka, R. (2006) Function and evolution of a gene family encoding odorant binding-like proteins in a social insect, the honey bee (*Apis mellifera*), *Genome Research* 16, p: 1404–1413
- Forstner, M., Gohl, T., Gondesén, I., Raming, K., Breer, H. & Krieger, J. (2008) Differential expression of SNMP-1 and SNMP-2 proteins in pheromone-sensitive hairs of moths, *Chemical Senses* 33, p: 291–299
- Gao, Q. & Chess, A. (1999) Identification of candidate *Drosophila* olfactory receptors from genomic DNA sequence, *Genomics* 60, p: 31–39
- Gao, Q., Yuan, B. & Chess, A. (2000) Convergent projections of *Drosophila* olfactory neurons to specific glomeruli in the antennal lobe, *Nature Neuroscience* 3(8), p: 780-785
- Gardiner, A., Barker, D., Butlin, R.K., Jordan, W.C. & Ritchie, M.G. (2008) *Drosophila* chemoreceptor gene evolution: selection, specialization and genome size, *Molecular Ecology* 17, p: 1648–1657
- Ghanbari, R., Anwar, F., Alkharfy, K. M., Gilani AH. & Saari, N. (2012) Valuable Nutrients and Functional Bioactives in Different Parts of Olive (*Olea europaea* L.)—A Review, *International Journal of Molecular Sciences* 13, p: 3291-3340
- Gong, P., Epton, MJ., Fu, G., Scaife, S., Hiscox, A., Condon, KC., Condon, GC., Morrison, NI., Kelly, DW., Dafa’alla, T., Coleman, PG. & Alpey, L. (2005) A dominant lethal genetic system for autocidal control of the Mediterranean fruitfly, *Nature Biotechnology* 23: p. 453-6.
- Goulding, S. E., Zur Lage, P., Jarman, A. P. (2000) *amos*, a Proneural Gene for *Drosophila* Olfactory Sense Organs that Is Regulated by *lozenge*, *Neuron* 25, p: 69-78
- Hallem, EA., Ho, MG. & Carlson, JR. (2004) The molecular basis of odor coding in the *Drosophila* antenna, *Cell* 117, p:965–979
- Hansson, B. S. & Stensmyr, M. C. (2011) Evolution of Insect Olfaction, *Neuron* 72
- Heinrich, JC. & Scott, MJ. (2000) A repressible female-specific lethal genetic system for making transgenic insect strains suitable for a sterile-release program, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 97: p. 8229-32
- Hildebrand, J. G. & Shepherd, G. M. (1997) Mechanisms of olfactory discrimination: Converging evidence for common principles across phyla, *Annual Review of Neuroscience* 20, p: 595–631
- 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, p: 10996–11001
- Kain, P., Chakraborty, T. S., Sundaram, S., Siddiqi, O., Rodrigues, V. & Hasan, G. (2008) Reduced odor responses from antennal neurons of G(q)alpha, phospholipase Cbeta, and *rdgA* mutants in *Drosophila* support a role for a phospholipid intermediate in insect olfactory transduction, *Journal of Neuroscience* 28, p: 4745 -4755
- Katoh, K. & Standley, D. M. (2013) MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability, *Molecular Biology and Evolution* 30(4), p: 772–780

- Knipling, E. (1955) Possibilities of insect control or eradication through the use of sexually sterile males, *Journal of Economic Entomology*, p. 459-462
- Koprivnjak, O., Dminic, I., Kosic, U. & Majetic, V. et al. (2010) Dynamics of oil quality parameters changes related to olive fruit attack, *European Journal of Lipid Science and Technology* 112, p. 1033–1040
- Kounatidis, I., Crotti, E., Sapountzis, P., Sacchi, L., Rizzi, A., Chouaia, B., Bandi, C., Alma, A., Daffonchio, D., Mavragani-Tsipidou, P. & Bourtzis, K. (2009) *Acetobacter tropicalis* is a major symbiont of the olive fruit fly (*Bactrocera oleae*), *Applied and Environmental Microbiology* 2009 75: p. 3281-8
- Kountouri, A.M., Mylona, A., Kaliora, A.C. & Andrikopoulos, N.K. (2007) Bioavailability of the phenolic compounds of the fruits (drupes) of *Olea europaea* (olives): Impact on plasma antioxidant status in humans, *Phytomedicine* 14, p: 659–667
