



# Κλωνοποίηση οσφρητικών υποδοχέων φρουτομυγών (οικ. Terhritidae) που εμπλέκονται στην αντίληψη φρουτοσμών και φερομονών

Αικατερίνη Παπαδημητροπούλου



Λάρισα, 2022



Θέμα διπλωματικής εργασίας:

«Κλωνοποίηση οσφρητικών υποδοχέων φρουτομυγών (οικ. Tephritidae)  
που εμπλέκονται στην αντίληψη φρουτοσμών και φερομονών»

“Cloning of Odorant Receptors from Fruit Flies (Diptera: Tephritidae)  
involved in chemoreception of fruity smells and pheromones”

ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ ΠΑΠΑΔΗΜΗΤΡΟΠΟΥΛΟΥ του ΧΑΡΑΛΑΜΠΟΥ

2022



Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας & Γονιδιωματικής του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, το διάστημα Σεπτέμβριο 2021 - Ιανουάριο 2022 υπό την επίβλεψη του κ. Κωνσταντίνου Μαθθιόπουλου, καθηγητή Μοριακής Βιολογίας.

#### ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

**Κωνσταντίνος Μαθθιόπουλος**, Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας

**Αντώνιος Γιακουντής**, Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας-Γονιδιωματικής

**Καλλιόπη Παπαδοπούλου**, Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών



## Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την τριμελή επιτροπή μου, τον κ. Ματθιόπουλο, τον κ. Γιακουντή και την κ. Παπαδοπούλου για τη συμβολή τους στην επίτευξη της διπλωματικής εργασίας.

Τον κ. Ματθιόπουλο διότι εκτός από εξαιρετικός επιστήμονας που με βοήθησε σε όλο το ταξίδι αυτής της πτυχιακής, προσωπικά ήταν πηγή έμπνευσης ήδη από την πρώτη διάλεξη Μοριακής Βιολογίας στο δεύτερο έτος.

Την Σπανομήτρου Αντωνία που ήμουν τυχερή ώστε να με επιβλέπει και να συνεργαστούμε στο εργαστήριο. Πρόκειται για μία επιστήμονα που νοιάζεται βαθύτατα για αυτό που κάνει και γι' αυτό δίνεται ολόψυχα στην εργασία της. Ήταν πάντα δίπλα μου ακόμα και στις πιο ανόητες απορίες μου, ακόμα και όταν έλειπε μίλια μακριά για εκπαίδευση στη Γερμανία.

Την Λευκή, τον Δημήτρη, την Ελένη, την Μυρτώ, την Βαρβάρα, τον Ιάσωνα και την Άντζελα (moriakis family) που με βοήθησαν και κυρίως με άντεξαν στις ατελείωτες ώρες εργαστηρίου.

Τους Joana, Francesca, Mees, Justine και Yishu που ήμασταν μαζί για εντατική εργασία πεδίου ενώ έγραφα την πτυχιακή και δεν με άφησαν να πεθάνω από αυπνία ή ασιτία.

Την οικογένεια μου, Μαμά, Μπαμπά, Γιάννη, Αλέξανδρο και Πέπε, για την στήριξη τους όλα αυτά τα χρόνια. Ειδικά τη μαμά μου που εκτός από πρότυπο και άνθρωπο που ξέρει πάντα τι είναι καλύτερο για εμένα, έλεγξε συντακτικά και την πτυχιακή αυτή! Σιγά-σιγά μαθαίνουμε και οι δύο πως να διαχειριζόμαστε το άγχος μου.

Τιμητική αναφορά στην Taylor Swift για τις ατελείωτες ώρες συντροφιάς στα ακουστικά μου.





## Περίληψη

Έντομα-εχθροί, όπως η Μεσογειακή Μύγα, *Ceratitis capitata*, και ο Δάκος της Ελιάς, *Bactrocera oleae*, είναι σημαντικής οικονομικής σημασίας καθώς δρουν παρασιτικά σε προϊόντα αγροτικών καλλιεργειών. Παρά την ύπαρξη πολλαπλών μεθόδων καταπολέμησης φρουτομυγών αυτών, δεν υπάρχει κάποια που να συναντά σύγχρονες απαιτήσεις όπως η ειδο-ειδικότητα, η μη τοξικότητα σε άλλα είδη ή μόλυνση του περιβάλλοντος, το χαμηλό κόστος, η αμεσότητα και η συμφωνία με το νομοθετικό πλαίσιο της εκάστοτε κοινωνίας. Η χρήση οσφρητικών ουσιών σε παγίδες που με ειδο-ειδικό τρόπο μπορούν να προσελκύσουν τα έντομα θα μπορούσε να είναι η βελτιωμένη παρεμβατική μέθοδος ελέγχου που πληροί τις απαιτήσεις αυτές. Επομένως, η διερεύνηση της μοριακής βάσης του οσφρητικού συστήματος των εντόμων αποτελεί ένα αξιοσημείωτο πεδίο έρευνας λόγω της σημασίας του σε βασικές λειτουργίες των εντόμων, όπως η μεσολάβησή του στην αναγνώριση της τροφής αλλά και στην αναπαραγωγή, συμπεριλαμβάνοντας τόσο τη σύζευξη όσο και την ωοαπόθεση.

Προς αυτή την κατεύθυνση, στην παρούσα πτυχιακή εργασία στοχεύθηκαν οσφρητικοί υποδοχείς της Μεσογειακής Μύγας και του Δάκου της Ελιάς ώστε να κλωνοποιηθούν και μελλοντικά να εισαχθούν σε στέλεχος δροσόφιλας, *Drosophila Melanogaster*, για να μελετηθούν τα προφίλ ενεργοποίησης τους. Αρχικά, ενισχύθηκαν οι αλληλουχίες που εντοπίστηκαν βιοπληροφορικά με χρήση ειδικών εκκινήτων. Ακολούθησαν πέψεις με διαφορετικά περιοριστικά ένζυμα για προσανατολισμένη σύνδεση με φορείς κλωνοποίησης (pBLUESCRIPT/pUAST). Η κλωνοποίηση πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροδιάτρηση ηλεκτροδεκτικών κυττάρων *Escherichia coli*. Η ταυτοποίηση γονιδίων πραγματοποιήθηκε τόσο με διαγνωστικές πέψεις όσο και με αλληλούχηση. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα τελικά κλωνοποιήθηκε ο οσφρητικός υποδοχέας OR85c της Μεσογειακής Μύγας.



## Abstract

Pests like the Mediterranean Fly, *Ceratitis capitata*, and Dakus, *Bactrocera oleae*, are of great financial importance considering their causing of damage to crops. However, despite plenty pest control methods existing, none of them meet modern requirements, i.e., species-specificity, lack of toxicity to mammals, being environmentally benign, low cost and having regulatory approval. The use of odorants in traps in order to lure insects in a species-specific manner could be the enhanced alternative control method that takes into account all these requirements. Thus, studying the molecular basis of the insects' olfactory system will offer an insight on basic insect functions, such as food recognition and reproduction, including mating and oviposition.

In the context of this thesis, the aim was cloning of Odorant Receptors (ORs) of the Mediterranean Fly and Dakus in a cloning vector that could be injected in *Drosophila Melanogaster* strains and then studying their activation profiles. Firstly, the OR sequences of those pests, homologous to closely related species *D. Melanogaster*, were amplified using specific primers. Digestions with different restriction enzymes followed in order to connect the insert to the cloning vector (pBLUESCRIPT/pUAST). Cloning was achieved with electroporation of electro-competent *Escherichia coli* cells. Gene identification was performed both by diagnostic digestions and sequencing. According to the results, odorant receptor OR85c was successfully cloned in cloning vector pUAST.



## Περιεχόμενα

Εισαγωγή.....	14
Έλεγχος πληθυσμών εντόμων αγροτικού ενδιαφέροντος.....	14
Μέθοδοι καταπολέμησης ζωικών εχθρών.....	14
Χημική μέθοδος.....	14
Βιολογικές μέθοδοι.....	15
Βιοτεχνολογικά μέτρα.....	15
Καλλιεργητικά μέτρα.....	16
Μηχανικά μέτρα.....	16
Η ανάγκη για ειδο-ειδικότητα.....	18
Γενικές οσμές.....	18
Φερομόνες.....	19
Πρόσληψη φερομονών στη <i>Drosophila</i> .....	19
Οσφρητικό σύστημα εντόμων.....	20
Μεταγωγή οσφρητικού σήματος στη <i>Drosophila</i> .....	23
Μοριακά συστατικά οσφρητικού συστήματος.....	23
Φρουτόμυγες: Μεσογειακή μύγα και Δάκος της Ελιάς.....	28
Σκοπός.....	32
Υλικά και Μέθοδοι.....	33
Απομόνωση νουκλεϊκών οξέων.....	33
Απομόνωση πλασμιδιακού DNA (Mini preps).....	33
Χειρισμός νουκλεϊκών οξέων.....	34
Κατακρήμνιση DNA.....	34
Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.....	35
Ανάκτηση DNA από πήκτωμα αγαρόζης.....	36
Πέψη με ένζυμα περιορισμού.....	37
Ποσοτικοποίηση DNA.....	38
Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	38
Εκκινητές οσφρητικών υποδοχέων.....	40
Κλωνοποίηση DNA.....	40
Αντίδραση σύνδεσης μορίων DNA σε πλασμιδιακό φορέα (Ligation).....	40
Πλασμιδιακοί φορείς.....	41
Παρασκευή δεκτικών κυττάρων για ηλεκτροδιάτρηση (competent cells).....	42
Μετασχηματισμός κυττάρων με ηλεκτροδιάτρηση.....	43

Καλλιέργεια μετασηματισμένων κυττάρων και διάκριση ανασυνδυασμένων κλώνων .....	44
Εργαστηριακοί πληθυσμοί.....	46
In silico ανάλυση .....	48
Blast (Basic Local Allignment Search Tool) .....	48
Geneious.....	48
Benchling .....	48
Αποτελέσματα.....	49
Ενίσχυση γονιδίων οσφρητικών υποδοχέων.....	49
Πέψη με ένζυμα περιορισμού .....	52
Κλωνοποίηση γονιδίων σε πλασμιδιακό φορέα pBLUESCRIPT.....	54
Ταυτοποίηση αλληλουχιών με επιβεβαιωτικές πέψεις με ένζυμα περιορισμού .....	55
Αλληλούχηση αλληλουχιών θετικών κλώνων.....	61
Κλωνοποίηση OR85c σε πλασμιδιακό φορέα pUAST και ταυτοποίηση με επιβεβαιωτικές πέψεις με ένζυμα περιορισμού .....	64
Αλληλούχηση OR85c που κλωνοποιήθηκε σε πλασμιδιακό φορέα pUAST .....	65
Συζήτηση .....	67
Κλωνοποίηση γονιδίων οσφρητικών υποδοχέων.....	67
OR85c .....	68
OR82α.....	69
OR67c .....	69
Μελλοντικές προσεγγίσεις.....	70
Συμπέρασμα.....	71
Παραρτήματα.....	72
Πίνακας 1: Εκκινητές για την ενίσχυση γονιδίων οσφρητικών υποδοχέων ομόλογων της δροσόφιλας.....	72
Αλληλουχίες γονιδίων οσφρητικών υποδοχέων .....	73
Πίνακας 2: Βέλτιστοι προσδέτες (Best ligands) οσφρητικών υποδοχέων της δροσόφιλας και οι ιδιότητές τους .....	81
Συναρμολόγηση αναγνώσεων αλληλούχησης (Assembly) με την χρήση της πλατφόρμας Geneious.....	82
Βιβλιογραφία .....	85
Εικόνες.....	88

## Εισαγωγή

### Έλεγχος πληθυσμών εντόμων αγροτικού ενδιαφέροντος

Για την ανέλιξη των σύγχρονων κοινωνιών και τρόπων ζωής ο άνθρωπος χρειάστηκε να επέμβει και να μεταβάλλει το περιβάλλον του. Στο χώρο, όμως, που καταλαμβάνει ο άνθρωπος και οι δραστηριότητες του υπάρχουν εξίσου και άλλοι οργανισμοί, κάποιοι εκ των οποίων μετατράπηκαν σε εχθρούς για τους ανθρώπινους σκοπούς. Καθίσταται, λοιπόν, αναγκαίος ο έλεγχος των πληθυσμών εκείνων των οργανισμών που με οποιοδήποτε τρόπο μπορούν να βλάψουν τον άνθρωπο.

Έντομα-Εχθροί θεωρούνται αυτά που μειώνουν (αξιόλογα) το εισόδημα και βλάπτουν την υγεία ή κατά οποιοδήποτε τρόπο «ενοχλούν» τον άνθρωπο. (Τζανακάκης, 1995)

Ζώα-εχθροί έχουν ιστορικά αποτελέσει αποσταθεροποιητικό παράγοντα στη γεωργία και σημαντική απειλή για την επισιτιστική ασφάλεια. Από τις διασημότερες ομοταξίες οι οποίες δημιουργούν προβλήματα είναι τα αρθρόποδα στα οποία συγκαταλέγονται έντομα όπως οι φρουτόμυγες. Είναι από τους σημαντικότερους διασυννοριακούς εχθρούς. Κατά την περίοδο 2008-2018 το 9% της συνολικής ζημίας σε ζωικές και φυτικές παραγωγές προκλήθηκε από ζωικούς εχθρούς όπως έντομα. (FAO, 2021)

### Μέθοδοι καταπολέμησης ζωικών εχθρών

Καταπολέμηση των ζωικών εχθρών θεωρείται η ανθρώπινη παρέμβαση για τη μείωση του πληθυσμού (σπάνια η πλήρης εξόντωση) ενός ζωικού εχθρού ή των ζημιών που προκαλεί και τα μέτρα που ο άνθρωπος εφαρμόζει για το σκοπό αυτό. (Τζανακάκης, 1995)

Για τον έλεγχο των αρθροπόδων εχθρών υπάρχει ποικιλία μεθόδων που έχουν γνωρίσει σημαντικές προόδους και καινοτομίες ανά τα χρόνια. Κάθε περίπτωση μπορεί να χρήζει διαφορετικό τρόπο αντιμετώπισης. Ένα είδος σε συγκεκριμένες συνθήκες μπορεί να αντιμετωπίζεται από μία ή και περισσότερες μεθόδους. Σε κάθε περίπτωση κάθε μέθοδος και διαφορετική αποτελεσματικότητα η οποία εξαρτάται από ποικίλους παράγοντες.

Οι μέθοδοι και τα μέτρα καταπολέμησης των εντόμων διακρίνονται σε χημικά, βιολογικά, καλλιεργητικά, μηχανικά κ.ά.

### Χημική μέθοδος

Στη μέθοδο αυτό γίνεται χρήση χημικών μέσων (εντομοκτόνα, ακαρεοκτόνα, νηματοκτόνα, στερωτικές ουσίες, ανασχετικές της ανάπτυξης, αντιμεταβολίτες, ελκυστικές, απωθητικές & αποτρεπτικές, φερομόνες κ.λπ.), τα οποία επηρεάζουν τη φυσιολογία, τη συμπεριφορά και την δυναμική του πληθυσμού ενός ζωικού εχθρού κατά τον τρόπο που εξυπηρετεί κάθε φορά τον άνθρωπο.

Φυτοπροστατευτικό Προϊόν, ΦΠ (Pesticide) ονομάζεται κάθε ουσία ή μείγμα ουσιών, συμπεριλαμβανομένων και των επεξεργασμένων ή μη φυτικών προϊόντων, που μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μέσο καταπολέμησης εχθρών, ασθενειών και ζιζανίων των φυτών ή να βελτιώσει την αποτελεσματικότητα των εν λόγω ουσιών. (Τζανακάκης, 1995)

Η χημική μέθοδος πρόκειται για την πιο διαδεδομένη μέθοδος καταπολέμησης ζωικών εχθρών λόγω της ευχέρειας εφαρμογής εντομοκτόνων, του χαμηλού κόστους αλλά και τα δραστικά αποτελέσματα (γρήγορα και με μεγάλο ποσοστό θανάτωσης) σε μη ανθεκτικούς

πληθυσμούς. Ωστόσο, η μαζική χρήση των συμβατικών χημικών εντομοκτόνων προκαλεί ρύπανση του περιβάλλοντος, έξαρση δευτερευόντων φυτοπαρασίτων και αφήνει υπολείμματα στα γεωργικά προϊόντα, πιθανώς επικίνδυνα για την υγεία του ανθρώπου. Από τα σημαντικότερα μειονεκτήματα της χρήσης τους οδηγεί στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας των πληθυσμών του εντόμου, με αποτέλεσμα η μέθοδος να καθίσταται αναποτελεσματική. (Τζανακάκης, 1995)

Η ανθεκτικότητα ζωικών εχθρών σε ένα ΦΠ ορίζεται ως ο πληθυσμός ο οποίος με την πάροδο των γενεών από ευπαθής καθίσταται ανθεκτικός απέναντι σε δεδομένο ΦΠ μέσα από την επιλογή των γονιδίων ανθεκτικότητας που ο πληθυσμός ήδη έχει (κληρονομήσιμη ιδιότητα). (Τζανακάκης, 1995)

### Βιολογικές μέθοδοι

Οι μέθοδοι αυτοί χρησιμοποιούν ζωντανούς οργανισμούς που είναι φυσικοί εχθροί του προς καταπολέμηση εντόμου. Περιλαμβάνουν την διατήρηση και ενίσχυση της βιοποικιλότητας, την εξαπόλυση ωφέλιμων εντόμων ή ακάρεων είτε την εισαγωγή εντομοπαθογόνων μυκήτων, βακτηρίων ή ιών.

Η μείωση της δράσης του ζωικού εχθρού μπορεί να επιτευχθεί με χαμηλό κόστος. Είναι ακίνδυνη μέθοδος για τον άνθρωπο, τα αγροτικά ζώα και τα καλλιεργούμενα φυτά.

Τα μέτρα αυτά έχουν περιορισμένες δυνατότητες καθώς αφορούν μόνο ορισμένα από τα ζώα-εχθρούς. Έχουν χαμηλότερη, λιγότερο άμεση και μη σταθερή αποτελεσματικότητα σε σχέση με τη χημική μέθοδο. Επιπλέον, παρόλο που η εφαρμογή μπορεί να είναι οικονομική, προαπαιτείτε πολυετής έρευνα με μεγάλες δαπάνες και χρήση εξειδικευμένου προσωπικού. Τέλος, είναι οικολογικά επικίνδυνα λόγω πιθανής εξαφάνισης ιθαγενών φυσικών εχθρών μίας περιοχής με την εισαγωγή εξωτικών ειδών.

### Βιοτεχνολογικά μέτρα

#### Τεχνική στείρων εντόμων (SIT)

Η μέθοδος στείρων εντόμων αποτελεί την πλέον διαδεδομένη εναλλακτική μέθοδο αντιμετώπισης των εντόμων-εχθρών, καθώς είναι ειδο-ειδική, φιλική στο περιβάλλον και εφαρμόσιμη σε μεγάλη κλίμακα.

Σύμφωνα με την αρχή της μεθόδου στείρωνεται μεγάλος αριθμός, κατά βάση, αρσενικών εντόμων σε εργαστηριακές συνθήκες και απελευθερώνονται με στόχο τη σύζευξή τους με αγρίου-τύπου θηλυκά έντομα και την επακόλουθη μείωση του φυσικού πληθυσμού.

Από τις πρώτες προσπάθειες αλλά και μέχρι και σήμερα, ακτινοβολία γ χρησιμοποιείται για τη στείρωση των εντόμων. Πριν την εφαρμογή της ακτινοβολίας τα έντομα διαχωρίζονται βάσει φύλου ώστε μόνο τα αρσενικά να στείρωθούν και μετέπειτα να απελευθερωθούν στον αγρό που θα συζευχθούν με τα θηλυκά έντομα.

Τα στείρωμένα με ακτινοβολία έντομα αποδείχθηκε ότι δεν είναι το ίδιο ανταγωνιστικά με τα αρσενικά αγρίου τύπου εξαιτίας των μεταλλάξεων που φέρουν. Η χρήση της ακτινοβολίας οδηγεί στην παραγωγή ελευθέρων ριζών οι οποίες δρουν επιβλαβώς για το έντομο. Οι καταπονήσεις που υφίστανται τα έντομα μπορεί να οδηγήσουν σε μείωση της



ικανότητας πτήσεων τους και σε αλλαγές κατά την προσυζευκτική τους συμπεριφορά (πρότυπο δόνησης φτερών, προσυζευκτικοί ήχοι). Παράλληλα, η ανάπτυξη τους στις ελεγχόμενες συνθήκες του εργαστηρίου επηρεάζει και άλλες φυσιολογικές διαδικασίες της αναπαραγωγής, όπως είναι η διαφορά στις ώρες της μέρας που εμφανίζουν οίστρο, σε σχέση με τα αγρίου τύπου άτομα. Έτσι, οι εργαστηριακοί πληθυσμοί έχουν σημαντικό μειονέκτημα για την προσέλκυση θηλυκών σε σύγκριση με τους φυσικού πληθυσμού. (Atkinson & Michel, 2002) (Lance & McInnis, 2005)

Στις πιο σύγχρονες εφαρμογές SIT η στείρωση πραγματοποιείται με την χρήση της γενετικής μηχανικής. Αντί για τυχαίες και πολλαπλές μεταλλάξεις μέσω ακτινών, οι μεταλλάξεις είναι στοχευμένες σε γονίδια που θα καταστήσουν το έντομο στείρο. Με αυτό τον τρόπο, η SIT παραμένει περιβαλλοντικά φιλική, ειδο-ειδική, δεν υπάρχει κίνδυνος ανάπτυξης ανθεκτικότητας για αυτή και τα αρσενικά είναι εξίσου ανταγωνιστικά με του αγρίου τύπου.

Η αποτελεσματικότητα της μεθόδου είναι πολύ υψηλή. Παρόλα αυτά η εφαρμογή της διασυννοριακά έχει περιορισμούς λόγω κοινωνικοπολιτικών φραγμών σε γενετικούς τροποποιημένους οργανισμούς (GMO's). Σημαντικός περιορισμός επίσης είναι ο διαχωρισμός των φύλων με μεγάλη απόδοση σε βιομηχανική κλίμακα. Η απελευθέρωση θηλυκών πρέπει να αποφεύγεται γιατί ανταγωνίζονται τα αγρίου τύπου θηλυκά μειώνοντας την αποτελεσματικότητα της μεθόδου.

#### Καλλιεργητικά μέτρα

Αφορούν μεταβολές στο περιβάλλον. Δηλαδή, καλλιεργητικές εργασίες που γίνονται με τα συνηθισμένα γεωργικά μηχανήματα ή εργαλεία και συντελούν στον περιορισμό των ζωικών εχθρών. Δεν απαιτούνται ειδικές δαπάνες ή απασχόληση, αλλά μικροαλλαγές κατά την εφαρμογή τους.

Όμως, απαιτείται συχνή εφαρμογή σε μεγάλες εκτάσεις και μάλιστα συνήθως με τη συνεργασία καλλιεργητών μίας ευρείας περιοχής. Συνήθως είναι επικουρικά μέτρα άλλων μεθόδων ή εφαρμόζονται όταν δεν είναι διαθέσιμη άλλη μέθοδος, καθώς δεν επαρκούν για την αντιμετώπιση των βλαβερών εντόμων. (Τζανακάκης, 1995)

#### Μηχανικά μέτρα

Τα μέτρα αυτά αφορούν την χρήση φυσικών αντικειμένων όπως παγίδες, μηχανήματα, συσκευές.

Μόνο σε λίγες περιπτώσεις προκαλούν μεγάλη θνησιμότητα των ζωικών εχθρών. Συνήθως είναι δαπανηρά. Είναι δημοφιλή, γιατί τα αποτελέσματά τους είναι εμφανή και άμεσα. (Τζανακάκης, 1995)

#### Παγίδευση

Στους πιο πολλούς ζωικούς εχθρούς αποτελεί βοηθητικό ή συμπληρωματικό μέτρο και χρησιμεύει πολλές φορές και για την παρακολούθηση πορείας πληθυσμού με σκοπό τον καθορισμό του χρόνου επέμβασης. Αν αποτελεί άμεσο μέσο καταπολέμησης (μαζική παγίδευση ενός ή και των 2 φύλων) απαιτείται μεγαλύτερος αριθμός παγίδων ανά στρέμμα. Συνιστάται στην πρόκληση διαφόρων ερεθισμάτων (χημικά, οπτικά ή άλλα), τα οποία ελκύουν το ζωικό εχθρό στην παγίδα από την οποία δεν μπορεί να διαφύγει και θανατώνεται ή πεθαίνει. Υπάρχουν διάφορα είδη παγίδων ανάλογα τα χαρακτηριστικά τους, π.χ. τροφικές, φερομονικές, χρωματικές, φωτεινές, κολλητικές, αναρροφητικές,

ύδατος κ.λπ. Ορισμένες παγίδες (τροφικές, φερομονικές, χρωματικές) δεν παγιδεύουν το ζωικό εχθρό κυριολεκτικά, αλλά προσελκύουν τα έντομα.

Η παγίδα εκτός από αποτελεσματική πρέπει να είναι και εκλεκτική, γιατί αυτή η εκλεκτικότητα εμποδίζει την παγίδευση εντόμων που δεν είναι στόχος προστατεύοντας την βιοποικιλότητα. Επιπλέον, η προσθήκη οσμής-προσελκυστικής ουσίας αυξάνει συνήθως την απόσταση δράσης της παγίδας και έτσι μειώνεται ο αριθμός αναγκαίων παγίδων ανά στρέμμα.

#### *Παγίδευες Lure and Kill: Χρήση οσμών στην καταπολέμηση εντόμων*

Η σημασία των γενικών οσμών και των φερομονών στις φυσιολογικές λειτουργίες των εντόμων έχει αποτελέσει ένα εργαλείο για την καταπολέμηση και τον έλεγχο της εξάπλωσης εκείνων που εμφανίζουν παρασιτική δράση. Η αντιμετώπιση των εντόμων-παρασίτων είναι αναγκαία είτε λόγω της ζημιάς που προκαλούν στις αγροτικές καλλιέργειες (π.χ. δάκος στην ελιά, μεσογειακή μύγα σε μια σειρά φρούτων και λαχανικών), είτε λόγω της λειτουργίας τους ως φορέων παθογόνων μικροοργανισμών που ευθύνονται για σοβαρές ασθένειες (π.χ. *A. gambiæ* και ελονοσία). Παρά τα, σχετικά, λίγα μοριακά δεδομένα για το οσφρητικό σύστημα των εντόμων-παρασίτων, η χρήση οσμών είναι ιδιαίτερα διαδεδομένη και εφαρμόζεται σε τεχνικές καταπολέμησης στις οποίες αξιοποιούνται ως προσελκυστικά σε παγίδες. Οι οσμές αυτές έχουν προσδιοριστεί κυρίως εμπειρικά, ενώ οι εξελίξεις στην αποκάλυψη των ειδοειδικών φερομονών και η δυνατότητα μαζικής παραγωγής τους έχει αυξήσει τη χρήση και την αποτελεσματικότητά τους.

#### *Τροφικές παγίδες*

Έλκυση ζωικού εχθρού (συνήθως Lepidoptera & Diptera) με ουσία ή μείγμα ουσιών κατά όμοιο τρόπο με μία θρεπτική του ουσία

Για παράδειγμα, σε Diptera που ωτοκοούν σε καρπούς χρησιμοποιούνται υδρολύματα πρωτεϊνών, υδατικά διαλύματα αλάτων του αμμωνίου ή συνδυασμό τους, τα οποία για το δάκο ελιάς & μύγα Μεσογείου χρησιμοποιούνται σε γυάλινες παγίδες τύπου McPhail (δακοπαγίδες) ή και παγίδα Steiner. Στις παγίδες αυτές απαιτείται ανανέωση του ελκυστικού υγρού κάθε λίγες ημέρες και δεν έχουν μεγάλη εκλεκτικότητα. (Τζανακάκης, 1995).

McPhail: Στο κάτω μέρος τους βρίσκεται το ελκυστικό υγρό και τα εισερχόμενα έντομα δύσκολα διαφεύγουν και τελικά πνίγονται. (Εικ.1)

Steiner: Αποτελείται από διαφανή συνθετική ύλη σε σχήμα βαρελιού με ανοίγματα στα δύο άκρα (βάσεις) για να εισέρχονται τα έντομα. Στο κέντρο της κρέμεται ο εξατμηστήρας με την ελκυστική ουσία και στο κάτω της μέρος υπάρχει λίγη σε ποσότητα σκόνη εντομοκτόνου. (Εικ.1)



Εικόνα 1: Εντομοπαγίδες McPhail (αριστερά) και Steiner (δεξιά) για τον έλεγχο πληθυσμών φρουτομυγών. Αριστερή φωτογραφία από Peggy Greb, USDA Agricultural Research Service, Bugwood.org. Δεξιά φωτογραφία από Okinawa Prefectural Fruit Fly Eradication Project Office.

#### Φερομονικές παγίδες

Ως ελκυστική πηγή έχουν συνθετική φερομόνη ή εκχύλισμα παρθένων εντόμων (συνήθως θήλεων) ή ζωντανά έντομα, που ελκύουν φερομόνη. Οι περισσότερες παγίδες ελκύουν άτομα του ενός μόνο φύλου και ονομάζονται και παγίδες φύλου ή σεξουαλικές παγίδες. Σε αυτές δεν απαιτείται συχνή ανανέωση ελκυστικής ουσίας (εκτός αυτής των ζωντανών εντόμων) και έχουν μεγάλη εκλεκτικότητα και ελκυστικότητα.

#### Η ανάγκη για ειδο-ειδικότητα

Η χρήση εντομοκτόνων και οι μη-ειδικές παγίδες εγκυμονούν μια σειρά κινδύνων για τη δημόσια υγεία και την ισορροπία των οικοσυστημάτων που οδηγούν αναπόφευκτα στην ανάγκη για βελτίωση των μεθόδων ελέγχου και ανάπτυξη μεθόδων εξειδικευμένων στο έντομο-στόχο, που η χρήση τους θα είναι συμφέρουσα, εύκολη, γρήγορη, αποτελεσματική αλλά και εφαρμόσιμη από νομοθετικής απόψεως.

Η ανάγκη για βελτίωση των μεθόδων καταπολέμησης με έμφαση στην ειδο-ειδικότητα οδηγεί στην εστίαση σε συγκεκριμένα μόρια με κρίσιμο ρόλο για τις βασικές λειτουργίες των εντόμων. Η συμπεριφορά του εντόμου και κατ' επέκταση η βιωσιμότητά του εξαρτάται από παράγοντες του οσφρητικού συστήματος, γεγονός που καθιστά το σύστημα αυτό ελκυστικό στόχο για τον έλεγχο των πληθυσμών. Η εμβάθυνση στα χαρακτηριστικά των επιμέρους μορίων του οσφρητικού συστήματος: πώς δομούνται και πώς τελούν την λειτουργία τους καθώς και πώς αλληλεπιδρούν με συγκεκριμένες οσμές ή φερομόνες, μπορεί να βοηθήσει στην ανάπτυξη ειδο-ειδικών προσεγγίσεων, για τον αποτελεσματικότερο έλεγχο και την καταπολέμηση εντόμων εχθρών.

#### Γενικές οσμές

Ως γενική οσμή χαρακτηρίζεται μια πτητική χημική ένωση με μοριακό βάρος μικρότερο από 300 kDa, η οποία γίνεται αντιληπτή μέσω του οσφρητικού τους συστήματος. Όλοι οι ζωντανοί οργανισμοί εκκρίνουν οσμές είτε σκόπιμα είτε ως προϊόντα-παραπροϊόντα του μεταβολισμού τους. Οι γενικές οσμές κατέχουν σημαντικό ρόλο στην επιβίωση των ζώων αφού τους επιτρέπουν να εντοπίσουν την τροφή τους και να αποφεύγουν θηρευτές και περιβαλλοντικούς κινδύνους.

## Φερομόνες

Οι φερομόνες αποτελούν συγκεκριμένες ενώσεις που εκκρίνονται από ένα άτομο και προσλαμβάνονται από ένα άλλο άτομο του ίδιου είδους για να επάγει μια αντίδραση, όπως κάποια συγκεκριμένη συμπεριφορά ή ενδοκρινική αλλαγή. Οι φερομόνες ανάλογα των συμπεριφορών που επάγουν χωρίζονται σε κατηγορίες: Σεξουαλικές και Συνάθροισης. (Τζανακάκης, 1995)

**Σεξουαλικές:** Εκκρίνονται από το θηλυκό ή το αρσενικό άτομο, ανάλογα με το είδος, με σκοπό την σεξουαλική προσέλκυση του αντίθετου φύλου.

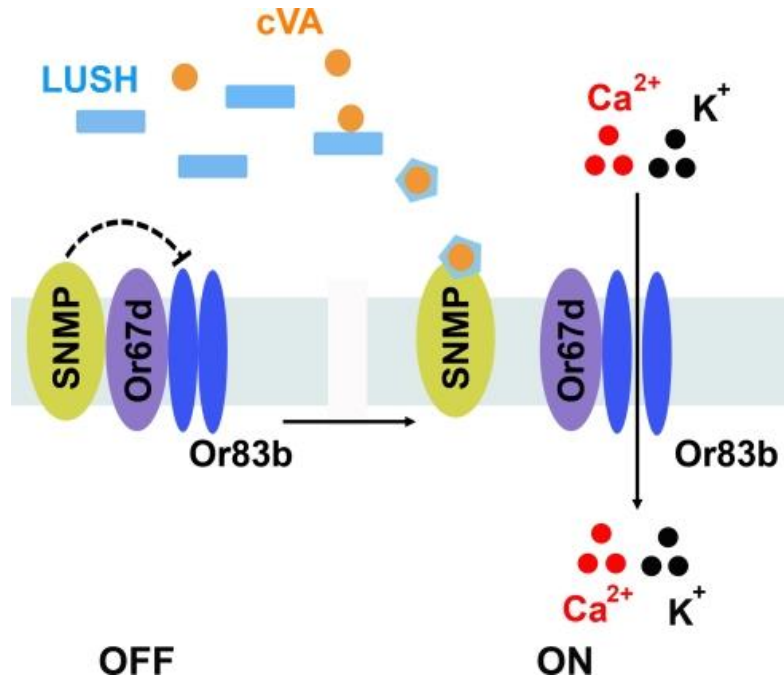
**Συνάθροισης:** Εκκρίνονται και προσλαμβάνονται και από τα δύο φύλα για να ειδοποιήσουν τα άλλα άτομα του είδους σε σχέση με την τοποθεσία μιας πηγής τροφής, ή ενός κινδύνου.

Τα κριτήρια για να θεωρηθεί μία ουσία φερομόνη είναι: α) να εκκρίνεται από ένα άτομο και να προσλαμβάνεται από ένα όμοιό του, β) να στέλνει πληροφορίες σχετικά με το φύλο, την τάξη και το είδος στον παραλήπτη και γ) η επίδρασή της να είναι νοηματική ή ειδοποιητήρια.

Μπορεί να είναι και μη-πτητικές ενώσεις με μοριακό βάρος μεγαλύτερο από μερικές εκατοντάδες kDa, συμπεριλαμβανομένων σχετικά μεγάλων οργανικών συστατικών όπως πεπτίδια και πρωτεΐνες.

### Πρόσληψη φερομονών στη *Drosophila*

Στη μύγα *Drosophila* έχει αποκαλυφθεί μόνο μια πτητική φερομόνη, η cVA (11-cis vaccenyl acetate). Αυτή εκκρίνεται από τα αρσενικά άτομα και επηρεάζει τη συμπεριφορά αρσενικών και θηλυκών ατόμων. Με της πρόσληψη της από το έντομο-δέκτη, η cVA συμπλοκοποιείται εξωτερικά του κυττάρου με την πρωτεΐνη OBP76a ή LUSH. Η σύνδεση της φερομόνης προκαλεί αλλαγές στη στερεοδομή της LUSH. Το σύμπλοκο cVA•OBP76a κινείται στην επιφάνεια του νευρώνα, προς ένα σύμπλεγμα αποτελούμενο από τον υποδοχέα OR67d, το συνυποδοχέα OR83b (Orco) και την μεμβρανική πρωτεΐνη SNMP. Η OBP76a, με την νέα στερεοδομή, δρα ως προσδέτης και αλληλεπιδρά με το παραπάνω σύμπλεγμα. Έτσι, ενεργοποιείται ο νευρώνας και το σήμα της φερομόνης μετάγεται στον εγκέφαλο. (Laughlin, Ha, Jones, & Smith, 2008) (Εικ.2)

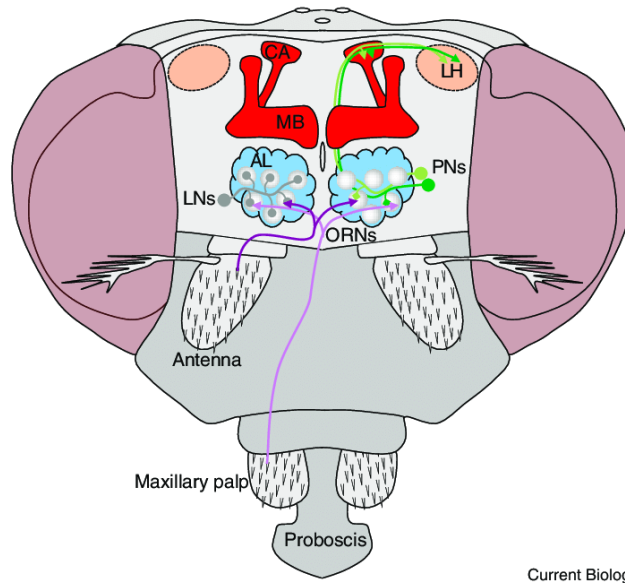


Εικόνα 2: Μοντέλο πρόσληψης φερομόνης cVA στη Δροσόφιλα. Ο εξωκυτταρικός υποδοχέας συνδέεται στη φερομόνη και ενεργοποιείται. Το ενεργοποιημένο σύμπλοκο συνδέεται στην μεμβρανική πρωτεΐνη SNMP και έτσι ενεργοποιείται ο υποδοχέας OR57d, οδηγώντας στην εισροή κατιόντων στους νευρώνες. (Ha, Tal & Smith, Dean, 2009)

### Οσφρητικό σύστημα εντόμων

Η όσφρηση είναι μία από τις βασικές αισθήσεις των ζωντανών οργανισμών. Η συμπεριφορά των εντόμων, όπως και σχεδόν όλων των ζώων, μπορεί να καθοριστεί από πτητικές χημικές ενώσεις του περιβάλλοντος (οσμές). Ανάμεσα σε ένα τεράστιο πλήθος διαφορετικών οσμών, κάθε οσμηρό ερέθισμα μπορεί μεταφράζεται σε κάποια ξεχωριστή πληροφορία για το περιβάλλον, διαγράφοντας συγκεκριμένη νευρωνική αναπαράσταση η οποία πυροδοτεί εξειδικευμένη διέγερση του εγκεφάλου και καταλήγει σε κάποια συμπεριφορά. Μάλιστα, η απόκριση σε κάποια οσμή μπορεί να είναι ειδο-ειδική. Δηλαδή, μία οσμή γίνεται αντιληπτή και έχει συγκεκριμένη σημασία μεταξύ ατόμων του ίδιου είδους. Σε μία πληθώρα οσμών σε ορισμένο περιβάλλον, τα άτομα ενός είδους καταφέρνουν να επικοινωνούν τόσο μεταξύ τους όσο και με το περιβάλλον μέσω της χημικής γλώσσας της όσφρησης. Επομένως, η όσφρηση καθίσταται κομβική στην επιβίωση και την αναπαραγωγή, καθοδηγώντας συμπεριφορές όπως εύρεση τροφής, εύρεση συντρόφου, εύρεση υποστρώματος για ωοαπόθεση, αποφυγή θηρευτών.

Η μελέτη του οσφρητικού στα έντομα είναι χρήσιμη καθώς πέρα από την πληθώρα αποκρίσεων σε οσμές διαθέτουν απλούστερο νευρικό σύστημα σε σύγκριση με αυτό των θηλαστικών. Η όσφρηση των ενήλικων εντόμων γίνεται αποκλειστικά στο κεφάλι στα δύο κύρια οσφρητικά όργανα: τις κεραίες (antennae) και τις γναθικές προσαρκτίδες (maxillary palps). (Εικ.3)

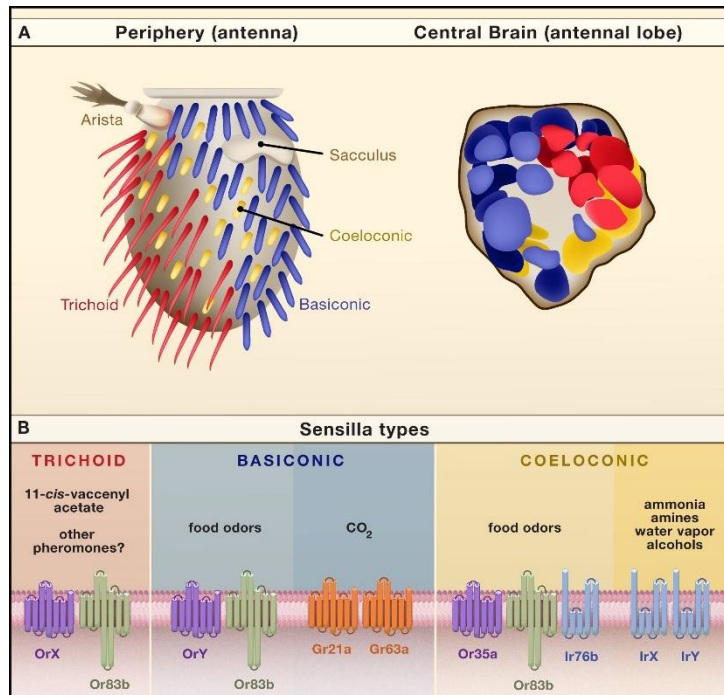


Current Biology

Εικόνα 3: Οσφρητικό μονοπάτι της Δροσόφιλα. (Perisse, Burke, Huetteroth, & Waddell, 2013).

Οι οσμές προσδιορίζονται από τους οσφρητικούς νευρώνες (OSNs, Odorant Sensory Neurons), οι οποίοι μεταφέρουν το μήνυμα στον εγκέφαλο. Διαφορετικοί νευρώνες ανταποκρίνονται σε διαφορετικές οσμές, αλλά και με διαφορές στον τύπο της απόκρισης (διεγερτικά ή ανασταλτικά) και της ένταση αυτής.

Οι οσφρητικοί νευρώνες στεγάζονται και προστατεύονται από τα αισθητικά τριχίδια (sensilla) τα οποία περιβάλλουν τα οσφρητικά όργανα. Τα αισθητικά τριχίδια διακρίνονται σε τρία είδη: α) τριχοειδή (trichoid) , β) βασικονικά (basiconic) και γ) κοιλοκονικά (coelonic). Κάθε είδος διαφέρει ως προς το μέγεθος, τη μορφολογία, την κατανομή στην κεραία και τις ενώσεις που αναγνωρίζουν οι νευρώνες που περιέχουν. (Εικ.4)



Εικόνα 4: Οσφρητικοί υποδοχείς στη Δροσόφιλα. Α) Σχηματική απεικόνιση κεραίας και λοβού (antennal lobe) στη Δροσόφιλα. Τα αισθητικά τριχίδια (Βασικονικά, Τριχοειδή, Κοιλοκονικά) που περιέχουν οσφρητικούς αισθητήριους νευρώνες (OSNs) στην κεραία (αριστερά). Οι άξονες των OSNs που εκφράζουν τον ίδιο οσφρητικό υποδοχέα προβάλλουν σε συγκεκριμένες περιοχές του λοβούστα τριχίδια προβάλλουν σε συγκεκριμένες περιοχές του λοβού ενεργοποιούν συγκεκριμένες περιοχές του εγκεφάλου, σχηματίζοντας τα σπειράματα (δεξιά) Β) έκφραση οσφρητικών υποδοχέων στους διαφορετικούς τύπους τριχιδίων. (Spletter & Luo, 2009)

Η κεραία καλύπτεται και από τα τρία είδη αισθητικών τριχιδίων ενώ οι γναθικές προσακτρίδες είναι πολύ απλούστερες δομές και καλύπτονται μόνο από ένα είδος τριχιδίων, τα μεγάλα βασικονικά (large basiconic). Στο ενήλικο άτομο της *Drosophila melanogaster*, συνολικά, ανά κεραία υπάρχουν 410 αισθητικά τριχίδια που περιέχουν 1200 OSNs, ενώ ανά γναθική προσακτρίδα περίπου 60 τριχίδια που περιέχουν 120 OSNs. (Couto, Alenius, & Dickson, 2005).

Κάθε οσφρητικό τριχίδιο περιλαμβάνει δενδρίτες από ένα έως πέντε οσφρητικούς νευρώνες (Vermeulen & Rospars, 2004). Πιο συγκεκριμένα, τα βασικωνικά sensilla, στεγάζουν δύο έως τέσσερις νευρώνες (Couto, Alenius, & Dickson, 2005) και παρουσιάζουν μεγαλύτερη εξειδίκευση στον εντοπισμό της τροφής ενώ τα τριχοειδή sensilla, στεγάζουν έναν έως τρεις νευρώνες και παρουσιάζουν μεγαλύτερη εξειδίκευση σε φερομόνες. Έτσι, μπορεί να εξηγηθεί γιατί τα αρσενικά έντομα διαθέτουν περισσότερα τριχοειδή sensilla απ' ότι τα θηλυκά αλλά λιγότερα βασικωνικά από αυτά (Laissue & Vosshall, 2008) (Jefferis, o.a., 2007) (Εικ.4).

Οι δενδρίτες ενός αισθητικού τριχιδίου που εκφράζουν τους ίδιους οσφρητικούς υποδοχείς συγκλίνουν σε σφαιρικές δομές στο λοβό του εγκεφάλου (antennal lobe), τα σπειράματα (glomeruli) (Hansson & Stensmyr, 2011). Έτσι, μέσω συνάψεων μεταφέρεται το οσφρητικό σήμα στο κεντρικό τμήμα του εγκεφάλου (Gao, Yuan, & Chess, 2000), Vosshall et al. 2000).

Η δομή των αισθητικών τριχιδίων, παρά τη μεγάλη ποικιλομορφία που διαθέτη, είναι πολύ συντηρημένη μεταξύ των ειδών. Για παράδειγμα, ο λοβός της κεραίας στην *D. melanogaster* έχει περισσότερα από 40 μορφολογικά ίδια σπειράματα, τα οποία εμφανίζουν μεγάλο βαθμό συντήρησης ανάμεσα στα διαφορετικά έντομα ως προς το μέγεθος, το σχήμα και τις θέσεις τους (Laissue & Vosshall, 2008).

#### Μεταγωγή οσφρητικού σήματος στη *Drosophila*

Στην *Drosophila*, κάθε οσφρητικός νευρώνας OSN εκφράζει συνήθως έναν οσφρητικό υποδοχέα OR. Εξαιρέσεις νευρώνων εκφράζουν περισσότερους από έναν ORs (Couto, Alenius, & Dickson, 2005). Η οσμή εισέρχεται μέσω πόρων στα αισθητικά τριχίδια και προσδένεται στους οσφρητικούς υποδοχείς των οσφρητικών νευρώνων είτε με τη βοήθεια οσμοδεσμευτικών πρωτεϊνών (Odorant Binding Proteins, OBPs) είτε με χημιοδεκτικών πρωτεϊνών (Chemosensory Proteins, CSPs) (Laissue & Vosshall, 2008), είτε χωρίς τη συμβολή αυτών.