- Kramer, JA. (2001) Omiga: a PC-based sequence analysis tool, *Molecular Biotechnology* 19(1), p: 97-106
- Kreher, SA., Kwon, JY., Carlson, JR. (2005) The molecular basis of odor coding in the *Drosophila* larva, *Neuron* 46, p: 445-456
- 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, Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology* 189, p: 519–526
- Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G. & Sonnhammer, EL. (2001) Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes, *Journal of Molecular Biology* 305(3), p: 567-80
- Kumar, S., Tamura K. & Nei, M. (1994) MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software for microcomputers, *Bioinformatics* 10, p: 189–191
- Kyriakidis, N. B. & Dourou, E. F. I. (2002) Effect of storage and *Dacus* infection of olive fruits on the quality of the produced virgin olive oil, *Journal of Food Lipids* 9 ,p.47 –55
- Laissue, P. P. & Vosshall, L. B. (2008) The Olfactory Sensory Map in *Drosophila*, *Brain Development in Drosophila melanogaster*
- Larsson, MC., Domingos, AI., Jones, WD., Chiappe, ME., Amrein, H. & Vosshall, LB. (2004) Or83b encodes a broadly expressed odorant receptor essential for *Drosophila* olfaction, *Neuron* 43, p:703–714
- Laughlin, JD., Ha, TS., Jones, DN. & Smith, DP. (2008) Activation of pheromone-sensitive neurons is mediated by conformational activation of pheromone-binding protein, *Cell* 133, p: 1255–1265
- Le Tutour, B. & Guedon, D. (1992) Antioxidant activities of *Olea europaea* leaves and related phenolic compounds, *Phytochemistry* 31, p: 1173–1178
- Lewis, SE., Searle, SMJ., Harris, N., Gibson, M., Iyer, V., Richter, J., Wiel, C., Bayraktaroglu, L., et al. (2002), Apollo: a sequence annotation editor, *Genome Biology*
- Li, X.C., Schuler, M.A. & Berenbaum, M.R. (2007) Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics, *Annual Review of Entomology* 52, p: 231-253
- Liscia, A., Angioni, P., Sacchetti, P., Poddighe, S., Granchietti, A., Setzu, M. D. & Belcari, A. (2013) Characterization of olfactory sensilla of the olive fly: Behavioral and electrophysiological responses to volatile organic compounds from the host plant and bacterial filtrate, *Journal of Insect Physiology* 59, p: 705–716
- Loukas, M., Economopoulos, AP., Zouros, E. & Vergini, Y.(1985) Genetic changes in artificially reared colonies of the olive fruit fly, *Entomological Society of America*, p: 159-165

- Lundin, C., Kall, L., Kreher, S. A., Kapp, K., Sonnhammer, E. L., Carlson, J. R., Heijne, G. & Nilsson, I. (2007), Membrane topology of the *Drosophila* OR83b odorant receptor, *FEBS Letters* 581, p: 5601 - 5604
- Mayer, M. (2006) Glutamate receptors at atomic resolution, *Nature* 440, p: 456–462
- Mayo, I., Anderson, M., Burguete, J. & Robles Chillida, E.M. (1987) Structure of superficial chemoreceptive sensilla on the third antennal segment of *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae), *International Journal of Insect Morphology and Embryology* 16, p: 131–141
- 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, p: 397–405
- McBride, C.S., Arguello, J.R. & O’Meara, B.C. (2007) Five *Drosophila* genomes reveal non neutral evolution and the signature of host specialization in the chemoreceptor superfamily, *Genetics* 177, p: 1395–1416
- McKenna, M. P., Hekmat-Safe, D. S., Gaines, P. & Carlson, J. R. (1994) Putative *Drosophila* pheromone-binding proteins expressed in a subregion of the olfactory system, *Journal of Biological Chemistry* 269, p: 16340–16347