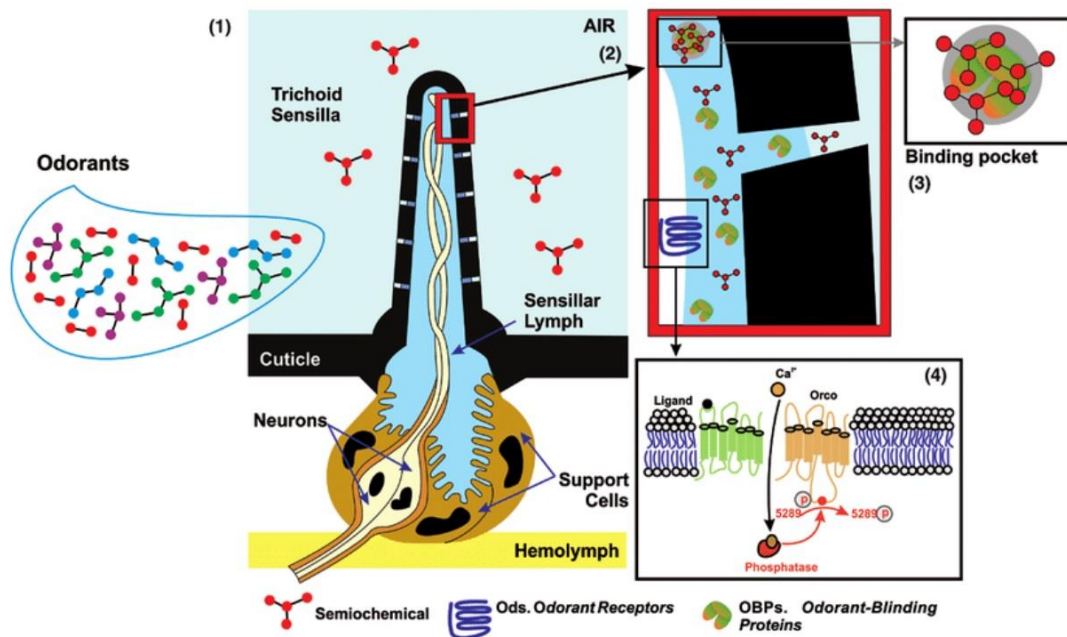
Η δομή των οσφρητικών υποδοχέων ORs μοιάζει με αυτή “ανάποδου” υποδοχέα GPCR των σπονδυλωτών. Αποτελούνται από επτά διαμεμβρανικές περιοχές με το N-τελικό άκρο τους να βρίσκεται εσωκυτταρικά και το C-τελικό άκρο τους εξωκυτταρικά (Lundin, et al., 2007). Πρόκειται για διάυλους κατιόντων  $Ca^{2+}$  και προκειμένου να ενεργοποιηθούν και να επέλθει μεταγωγή σήματος σχηματίζουν ετεροδιμερή σύμπλοκα με τον συντηρημένο σε όλα τα έντομα οσφρητικό συνυποδοχέα, Orco (Odorant co-receptor, OR83b) (Benton, Sachse, Michnick, & Vosshall, 2006).

Όταν προσδένεται η οσμή στο σύμπλοκο OR•Orco τότε αυξάνεται η εισροή ιόντων  $Ca^{2+}$  (Sato, Pellegrino, Nakagawa, Vosshall, & Touhara, 2008). Η εμπλοκή των G πρωτεϊνών στο σηματοδοτικό μονοπάτι παραμένει αμφιλεγόμενη (Yao & Carlson, 2010). Ο ηλεκτροφυσιολογικός έλεγχος αυτών των καναλιών έδειξε πως η ενεργοποίηση των ORs δεν εξαρτάται από δεύτερα μηνύματα μεταγωγής σήματος, όπως το cAMP και το cGMP (Sato, Pellegrino, Nakagawa, Vosshall, & Touhara, 2008). Όμως, η ετερόλογη έκφραση των υποδοχέων και η εφαρμογή οσμής έδειξαν αύξηση της συγκέντρωσης του cAMP και ενεργοποίηση της έκφρασης ενός καναλιού ιόντων ελεγχόμενου από το συνυποδοχέα Orco (Wicher, et al., 2008) Το μονοπάτι ενεργοποιείται και σε περιπτώσεις που η οσμή έχει πολύ χαμηλή συγκέντρωση με αποτέλεσμα να μην μπορεί να ενεργοποιηθεί απευθείας ο OR (Bouchard, 2015). Επίσης, 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, Getahun, Lavista Llanos, Olsson, & Wicher, 2011). Αφού η οσμή προσδεθεί και ενεργοποιήσει τον υποδοχέα διασπάται από ειδικά ένζυμα αποικοδόμησης (Odorant Degrating Enzymes, ODEs) (Vogt & Riddiford, Pheromone binding and inactivation by moth antennae, 1981).

#### Μοριακά συστατικά οσφρητικού συστήματος

Η μεταγωγή σήματος της οσμής από τα αισθητήρια όργανα στον εγκέφαλο για να επιτευχθεί βασίζεται σε διαφορετικά μόρια που συνεργάζονται σε ένα καταρράκτη αντιδράσεων. Αυτά ενέχουν σε μία από τις δύο κατηγορίες: Οσφρητικοί Υποδοχείς (Odorant receptors, ORs) και Οσμοδεσμευτικές πρωτεΐνες (OBPs).





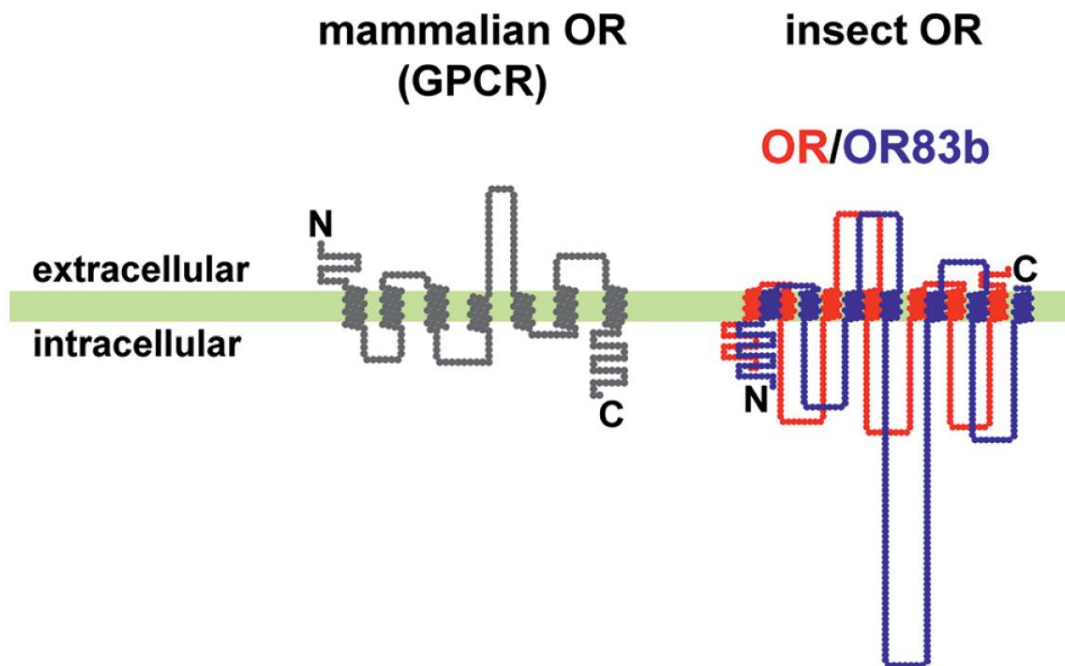
Εικόνα 5: Γενική οργάνωση του οσφρητικού τριχιδίου ενός εντόμου. (1) Μόρια οσμών φτάνουν στο τριχίδιο. (2) Τα μόρια οσμών περνούν στη λέμφου αφού περάσουν μέσα στο τριχίδιο. (3) Τα μόρια οσμών συνδέονται με OBPs και μετά συνδέονται σε ORs. (4) Οι ORs μετατρέπουν το χημικό σήμα σε ηλεκτρικό, που διεγείρει συμπεριφορική απόκριση.

#### Οσφρητικοί υποδοχείς (ORs)

Ο ρόλος των υποδοχέων είναι η διάκριση μεταξύ των οσμών καθώς ανταποκρίνονται σε κάθε οσμή μόνο τα κύτταρα που έχουν τον κατάλληλο υποδοχέα. Επιπλέον ρόλος των υποδοχέων είναι η μεταφορά του σήματος από τον εξωκυττάριο στον ενδοκυττάριο χώρο της μεμβράνης. Έτσι, ενεργοποιείται ο νευρώνας και μεταφέρεται το μήνυμα στον εγκέφαλο οδηγώντας σε συγκεκριμένη απόκριση.

Στο γονιδίωμα της *Drosophila* έχουν ταυτοποιηθεί συνολικά 60 γονίδια τα οποία κωδικοποιούν 62 οσφρητικούς υποδοχείς, με τους 2 να αποτελούν προϊόντα εναλλακτικού ματίσματος (Robertson, Warr, & Carlson, 2003).

Η δομή των οσφρητικών υποδοχέων των εντόμων περιλαμβάνει επτά διαμεμβρανικές περιοχές. Σε αντίθεση με τους υποδοχείς των σπονδυλωτών, στα έντομα δεν υπάρχει ομολογία με τους GPCR υποδοχείς καθώς και φαίνεται να έχουν διαφορετική εξελικτική πορεία από τους χημειούποδοχείς άλλων ζωντανών οργανισμών (Vosshall, Amrein, Morozov, Rzhetsky, & Axel, 2006). Αποτελούν μία καινούργια οικογένεια μεμβρανικών πρωτεϊνών. Η δομή τους μοιάζει με την ανεστραμμένη δομή GPCR υποδοχέων, δηλαδή το αμινικό άκρο έχει κατεύθυνση στο κυτταρόπλασμα αντί για εξωκυτταρικά (Benton, Sachse, Michnick, & Vosshall, 2006) (Winstrand, Käll, & Sonnhhammer). Πρόκειται για προσδετο-εξαρτώμενους διαύλους ιόντων (ligand-gated ion channels) (Sato, Pellegrino, Nakagawa, Vosshall, & Touhara, 2008). Οι αμινοξικές αλληλουχίες των ORs χαρακτηρίζονται από μεγάλη ποικιλομορφία με μόνο περίπου το 20% των αλληλουχιών όμοιο.



Εικόνα 6: Η διακριτή δομή των ORs στα θηλαστικά και τα έντομα (Benton, 2006).

Συγκρίνοντας τα γονίδια *OR* της *Drosophila* με τα αντίστοιχα των θηλαστικών αναδείχθηκε ότι οι γονιδιακές οικογένειές τους δεν εμφανίζουν ομοιότητες στις αλληλουχίες τους (Hallem, Dahanukar, & Carlson, 2006). Στα έντομα, όπως και στα θηλαστικά έχει συντηρηθεί ότι κάθε νευρώνας OSN εκφράζει μόνο έναν ή ένα μικρό αριθμό γονιδίων *OR*. Επιπλέον, διαφορετικά γονίδια υποδοχέων εκφράζονται σε διαφορετικούς υποπληθυσμούς νευρώνων OSNs.

Κάθε υποδοχέας *OR* δεν αναγνωρίζει αποκλειστικά μία οσμή, αλλά μπορεί να ενεργοποιηθεί και με άλλα χημικά ερεθίσματα. Ο συνδυασμός του σήματος που δίνουν οι διάφοροι υποδοχείς δημιουργεί τελικά τη μοναδική αναπαράσταση της κάθε οσμής στον εγκέφαλο (Ache & Young, 2005).

#### Συνυποδοχέας *ORCO*

Ο συνυποδοχέας *OR83b*, γνωστός ως *ORCO* (Odorant receptor co-receptor), είναι μία ιδιαίτερη περίπτωση υποδοχέα. Κωδικοποιείται από υψηλά συντηρημένο γονίδιο που ανήκει στην υπερικογένεια των *ORs* (Krieger, Klink, Mohl, Raming, & Breer, 2003). Ωστόσο διαφέρει από τους άλλους υποδοχείς καθώς εκφράζεται στους περισσότερους νευρώνες μαζί με τους εξειδικευμένους υποδοχείς κάθε νευρώνα (Benton, Sachse, Michnick, & Vosshall, 2006) αλλά δεν αναγνωρίζει κάποια οσμή από μόνος του (Dobritsa, Van der Goes van Nater, Warr, Steinbrecht, & Carlson, 2003) (Hallem, Ho, & Carlson, 2004). Ο *OR83b* αποτελεί υποχρεωτικό συνυποδοχέα για όλους τους κοινούς οσφρητικούς υποδοχείς με τους οποίους σχηματίζει ετεροδιμερές σύμπλοκο στην επιφάνεια των νευρώνων OSN (Larsson, et al., 2004) Η ύπαρξη του *OR83b* είναι αναγκαία για την στόχευση και τη λειτουργική έκφραση των *ORs* σε όλους τους νευρώνες (Benton, Sachse, Michnick, & Vosshall, 2006)

#### Οσμοδεσμευτικές πρωτεΐνες (OBPs)

Οι οσμοδεσμευτικές πρωτεΐνες OBPs είναι μικρές υδατοδιαλυτές, εξωκυττάρειες πρωτεΐνες που εδράζονται στο λεμφικό υγρό που περιβάλλει τους αισθητικούς δενδρίτες. Έχει προταθεί ότι στα ασπόνδυλα έχουν ρόλο στη μεταφορά υδρόφοβων προσδετών, στην αποτροπή της αποικοδόμησης του προσδέτη πριν αυτός ενεργοποιήσει τον αντίστοιχο υποδοχέα αλλά και στην αποικοδόμηση οσμών μετά την ενεργοποίηση και την απομάκρυνση τους από την λέμφο. Συμπληρωματικά, πιθανολογείται ότι δρουν ως συμπαράγοντες για την μεταγωγή σήματος (Steinbrecht, 1998)

Οι περισσότερες OBPs αποτελούνται από ένα βρόχο με έξι α-έλικες που συνδέονται με θηλιές και συγκρατούνται με τρεις δισουλφιδικούς δεσμούς. Σχεδόν όλες οι OBPs έχουν χαρακτηριστικό μοτίβο έξι συντηρημένων κυστεϊνών της μορφής (C<sub>1</sub>-X<sub>20-35</sub>-C<sub>2</sub>-X<sub>3</sub>-C<sub>3</sub>-X<sub>20-30</sub>-C<sub>4</sub>-X<sub>8-12</sub>-C<sub>5</sub>-X<sub>8</sub>-C<sub>6</sub>). Ανάμεσα στη δεύτερη και την τρίτη κυστεΐνη διαμεσολαβούν πάντα τρία αμινοξέα και μεταξύ της πέμπτης και της έκτης πάντα οκτώ (Pelosi, Zhou, Ban, & Calvello, 2006).

Το μέγεθος τους κυμαίνεται μεταξύ 15-20 kDa.

Οι OBPs των εντόμων χωρίζονται σε 5 υποοικογένειες βάσει τις δομής τους: α) κλασσικές OBPs, που διατηρούν τα παραπάνω γνωρίσματα, β) διμερείς OBPs, που φέρουν δύο μοτίβα έξι-κυστεϊνών, γ) τις plus-C OBPs, που φέρουν δύο επιπλέον συντηρημένα κατάλοιπα κυστεΐνης και ένα προλίνης, δ) τις minus-C OBPs, που έχουν δύο λιγότερες συντηρημένες κυστεΐνες και 5) τις ατυπικές OBPs, που φέρουν 9-10 κυστεΐνες και ένα εκτεταμένο C-τελικό άκρο (Liu, et al., 2010)

Ωστόσο, χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες βάσει της δράσης τους: α) πρωτεΐνες που δεσμεύουν φερομόνες (Pheromone Binding Proteins, PBPs), β) πρωτεΐνες δέσμευσης γενικών οσμών (General Odor Binding Proteins, GOBPs) και γ) κεραιο-ειδικές πρωτεΐνες (antennal specific proteins, ASPs). Όπως δηλώνει το όνομα τους, οι PBPs συμβάλλουν στην πρόσληψη της φερομόνης και τη μεταφορά της στους υποδοχείς ενώ οι GOBPs στην πρόσληψη των πτητικών γενικών οσμών. Οι ASPs εκφράζονται σε πολύ υψηλές τιμές στις κεραίες των εντόμων αλλά δεν έχει προσδιοριστεί επακριβώς ο ρόλος τους.

Οι OBPs εκφράζονται στη λέμφο των αισθητικών τριχιδίων στις κεραίες του εντόμου σε αφθονία. Δεσμεύουν ειδικά ένα αρκετά περιορισμένο αριθμό πιθανών προσδετών. Επομένως, οι OBPs αναγνωρίζουν τάξεις δομικά όμοιων οσμών, καθώς και διακρίνουν σημειοχημικές ουσίες (π.χ. φερομόνες) με διαφορετικές χημικές δομές. Παρά τη δομική τους ομολογία φέρουν κοιλώματα δέσμευσης (binding cavities), σε ποικιλία μεγεθών και υδρόφοβα περιβάλλοντα, που μπορούν να συνδέονται με μεγάλο εύρος οργανικών μορίων και παραγόμενων οσμών (Tegoni, Campanacci, & Cambillau, 2004).

#### Γευστικοί υποδοχείς (GRs, Gustatory Receptors):

Οι γευστικοί υποδοχείς μοιάζουν δομικά με τους ORs. Ο ρόλος τους είναι η αναγνώριση γεύσεων μέσω διαφορετικών νευρωνικών μονοπατιών και βρίσκονται σε διαφορετικά σημεία του σώματος του εντόμου (πόδια, φτερά, προβοσκίδα). Όμως, κάποιοι GRs έχουν ρόλο σε οσφρητικά μονοπάτια, ακόμα και σε αυτά αναγνώρισης φερομονών. Για παράδειγμα, ο GR68a στη *Drosophila* σχετίζεται με τη συμπεριφορά των εντόμων κατά τη

σύζευξη. Πιθανώς, είναι ο υποδοχέας κάποιας μη-πτητικής φερομόνης που εκλύει το θηλυκό στο αρσενικό κατά το πρώιμο στάδιο της σύζευξης (Bray & Amrein, 2003)

Γουανυλικές κυκλάσες (GCs):

Οι γουανυλικές κυκλάσες είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που μετατρέπουν την τριφωσφορική γουανοσίνη (GTP) σε μονοφωσφορική κυκλική γουανοσίνη (cGMP). Κάποιες φαίνεται να εμπλέκονται στην αναγνώριση οσμών-φερομονών και στη ρύθμιση αυτής.

Ιονοτροπικοί υποδοχείς (IRs, Ionotropic Receptors):

Οι ιονοτροπικοί υποδοχείς έχουν παρόμοιο ρόλο αλλά διαφορετική δομή από τους ORs. Εντοπίζονται σε κωλοκονικά τριχίδια της κεραίας που δεν εκφράζουν ORs με εξαίρεση του OR35a. Οι προσδέτες των IRs αναγνωρίζονται πολύ ασθενώς ή καθόλου από τους ORs και οι ισχυροί προσδέτες των ORs δεν διεγείρουν τους IRs.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον εμφανίζει το γονίδιο IR84a το οποίο προάγει την σεξουαλική συμπεριφορά στις μύγες σε περιοχές με άφθονες θρεπτικές ουσίες χάρη στην ανίχνευση "αφροδιασιακών" στην τροφή.

Οι IRs υπάρχουν σε όλα τα είδη που έχουν εξεταστεί και ανήκουν στην κατηγορία των πρωτοστόμιων (Rytz, Croset, & Benton, 2013), σε αντίθεση με τους ORs που εντοπίζονται μόνο στα έντομα.

Ένζυμα αποικοδόμησης οσμών (ODEs, Odorant Degrading Enzymes):

Τα ένζυμα αποικοδόμησης οσμών εμποδίζουν την συσσώρευση της οσμής και την παρατεταμένη αλληλεπίδραση με τους υποδοχείς. Όπως υποδηλώνει το όνομα τους, αποικοδομούν τους προσδέτες μετά την αλληλεπίδραση τους με τους υποδοχείς (Vogt, 2003). Τα ένζυμα αυτά εντοπίζονται σε διαλυτή μορφή εξωκυτταρικά ή δεσμευμένα στη μεμβράνη ή το κυτταρόπλασμα ενδοκυτταρικά.

Χημειοδεκτικές πρωτεΐνες (CSPs, Chemosensory Proteins):

Οι πρωτεΐνες CSPs έχουν παρόμοια δράση με τις OBPs, παρά τις διαφορές σε δομή και έκφραση. Συγκεκριμένα, διατηρούν μοτίβο με συντηρημένα τέσσερα (αντί για έξι στις OBPs) κατάλοιπα κυστεΐνης (C<sub>1</sub>-X<sub>6</sub>-C<sub>2</sub>-X<sub>6-18</sub>-C<sub>3</sub>-X<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>) μέσω των οποίων συγκροτούν δύο (αντί για τρεις) δισουλφιδικούς δεσμούς. Επιπλέον, η έκφραση τους δεν περιορίζεται μονάχα στις κεραίες όπως στις OBPs, αλλά παρατηρείται και στα πόδια του εντόμου (Tomaselli, et al., 2006).

Sensory Neuronal Membrane Proteins (SNMPs):

Οι νευρικές αισθητήριες μεμβρανικές πρωτεΐνες είναι αυτές που εκφράζονται στην επιφάνεια των οσφρητικών νευρώνων και οι ρόλοι τους είναι ακόμα υπό διερεύνηση. Έχει προταθεί ότι έχουν δράσει ως υποδοχείς σε λεπιδόπτερα, ότι αλληλεπιδρούν και καθοδηγούν το σύμπλεγμα OBP-προσδέτη ή ότι αλληλεπιδρούν με άλλες πρωτεΐνες των δενδριτών (π.χ. ORs) σχηματίζοντας ετεροδιμερή. Για παράδειγμα, έχει αποδειχθεί στη *Drosophila* πως μία SNMP πρωτεΐνη δρα ως συνυποδοχέας της φερομόνης cVA (Jin, Ha, & Smith, 2008).

## Φρουτόμυγες: Μεσογειακή μύγα και Δάκος της Ελιάς

Η Μύγα της Μεσογείου, δηλαδή το έντομο *Ceratitis capitata*, αποτελεί έναν από τους σοβαρότερους εχθρούς των καλλιεργούμενων φυτών παγκοσμίως. Προσβάλλει πάνω από 350 είδη φυτών και οι ζημιές που προκαλεί ανέρχονται σε αρκετές εκατοντάδες εκατομμύρια δολάρια ετησίως. Πολλές χώρες έχουν ανακηρύξει την Μύγα της Μεσογείου έντομο καραντίνας.

Τα τέσσερα στάδια που διέρχεται η Μύγα της Μεσογείου για να ολοκληρώσει τον βιολογικό της κύκλο είναι: αυγό, προνύμφη, χρυσαλλίδα και τέλειο. Η διάρκειά του εξαρτάται από τις συνθήκες, την εποχή και τις θερμοκρασίες και διαρκεί από 21 έως και 100 ημέρες.

Μετά την σύζευξη των ενηλίκων, το θηλυκό εναποθέτει από 1 έως 14 αυγά ανά θέση στον καρπό, κατά προτίμηση σε σχισίματα ή ευπαθή σημεία της επιδερμίδας. Με την εκκόλαψη των αυγών, βγαίνουν οι νεαρές προνύμφες, οι οποίες κατατρώνουν εσωτερικά τον καρπό. Αφού διέλθουν τρία προνυμφικά στάδια, νυμφώνονται κυρίως στο έδαφος, σε μικρό βάθος. Από εκεί, με μέση θερμοκρασία 24-26°C εντός 6 έως 13 ημερών εξέρχονται τα ενήλικα. Το χειμώνα παραμένει ως προνύμφη στους καρπούς που βρίσκονται στο δέντρο ή στο έδαφος, ενώ σπάνια και ως πλαγγόνα (pupa) ή ακμαίο στο έδαφος. (Carey, et al., 2008)

Εμφανή σημάδια στα σημεία ωθοσείας των προσβεβλημένων καρπών, γύρω από τα οποία μπορεί υπάρχει μερική αποσύνθεση των ιστών ή και δευτερογενής σήψη καθώς και έκκριση μελιτωμάτων μαρτυρούν την προσβολή και ζημιά του καρπού από τη μύγα της μεσογείου. Από τα σημεία προσβολής μπορούν να εισέλθουν μύκητες και βακτήρια. Στους σήποντες καρπούς μπορούν να παρουσιασθούν και δευτερογενείς προσβολές από άλλα έντομα.

Οι ποικίλοι ξενιστές της φρουτόμυγας μπορεί να ανήκουν σε ακρόδρυα, αμπέλι, γιγαρτόκαρπα, εσπεριδοειδή, καρποφόροι θάμνοι, λαχανικά, πυρηνόκαρπα ή και τροπικά – υποτροπικά φυτά. (Liquidó, Shinoda, & Cunningham, 1991)

### Καταπολέμηση

Για την αντιμετώπιση της Μύγας της Μεσογείου χρησιμοποιούνται διάφορα μέσα – χημικά, βιολογικά κ.α. (Leftwich, et al., 2014)

### Βιολογική καταπολέμηση

Τα έντομα *Forpous ceratitivorus*, *Psytalia concolor* έχουν χρησιμοποιηθεί για την καταπολέμηση της Μύγας της Μεσογείου στην Χαβάη και στην Κένυα αντίστοιχα. Η εξαπόλυση των ήταν επιτυχής αλλά το κόστος για την μαζική παραγωγή και διάθεση τους είναι υψηλό.

Αντίθετα, ο εντομοπαθογόνος μύκητας *Beauveria bassiana* χρησιμοποιείται σε διάφορα σκευάσματα για τον έλεγχο των πληθυσμών της Μύγας της Μεσογείου, με ικανοποιητικά αποτελέσματα και λογικό κόστος.

## Βιοτεχνική καταπολέμηση

### 1) Εξαπόλυση στείρων εντόμων (Sterile Insect Technique, SIT)

Η μέθοδος συνίσταται στην εξαπόλυση στειρωμένων ατόμων της Μύγας της Μεσογείου με σκοπό την μείωση της αναπαραγωγικής δυνατότητας αυτής σε μια δεδομένη περιοχή και συνεπώς τον έλεγχο του πληθυσμού της. Εφαρμόζεται με ικανοποιητικά αποτελέσματα.

### 2) Μαζική παγίδευση

Με την μέθοδο της μαζικής παγίδευσης επιχειρείται ο έλεγχος των πληθυσμών της Μύγας της Μεσογείου με την χρήση φερομονικών, τροφικών και χρωματικών παγίδων, οι οποίες χρησιμοποιούνται είτε μόνες είτε σε συνδυασμό. Και αυτή η μέθοδος εφαρμόζεται και αποδίδει ικανοποιητικά αποτελέσματα.

## Χημική καταπολέμηση

### 1) Δολωματικοί ψεκασμοί

Για την πραγματοποίηση των δολωματικών ψεκασμών γίνεται χρήση εντομοκτόνου δραστικής ουσίας μαζί με τροφικό ελκυστικό 2-3% (υδρολυμένη πρωτεΐνη ή κάποιο άλλο τροφικό ελκυστικό) και ψεκάζονται το μη καρποφόρο τμήμα των δέντρων καθώς και το εσωτερικό αυτών.

### 2) Ψεκασμοί κάλυψης

Για την πραγματοποίηση των ψεκασμών κάλυψης γίνεται χρήση εντομοκτόνου δραστικής ουσίας και ψεκάζεται ολόκληρη η επιφάνεια των δέντρων. Οι ψεκασμοί ξεκινούν με την ωρίμανση των καρπών και επαναλαμβάνονται, εφόσον υπάρχει η δυνατότητα, ανά 3 εβδομάδες.

Μερικές από τις εντομοκτόνες δραστικές ουσίες που χρησιμοποιούνται για την καταπολέμηση της Μύγας της Μεσογείου και στους δύο τύπους ψεκασμών είναι:

<b>Δραστική Ουσία</b>	<b>Τύπος εντομοκτόνου</b>
<i>Acetamiprid</i>	Νεονικοτινοειδές
<i>Beta-cyfluthrin</i>	Συνθετικό Πυρεθροειδές
<i>Deltamethrin</i>	Συνθετικό Πυρεθροειδές
<i>Lambda-Cyhalothrin</i>	Συνθετικό Πυρεθροειδές
<i>Malathion</i>	Οργανοφωσφορικό
<i>Phosmet</i>	Οργανοφωσφορικό
<i>Spinosad</i>	Βιο-εντομοκτόνο
<i>Thiacloprid</i>	Νεονικοτινοειδές

Ο Δάκος της Ελιάς αναγνωρίζεται ως ο σημαντικότερος εχθρός των ελαιόδεντρων. Σε περιόδους έξαρσης της προσβολής η ζημιά που προκαλεί, ποσοτική και ποιοτική μπορεί να ανέλθει μέχρι και στο 80% της ελαιοπαραγωγής, ενώ η αντιμετώπισή του συμβάλει σημαντικά στην αύξηση του κόστους της καλλιέργειας.

Τα τέσσερα στάδια που διέρχεται ο Δάκος στο βιολογικό του κύκλο είναι: αβγό, προνύμφη, πλαγγόνα και τέλειο. Η διάρκειά του εξαρτάται από τις συνθήκες, την εποχή και τις θερμοκρασίες και διαρκεί από 30 έως και 90 ημέρες. Μετά την σύζευξη των ενηλίκων, το θηλυκό εναποθέτει 1 αυγό ανά θέση και καρπό.

Με την εκκόλαψη των αυγών, βγαίνουν οι νεαρές προνύμφες, οι οποίες τρώγουν εσωτερικά τον καρπό διανοίγοντας στοές. Αφού διέλθουν τρία προνυμφικά στάδια, νυμφώνονται το καλοκαίρι μέσα στον ίδιο καρπό της ελιάς ενώ το φθινόπωρο η νύμφωση πραγματοποιείται λίγα εκατοστά από την επιφάνεια του έδαφος. Από εκεί, με μέση θερμοκρασία 25 0C, εντός 20 έως 34 ημερών εξέρχονται τα ενήλικα. Το χειμώνα παραμένει ως πλαγγόνα (pupa) στο έδαφος και σε βάθος 1-6 cm ή ως ακμαίο σε προφυλαγμένες θέσεις και σε περιοχές με ήπιους χειμώνες.

Η προσβολή των καρπών φαίνεται με μικρές τριγωνικές κηλίδες στα σημεία ωθοεσίας, συνήθως μια ανά καρπό το καλοκαίρι, ενώ το φθινόπωρο και ιδίως σε περιόδους περιορισμένης ελαιοπαραγωγής, μπορεί να είναι περισσότερες. Οι στοές των προνυμφών στους άγουρους καρπούς μπορεί να γίνουν εξωτερικά αντιληπτές ως ελαιώδεις κηλίδες σκούρου χρώματος. Από τις οπές μπορούν να εισέλθουν παθογόνοι μύκητες με σημαντικότερο τον *Macrophoma dalmatica*, τον οποίον μεταφέρει το δίπτερο *Prolasioptera berlesiana*, προκαλώντας τις ασθένειες 'ξεροβούλα' στις άγουρες και 'σαποβούλα' στις ώριμες ελιές. Τέλος, προ της νυμφώσεως οι προνύμφες ανοίγουν μια στρογγυλή τρύπα στον καρπό της ελιάς, η οποία καλύπτεται μόνο από την εφυμενίδα, για να διευκολυνθεί η έξοδος των ακμαίων. (Katsoyannos, 1992)

### **Καταπολέμηση**

Ο Δάκος της Ελιάς αντιμετωπίζεται με την χρήση διαφόρων μέσων – χημικών, βιολογικών κ.α.

### **Βιολογική καταπολέμηση**

Το έντομο *Psytallia concolor* (συν. *Opius concolor*), έχει δοκιμασθεί για την καταπολέμηση του Δάκου της Ελιάς με πολύ καλά αποτελέσματα. Ωστόσο εξαιτίας του υψηλού κόστους παραγωγής δεν εφαρμόζεται. (Katsoyannos, 1992)

### **Βιοτεχνική καταπολέμηση**

#### 1) Εξαπόλυση στειρών εντόμων

Η μέθοδος συνίσταται στην εξαπόλυση στειρωμένων ατόμων Δάκου της Ελιάς με σκοπό την μείωση της αναπαραγωγικής δυνατότητας αυτού σε μια δεδομένη περιοχή και συνεπώς τον έλεγχο του πληθυσμού της. Εξαιτίας όμως της αρνητικής συζευκτικής συμπεριφοράς των στειρωμένων ατόμων, δεν εφαρμόζεται.

## 2) Μαζική παγίδευση

Με την μέθοδο της μαζικής παγίδευσης επιχειρείται ο έλεγχος των πληθυσμών του Δάκου της Ελιάς με την χρήση φερομονικών, τροφικών και χρωματικών παγίδων, οι οποίες χρησιμοποιούνται είτε μόνες είτε σε συνδυασμό. Η μέθοδος εφαρμόζεται και αποδίδει ικανοποιητικά αποτελέσματα (Haniotakis, Kozyrakis, & Bonatsos, 1986).

### Χημική καταπολέμηση

#### 1) Δολωματικοί ψεκασμοί

Για την πραγματοποίηση των δολωματικών ψεκασμών γίνεται χρήση εντομοκτόνου δραστικής ουσίας μαζί με τροφικό ελκυστικό 2-4% (υδρολυμένη πρωτεΐνη ή κάποιο άλλο τροφικό ελκυστικό) και ψεκάζονται ο κορμός και τμήμα της κόμης κάθε τρίτου δέντρου.

#### 2) Ψεκασμοί κάλυψης

Για την πραγματοποίηση των ψεκασμών κάλυψης γίνεται χρήση εντομοκτόνου δραστικής ουσίας και ψεκάζεται ολόκληρη η επιφάνεια των δέντρων.

Μερικές από τις εντομοκτόνες δραστικές ουσίες που χρησιμοποιούνται για να καταπολεμηθεί ο Δάκος της Ελιάς και στους δύο τύπους ψεκασμών είναι:

<b>Δραστική Ουσία</b>	<b>Τύπος εντομοκτόνου</b>
<i>Alpha-cypermethrin</i>	Συνθετικό Πυρεθροειδές
<i>Beauveria bassiana strain ATCC 74040</i>	Βιο-εντομοκτόνο
<i>Beauveria bassiana strain GHA</i>	Βιο-εντομοκτόνο
<i>Beta-cyfluthrin</i>	Συνθετικό Πυρεθροειδές
<i>Deltamethrin</i>	Συνθετικό Πυρεθροειδές
<i>Dimethoate</i>	Οργανοφωσφορικό
<i>Lambda-Cyhalothrin</i>	Συνθετικό Πυρεθροειδές
<i>Phosmet</i>	Οργανοφωσφορικό
<i>Spinosad</i>	Βιο-εντομοκτόνο
<i>Thiacloprid</i>	Νεονικοτινοειδές



## Σκοπός

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι ο σχεδιασμός νέας γενιάς προσελκυστικών που βασίζονται σε συνθετικά μόρια για να γίνει χρήση τους σε παγίδες. Κάθε συνθετικό μόριο πρόκειται να εξειδικεύεται στην προσέλκυση συγκεκριμένου είδους φρουτόμυγας, ώστε να επιτευχθεί έλεγχος των πληθυσμών με ειδο-ειδικό τρόπο, καθώς θα προσδένεται ισχυρά στους οσφρητικούς υποδοχείς κάθε είδους.

Στα πλαίσια της συγκεκριμένης πτυχιακής έγινε απομόνωση γονιδίων οσφρητικών υποδοχέων της μύγας της μεσογείου και επιλογή γονιδίων οσφρητικών υποδοχέων του δάκου της ελιάς για μελλοντική απομόνωση.

Στόχος της κλωνοποίησης γονιδίων οσφρητικών υποδοχέων είναι η έκφραση τους εκτοπικά σε *D. melanogaster* ώστε να επιτευχθεί η μελέτη τους. Στα στελέχη της δροσόφιλας θα πραγματοποιηθεί ηλεκτροφυσιολογικός έλεγχος για την ενεργοποίηση των υποδοχέων. Με την αναγνώριση των προφίλ ενεργοποίησης κάθε υποδοχέα μπορούν να σχεδιαστούν καινοτόμα μόρια που θα προσδένονται ισχυρά και θα ενεργοποιούν ειδικά τον υποδοχέα αυτό.

## Υλικά και Μέθοδοι

### Απομόνωση νουκλεϊκών οξέων

#### Απομόνωση πλασμιδιακού DNA (Mini preps)

Η διαδικασία στοχεύει στην απομόνωση αποκλειστικά πλασμιδιακού DNA από υγρή βακτηριακή καλλιέργεια κυττάρων DH5α ή XL1-Blue . Η αποτελεσματική απομόνωση πλασμιδιακού DNA περιλαμβάνει α) ανάπτυξη βακτηριακής καλλιέργειας, β) λύση βακτηριακών κυττάρων, γ) απενεργοποίηση των κυτταρικών νουκλεασών και δ) διαχωρισμό του πλασμιδιακού DNA από κυτταρικά υπολείμματα (χρωμοσωμικό DNA και πρωτεΐνες).

Η καλλιέργεια των μετασχηματισμένων βακτηρίων πραγματοποιείται σε θρεπτικό μέσο LB που έχει προσθεθεί 50μg/ml αμπικιλίνης. Τόσο το πλασμίδιο pBS όσο και το πλασμίδιο pUAST περιέχουν γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη. Έτσι, αποφεύγεται η ανάπτυξη μη μετασχηματισμένων βακτηρίων.

Η λύση των κυττάρων πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο αλκαλικής λύσης με ή χωρίς την χρήση kit.

Το πρωτόκολλο που ακολουθεί αποτελεί τροποποίηση των μεθόδων των Birnboim & Doly (1979) και Ish-Horowicz & Burke (1981). (Sambrook, 1989)

Υλικά
<b>Solution I (Διάλυμα λύσης)</b>
<b>Solution II (αλκαλικό διάλυμα)</b>
<b>Solution III (διάλυμα εξουδετέρωσης)</b>
<b>Οξικό νάτριο (CH<sub>3</sub>COONa) pH 5.2</b>
<b>Absolute αιθανόλη</b>
<b>Αιθανόλη 70%</b>
<b>Γλυκογόνο</b>
<b>H<sub>2</sub>O με RNAase</b>

#### Μεθοδολογία

- 1) Ενοφθαλμισμός μεμονωμένου μετασχηματισμένου βακτηριακού κλώνου σε θρεπτικό μέσο LB εμπλουτισμένο με αμπικιλίνη. Επώαση overnight (16 ώρες) στους 37°C υπό ανάδευση (210rpm).
- 2) Μεταφορά σε σωληνάκι τύπου erpendorf 1,5ml κορεσμένης αποικίας. Φυγοκέντρηση σε 12.000g για 30 δευτερόλεπτα στους 4°C. Αποθήκευση υπολειπόμενης καλλιέργειας στους 4°C.
- 3) Απόρριψη υπερκειμένου αφήνοντας το ίζημα όσο πιο στεγνό είναι δυνατόν δουλεύοντας στον πάγο.
- 4) Επαναδιάλυση ιζήματος σε 100μl παγωμένου διαλύματος I (50 mM glucose, 10 mM EDTA, 25 mM Tris-HCl pH 8.0) με ανάδευση στο vortex. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 3-5 λεπτά.

- 5) Προσθήκη 200μl από πρόσφατα παρασκευασμένο διαλύματος II (0.2 N NaOH, 1% SDS). Γίνεται μίξη του περιεχομένου αναποδογυρίζοντας το σωληνάκι erpendorf για πέντε φορές. Ακολουθεί επώαση στον πάγο.
- 6) Προσθήκη 150μl (3M) παγωμένου διαλύματος III ( 5M potassium acetate, glacial acetic acid, H<sub>2</sub>O). Ήπια ανάδευση περιεχομένου με ανεστραμμένο erpendorf για 10 δευτερόλεπτα. Επώαση για 3-5 λεπτά.
- 7) Φυγοκέντρηση σε 12.000g για 5 λεπτά στην ψυχόμενη φυγόκεντρο (4°C). Μεταφορά υπερκειμένου σε νέο σωληνάκι erpendorf.
- 8) Προσθήκη ίσου όγκου PCI (phenol:chloroform:isoamyl alcohol) και ανάδευση με vortex. Φυγοκέντρηση 12.000g για 2 λεπτά στους 4°C.
- 9) Μεταφορά οργανικής φάσης όγκου V σε νέο erpendorf.
- 10) Κατακρήμνιση DNA με προσθήκη 2V απόλυτης αιθανόλης, 0,1V CH<sub>3</sub>COONa, 4μl γλυκογόνου
- 11) Φυγοκέντρηση σε 12.000g για 5 λεπτά στην ψυχόμενη φυγόκεντρο (4°C).
- 12) Απόρριψη υπερκειμένου και προσθήκη 70% αιθανόλης στους 4°C.
- 13) Απόρριψη υπερκειμένου και στέγνωμα του ιζήματος σε ξηραντήρα κενού. Αναδιάλυση σε 50μl H<sub>2</sub>O που περιέχει RNAase (20μg/ml).
- 14) Αποθήκευση DNA στους -20°C.

### Χειρισμός νουκλεϊκών οξέων

#### Κατακρήμνιση DNA

Η κατακρήμνιση του DNA επιτρέπει την συμπύκνωση καθώς και τον καθαρισμό των νουκλεϊκών οξέων ενός διαλύματος. Επιτυγχάνεται με την χρήση αλκοόλης (συνήθως αιθανόλη ή προπανόλη) και άλατος.

Το υδρόφιλο DNA διαλύεται στο νερό όχι όμως σε αλκοολικό διάλυμα. Η αλκοόλη και το άλας μειώνουν τη διαλυτότητα του οδηγώντας στην κατακρήμνιση του.

Υλικά
<b>Ισοπροπανόλη ή αιθανόλη 100%</b>
<b>CH<sub>3</sub>COONa 3M pH 3,4</b>
<b>Γλυκογόνο 20mg/ml</b>
<b>Αιθανόλη 70%</b>

#### Μεθοδολογία

Για διάλυμα όγκου V:

- 1) Προσθήκη 1V ισοπροπανόλης ή 2,5V παγωμένης αιθανόλης
- 2) Προσθήκη 0.1V CH<sub>3</sub>COONa ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 0.3M
- 3) Προσθήκη γλυκογόνου (carrier)
- 4) Επώαση μείγματος σε θερμοκρασία δωματίου
- 5) Φυγοκέντρηση για 10 λεπτά, 14.000rpm στους 4°C και απόρριψη υπερκειμένου
- 6) Προσθήκη 1 ml αιθανόλης 70%
- 7) Απόρριψη υπερκειμένου: Το υπερκείμενο απορρίπτεται με προσοχή γιατί το ίζημα μπορεί να αποκολληθεί από τα τοιχώματα του erpendorf. Αυτό επιτυγχάνεται με την χρήση tip και όχι απευθείας απόχυση του υπερκειμένου

8) Στέγνωμα ιζήματος σε ξηραντήρα κενού και επαναδιάλυση με H<sub>2</sub>O.

#### Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση είναι μία μέθοδος διαχωρισμού, οπτικοποίησης και απομόνωσης μορίων. Συνήθως χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό του μεγέθους και της καθαρότητας ενός δείγματος. Η μέθοδος βασίζεται στην αρχή μετανάστευσης φορτισμένων μορίων υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Η ηλεκτροστατική δύναμη που αναπτύσσεται κατευθύνει τα φορτισμένα μόρια προς το ηλεκτρόδιο του αντίθετου φορτίου. Τα μόρια μετακινούνται μέσα σε πήκτωμα όχι συμπαγές αλλά με πόρους, για παράδειγμα αγαρόζης. Λόγω των διαφορετικών φορτίων και μαζών, τα διάφορα μόρια θα κινηθούν με διαφορετικές ταχύτητες.

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης χρησιμοποιείται κυρίως για διαχωρισμό δίκλωνου DNA σε ουδέτερο pH. Υπό αυτές τις συνθήκες το DNA φέρει αρνητικό φορτίο λόγω των φωσφορικών ομάδων. Επομένως, τα τμήματα DNA στην κάθοδο (-) θα μετακινηθούν προς την άνοδο (+).

Η ηλεκτροφορητική ικανότητα του DNA εξαρτάται από α) το μέγεθος του DNA, β) τη συγκέντρωση της αγαρόζης, γ) τη στερεοδιάταξη του DNA, δ) την τάση του ηλεκτρικού πεδίου, ε) την παρουσία χρωστικών, ζ) τη σύσταση και ισχύ του διαλύματος ηλεκτροφόρησης.

<b>Υλικά</b>
<b>Αγαρόζη 10mg/ml</b>
<b>Διάλυμα TBE 5X (Tris , EDTA 0,5M pH 8, Boric acid)</b>
<b>Βρωμιούχο αιθίδιο</b>
<b>Μάρτυρας (Ladder)</b>
<b>Χρωστική φόρτισης (gel loading) 6X</b>

#### Μεθοδολογία

Παρασκευή 1% ηηκτώματος αγαρόζης και ηλεκτροφόρηση

- 1) Ζύγισμα επιθυμητής ποσότητας σκόνης αγαρόζης.
- 2) Προσθήκη σε κωνική φιάλη σκόνης αγαρόζης και της επιθυμητής ποσότητας ρυθμιστικού διαλύματος. Για παράδειγμα, για 100ml ηηκτώματος γίνεται ανάμιξη 10 ml 5X TBE, 90 ml απιονισμένο νερό και 1g αγαρόζης.
- 3) Θέρμανση έως την διάλυση της αγαρόζης. Σποραδικές ανακινήσεις της φιάλης για την ομοιόμορφη διάλυση.
- 4) Κατέβασμα της θερμοκρασίας σε επίπεδα ανεκτά για το δέρμα (~50 °C). Η φιάλη πρέπει να είναι σε συνεχή ανάδευση.
- 5) Προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου.
- 6) Απόχυση διαλύματος στη βάση πολυμερισμού αφού έχουμε διαλέξει το επιθυμητό «χτενάκι» για το σχηματισμό των ηηγαδίων, θέσεων φόρτωσης των δειγμάτων.
- 7) Αφού στερεοποιηθεί ηηκτωμα, αφαιρούνται με προσοχή τα χτενάκια και το ηηκτωμα μεταφέρεται στην ηλεκτροφορητική συσκευή η οποία περιέχει το ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα. Το ρυθμιστικό διάλυμα πρέπει να καλύπτει το ηηκτωμα.

- 8) Προσθήκη χρωστικής στα δείγματα.  
Σημείωση: Η ποσότητα του DNA που φορτώνουμε πρέπει να μην είναι μικρότερη από 1γ αλλά ούτε και αρκετά μεγάλη. Στην πρώτη περίπτωση δεν θα είναι δυνατή η εμφάνιση του ενώ στην δεύτερη δεν θα γίνει σωστός διαχωρισμός των μορίων.
- 9) Εφαρμογή ηλεκτρική τάσης μέχρι να διαχωριστούν επαρκώς οι διαφορετικές μπάντες.
- 10) Παρατήρηση και φωτογράφιση ηλεκτώματος με την χρήση υπεριώδους ακτινοβολίας.
- 11) Αν χρειάζεται να απομονωθεί συγκεκριμένη ζώνη DNA από το ηλεκτώμα τότε γίνεται αποκοπή της με ξυράφι. Χρειάζεται προσοχή και αμεσότητα. Όσο περισσότερο εκτίθεται το DNA σε υπεριώδη ακτινοβολία αυξάνεται η πιθανότητα μετάλλαξης του. Το κομμάτι που αποκόβεται τοποθετείται σε σωληνάκι τύπου erpendorf 1.5ml.
- 12) Το DNA μπορεί να διατηρηθεί στους 4 °C.