- Missbach, C., Dweck, H. KM., Vogel, H., Vilcinskas, A., Stensmyr, M. C., Hansson, B. S. & Grosse-Wilde, E. (2014) Evolution of insect olfactory receptors, *eLife*
- Mombaerts, P., Wang, F., Dulac, C. et al. (1996) Visualizing an olfactory sensory map, *Cell* 87(4), p: 675-686
- Montedoro, G.F. (1972) Phenolic constituents of virgin olive oils. I. Identification of some phenolic acids and their antioxidant capacity, *Food Science and Technology* 3, p: 177–186
- Naczki, M. & Shahidib, F. (2004) Extraction and analysis of phenolics in food, *Journal of Chromatography A* 1054, p: 95–111
- Nakagawa, T., Sakurai, T., Nishioka, T. & Touhara, K. (2005) Insect sex-pheromone signals mediated by specific combinations of olfactory receptors, *Science* 307, p: 1638–1642
- Nardi, F., Carapelli, A., Dallai, R. & Frati, F. (2003) The mitochondrial genome of the olive fly *Bactrocera oleae*: two haplotypes from distant geographical locations, *Insect Molecular Biology* 12, p: 605-611
- Nardi, F., Carapelli, A., Dallai, R., Roderick, G. K. & Frati, F. (2005) Population structure and colonization history of the olive fly, *Bactrocera oleae* (Diptera, Tephritidae), *Molecular Ecology* 14, p: 2729–2738
- Nei, M., Niimura, Y. & Nozawa, M. (2008) The evolution of animal chemosensory receptor gene repertoires : roles of chance and necessity, *Nature Reviews Genetics* 9, p: 951–963
- Niaounakis, M. & Halvadakis, C.P. (2006) Characterization of Olive Processing Waste, In *Waste Management Series*, 2nd ed., Elsevier Volume 5, Chapter 2, p: 23–64
- Nichols, Z. & Vogt, R.G. (2008) The SNMP/CD36 gene family in Diptera, Hymenoptera and Coleoptera: *Drosophila melanogaster*, *D. pseudoobscura*, *Anopheles gambiae*, *Aedes aegypti*, *Apis mellifera*, and *Tribolium castaneum* , *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 38, p: 398–415
- Owczarzy, R., Tataurov, A.V., Wu, Y., Manthey, J.A., McQuisten, K. A., Almabrazi, H. G., et al. (2008) IDT SciTools: a suite for analysis and design of nucleic acid oligomers, *Nucleic Acids Research*
- Papanicolaou, A., Schetelig, M. F., Arensburger, P., Atkinson, P. W., Benoit, J. B., Bourtzis, K., et al. (2016) The whole genome sequence of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Wiedemann), reveals insights into the biology and adaptive evolution of a highly invasive pest species, *Genome Biology* 17, p: 192

- Pellegrino, M., Steinbach, N., Stensmyr, M.C., Hansson, B.S. & Vosshall, L.B. (2011) A natural polymorphism alters odour and DEET sensitivity in an insect odorant receptor, *Nature* 478, p: 511–514
- Pelosi, P., Iovinella, I., Zhu, J., Wang, G. & Dani, F. R. (2017) Beyond chemoreception: diverse tasks of soluble olfactory proteins in insects, *Biological Reviews* Volume 93, p: 184–200
- Pelosi, P., Zhou, J. J., Ban, L. P. & Calvello, M. (2006) Soluble proteins in insect chemical communication, *Cellular and Molecular Life Sciences* 63, p: 1658–1676
- Pikielny, C. W., Hasan, G., Rouyer, F. & Rosbash, H. (1994) Members of a family of *Drosophila* putative odorant-binding proteins are expressed in different subsets of olfactory hairs, *Neuron* 12, p: 35–49
- Pimentel, D. (1995) Amounts of pesticides reaching target pests: Environmental impacts and ethics, *Journal of Agricultural and Environmental Ethics* 8: p. 17–29
- Pinelli, P., Romani, A., Vincieri, FF., Mullinacci, N. & Cimato, A. (1999) Polyphenolic content in five tuscany cultivars of *Olea europaea*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47, p: 964–967