#### Ανάκτηση DNA από ηλεκτώμα αγαρόζης

Η ανάκτηση DNA από ηλεκτώμα αγαρόζης (gel extraction) είναι η τεχνική απομόνωσης και καθαρισμού ενός επιθυμητού θραύσματος DNA από το ηλεκτώμα αγαρόζης ύστερα από ηλεκτροφόρηση. Με την ηλεκτροφόρηση έχει γίνει ο διαχωρισμός των τμημάτων σε ζώνες και με την ολοκλήρωση της μπορεί να γίνει αποκοπή συγκεκριμένης ζώνης. Στο τμήμα του ηλεκτώματος που απομονώνεται μπορεί να ακολουθήσει η ανάκτηση του DNA.

Για την ανάκτηση DNA χρησιμοποιήθηκε το clean up kit των Macherey-Nagel.

Τα kit που έχουν παρασκευαστεί από εταιρίες περιλαμβάνουν τα εξής βήματα: την τήξη του ηλεκτώματος σε διάλυμα που συνήθως περιέχει ισόθειο-κυανίνη γουανιδίνη, τη σύνδεση του DNA σε μεμβράνη/στήλη παρουσία χρομοσομικών αλάτων και την έκλυση του DNA με απιονισμένο αποστειρωμένο νερό.

#### Μεθοδολογία

- 1) Αποκοπή και ζύγισμα κομματιού ηλεκτώματος που τοποθετείται σε σωλήνα τύπου erpendorf.  
Σημείωση: Ελαχιστοποίηση του χρόνου έκθεσης UV για την αποφυγή μετάλλαξης του DNA.
- 2) Προσθήκη διαλύματος 200μl Buffer NT1 ανά 100mg ηλεκτώματος.
- 3) Επώαση στους 50°C μέχρι την τήξη του ηλεκτώματος (περίπου για 5-10 λεπτά)
- 4) Τοποθέτηση της στήλης σε σωλήνα συλλογής (2ml). Φόρτωση μέχρι 700μl δείγματος για σύνδεση του DNA στη στήλη. Φυγοκέντρηση για 30s στα 11.000g. Απόρριψη του υγρού και επανατοποθέτηση στήλης στο σωλήνα συλλογής.  
Αν η ποσότητα του διαλύματος DNA είναι μεγαλύτερη από την επιτρεπτή το βήμα επαναλαμβάνεται.
- 5) Προσθήκη 700μl Buffer NT3. Φυγοκέντρηση για 30s στα 11.000g. Απόρριψη του υγρού και επανατοποθέτηση στήλης στο σωλήνα συλλογής.  
Το βήμα αυτό επαναλαμβάνεται μία φορά.
- 6) Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στα 11.000g για απομάκρυνση Buffer NT3
- 7) Επώαση στήλης στους 70°C για 2-5min.

- 8) Μεταφορά στήλης σε Eppendorf 1.5ml για την έκλουση του DNA. Προσθήκη 25μl ζεστού ddH<sub>2</sub>O (70°C) και επώαση της στήλης στους 70°C για 5 λεπτά. Φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στα 11.000g.

Το βήμα αυτό επαναλαμβάνεται.

Σημείωση: Η έκλουση με ζεστό νερό και η σταδιακή έκλουση με επώσεις της στήλης αυξάνουν την απόδοση της τεχνικής

- 9) Μέτρηση συγκέντρωσης DNA, για παράδειγμα με την χρήση του Quawell

#### Πέψη με ένζυμα περιορισμού

Τα ένζυμα περιορισμού είναι ειδικές ενδονουκλεάσες που αναγνωρίζουν συγκεκριμένες παλίνδρομες αλληλουχίες νουκλεοτιδίων στο DNA και δημιουργούν τομές σε αυτό αφήνοντας το με μονόκλινα συμπληρωματικά άκρα ή δίκλινα τυφλά άκρα. Οι θέσεις που αναγνωρίζουν ονομάζονται θέσεις περιορισμού και έχουν μήκος 4-8 νουκλεοτίδια.

Τα ένζυμα αυτά απομονώνονται από προκαρυωτικούς οργανισμούς και ο φυσιολογικός τους ρόλος είναι η προστασία έναντι εισβολής βακτηριοφάγων. Κατακερματίζουν το εισερχόμενο γονιδίωμα ενώ το βακτηριακό DNA προστατεύεται λόγω των μεθυλιωμένων θέσεων αναγνώρισης των ενδονουκλεασών.

Η δράση κάθε ενζύμου εξαρτάται από την θερμοκρασία επώασης και από τη σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος. Το ρυθμιστικό διάλυμα καθορίζει το pH και την ιοντική ισχύ του περιβάλλοντος. Το pH διατηρείται σταθερό από την παρουσία Tris-HCl. Η ιοντική ισχύς καθορίζεται κυρίως από τα ιόντα Mg<sup>+2</sup> και Na<sup>+</sup> και μπορεί να είναι υψηλή, μέση ή υψηλή.

Για τον σχεδιασμό αντίδρασης πέψης χρειάζεται ο υπολογισμός της κατάλληλης ποσότητας ενζύμου. Η ποσότητα του ενζύμου που απαιτείται εξαρτάται από την ενεργότητα αυτού και της ποσότητας και του μεγέθους του προς κατάτμηση DNA. Πληροφορίες για την ενεργότητα ενός ενζύμου και τις ιδανικές συνθήκες επώασης παρέχονται από την εταιρία από την οποία διατίθεται το ένζυμο. Επιπλέον, πρέπει να λαμβάνεται υπόψιν ο όγκος του ενζύμου να μην ξεπερνά το 1/10 του όγκου της αντίδρασης, γιατί η γλυκερόλη που περιέχεται στο διάλυμα του ενζύμου μπορεί να δρά ανασταλτικά στην αντίδραση.

<b>ΥΛΙΚΑ</b>
<b>DNA</b>
<b>Ένζυμο/α περιορισμού</b>
<b>Ρυθμιστικό διάλυμα, συγκεκριμένο για το εκάστοτε ένζυμο ή συνδυασμό ενζύμων</b>
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>

#### Μεθοδολογία

- 1) Σχεδιασμός αντίδρασης και ανάμειξη DNA, ενζύμου, ρυθμιστικού διαλύματος και συμπλήρωση νερού αν χρειάζεται σε σωληνάκι eppendorf ή PCR.
- 2) Επώαση στην βέλτιστη θερμοκρασία του ενζύμου για όσο χρόνο είναι απαραίτητο, ανάλογα την ποσότητα του προς κατάτμηση DNA, την ποσότητα και ενεργότητα του ενζύμου

### Ποσοτικοποίηση DNA

Η ποσοτικοποίηση μπορεί να γίνει εμπειρικά μέσω της παρατήρησης της ζώνης μετά από ηλεκτροφόρηση αλλά και με την χρήση μηχανημάτων όπως η συσκευή Quawell.

Η συσκευή Quawell είναι φωτόμετρο υπεριώδους ακτινοβολίας (260nm και 280nm). Χρησιμοποιείται για την ποσοτικοποίηση νουκλεϊκών οξέων και πρωτεϊνών (dsDNA, ssDNA, RNA and Protein 280nm). Με 1-2μl δείγματος άμεσα, με ακρίβεια και επαναληψιμότητα, μετρά τη συγκέντρωση (ng/μl).

Επιπλέον, υπολογίζεται ο λόγος απορρόφησης A260/A280 που είναι χρήσιμος ως ένδειξη για την καθαρότητα του δείγματος αλλά και την ακρίβεια της μέτρησης που καταγράφεται. Ο λόγος ενδείκνυται να κυμαίνεται από 1.8 έως 2. Ο λόγος 1.8 γενικά θεωρείται «καθαρό» DNA και ο λόγος 2 «καθαρό» RNA. Σε κάθε περίπτωση χαμηλότερος λόγος σηματοδοτεί την παρουσία πρωτεΐνης, φαινόλης ή άλλων προσμίξεων που απορροφούν στα 280 nm.

### Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αποτελεί μια γρήγορη, εύκολη και οικονομική τεχνική που επιτρέπει τον ενζυμικό πολλαπλασιασμό επιλεγμένων αλληλουχιών DNA in vitro, χωρίς την χρήση ζωντανών οργανισμών. Αναπτύχθηκε την δεκαετία του '80 από τον Kary Mullis. Είναι μία επιλεκτική και με μεγάλη ευαισθησία μέθοδος, καθώς έχει δυνατότητα ανίχνευσης και ενίσχυσης αλληλουχίας από ένα μόνο μόριο. (Mullis K.B., 1986)

Η μέθοδος βασίζεται στην επαναλαμβανόμενη αντιγραφή ενός τμήματος DNA με την βοήθεια μιας θερμοανθεκτικής πολυμεράσης και δύο ολιγονουκλεοτιδικών εκκινήτων. Σε κάθε κύκλο ο νεοσυντιθέμενος κλώνος λειτουργεί ως εκμαγείο για τη σύνθεση νέων, πολλαπλασιάζοντας εκθετικά την αλληλουχία στόχο.

Ένας κύκλος PCR περιλαμβάνει τρία κύρια στάδια:

**Αποδιάταξη:** Στο στάδιο αυτό αποδιατάσσεται το δίκλωνο DNA στις δύο μονόκλωνες αλυσίδες του, σε υψηλή θερμοκρασία 94-95°C.

**Υβριδοποίηση:** Στο στάδιο αυτό υβριδοποιούνται οι εκκινήτες (primers) στις αποδιαταγμένες αλυσίδες.

Η θερμοκρασία υβριδοποίησης ( $T_a$ ) εξαρτάται από την θερμοκρασία τήξης των εκκινήτων ( $T_m$ ).

Η  $T_m$  υπολογίζεται με τον τύπο:

$T_m = 4 * (\text{αριθμός βάσεων G+C}) + (\text{αριθμός βάσεων A+T})$ , ενώ η  $T_a$  ισούται με  $T_m - 5$  (Thein, 1986)

**Επιμήκυνση:** Στο στάδιο αυτό δρα το ένζυμο Taq πολυμεράση, το οποίο αναγνωρίζοντας τους εκκινήτες επιμηκύνει την επιθυμητή αλληλουχία. Η θερμοκρασία για την αντίδραση επιμήκυνσης είναι 72-74°C.

Ο αριθμός των κύκλων ρυθμίζεται βάσει το μέγεθος του επιθυμητού προϊόντος. Βέβαια, μετά τους 30 κύκλους η μέθοδος εμφανίζει συχνά λάθη. Ο υπολογισμός των τελικών

αντιγράφων της αλληλουχίας προκύπτει ως 2<sup>ν</sup> αντίγραφα του κάθε αρχικού μορίου DNA, όπου ν οι κύκλοι της PCR.

Στάδια μιας τυπικής αντίδρασης PCR

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

Υλικά
DNA
Εκκινητές (Forward και Reverse)
dNTPs
DNA Taq πολυμεράση
Ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμου (Buffer)
MgCl <sub>2</sub>

Μεθοδολογία

- 1) Σχεδιασμός της αντίδρασης

Υλικά	Carχικό	CTελικό	Ποσότητα
DNA	-	10-40ng	εξαρτάται από Carχ
Buffer	10X	1X	2μL
dNTPs	40mM	0,8Mm	0,4μL
εκκινητής F	10pmol/μL	0,4-0,6μM	0,7μL
εκκινητής R	10pmol/μL	0,4-0,6μM	0,7μL
Taq πολυμεράση	5units/μL	1unit	0,2μL
ddH <sub>2</sub> O	-	-	Up to 20μl

- 2) Εισαγωγή όλων των συστατικών σε σωληνάκια PCR, δουλεύοντας στον πάγο.
- 3) Τα σωληνάκια PCR τοποθετούνται στον θερμοκυκλοποιητή με το κατάλληλο πρόγραμμα και αφήνονται να επωάσουν για όση ώρα χρειάζεται.



## Εκκινητές οσφρητικών υποδοχών

Για την κλωνοποίηση των γονιδίων των υποδοχών είναι αναγκαία η ενσωμάτωση τους σε πλασμιδιακούς φορείς. Για την υποβοήθηση της αντίδρασης σύνδεσης, που θα περιγραφεί παρακάτω, είναι χρήσιμη η παραγωγή μονόκλωνων συμπληρωματικών «κολλώδη» άκρων μεταξύ του πλασμιδίου και του προς ενσωμάτωση DNA. Για να επιτευχθεί αυτό μπορούν και τα δύο είδη DNA να κοπούν με τα ίδια περιοριστικά ένζυμα.

Επιπλέον, με την χρήση διαφορετικού ενζύμου για κάθε άκρο επιτυγχάνεται η προσανατολισμένη ενσωμάτωση του ενθέματος στο πλασμίδιο.

## Κλωνοποίηση DNA

Με τη μοριακή κλωνοποίηση επιδιώκεται η αντιγραφή μορίων ή γονιδίων με σκοπό την ευχερέστερη μελέτη τους ή εκμετάλλευσή τους. Η διαδικασία της κλωνοποίησης αφορά την εισαγωγή τμήματος DNA σε φορέα, συνήθως πλασμιδιακού, και ακολούθως την εισαγωγή του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου εντός ορισμένης κυτταρικής σειράς. Η διαδικασία περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

1. Αντίδραση σύνδεσης μορίων DNA σε πλασμιδιακό φορέα (ligation).
2. Παρασκευή δεκτικών κυττάρων για ηλεκτροδιάτρηση.
3. Μετασχηματισμός κυττάρων με ηλεκτροδιάτρηση.
4. Καλλιέργεια μετασχηματισμένων κυττάρων και διάκριση ανασυνδυασμένων κλώνων.

### Αντίδραση σύνδεσης μορίων DNA σε πλασμιδιακό φορέα (Ligation)

Η αντίδραση σύνδεσης μορίων DNA σε πλασμιδιακό φορέα είναι η αντίδραση για την κατασκευή ενός ανασυνδυασμένου πλασμιδίου. Πρόκειται για μία διαμοριακή αντίδραση μεταξύ των άκρων γραμμικού πλασμιδιακού φορέα και ενθέματος με τη δράση της DNA λιγάσης. Η σύνδεση πραγματοποιείται με το σχηματισμό τεσσάρων φωσφοδιεστερικών δεσμών μεταξύ των 5' φωσφορικών καταλοίπων και των 3' υδροξυλομάδων.

Η ταχύτητα και η φύση της αντίδρασης σύνδεσης τμημάτων DNA επηρεάζεται από μία σειρά παραμέτρων όπως: η θερμοκρασία, η συγκέντρωση ιόντων, το είδος των άκρων του DNA (κολλώδη ή τυφλά), η σχετική συγκέντρωση των άκρων του DNA και η συγκέντρωση και το μοριακό βάρος των τμημάτων DNA.

Η αντίδραση πραγματοποιείται στην βέλτιστη θερμοκρασία δράσης του ενζύμου (37°C). Ως αναφορά την συγκέντρωση των δύο άκρων μιας τυχαίας έλικας DNA και την ολική συγκέντρωση άκρων που βρίσκονται στην αντίδραση, ο μοριακός λογος ενθέμα/πλασμίδιο θα πρέπει να είναι από 1:1 έως 7:1 ενώ η ποσότητα του DNA που κλωνοποιείται υπολογίζεται από τον τύπο  $ng\ DNA = ng\ \text{πλασμιδίου} \times a \times b$ , όπου  $a$  ο μοριακός λογος ενθέμα/πλασμίδιο και  $b$  ο λόγος μεγέθους ενθέμα/πλασμίδιο. Τα άκρα μέσα σε μία αντίδραση πρέπει να είναι κοντά ώστε η λιγάση να καταλύσει την σύνδεση τους.

Ένα πλασμίδιο στη γραμμική του μορφή μπορεί να έχει είτε συμπληρωματικά, είτε τυφλά άκρα. Σε κάθε περίπτωση αλλάζει η προσέγγιση για την εισαγωγή του ενθέματος. Στην συγκεκριμένη περίπτωση τα άκρα είναι κολλώδη από πέψη με περιοριστικά ένζυμα που προηγήθηκε. Μάλιστα κάθε άκρο έχει διαφορετικό προεξέχων άκρο που προέκυψε από

δύο διαφορετικά ένζυμα. Με τα ίδια δύο περιοριστικά ένζυμα δημιουργήθηκαν τα ίδια κολλώδη άκρα και στον φορέα.

Στην παρούσα μεθοδολογία ως ένζυμο χρησιμοποιείται η T4 DNA λιγάση, λόγω της ικανότητας της να καταλύει τη σύνδεση άκρων όλων των ειδών (τυφλά, προεξέχοντα) (Sgaramella, 1978). Ως φορέας χρησιμοποιείται είτε ο pBLUESCRIPT για το μέγεθος του είτε ο pUAST που είναι ο τελικός επιθυμητός φορέας κλωνοποίησης. Είναι σημαντικός για ενέσης σε δροσόφιλα που είναι μετέπειτα στόχος.

Υλικά	Ποσότητες
DNA δείγματος (ένθεμα)	ng υπολογίζονται από τύπο
Φορέας κλωνοποίησης	50ng συνήθως
T4 DNA λιγάση (1U/μL)	1μL (1u)
Ρυθμιστικό διάλυμα T4 λιγάσης (10X)	2μL (1X)
ddH <sub>2</sub> O	Up to 20μl

#### Μεθοδολογία

Για την επιτυχή έκβαση της αντίδρασης σύνδεσης έχει υπολογιστεί πως ο μοριακός λόγος ενθέματος-πλασμιδίου πρέπει να κυμαίνεται από 1:1 έως 7:1, με την ποσότητα του φορέα να υπολογίζεται συνήθως σε 50ng.

Η ποσότητας του ενθέματος που θα προστεθεί στην αντίδραση υπολογίζεται από τον τύπος:

$$ng \text{ ενθέματος} = [ng \text{ φορέα} * (bp \text{ ενθέματος} / bp \text{ φορέα})] * \text{μορ. λόγος ενθέματος-πλασμιδίου}$$

- 1) Υπολογισμός ποσότητας φορέα και ενθέματος (από τον τύπο) και του ενζύμου βάσει της ενεργότητας του
- 2) Εισαγωγή όλων των συστατικών της αντίδρασης σε σωληνάκι για PCR, δουλεύοντας στον πάγο
- 3) Συμπλήρωση με ddH<sub>2</sub>O μέχρι 20μl αν είναι απαραίτητο
- 4) Gently mix the reaction by pipetting up and down and microfuge briefly.
- 5) Επώαση για 16h στους 16°C.
- 6) Απενεργοποίηση της λιγάσης στους 65°C για 10 λεπτά

#### Πλασμιδιακοί φορείς

##### *pBluescript II KS (+)*

Ο συγκεκριμένος πλασμιδιακός τύπος είναι σχεδιασμένος για βακτηριακή έκφραση. Έχει μέγεθος 2961 bp καθώς και ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη.

Πρόκειται για ένα τυπικό φορέα κλωνοποίησης.

##### *pUAST: P element-based φορέας για Gal4-ελεγχόμενη έκφραση γονιδίων στη Δροσόφιλα*

Ο συγκεκριμένος πλασμιδιακός τύπος είναι σχεδιασμένος για έκφραση σε έντομα και συγκεκριμένα στη Δροσόφιλα. Έχει μέγεθος 8904 bp καθώς και ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη.

Ο pUAST σχεδιάστηκε από τους Brand και Perimon (1993) ώστε να αποτελείται από πέντε διαδοχικά παρατεταγμένες θέσεις σύνδεσης GAL4 που ακολουθούνται από το TATA box και την έναρξη μεταγραφής της hsp70, από πολυσυνδέτη που περιέχει μοναδικές θέσεις περιορισμού για for EcoRI, BglII, NotI, Xho, KpnI and XbaI, από την αλληλουχία του T ιντρονίου της SV40 και τέλος μία θέση πολυαδενυλίωσης. Όλα αυτά περιλαμβάνονται σε ένα φορέα που περιέχει το στοιχείο P. Ο συγκεκριμένος P-element φορέας, pCaSpeR3, περιέχει τα άκρα P3' και P5' καθώς και ένα γονίδιο-δείκτη για επιτυχή ενσωμάτωση στο γονιδίωμα της *Drosophila*.

Στην Δροσόφιλα δεν παρατηρείται ομόλογος ανασυνδυασμός μεταξύ εξωγενών αλληλουχιών και του γονιδιώματος και επιπλέον δεν υπάρχουν εξωχρωμοσωμικοί φορείς. Για να επιτύχουμε ενσωμάτωση κλωνοποιημένης περιοχής στο γονιδίωμα χρησιμοποιούμε φορείς που περιέχουν το στοιχείο P, ένα μεταθετό στοιχείο της μύγας που μπορεί να «μεταπηδήσει» από ένα βακτηριακό πλασμίδιο στο γονιδίωμα της μύγας.

#### Παρασκευή δεκτικών κυττάρων για ηλεκτροδιάτρηση (competent cells)

Για την επίτευξη κλωνοποίησης βακτηρίων με πλασμιδιακό DNA είναι απαραίτητα τα κύτταρα να είναι ικανά να δεκτούν το πλασμίδιο. Ο μετασχηματισμός μπορεί να συμβεί είτε με CaCl<sub>2</sub> είτε με ηλεκτροδιάτρηση. Για κάθε μέθοδο, τα κύτταρα πρέπει να επεξεργαστεί διαφορετικά ώστε να γίνουν δεκτικά.

Η ηλεκτροδιάτρηση είναι πιο αποδοτική από το χημικό μετασχηματισμό γι' αυτό προτιμάται για μεγάλα πλασμίδια. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιείται η ηλεκτροδιάτρηση γι' αυτό θα περιγραφεί η διαδικασία παρασκευής ηλεκτροδεκτικών κυττάρων.

Τα κύτταρα, καθώς κατά την ηλεκτροδιάτρηση θα τους ασκηθεί ηλεκτρική τάση, πρέπει να βρίσκονται σε χωρίς ιοντική ισχύ διάλυμα.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιείται το στέλεχος DH5α του εντεροβακτηρίου *E. coli*.

#### DH5α

Το στέλεχος αυτό είναι σχεδιασμένο από τον Douglas Hanahan για την μεγιστοποίηση της απόδοσης μετασχηματισμού. Φέρουν τρεις χαρακτηριστικές μεταλλάξεις: στα *recA1* και *endA1* για την υποβοήθηση της εισαγωγής του πλασμιδίου και στο *lacZΔM15* για blue white επιλογή.

<b>Υλικά</b>
<b>Στερεό θρεπτικό υλικό LB άγαρ (σε 1L περιέχει: 10gr Tryptone, 15gr agar, 15gr Yeast extract, 5gr NaCl)</b>
<b>Υγρό θρεπτικό υλικό LB Broth (σε 1L περιέχει: 10gr Bactrotryptone, 5gr Yeast extract, 5gr NaCl)</b>
<b><i>E. coli</i> DH5α κύτταρα</b>
<b>Γλυκερόλη 10%</b>
<b>1L ddH<sub>2</sub>O</b>

## Μεθοδολογία

- 1) Ενοφθάλμιση ποσότητας κυττάρων DH5α, που διατηρούνται στους -80°C με χρήση αποστειρωμένου κρίκου ενοφθαλμισμού, σε στερεό θρεπτικό υλικό LB άγαρ. Επώαση για 16h στους 37°C.
- 2) Προσθήκη σε αποστειρωμένο δοκιμαστικό σωλήνα 1mL υγρού θρεπτικού υλικού LB, κάτω από ασηπτικές συνθήκες. Απομόνωση μίας αποικίας από την στερεή καλλιέργεια DH5α και ενοφθαλμισμός σε υγρό θρεπτικό LB με αυτήν. Επώαση 37°C, υπό ανάδευση (210rpm) για 16h.
- 3) Μεταφορά της βακτηριακής καλλιέργειας σε αποστειρωμένη κωνική φιάλη με υγρό LB (300mL).
- 4) Επώαση στους 37°C, υπό ανάδευση (210rpm) έως ότου η τιμή της οπτικής πυκνότητας OD<sub>600</sub> του εναιωρήματος να κυμαίνεται μεταξύ 0,4-0,6 (περίπου 2h).
- 5) Μοίρασμα της καλλιέργειας σε σωλήνα τύπου falcon των 50mL και διατήρησή τους στον πάγο με στόχο την αναστολή ανάπτυξης των κυττάρων. Οι διαδικασίες γίνονται στο cold room.
- 6) Φυγοκέντρηση στις 4.000 στροφές, για 10min στους 4°C για συλλογή των κυττάρων. Απομάκρυνση του υπερκείμενου και ήπια επαναδιάλυση του ιζήματος των κυττάρων σε προψυγμένο αποστειρωμένο ddH<sub>2</sub>O (~50mL/falcon). Το βήμα αυτό επαναλαμβάνεται μία φορά.
- 7) Φυγοκέντρηση στις 4.000 στροφές, για 10min στους 4°C.
- 8) Απομάκρυνση του υπερκείμενου, ήπια επαναδιάλυση του ιζήματος σε προψυγμένο διάλυμα γλυκερόλης 10% (4mL/falcon) και φυγοκέντρηση στις 4.000 στροφές για 10min σε θερμοκρασία 4°C.
- 9) Απομάκρυνση του υπερκείμενου και ήπια επαναδιάλυση του ιζήματος σε προψυγμένο διάλυμα γλυκερόλης 10% (250μL/falcon).
- 10) Διαίρεση του κυτταρικού εναιωρήματος σε κλάσματα των 40μL σε σωληνάκια τύπου erpendorf και πάγωμα με χρήση υγρού αζώτου.
- 11) Διατήρηση των κλασμάτων σε θερμοκρασία -80°C.

Για τον υπολογισμό της απόδοσης των δεκτικών κυττάρων γίνεται μετασχηματισμός με ηλεκτροδιάτρηση, χρησιμοποιώντας πλασμίδια γνωστής συγκέντρωσης. Γίνεται καταμέτρηση λευκών (μετασχηματισμένων) αποικιών στα τρυβλία και αναγωγή σε μονάδες rfu/μg.

### Μετασχηματισμός κυττάρων με ηλεκτροδιάτρηση

Η ηλεκτροδιάτρηση είναι μια μηχανική μέθοδος για την εισαγωγή DNA σε δεκτικά κύτταρα. Κατά τη μέθοδο αυτή ηλεκτρικοί παλμοί αποδιοργανώνουν στιγμιαία τη φωσφολιπιδική διπλοστοιβάδα της μεμβράνης, προκαλώντας το σχηματισμό πόρων και επιτρέποντας έτσι στο DNA να εισέλθει στο εσωτερικό του κυττάρου (Neumann, Schaefer-Ridder, Wang, & Hofschneider, 1982)

Παρατεταμένη εφαρμογή ή και υψηλή ένταση του διαχεόμενου ρεύματος μπορεί να δημιουργήσει πόρους που θα προκαλέσουν την λύση του κυττάρου λόγω ωσμωτικής πίεσης. Για το λόγω αυτό έχουν ιδιαίτερη σημασία για την επιτυχία της μεθόδου η διάρκεια εφαρμογής και η ένταση του διαχεόμενου ρεύματος.

Τα βασικά πλεονεκτήματα της μεθόδου σε σχέση με άλλες μεθόδους μετασχηματισμού είναι: α) μεγάλη αποτελεσματικότητα, β) μη απαίτηση μεγάλων ποσοτήτων DNA, γ) μη σχηματισμός σφαιροπλαστών, επομένως εφαρμόσιμη σε κύτταρα χωρίς κάποια επεξεργασία.

<b>Υλικά</b>
<b>DNA ανασυνδυασμένου φορέα</b>
<b>Δεκτικά κύτταρα DH5α</b>
<b>Υγρό θρεπτικό υλικό LB Broth-Free (σε 1L περιέχει: 10gr Bactrotryptone, 5gr Yeast extract, 5gr NaCl)</b>

#### Μεθοδολογία

- 1) Κάθε εργασία γίνεται σε αποστειρωμένες συνθήκες, κάτω από φλόγα (ασηπτικές συνθήκες), καθώς θα γίνει χρήση θρεπτικού υλικού που δεν έχει κάποιο αντιβιοτικό.
- 2) Τοποθέτηση του κλάσματος των δεκτικών κυττάρων (40μL), από τους -80°C στον πάγο, για να τηχθούν. (περίπου 2 λεπτά)
- 3) Προσθήκη 2μL δείγματος των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων στο Eppendorf των δεκτικών κυττάρων.  
Σημείωση: Η ποσότητα του δείγματος εξαρτάται από την συγκέντρωση του πλασμιδίου.
- 4) Μεταφορά του μείγματος σε ειδική προψυγμένη κυψελίδα, διαμέτρου 0,2cm και τοποθέτηση της στη θέση υποδοχής της συσκευής.
- 5) Εφαρμογή ηλεκτρικού παλμού εντάσεως 13,8kV/cm για 5-6msec.
- 6) Άμεση προσθήκη 1mL διαλύματος θρεπτικού LB-free. Τα κύτταρα είναι στρεσαρισμένα και δεν θα αναπτυσσόταν παρουσία αντιβιοτικού.
- 7) Ήπια ανάδευση με την χρήση της πιπέτας και μεταφορά όλης της ποσότητας σε αποστειρωμένο σωλήνα.
- 8) Επώαση του μίγματος, υπό ήπια ανάδευση (180rpm) σε θερμοκρασία 37°C για 1h. Το βήμα αυτό είναι και την «ανάρρωση» (recovery) των κυττάρων.
- 9) Άνισο μοίρασμα της καλλιέργειας σε δύο σωληνάκια τύπου eppendorf. Το ένα αποθήκευση στους 4°C ενώ το άλλο χρησιμοποιείται άμεσα για την καλλιέργεια των κυττάρων σε τρυβλίο για διάκριση και μετέπειτα απομόνωση ανασυνδυασμένων κλώνων. Η ποσότητα που θα χρησιμοποιηθεί εξαρτάται από την απόδοση που έχουν τα δεκτικά κύτταρα.

**Καλλιέργεια μετασχηματισμένων κυττάρων και διάκριση ανασυνδυασμένων κλώνων**  
Με το πέρας της διαδικασίας μετασχηματισμού, τα κύτταρα επιστρώνονται σε τρυβλία Petri με στερεό θρεπτικό υπόστρωμα LB άγαρ. Για το διαχωρισμό των ανασυνδυασμένων από τους μη ανασυνδυασμένους κλώνους χρησιμοποιούνται ένας δείκτης επιλογής και ένας δείκτης αναφοράς.

Ως δείκτης επιλογής χρησιμοποιείται το αντιβιοτικό αμπικιλίνη το οποίο προστίθεται στα τρυβλία κατά την παραγωγή του θρεπτικού υποστρώματος. Έτσι, θα καταφέρουν να

αναπτυχθούν μόνο τα κύτταρα που φέρουν το πλασμίδιο χάρη στο οποίο προσδίδεται η ανθεκτικότητα στο συγκεκριμένο αντιβιοτικό.

Η ταυτοποίηση των βακτηρίων που φέρουν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο πραγματοποιείται με τον έλεγχο της α-συμπληρωματικότητας του ενζύμου β-γαλακτοσιδάση. Οι απαραίτητες αλληλουχίες για την κωδικοποίηση του ενζύμου βρίσκονται και στο γονιδίωμα της *E. coli* αλλά και στο πλασμιδιακό DNA. Από το DNA του βακτηρίου ένα τμήμα του περιέχει τις ρυθμιστικές αλληλουχίες και την κωδική πληροφορία των πρώτων 146 αμινοξέων της πρωτεΐνης, ενώ στο πλασμιδιακό DNA βρίσκεται το γονίδιο *lacZ* του οποίου οι αλληλουχίες κωδικοποιούν τα υπόλοιπα αμινοξέα της πρωτεΐνης, με την αλληλουχία του πολυσυνδέτη να βρίσκεται εσωτερικά του αναγνωστικού του πλαισίου. Φυσιολογικά, λοιπόν, η από κοινού έκφραση των αλληλουχιών του πλασμιδιακού φορέα και του βακτηρίου οδηγούν στη σύνθεση της β-γαλακτοσιδάσης. Σε περίπτωση ανασυνδυασμού η αλληλουχία του ενθέματος εισάγεται στην περιοχή του πολυσυνδέτη του πλασμιδίου, διακόπτοντας το αναγνωστικό πλαίσιο του γονιδίου *lacZ* και κατ' επέκταση τη σύνθεση β-γαλακτοσιδάσης.

Η σύνθεση ή μη του ενζύμου ελέγχεται μέσω της εισαγωγής στο υπόστρωμα του χρωμογόνου υποστρώματος X-gal, το οποίο φυσιολογικά μεταβολίζεται από τη β-γαλακτοσιδάση δημιουργώντας χαρακτηριστικές μπλε αποικίες, παρουσία του επαγωγέα IPTG. Οπότε, εάν ο ανασυνδυασμός του πλασμιδίου είναι επιτυχής, τότε το X-gal δε θα μεταβολίζεται και άρα οι αποικίες θα διακρίνονται με λευκό (άχρωμο) χρώμα. Αντίθετα, σε περίπτωση που ο ανασυνδυασμός αποτύχει οι βακτηριακές αποικίες θα εμφανίζονται μπλε.

Υλικά
<b>Στερεό θρεπτικό μέσο LB άγαρ με αμπικιλίνη (σε 1L περιέχει: 10gr Tryptone, 15gr agar, 15gr Yeast extract, 5gr NaCl)</b>
<b>Αμπικιλίνη (100μg/mL)</b>
<b>X-gal (20mg/mL)</b>
<b>IPTG (200mg/mL)</b>

## Μεθοδολογία

- 1) Παρασκευή της επιθυμητής ποσότητας στερεού θρεπτικού LB άγαρ (25-30mL/ανά τρυβλίο) με προσθήκη της αντίστοιχης ποσότητας αμπικιλίνης (100μg/mL).
- 2) Τοποθέτηση του LB άγαρ στα τρυβλία, υπό ασηπτικές συνθήκες, για τη στερεοποίηση του.
- 3) Προσθήκη 20μL X-gal, 2μL IPTG καθώς και της επιθυμητής ποσότητας μετασηματισμένων κυττάρων και επίστρωσή τους στα τρυβλία.  
Tip1: το τρυβλίο είναι θερμασμένο, για περίπου 10 λεπτά στους 37°C, για την αποφυγή στρεσαρίσματος των κυττάρων.
- 4) Επώαση στους 37°C για 12-16h.
- 5) Ταυτοποίηση των ανασυνδυασμένων αποικιών, βάσει του χρώματός τους (λευκές).

## Εργαστηριακοί πληθυσμοί

Το εργαστηριακό στέλεχος *C. capitata* που χρησιμοποιήθηκε για την διεξαγωγή των πειραμάτων είναι το EgII.

Οι συνθήκες εντομοτροφίου ήταν  $65\pm 5\%$  υγρασία,  $23\pm 2^\circ\text{C}$  με φωτοπερίοδο 12:12 (φως: σκοτάδι). Ημερησίως συλλεγόντουσαν αυγά και τοποθετούνταν σε τροφή προνυμφών σε πλαστικά μπολ. Στο 4<sup>ο</sup> στάδιο προνυμφών μεταφέρονταν σε άμμο για την μετάβαση στο στάδιο της πούπας. Στο τελευταίο στάδιο πούπας πριν την έκδυση, τοποθετιόντουσαν σε κλουβί.

Παρασκευή τροφής προνυμφών *C. capitata*

Υλικά	Για 500mL τροφής
Νερό	450mL
Μαγιά	30gr
Ζάχαρη	30gr
Χαρτοβάμβακας	30gr
Διάλυμα χοληστερόλης (25gr χοληστερόλη, 350mL dH <sub>2</sub> O, 125mL 95% αιθανόλη)	10mL
Διάλυμα HCl (97,5mL 25% HCl, 352,5mL dH <sub>2</sub> O)	10mL
Διάλυμα Βενζοϊκού Νατρίου (25gr Βενζοϊκό Νάτριο, 75ml dH <sub>2</sub> O, 150mL 95% αιθανόλη)	10mL

Παρασκευή τροφής ενηλίκων *C. capitata*

Υλικά	Για 20gr τροφής
Υδρολυμένη μαγιά	4gr
Κρυσταλλική ζάχαρη	16gr

Παρασκευή τροφής προνυμφών *B. oleae*

Υλικά	Για 1kg τροφής
Νιπαγίνη	2gr
Σορβικό Κάλιο	0.5gr
Λάδι	20mL
Tween 80	7,5mL
Νερό	500mL
Μαγιά	75gr
Σόγια	30gr
Άχνη ζάχαρη	20gr
HCl	32%
Κυτταρίνη	300gr

Μεθοδολογία

- 1) Ζυγίσμα νιπαγίνης και σορβικού καλίου τα οποία προστίθενται στο κάδο του mixer.

- 2) Προσθήκη λαδιού και Tween 80.
- 3) Προσθήκη νερού και ανάδευση μέχρι διάλυσης των συστατικών.
- 4) Προσθήκη σόγιας, μαγιάς και ζάχαρης και συνεχίζει η ανάδευση.
- 5) Προσθήκη αραιωμένου HCl.
- 6) Προσθήκη κυτταρίνης και ολοκλήρωση με ταχύ και έντονη ανάδευση.

Παρασκευή τροφής ενηλίκων *B. oleeae*

<b>Υλικά</b>	<b>Για 42,4gr</b>
<b>Άχνη ζάχαρη</b>	32gr
<b>Υδρολυμένη Μαγιά</b>	8gr
<b>Κρόκος αυγού</b>	2,4gr

Μεθοδολογία

- 1) Όλα τα συστατικά ανακατεύονται μαζί

Παρασκευή μείγματος παραφίνης

Το μείγμα αυτό τοποθετείται σε τούλι ειδικής κατασκευής και τελικά έχει κατάλληλη σύσταση και δομή ώστε να ωοαποθέτουν οι θηλυκοί δάκοι.

<b>Υλικά</b>	<b>Για 1kg</b>
<b>Παραφίνη 52-54C</b>	850gr
<b>Παραφίνη 46-48C</b>	85gr
<b>Κερί Μέλισσας</b>	65gr

Μεθοδολογία

1. Τα υλικά μετρούνται και τοποθετούνται σε εστία ώσπου να τηχθούν
2. Αφού λιώσουν τα συστατικά, καλύπτεται το τούλι της κατασκευής με ταχύ ρυθμό με 2-3 λεπτές στρώσεις.



## In silico ανάλυση

In silico ανάλυση αναφέρεται σε οποιαδήποτε ανάλυση πραγματοποιείται με τη βοήθεια υπολογιστή.

### Blast (Basic Local Allignment Search Tool)

Το πρόγραμμα Blast (Altschul, 1990) αποτελεί εργαλείο σύγκρισης και στοίχισης νουκλεοτιδικών και πρωτεϊνικών αλληλουχιών, βάσει ομολογίας. Αναζητά και εντοπίζει ομόλογες περιοχές, κατατεθειμένες στις βάσεις δεδομένων, που εμφανίζουν τοπική ομοιότητα με μέρος ή ολόκληρη την αλληλουχία που έχει εισαχθεί από το χρήστη. Το πρόγραμμα χωρίζεται σε επιμέρους κατηγορίες ανάλογα με το είδος της αναζήτησης: Blastn (σύγκριση νουκλεοτιδικών αλληλουχιών), Blastx (σύγκριση μεταγραφόμενων νουκλεοτιδικών αλληλουχιών με πρωτεϊνικές αλληλουχίες), Blastp (σύγκριση πρωτεϊνικών αλληλουχιών) κ.α.

Στην παρούσα εργασία η αναζήτηση επικεντρώθηκε στον εντοπισμό ομόλογων οσφρητικών υποδοχέων της δροσόφιλας με τη μεσογειακή μύγα και τον δάκο.

### Geneious

Το Geneious είναι μία πλατφόρμα με εργαλεία Μοριακής Βιολογίας και ανάλυσης αλληλουχιών συμπεριλαμβανομένου στοίχισης, δημιουργία δέντρων, σχεδιασμό κλωνοποίησης και εκκινήτων.

Είναι δυνατή η στοίχιση DNA ή πρωτεϊνικών αλληλουχιών κατά ζεύγη ή η πολλαπλή στοίχιση αυτών με τη χρήση αλγορίθμων όπως MUSCLE, MAFFT, Clustal Omega, MAUVE και LastZ. Εξίσου δυνατή είναι η χαρτογράφηση και η de novo συναρμολόγηση αλληλουχιών (Assembly). Χρησιμοποιεί αλγόριθμους όπως Geneious, SPAdes, Flye, MIRA, Tadpole και Velvet

### Benchling

Το Benchling είναι μια βιοπληροφορική πλατφόρμα βασιζόμενη σε λογισμικά εργαλεία στο cloud. Επιτρέπει την στοίχιση, την οπτικοποίηση, την ανάλυση και την επεξεργασία ακολουθιών.

## Αποτελέσματα

### Ενίσχυση γονιδίων οσφρητικών υποδοχέων

Η ενίσχυση γονιδίων που εμπλέκονται στο οσφρητικό σύστημα της μεσογειακής μύγας και του δάκου, ξεκίνησε με την επιλογή των γονιδίων αυτών. Η επιλογή βασίστηκε σε αναζήτηση ομολογιών με γονίδια υποδοχέων που έχουν χαρακτηριστεί στο συγγενικό είδος *D. Melanogaster*. Η δροσόφιλα είναι ένα δίπτερο έντομο, όπως η μεσογειακή μύγα και ο δάκος. Ως αφετηρία, η επιλογή γονιδίων υποδοχέων ORs έγινε βάσει του προσδέτη που τους ενεργοποιεί. Οι οσμές που προτιμήθηκαν ήταν είτε φερομονών είτε οσμές άνθων ή τροφής ([βλ. παράρτημα](#))

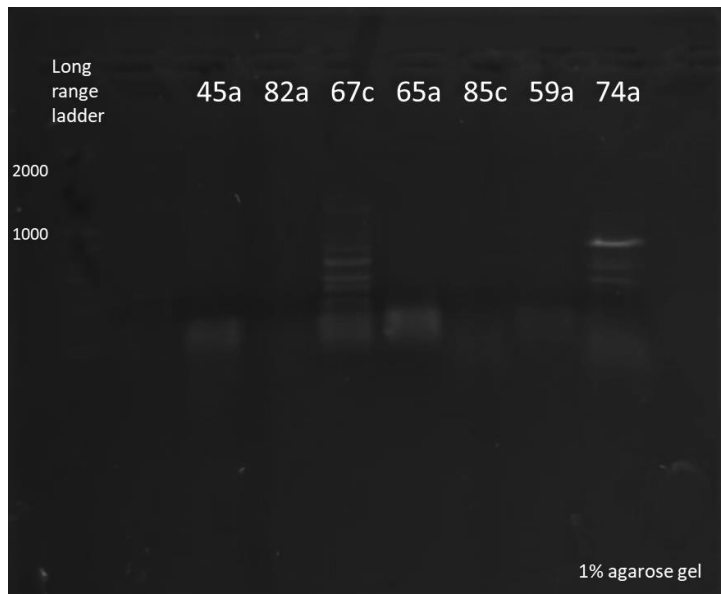
Έγινε επιλογή 7 αλληλουχιών γονιδίων οσφρητικών υποδοχέων: Or67c, Or82a, Or74a, Or45a, Or47b, Or85c, Or59a ([βλ. παράρτημα](#)) του στελέχους ISPra. Με την επιλογή υποδοχέων της δροσόφιλας, οι αλληλουχίες τους χρησιμοποιήθηκαν στην πλατφόρμα BLAST για την εύρεση των ομόλογων αυτών σε μεσογειακή μύγα και δάκο. Γονιδιώματα και για τα δύο είδη είναι διαθέσιμα στη βάση δεδομένων. Τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν για την αλληλούχηση του γονιδιώματος για την μεσογειακή μύγα είναι το στέλεχος ISPra και το στέλεχος EgII (2 διαθέσιμα assembly [Ccap 2.1](#) και [EgII 3.2.1](#)).

Αφού εντοπίστηκαν τα γονίδια-στόχοι της συγκεκριμένης πτυχιακής, χρησιμοποιήθηκαν οι κωδικές περιοχές για τον σχεδιασμό εκκινητών.

Ως αναφορά τον σχεδιασμό των εκκινητών πρέπει να λαμβάνονται υπόψιν α) η περιεκτικότητα G/C να είναι μεταξύ 40-60%, β)  $\Delta G > -9$  για κάθε εκκινητή ώστε να αποφεύγεται η συμπληρωματικότητα μεταξύ των εκκινητών (ομοδιμερή ή ετεροδιμερή), γ) να μην περιέχουν εσωτερικές παλινδρομικές αλληλουχίες και δ) να παρουσιάζουν παρόμοιες τιμές θερμοκρασίας τήξης  $T_m$ . Η θερμοκρασία τήξης υπολογίζεται κατά προσέγγιση με την εξής σχέση:  $2^{\circ}\text{C}$  για κάθε A ή T και  $4^{\circ}\text{C}$  για κάθε G ή C [ $T_m = 2 \times (A+T) + 4 \times (G+C)$ ]. Με αυτόν τον υπολογισμό η θερμοκρασία τήξης των εκκινητών είναι επιθυμητό να βρίσκεται μεταξύ  $50-70^{\circ}\text{C}$ .

Εξαιτίας της χρήσης κωδικών περιοχών καθίσταται αδύνατος ο σχεδιασμός εκκινητών με τις ιδανικές ιδιότητες για την ενίσχυση.

Στην αλληλουχία των εκκινητών έγινε προσθήκη ετικετών που έφεραν θέσεις κοπής ενζύμων περιορισμού διαφορετικό σε εμπρόσθιο και οπίσθιο άκρο. Αυτό εξυπηρετεί στην προσανατολισμένη ενσωμάτωση του τμήματος DNA στο φορέα κλωνοποίησης κατά την αντίδραση σύνδεσης αργότερα. Πραγματοποιήθηκε η πρώτη PCR με μήτρα ολικό cDNA μεσογειακής μύγας στελέχους EgII σε κοινές συνθήκες για όλους τους εκκινητές ( $T_a: 60^{\circ}\text{C}$ ) και χρόνο επιμήκυνσης 2:00 min.



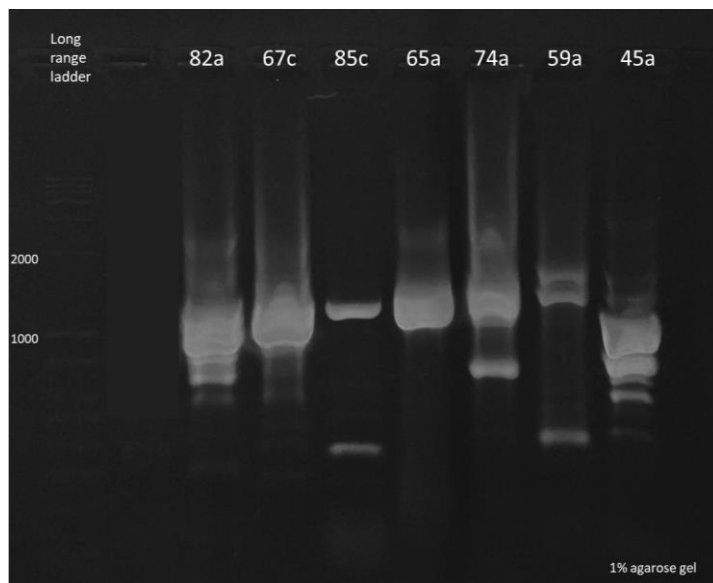
**Αναμενόμενες  
αλληλουχίες**

Or67c	1254bp
Or82a	1162bp
Or74a*	1291bp
Or45a	1247bp
Or13a	1341bp
Or65a	1344bp
Or85c	1245bp
Or59a	1455bp

\* Κομμένο με BamHI/XhoI

Εικόνα 7: PCR με χρήση εκκινητών για οσφρητικούς υποδοχείς και οι αναμενόμενες ζώνες κάθε αλληλουχίας γονιδίου.