- Pitts, R.J., Fox, AN. & Zwiebel, L.J. (2004) A highly conserved candidate chemoreceptor expressed in both olfactory and gustatory tissues in the malaria vector *Anopheles gambiae*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, p: 5058–5063
- Pooley, R.J. & Peterson, LR. (1997) Mechanisms of microbial susceptibility and resistance to antimicrobial agents, In *The Biologic and Clinical Basis of Infectious Diseases*, p. 550
- *Progress in Molecular Biology and Translational Science* (2015), edited by Claude Bouchard, vol. 135
- Ramdya, P. & Benton, R. (2010) Evolving olfactory systems on the fly, *Trends in Genetics* 26, p: 307–316
- Rao, M. R., Singh, M. P. & Day, R. (2000) Insect pest problems in tropical agroforestry systems: Contributory factors and strategies for management, *Agroforestry Systems* 50: p. 243–277
- Ray, A., Van der Goes, Van Naters W., and Carlson J. R. (2014) Molecular determinants of odorant receptor function in insects, *Journal of Biosciences* 39(4), p: 555–563
- Ressler, KJ., Sullivan, SL. & Buck, LB. (1994) Information coding in the olfactory system: evidence for a stereotyped and highly organized epitope map in the olfactory bulb, *Cell* 79(7), p: 1245–1255
- Rice R.E. (2000). *Bionomics of the Olive Fruit Fly Bactrocera (Dacus) oleae*, U.C. Kearney Agricultural Center, KAC Plant Protection Quarterly
- Robertson, HM., Warr, CG. & Carlson, JR. (2003) Molecular evolution of the insect chemoreceptor gene superfamily in *Drosophila melanogaster*, *Proceedings of the National Academy of Sciences* Suppl 2, p: 14537–14542
- 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, *The Journal of Biological Chemistry* 272, p: 14792–14799
- Rogers, M., Krieger J. & Vogt, R. (2001) Antennal SNMPs (sensory neuron membrane proteins) of *Lepidoptera* define a unique family of invertebrate CD36-like proteins, *Journal of Neurobiology* 49, p: 47–61
- Rojnic, I.D., Bazok, R. & Barcic, J. I. (2014) *European Journal of Lipid Science and Technology* 116
- Rollmann, S.M., Wang, P., Date, P., West, S.A., Mackay, T.F.C. & Anholt, R.R.H. (2010) Odorant receptor polymorphisms and natural variation in olfactory behavior in *Drosophila melanogaster*, *Genetics* 186, p: 687–697

- Rotundo, G., Germinara, G.S. & De Cristofaro, A. (2001) Identificazione di composti volatili in estratti da diverse cultivar di *Olea europea* L. biologicamente attivi su *Bactrocera oleae* (Gmelin) (Diptera: Tephritidae), *Bollettino Laboratorio Entomologia agraria Filippo Silvestri* 57, p: 25–34
- Ryan, D., Robards, K. & Lavee, S. (1999) Changes in phenolic content of olive during maturation, *Journal of Food Science and Technology* 34, p: 265–274
- Sacchetti, P., Granchietti, A., Landini, S., Viti, C., Giovannetti, L. & Belcari, A (2008) Relationships between the olive fly and bacteria, *Journal of Applied Entomology*, 132: p. 682-689
- Sacchetti, P., Landini, S., Granchietti, A., Camera, A., Rosi, M.C. & Belcari, A. (2007) Attractiveness to the olive fly of *Pseudomonas putida* isolated from the foregut of *Bactrocera oleae*, *IOBC/WPRS Bulletin* 30, p: 37–42
- Sagri, E., Reczko, M., Tsoumani, K. T., Gregoriou, ME., Harokopos, V., Mavridou, AM., Tastsoglou, S., Athanasiadis, K., Ragoussis, J. & Mathiopoulos K. D. (2014) The molecular biology of the olive fly comes of age, *BMC Genetics*, 15
- Sagri, E., Koskinioti, P., Gregoriou, ME., Tsoumani, K. T., Bassiakos, Y. C. & Mathiopoulos K. D. (2017) Housekeeping in Tephritid insects: the best gene choice for expression analyses in the medfly and the olive fly, *Scientific Reports* 7:45634
- Sánchez-Gracia, A., Vieira, F.G. & Rozas, J. (2009) Molecular evolution of the major chemosensory gene families in insects, *Heredity* 103, p: 208–216
- Sargsyan, V., Getahun, M. N., Lavista Llanos, S., Olsson, S. B., Hansson, B. S. & Wicher, D. (2011) Phosphorylation via PKC regulates the function of the *Drosophila* odorant coreceptor, *Frontiers in Cellular Neuroscience* 5
- Sato, K., Pellegrino, M., Nakagawa, T., Vosshall, LB. & Touhara, K. (2008) Insect olfactory receptors are heteromeric ligand-gated ion channels, *Nature* 452, p: 1002–1006
- Scarpati, M.L., Lo Scalzo, R. & Vita, G. (1993) *Olea europaea* volatiles attractive and repellent to the olive fruit fly (*Dacus oleae*, Gmelin), *Journal of Chemical Ecology* 19, p: 881–891
- Scott, J. G., Warren, W. C., Beukeboom, L. W., Bopp, D., Clark, A. G., Giers, S. D., Hediger M., et al. (2014) Genome of the house fly, *Musca domestica* L., a global vector of diseases with adaptations to a septic environment 15, p: 466
- Scott, K., Brady, R., Cravchik, A., Morozov, P., Rzhetsky, A., Zuker, C. & Axel, R. (2001) A chemosensory gene family encoding candidate gustatory and olfactory receptors in *Drosophila*, *Cell* 104(5), p: 661-73
- Semaniuk, U. (2015) Olfactory System in *Drosophila*, *Journal of Vasyl Stefanyk Precarpathian National University* Vol. 2, No. 1, p: 85-92
- Seprox- Biotech (Spanish Biotech Company)
- Shanbhag, SR., Mueller, B., Steinbrecht, RA. (1999) Atlas of olfactory organs of *Drosophila melanogaster*. 1. Types, external organization, innervation and distribution of olfactory sensilla, *International Journal of Insect Morphology and Embryology* 28(4), p:377-397
- Smadja, C., Shi, P., Butlin, RK. & Robertson, HM. (2009) Large gene family expansions and adaptive evolution for odorant and gustatory receptors in the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*, *Molecular Biology and Evolution* 26, p: 2073–2086
- Stensmyr, M. C., Dekker T. & Hansson B. S. (2003) Evolution of the olfactory code in the *Drosophila melanogaster* subgroup, *The Royal Society* 270, p: 2333–2340
- Stocker, RF. (1994) The organization of the chemosensory system in *Drosophila melanogaster*: a review, *Cell and Tissue Research* 275(1), p: 3-26

- Strausfeld, NJ. & Hildebrand, JG. (1999) Olfactory systems: common design, uncommon origins?, *Current Opinion in Neurobiology* 9(5), p: 634-639
- Swarup, S., Williams, TI. & Anholt, RR. (2011) Functional dissection of Odorant binding protein genes in *Drosophila melanogaster*, *Genes, Brain and Behavior* 10, p: 648–657
- Theophrastus: Enquiry into plants (History of plants HP) (1916), I & II (HORT, A. F., translator) London, Cambridge & Massachusetts; [in ancient Greek with English translation]
- Therios, I. N. (2009) Olives: Volume 18 of Crop Production Science in Horticulture (History of Olive Growing)
- Thomas, DD., Donnelly, CA., Wood, RJ. & Alphey, LS. (2000) Insect population control using a dominant, repressible, lethal genetic system, *Science* 287: 2474-6
- Tuck, KL. & Hayball, PJ. (2002) Major Phenolic Compounds in Olive Oil: Metabolism and Health Effects, *The Journal of Nutritional Biochemistry* 13, p: 636-644
- Varikou, K., Garantonakis, N. & Biroukaki, A. (2014) Response of olive fruit fly *Bactrocera oleae* to various attractant combinations, in orchards of Crete, *Bulletin of Insectology* 67 (1): p. 109-114
- Vassar, R., Chao, SK., Sitcheran, R. et al. (1994) Topographic organization of sensory projections to the olfactory bulb, *Cell* 79(6), p:981-991
- Vieira, F.G. & Rozas, J. (2011) Comparative genomics of the odorant binding and chemosensory protein gene families across the Arthropoda: origin and evolutionary history of the chemosensory system, *Genome Biology and Evolution* 3, p: 476–490