Αναδείχθηκε η μη ειδικότητα των εκκινητών. Ακολούθησε απομόνωση τυφλών ζωνών των ευρύτερων περιοχών του πηκτώματος αгарόζης που αναμενότουσαν να υπάρχουν ζώνες για κάθε υποδοχέα ώστε να περιοριστεί το πλήθος των αλληλουχιών που χρησιμοποιείται ως μήτρα στην PCR και κατ' επέκταση να μειωθεί η ενίσχυση μη ειδικών περιοχών/ παραπροϊόντων. Έγινε ανάκτηση του DNA και ακολούθησε Re-PCR στις ίδιες συνθήκες.



**Αναμενόμενες  
αλληλουχίες**

Or67c	1254bp
Or82a	1162bp
Or74a*	1291bp
Or45a	1247bp
Or13a	1341bp
Or65a	1344bp
Or85c	1245bp
Or59a	1455bp

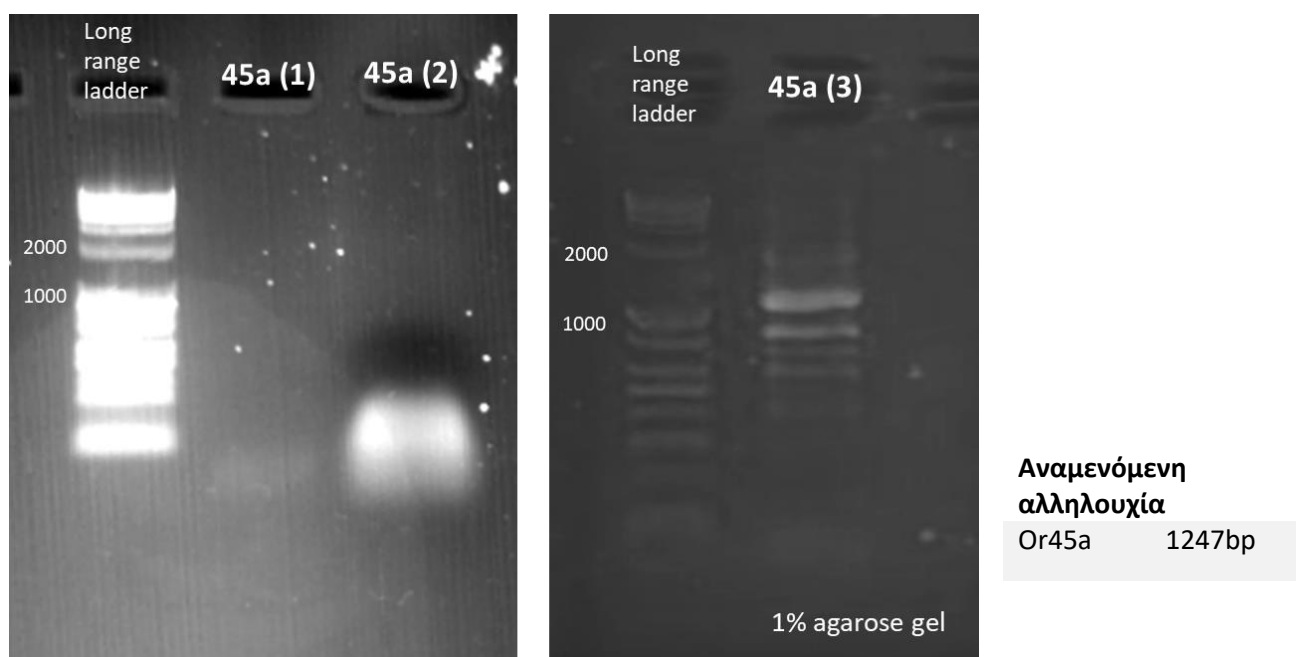
\* Κομμένο με BamHI/XhoI

Εικόνα 8: Re-PCR με χρήση εκκινητών για οσφρητικούς υποδοχείς και οι αναμενόμενες ζώνες κάθε αλληλουχίας γονιδίου.

Παρά τα παραπροϊόντα, θεωρήθηκε ότι έγινε ενίσχυση των επιθυμητών αλληλουχιών σε όλα εκτός το 45a.

Έγινε απομόνωση των έντονων ζωνών από το πήκτωμα αγαρόζης αφού έγινε η υπόθεση ότι λόγω των παραπροϊόντων μπορεί να μην έτρεξαν σωστά και μεγαλύτερα κομμάτια DNA να παρασύρθηκαν χαμηλότερα. Τα μόρια DNA αφού ανακτήθηκαν, αποθηκεύτηκαν στους -20°C.

Για το 45a ακολούθησε βελτιστοποίηση των συνθηκών της αντίδρασης, εναλλάσσοντας τις θερμοκρασίες  $T_a$  (63-65°C) και την αρχική ποσότητα cDNA-μήτρας, ώστε να επιτευχθεί η ειδικότερη ενίσχυση του εξεταζόμενου γονιδίου.



Εικόνα 9: Troubleshooting PCR OR45a. Για αντιδράσεις (1), (3) ηλεκτροφορήθηκαν από 2ul ενώ για την αντίδραση (2) ηλεκτροφορήθηκε όλη η ποσότητα. Στις (1), (2) δεν έγινε ενίσχυση. Στην (3) φαίνεται αναμενόμενη ζώνη.

## Πέψη με ένζυμα περιορισμού

Για την δημιουργία κολλώδων άκρων, χρήσιμων στη μετέπειτα αντίδραση σύνδεσης, τόσο τα γονίδια που ενισχύθηκαν όσο και ο φορέας κλωνοποίησης πρέπει να κοπούν με τα ίδια ένζυμα περιορισμού.

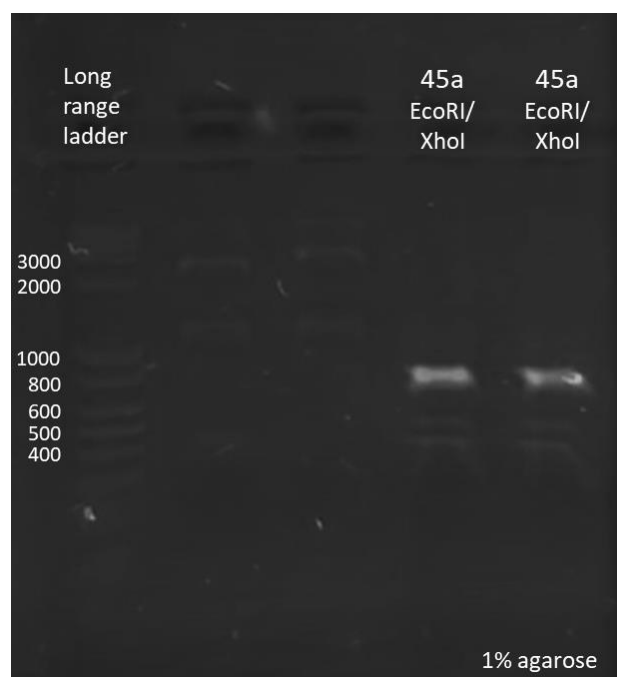


### Αναμενόμενες αλληλουχίες

Or65a 1344bp

Or85c 1245bp

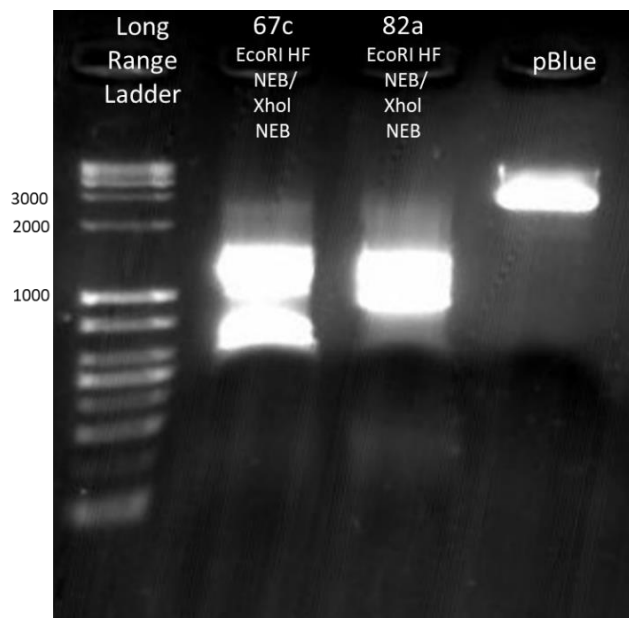
Εικόνα 10: Πέψη OR65a και OR85c με EcoRI (NEB)/XhoI (NEB). Ο μη αναμενόμενος διαχωρισμός του long range ladder οφείλεται σε μικρότερη συγκέντρωση αгарόζης από αυτή που αναγράφεται ή ο ladder είναι αλλοιωμένος.



### Αναμενόμενη αλληλουχία

Or45a 1247bp

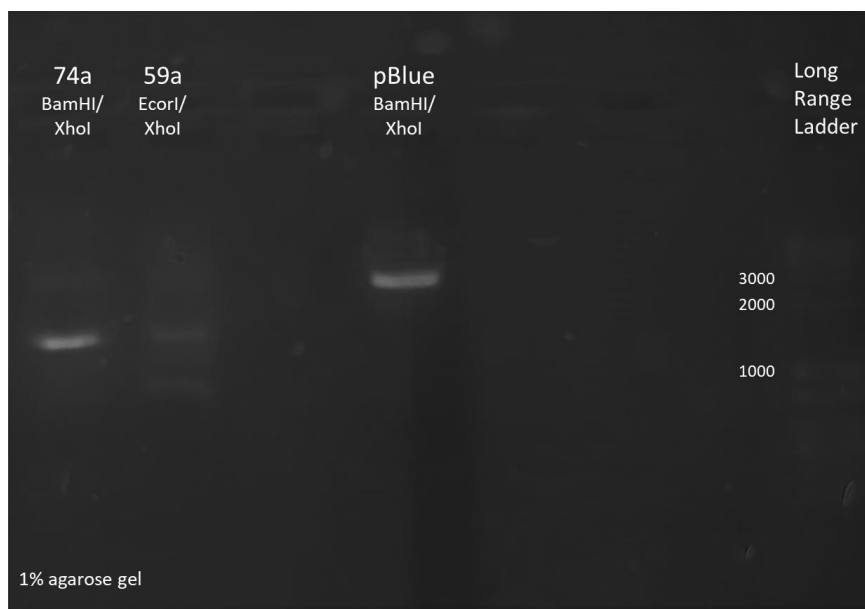
Εικόνα 11: Πέψη OR45a με EcoRI (NEB)/XhoI (NEB).



**Αναμενόμενες  
αλληλουχίες**

Or67c	1254bp
Or82a	1162bp

Εικόνα 12: Πέψη OR82a και OR67c με *EcoRI* (*NEB*)/*XhoI* (*NEB*).



**Αναμενόμενες  
αλληλουχίες**

Or74a*	1291bp
Or59a	1455bp

Εικόνα 13: Πέψη OR59a με *EcoRI* (*NEB*)/*XhoI* (*NEB*) και Πέψη OR65a και OR74a με *BamHI* (*NEB*)/*XhoI* (*NEB*).

Ακολούθησε απομόνωση των ζωνών και ανάκτηση του DNA από το πήκτωμα αγαρόζης.

### Κλωνοποίηση γονιδίων σε πλασμιδιακό φορέα pBLUESCRIPT

Τα προϊόντα PCR των παραπάνω γονιδίων απομονώθηκαν και ανακτήθηκαν από πήκτωμα αγαρόζης και εν συνεχεία κλωνοποιήθηκαν σε πλασμιδιακό φορέα pBLUESCRIPT. Έπειτα πραγματοποιήθηκε η εισαγωγή των μετασχηματισμένων πλασμιδίων σε δεκτικά κύτταρα *E. coli* DH5α μέσω ηλεκτροδιάτρησης και η ταυτοποίηση των ανασυνδυασμένων κλώνων μέσω Blue/White επιλογής. Από λευκούς κλώνους έγινε απομόνωση πλασμιδίου για την επιβεβαίωση της επιτυχής κλωνοποίησης και διαγνωστικές πέψεις με ένζυμα περιορισμού για την επιβεβαίωση της ενσωμάτωσης των γονιδίων.

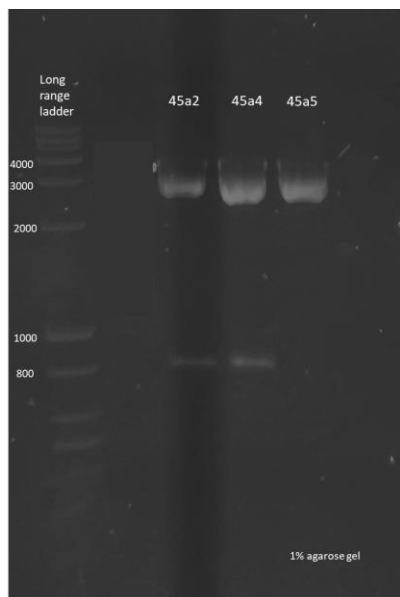
Τελικός στόχος είναι η κλωνοποίηση στον φορέα pUAST γιατί είναι ο κατάλληλος φορέας για ένεση και έκφραση σε δροσόφιλα. Ωστόσο, η κλωνοποίηση απευθείας στο φορέα pUAST, παρά τις προσπάθειες, δεν είχε επιτυχία. Περιοριστικοί παράγοντες της κλωνοποίησης αποτέλεσαν η συγκέντρωση των ενθεμάτων που δεν ήταν αρκετά υψηλή και το περιοριστικό μέγεθος του φορέα που δυσχεραίνει την εισαγωγή στα βακτήρια.

Μια προσέγγιση για την επίλυση του ζητήματος ήταν η πρώτη κλωνοποίηση με πλασμιδιακό φορέα pBLUESCRIPT για την σημαντική ενίσχυση των γονιδίων μέσα στα βακτήρια *E.coli*. Έτσι, η υψηλή συγκέντρωση ενθέματος εξασφαλίζεται κατά την πλασμιδιακή απομόνωση από ανασυνδυασμένους βακτηριακούς κλώνους (mini-preps), διαδικασία με μεγάλη απόδοση και άρα απομόνωσης υψηλής συγκέντρωσης πλασμιδιακού DNA. Μετά από πέψη με περιοριστικά ένζυμα, απομένουν υψηλές συγκεντρώσεις του ενθέματος που τότε μπορούν ευκολότερα να συνδεθούν με τον πλασμιδιακό φορέα pUAST και έτσι να επιτευχθεί η κλωνοποίηση.

## Ταυτοποίηση αλληλουχιών με επιβεβαιωτικές πέψεις με ένζυμα περιορισμού

### OR45a

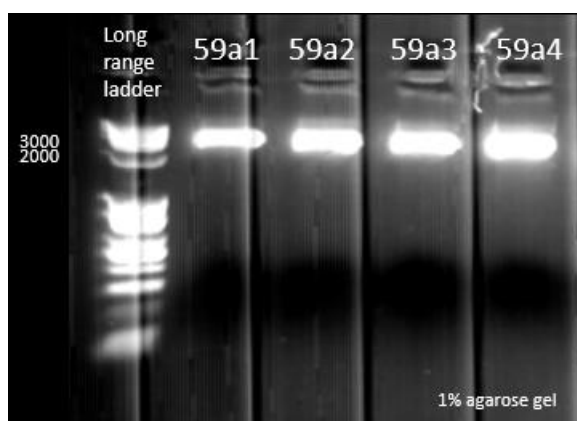
Μετά την απομόνωση του πλασμιδίου (pBS/OR45a) των λευκών αποικιών DH5α έγινε πέψη με *EcoRI*/*XhoI*. Οι αναμενόμενες ζώνες είναι 1.247 bp για τον OR45a και 2928 bp για τον pBS.



Εικόνα 14: Πέψη 2μl δειγμάτων *mini-prep* με *EcoRI* (NEB) /*XhoI* (NEB).

### OR59a

Μετά την απομόνωση του πλασμιδίου (pBS/OR59a) των λευκών αποικιών DH5α έγινε πέψη με *EcoRI*/*XhoI*. Οι αναμενόμενες ζώνες είναι 1455 bp για τον OR59a και 2928 bp για τον pBS.

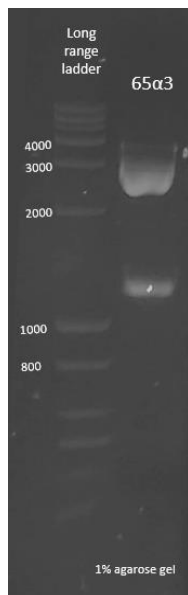


Εικόνα 15: Πέψη 2μl δειγμάτων *mini-preps* με *EcoRI* (NEB) /*XhoI* (NEB)



### OR65a

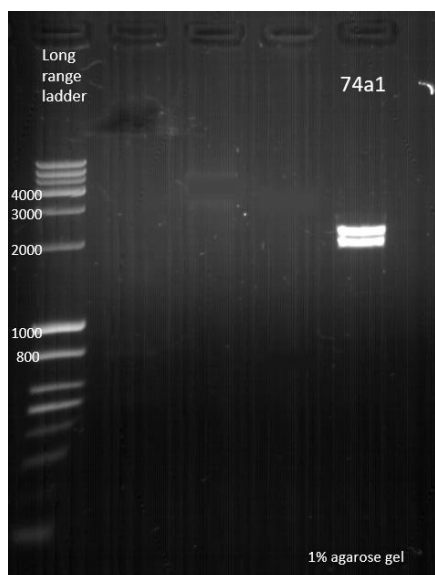
Μετά την απομόνωση του πλασμιδίου (pBS/OR65a) των λευκών αποικιών DH5α έγινε πέψη με *Eco*RI/*Xho*I. Οι αναμενόμενες ζώνες είναι 1.350 bp για τον OR65a και 2928 bp για τον pBS.



Εικόνα 16: Πέψη 2μl δείγματος *mini-preps* με *Eco*RI (*NEB*) /*Xho*I (*NEB*)

### OR74a

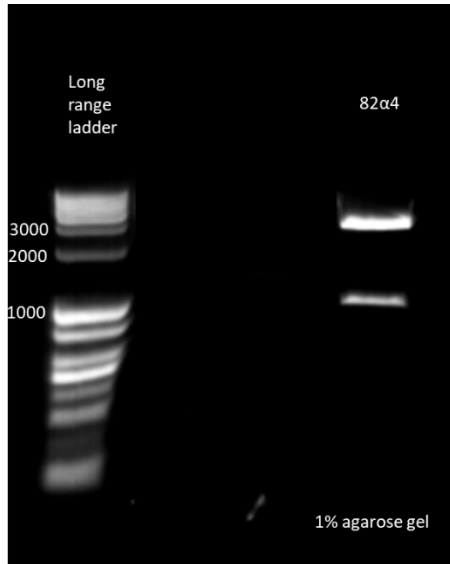
Μετά την απομόνωση του πλασμιδίου (pBS/OR74a) των λευκών αποικιών DH5α έγινε πέψη με *Bam*HI/*Xho*I. Οι αναμενόμενες ζώνες είναι 1.291 bp για τον OR74a και 2928 bp για τον pBS.



Εικόνα 17: Πέψη 2μl δείγματος *mini-preps* με *Bam*HI/*Xho*I

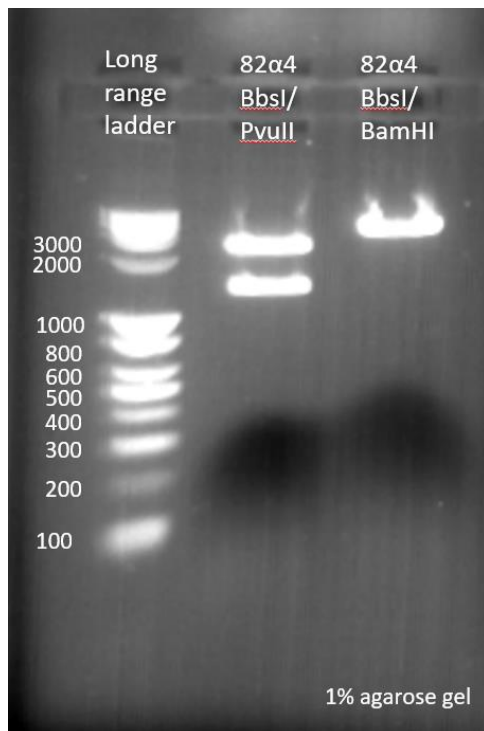
## OR82a

Μετά την απομόνωση του πλασμιδίου (pBS/OR82a) των λευκών αποικιών DH5α έγινε πέψη με *EcoRI*/*XhoI*. Οι αναμενόμενες ζώνες είναι 1.162 bp για τον OR82a και 2928 bp για τον pBS.



Εικόνα 18: Πέψη 2μl δείγματος mini-preps με *EcoRI* (NEB)/*XhoI* (NEB)

Για επιπλέον επιβεβαίωση ότι πρόκειται για θετικό κλώνο έγινε πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα *BbsI*/*PvuII* και *BbsI*/*BamHI*. Οι αναμενόμενες ζώνες είναι 2.513 bp, 621 bp, 423 bp, 303 bp και 133 bp για *BbsI*/*PvuII* και 3.852 bp και 141 bp για *BbsI*/*BamHI*.



### Αναμενόμενες ζώνες

#### OR82a *BbsI*/*PvuII*

2.513 bp

621 bp

423 bp

303 bp

133 bp

#### OR82a *BbsI*/*BamHI*

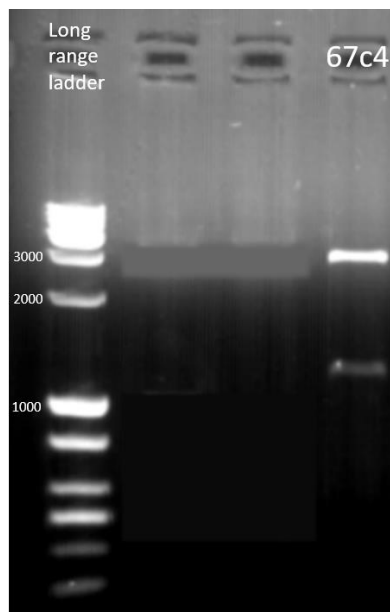
3.852 bp

141 bp

Εικόνα 19: Πέψη 2μl mini-prep με ένζυμα περιορισμού *BbsI* (NEB)/*PvuII* (NEB) και *BbsI* (NEB)/*BamHI* (NEB)

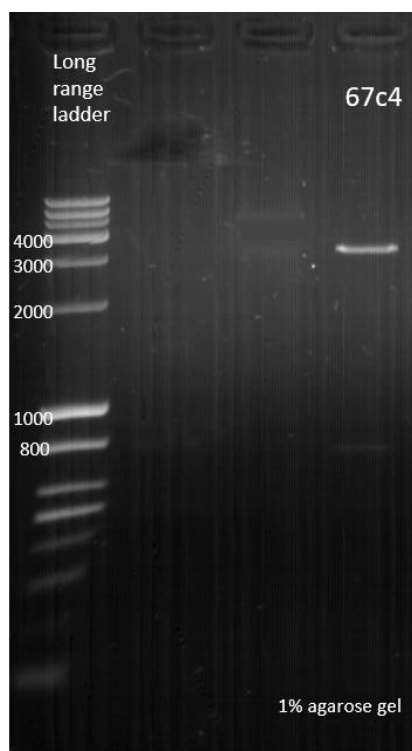
## OR67c

Μετά την απομόνωση του πλασμιδίου (pBS/OR67c) των λευκών αποικιών DH5α έγινε πέψη με *EcoRI*/*XhoI*. Οι αναμενόμενες ζώνες είναι 1.254 bp για τον OR67c και 2928 bp για τον pBS.