- Visioli, F., & Galli, C. (1998) The effect of minor constituents of olive oil on cardiovascular disease: New findings, *Nutrition Reviews* 56, p: 142-147
- Vogt, R. G. & Riddiford L. M. (1981) Pheromone binding and inactivation by moth antennae, *Nature* 293, p: 161–163
- Vogt, R. G., Prestwich, G. D. & Lern, M. R. (1991) Odorant-binding-protein subfamilies associate with distinct classes of olfactory receptor neurons in insects, *Developmental Neurobiology* 22, p: 74–84
- Vogt, R.G. (2003) Biochemical diversity of odor detection: OBPs, ODEs and SNMPs. In: Blomquist, G.J., Vogt, R.G. (Eds.), *Insect Pheromone Biochemistry and Molecular Biology*, Elsevier Academic Press, p: 391–446
- Vosshall L. B. (2003) Diversity and expression of odorant receptors in *Drosophila*, *Insect Pheromone Biochemistry and Molecular Biology* , p: 567–591
- Vosshall, L.B. & Hansson, B.S. (2011) A unified nomenclature system for the insect olfactory coreceptor, *Chemical Senses* 36, p: 497–498
- Vosshall, LB., Amrein, H., Morozov, PS., Rzhetsky, A. & Axel, R. (1999) A spatial map of olfactory receptor expression in the *Drosophila* antenna, *Cell* 96, p: 725–736
- Vosshall, LB., Wong, AM. & Axel R. (2000) An olfactory sensory map in the fly brain, *Cell* 102, p: 147-159
- Walker, M., (1997) *Natures Antibiotic olive Leaf Extract*, Kensington Publishing Corp. New York
- Walker, W. B. III, Gonzalez, F., Garczynski, S. F. & Witzgall, P. (2016) The chemosensory receptors of codling moth *Cydia pomonella*—expression in larvae and adults, *Scientific Reports* 6
- Wanner, K. W., Willis, L. G., Theilmann, D. A., Isman, M. B., Feng, Q. & Plettner, E. (2004) Analysis of the insect OS-D-like gene family, *Journal of Chemical Ecology* 30, p: 889–911
- Wicher, D., Schafer, 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, p: 1007-1011

- 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
- Yang, Y., Krieger, J., Zhang, L. & Breer, H. (2012) The olfactory co-receptor Orco from the migratory locust (*Locusta migratoria*) and the desert locust (*Schistocerca gregaria*): identification and expression pattern., *International Journal of Biological Sciences* 8, p: 159–170
- Yao, CA. & Carlson, JR. (2010) Role of G-proteins in odor-sensing and CO₂-sensing neurons in *Drosophila*, *Journal of Neuroscience* 30(13), p: 4562-72
- Yao, CA., Ignell, R. & Carlson, JR. (2005) Chemosensory coding by neurons in the coeloconic sensilla of the *Drosophila* antenna, *Journal of Neuroscience* 25, p: 8359–8367
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S. & Madden, TL. (2012) Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction, *BMC Bioinformatics* 13, p: 134
- Younus, F., Chertemps, T., Pearce, S. L., Pandey, G., Bozzolan, F., Coppin, C. W., Russell, R. J., Maïbèche - Coisne, M., Oakeshott, J. G. (2014) Identification of candidate odorant degrading gene/enzyme systems in the antennal transcriptome of *Drosophila melanogaster*, *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 53, p: 30-43
- Zarzuelo, A., Duarte, J., Jiménez, J., González, M. & Utrilla, MP. (1991) Vasodilator effect of olive leaf, *Planta Medica* 57(5), p: 417-9

EIKONEΣ:

- Biorad CFX Manager
- Bio-rad Laboratories, 2006
- Carluccio, MA., Siculella, L., Ancora, MA., Massaro, M., Scoditti, E., Storelli, C., Visioli, F., Distanto, A. & De Caterina, R. (2003) Olive oil and red wine antioxidant polyphenols inhibit endothelial activation: antiatherogenic properties of mediterranean diet phytochemicals, *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 23, p: 622–629
- de Bruyne, M., Foster, K. & Carlson, JR. (2001) Odor coding in the *Drosophila* antenna, *Neuron* 30(2), p: 537-552
- Fishilevich, E. & Vosshall, L.B. (2005) Genetic and functional subdivision of the *Drosophila* antennal lobe, *Current Biology* 15 (17), p: 1548-1553
- Fredrickson, WR. (2000) F and S Group, Inc. Method and Composition for Antiviral Therapy with Olive Leaves
- Goldman, AL., Van der Goes van Naters, W., Lessing, D., et al. (2005) Coexpression of two functional odor receptors in one neuron, *Neuron* 45(5), p: 661-666
- Ha, TS. & Smith, DP. (2006) A pheromone receptor mediates 11-cis-vaccenyl acetate-induced responses in *Drosophila*, *Journal of Neuroscience* 26(34), p: 8727-8733
- <http://www.growweedeasy.com/cannabis-aphids>
- <https://www.flickr.com/photos/bodorjanos40/5497697736>
- <https://www.sciencedaily.com/releases/2015/09/150922115827.htm>
- Jones, WD., Cayirlioglu, P., Kadow, IG., et al. (2007) Two chemosensory receptors together mediate carbon dioxide detection in *Drosophila*, *Nature* 445, p: 86-90
- Kaupp, U. B. (2010) Olfactory signalling in vertebrates and insects: differences and commonalities, *Nature Reviews Neuroscience* 11, p: 188–200
- Larsson, MC., Domingos, AI., Jones, WD., et al. (2004) Or83b encodes a broadly expressed odorant receptor essential for *Drosophila* olfaction, *Neuron* 43, p: 703-714

- Mitaka, Y., Kobayashi, K., Mikheyev, A., Tin, M. M. Y., Watanabe, Y. & Matsuura, K. (2016), Caste-Specific and Sex-Specific Expression of Chemoreceptor Genes in a Termite, *PLoS ONE*
- Omar S. H. (2010) Oleuropein in Olive and its Pharmacological Effects, *Scientia Pharmaceutica* 78, p: 133–154
- Owen, RW., Giacosa, A., Hull, WE., Haubner, R., Würtele, G., Spiegelhalter, B. & Bartsch, H. (2000) Olive oil consumption and health: the possible role of antioxidants, *The Lancet Oncology* 1, p: 107–112
- Pellegrino, M. & Nakagawa, T. (2009) Smelling the difference: controversial ideas in insect olfaction, *The Journal of Experimental Biology*
- Ray, A., Van der Goes, Van Naters W., and Carlson J. R. (2014) Molecular determinants of odorant receptor function in insects, *Journal of Biosciences* 39(4), p: 555–563
- Rice R.E. (2000). Bionomics of the Olive Fruit Fly *Bactrocera (Dacus) oleae*, U.C. Kearney Agricultural Center, KAC Plant Protection Quarterly
- Scott, K., Brady, R., Jr., Cravchik, A., et al. (2001) A chemosensory gene family encoding candidate gustatory and olfactory receptors in *Drosophila*, *Cell* 104(5), p: 661-673
- Suh, GS., Wong, AM., Hergarden, AC., et al. (2004) A single population of olfactory sensory neurons mediates an innate avoidance behaviour in *Drosophila*, *Nature* 431(7010), p: 854-859
- Therios, I. N. (2009) Olives: Volume 18 of *Crop Production Science in Horticulture (History of Olive Growing)*
- Tripoli, E., Giammanco, M., Tabacchi, G., Di Majo, D., Giammanco, S. & La Guardia, M. (2005) The phenolic composition of olive oil: structure, biological activity, and beneficial effects on human health, *Nutrition Research Reviews* 18, p: 98–112
- Visioli, F., Bellosta, S., Galli, C. (1998) Oleuropein, the bitter principles of olives, enhances nitric oxide production by mouse macrophages, *Life Sciences* 62, p: 541–546
- Visioli, F., Poli, A. & Galli, C. (2002) Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil, *Medicinal Research Reviews* 22, p: 65–75
- www.biodiversidadvirtual.org
- www.flickr.com
- Yao, CA., Ignell, R. & Carlson, JR. (2005) Chemosensory coding by neurons in the coeloconic sensilla of the *Drosophila* antenna, *Journal of Neuroscience* 25(37), p: 8359-8367