Εικόνα 20: Πέψη 2μl δείγματος *mini-prep* με *EcoRI* (NEB)/*XhoI* (NEB)

Για επιπλέον επιβεβαίωση ότι πρόκειται για θετικό κλώνο έγινε πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα *BamHI*/*AccI*. Οι αναμενόμενες ζώνες είναι 3.131 bp και 1.021 bp.



Αναμενόμενες ζώνες

**OR67c *AccI*/*BamHI***

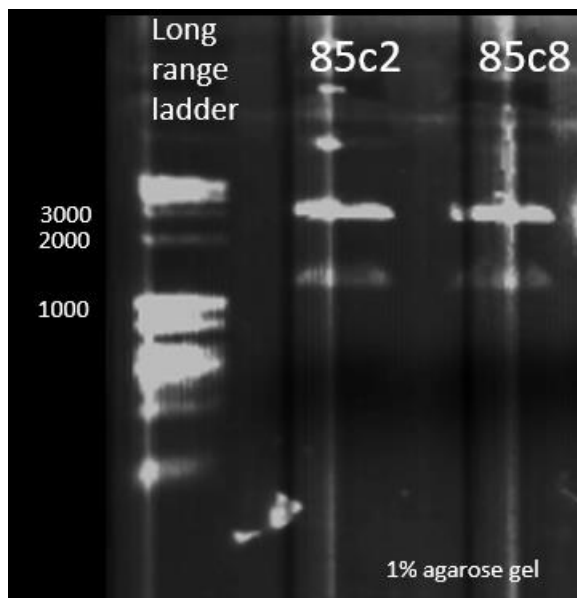
3.131 bp

1.021 bp

Εικόνα 21: Πέψη 2μl δείγματος *mini-prep* με *AccI* (NEB)/*BamHI* HF (NEB)

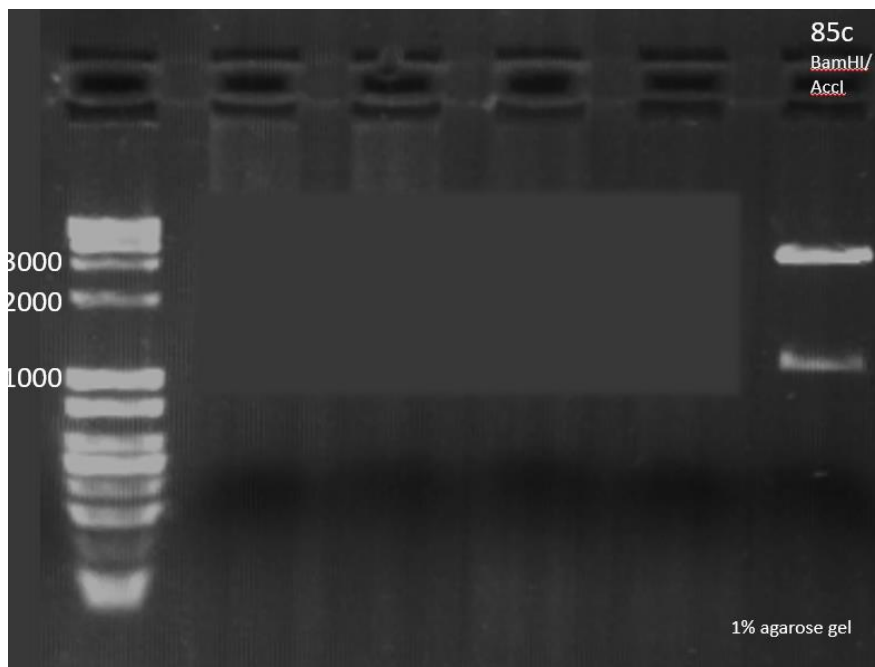
## OR85c

Μετά την απομόνωση του πλασμιδίου (pBS/OR85c) των λευκών αποικιών DH5α έγινε πέψη με EcoRI/XhoI. Οι αναμενόμενες ζώνες είναι 1.253 bp για τον OR67c και 2928 bp για τον pBS.



Εικόνα 22: Πέψη 2μl δείγματος mini-preps με EcoRI (NEB)/XhoI (NEB)

Για επιπλέον επιβεβαίωση αν πρόκειται για θετικό κλώνο έγινε πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα BamHI/AccI. Οι αναμενόμενες ζώνες είναι 3.102 bp και 1.083 bp.



Αναμενόμενες ζώνες

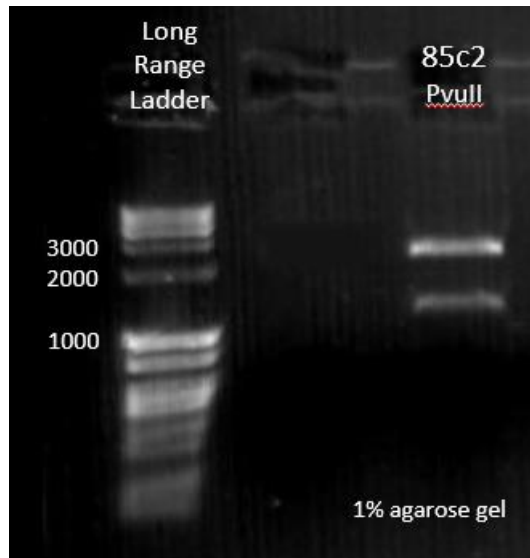
**OR85c AccI/BamHI**

3.102 bp

1.083 bp

Εικόνα 23: Πέψη 2μl δείγματος mini-prep με AccI (NEB)/BamHI HF (NEB)

Για επιπλέον επιβεβαίωση αν πρόκειται για θετικό κλώνο έγινε πέψη με τα περιοριστικό ένζυμο PvuII. Οι αναμενόμενες ζώνες είναι 2.513 bp, 1.240 bp και 432 bp.



Αναμενόμενες ζώνες

OR85c PvuII

2.513 bp

1.240 bp

432 bp

Εικόνα 24: Πέψη 2μl δείγματος mini-preps με PvuII-HF (NEB)

## Αλληλούχηση αλληλουχιών θετικών κλώνων

Αποτελέσματα αλληλούχησης υπάρχουν από τις προσπάθειες κλωνοποίησης των OR67c, OR65a, OR82a και OR85c. Τα αποτελέσματα αλληλούχησης για τους OR45a και OR65a δεν ήταν αξιόπιστα λόγω μη καθαρότητας του δείγματος ενώ για τους OR59a και OR74a βάσει των προτύπων πέψων αξιολογήθηκε πως δεν κλωνοποιήθηκε κάτι για να σταλθεί για αλληλούχηση.

Μονάχα ο OR85c κλωνοποιήθηκε επιτυχώς στον φορέα κλωνοποίησης pBLUESCRIPT, οπότε μόνο για αυτόν προχώρησε η κλωνοποίηση σε φορέα κλωνοποίησης pUAST.

## OR67c

Τα αποτελέσματα της αλληλούχησης συναρμολογήθηκαν με την χρήση της πλατφόρμας Geneious ([βλ. παράρτημα](#)). Ακολούθησε BLAST με την χρήση της συναινετικής αλληλουχίας (consensus) για να επιβεβαιωθεί η ομολογία.

Sequences producing significant alignments		Download	Manage columns	Show	100		
Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Ceratitis capitata strain EGII genome assembly contig scaffold 2 whole genome shotgun sequence	701	1208	45%	0.0	99.23%	80943084	CAJHJT010000012.1

Ακολούθησε στοιχισή του κωδικής περιοχής του γονιδίου που εντοπίστηκε με τις δύο αναγνώσεις της αλληλούχησης.



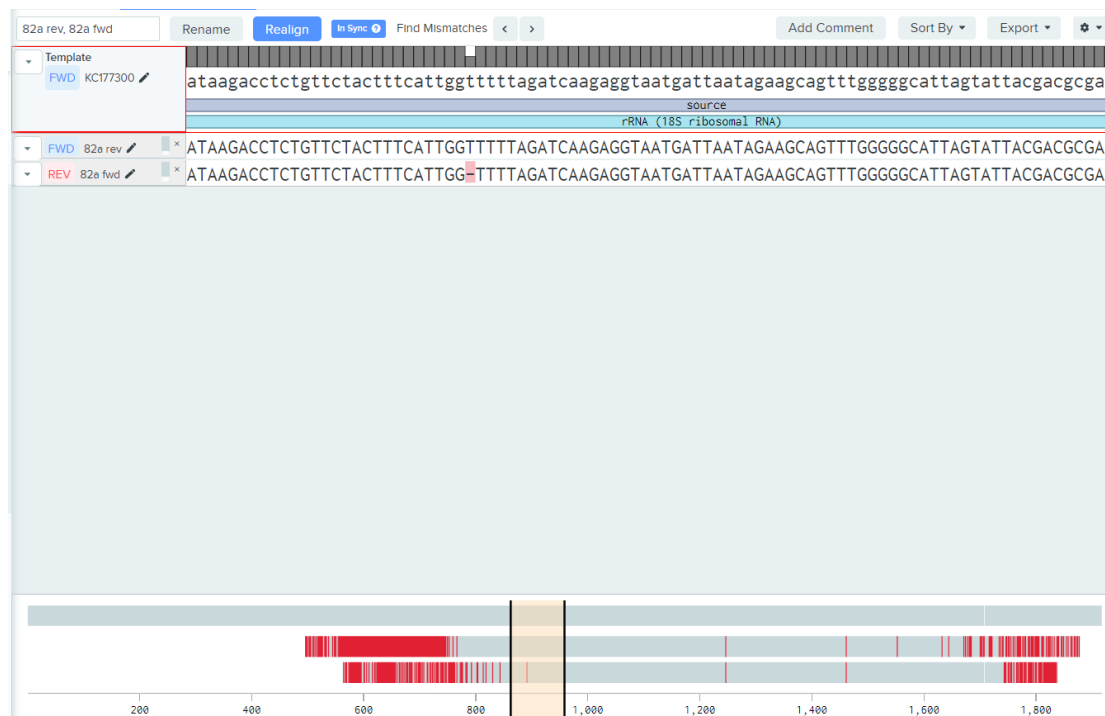
Δεν αλληλουχήθηκε το γονίδιο OR67c αλλά ένα μέρος του γονιδίου της πρωτεΐνης peste.

## OR82a

Τα αποτελέσματα της αλληλούχησης συναρμολογήθηκαν με την χρήση της πλατφόρμας Geneious ([βλ. παράρτημα](#)). Ακολούθησε BLAST με την χρήση της συναινετικής αλληλουχίας (consensus) για να επιβεβαιωθεί η ομολογία.

Sequences producing significant alignments		Download	Select columns	Show	100	?		
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Ceratitlis capitata 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">Ceratitlis capitata</a>	1687	1687	78%	0.0	96.93%	1916	<a href="#">KC177300.1</a>

Ακολούθησε στοίχιση του κωδικής περιοχής του γονιδίου που εντοπίστηκε με τις δύο αναγνώσεις της αλληλούχησης.



Δεν αλληλουχήθηκε το γονίδιο OR82a αλλά τμήμα του rRNA της υπομονάδας 18S του ριβοσώματος.

## OR85c

Τα αποτελέσματα της αλληλούχησης συναρμολογήθηκαν με την χρήση της πλατφόρμας Geneious ([βλ. παράρτημα](#)). Ακολούθησε BLAST με την χρήση της συναινετικής αλληλουχίας (consensus) για να επιβεβαιωθεί η ομολογία.

Sequences producing significant alignments								Download	Manage columns	Show	100	?
								GenBank	Graphics	Distance tree of results	MSA Viewer	
Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession					
<input checked="" type="checkbox"/> Ceratitis capitata strain EGI1 genome assembly contig scaffold_1 whole genome shotgun sequence	1315	1971	89%	0.0	93.04%	101214917	CAJHJT010000001.1					

Ακολούθησε στοίχιση του κωδικής περιοχής του γονιδίου OR85c με τις δύο αναγνώσεις της αλληλούχησης.

The screenshot displays the Geneious interface for sequence alignment. The top panel shows the alignment of the OR85c cDNA sequence (85c fwd pBS, 85c rev pBS) against the reference sequence (85c cDNA EGI1, revised). The alignment is shown as a series of horizontal bars representing the sequence, with a vertical line indicating the position of the insertion site. The bottom panel shows a graphical representation of the alignment, with a scale from 0 to 1,200 bases. The alignment is labeled 'Bases 1188' and 'Insert 1189'. The 'ASSEMBLY WIZARD' and 'SPLIT WORKSPACE' buttons are visible at the bottom right.

Το γονίδιο του υποδοχέα OR85c κλωνοποιήθηκε στο φορέα pBLUESCRIPT.

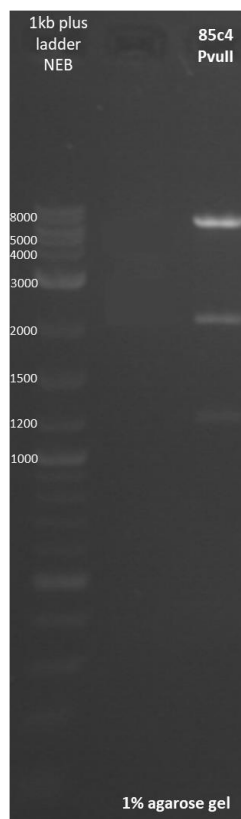


## Κλωνοποίηση OR85c σε πλασμιδιακό φορέα pUAST και ταυτοποίηση με επιβεβαιωτικές πέψεις με ένζυμα περιορισμού

Το μήκος του pUAST κομμένου με EcoRI/XhoI είναι 8876 bp ενώ του ενθέματος κομμένου με τα ίδια ένζυμα είναι 1253 bp. Άρα το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο έχει μήκος 10129 bp.



Εικόνα 25: Ηλεκτροφόρηση 2μl δείγματος mini-prep OR85c/DH5α *E. coli* κύτταρα.



Αναμενόμενες ζώνες

OR85c PvuII

6.840 bp

2.080 bp

Εικόνα 26: Πέψη 85c4 με PvuII-HF

## Αλληλούχηση OR85c που κλωνοποιήθηκε σε πλασμιδιακό φορέα pUAST

Τα αποτελέσματα της αλληλούχησης συναρμολογήθηκαν με την χρήση της πλατφόρμας Geneious (βλ. παράρτημα) . Ακολούθησε blast με την χρήση της συναινετικής αλληλουχίας (consensus) για να επιβεβαιωθεί η ομολογία.

Sequences producing significant alignments								Download	Manage columns	Show	
Select all 1 sequences selected								GenBank	Graphics	Distance tree of results	MSA Viewer
Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession				
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Cerialtis capitata strain EgII genome assembly contig: scaffold_1_whole_genome_shotgun_sequence</a>	1363	1965	72%	0.0	94.74%	101214917	<a href="#">CAJHJ101000001.1</a>				

Τελικά, πραγματοποιήθηκε στοίχιση του κωδικής περιοχής του γονιδίου OR85c με τις δύο αναγνώσεις της αλληλούχησης.



Η νουκλεοτιδική αλληλουχία που έχει κλωνοποιηθεί στοιχίζεται 100%.

Η αλληλουχία του γονιδίου 85c της μεσογειακής μύγας που εντοπίστηκε από το BLAST και είναι ίδια με την κλωνοποιημένη αλληλουχία είναι από τα δεδομένα αλληλούχησης γονιδιώματος του στελέχους EgII, όπου είναι και το στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε για την πειραματική διαδικασία.

Οι εκκινητές σχεδιάστηκαν στην αλληλουχία του γονιδίου 85c από δεδομένα αλληλούχησης γονιδιώματος του στελέχους ISPRA. Για αυτό έγινε στοίχιση των αναγνώσεων της αλληλούχησης και με το γονίδιο που χρησιμοποιήθηκε εξαρχής.



Εντοπίζονται 4 μεταλλάξεις στην αλληλουχία: 3 σιωπηλές και μία μη-συντηρητική μετατάλλαξη από σερίνη σε προλίνη (S33P).

## Συζήτηση

Έντομα-εχθροί των γεωργικών καλλιεργειών εξακολουθούν να είναι στα σημαντικότερα οικονομικά και κοινωνικά σύγχρονα ζητήματα. Οι μέθοδοι αντιμετώπισης του όμως έχουν αναδείξει μια σειρά ζητημάτων σε σχέση με το περιβάλλον, την ισορροπία οικοσυστημάτων και τη δημόσια υγεία. Η αλόγιστη χρήση εντομοκτόνων έχει με δυσμενείς συνέπειες για την ανθρώπινη υγεία και το περιβάλλον, ενώ πιο οικολογικές τεχνικές δεν έχουν την απαραίτητη εξειδίκευση, επιδρώντας έτσι σε κοινωφελή έντομα και διαταράσσοντας καίρια τις ισορροπίες των φυσικών πληθυσμών.

Η διεύρυνση των μοριακών γνώσεων σε σχέση με το οσφρητικό σύστημα της μεσογειακής μύγας και του δάκου της ελιάς θα ρίξει φως σε βασικές λειτουργίες των εντόμων αυτών, καθώς η όσφρηση καθοδηγεί συμπεριφορές όπως η σύζευξη, η ωοαπόθεση και η εύρεση της τροφής. Η ανάλυση των γονιδίων και των πρωτεϊνών που εμπλέκονται στο σύστημα αυτό μπορεί να συντελέσει καθοριστικά στη βελτίωση των υπάρχουσών τεχνικών ελέγχου και καταπολέμησης τους.

Η παρούσα διπλωματική εργασία αποτέλεσε την προσπάθεια εντοπισμού και ανάλυσης γονιδίων τα οποία κωδικοποιούν πρωτεΐνες με ρόλο στις οσφρητικές διαδικασίες της μεσογειακής μύγας και του δάκου. Για την επίτευξη αυτού ως αφετηρία ήταν η ενίσχυση και κλωνοποίηση γονιδίων οσφρητικών υποδοχέων, ομόλογων του συγγενικού είδους *D.melanogaster*. Τα συμπεράσματα και τα ζητήματα που προέκυψαν θα παρουσιαστούν χωριστά προς περαιτέρω διερεύνηση.

### Κλωνοποίηση γονιδίων οσφρητικών υποδοχέων

Στη δροσόφιλα έχουν χαρακτηριστεί και τα 60 γονίδια οσφρητικών υποδοχέων της (Robertson , Warr, & Carlson, 2003). Σε έντομα δροσόφιλας μπορεί να γίνει εισαγωγή κλωνοποιημένου γονιδίου OR με ένεση των πλασμιδίων και να εκφραστεί εκτοπικά ο οσφρητικός υποδοχέας της μεσογειακής μύγας ή του δάκου στην επιφάνεια οσφρητικού νευρώνα δροσόφιλας. Τότε, απόκριση σε οποιαδήποτε οσμή που δεν καταγράφεται σε προφίλ ενεργοποίησης δροσόφιλας-μάρτυρα οφείλεται στην ενεργοποίηση του προς μελέτη υποδοχέα.

Οι πληροφορίες των προσδετών μπορούν να χρησιμοποιηθούν για μοντελοποίηση και σύνθεση νέων μορίων που θα ενεργοποιούν ισχυρά τους υποδοχείς. Αν πρόκειται για υποδοχείς φερομονών ή τροφής τότε τα καινοτόμα συνθετικά αυτά μόρια είναι χρήσιμα για την προσέλκυση (Lure) των εντόμων, και μάλιστα με ειδο-ειδικό τρόπο σε παγίδες. Η εκτεταμένη ανάλυση των ουσιών του μείγματος προσέλκυσης και των επιπέδων απόκρισης του εντόμου είναι οι προτάσεις που θα αναβαθμίσουν τις ήδη υπάρχουσες παγίδες αυτού του τύπου.

Επιλέχθηκε η δροσόφιλα ως οργανισμός για να γίνει εισαγωγή των γονιδίων λόγω συγγένειας των ειδών. Επίσης, ως οργανισμός- πρότυπο έχει το πλεονέκτημα να έχει μελετηθεί εκτενώς και να είναι πλήρως χαρακτηρισμένο το οσφρητικό της σύστημα.

Για τις ενέσεις στην δροσόφιλα προτείνεται η χρήση του πλασμιδίου pUAST γιατί είναι κατάλληλος φορέας για εκτοπική έκφραση γονιδίων σε έντομα.

Μαζί με τον προς μελέτη υποδοχέα θα γίνει εισαγωγή και του συνυποδοχέα, ώστε να σχηματίζεται το λειτουργικό σύμπλοκο και να μπορέσουν να καταγραφούν αποτελέσματα. Ο συνυποδοχέας έχει ήδη κλωνοποιηθεί.

Από τα επτά γονίδια που επιλέχθηκαν μόνο ο υποδοχέας OR85c κλωνοποιήθηκε επιτυχώς στο πλασμίδιο pUAST. Στα υπόλοιπα γονίδια, παρά την προσπάθεια βελτιστοποίησης των συνθηκών, δεν έγινε κλωνοποίηση. Αυτό πιθανώς οφείλεται στην μη ευελιξία σχεδιασμού των εκκινητών. Οι εκκινητές, αφού η μήτρα της PCR ήταν cDNA, αναγκαστικά βασίστηκαν αποκλειστικά στις 15-20 βάσεις των άκρων των αλληλουχιών. Αυτό δεν αφήνει περιθώρια για να σχεδιαστούν primer με τις ιδανικές ιδιότητες.

Επιπλέον, οι εκκινητές σχεδιάστηκαν βάσει του διαθέσιμου γονιδιώματος μεσογειακής μύγας στελέχους ISPRa, που είναι διαφορετικό στέλεχος από αυτό που χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή cDNA και κατ' επέκταση την κλωνοποίηση. Ακόμα και μεταξύ στελεχών του ίδιου είδους υπάρχει γενετική ποικιλομορφία (Haymer, McInnis, & Archangeli, 1992) και σε αυτή την περίπτωση πρόκειται για δύο εργαστηριακούς πληθυσμούς, πληθυσμούς δηλαδή που συντηρούνται υπό ελεγχόμενες συνθήκες σε μικρό -συνήθως- μέγεθος. Επομένως, είναι πιθανό αλλαγές που δεν εξελίσσονται μέσω της φυσικής επιλογής (όπως σιωπηλές μεταλλάξεις) να διατηρούνται.

Εξαιτίας των παραπάνω οι εκκινητές δεν είναι οι ιδανικοί και το αποτέλεσμα είναι η μη ειδική σύνδεση τους. Προωθείται η ενίσχυση παραπροϊόντων και όχι των γονιδίων-στόχων. Ακόμα και με την πρόσδεση των εκκινητών στο cDNA των γονιδίων για να τα ενισχύσουν, αν ταυτόχρονα προσδένονται σε μη ειδικές θέσης σύνδεσης τότε στην αντίδραση της PCR προωθείται η ενίσχυση των μικρότερων αλληλουχιών. Δεδομένου ότι οι αλληλουχίες των γονιδίων που στοχεύθηκαν για να ενισχυθούν είναι μεγάλες (1162bp- 1455bp) γίνεται κατανοητή τόσο η δυσκολία ενίσχυση τους αλλά και η παρουσία των παραπροϊόντων.

Η προσπάθεια μείωσης των αλληλουχιών που αποτελούν την μήτρα της αντίδρασης της επαναληπτικής PCR δεν ήταν αρκετή για να ενισχυθούν τα γονίδια των υποδοχέων.

Ούτε η αύξηση της θερμοκρασίας τήξης οδήγησε σε περιορισμό των παραπροϊόντων.

Το πρόβλημα ωστόσο μπορεί να είναι και τεχνικό, στην περίπτωση που κατά την κοπή του πηκτώματος αγαρόζης για την ανάκτηση DNA σε οποιαδήποτε PCR δεν απομονώθηκε η ζώνη που περιείχε την ενισχυμένη αλληλουχία-στόχο.

Με αυτά τα δεδομένα, για τους υποδοχείς που δεν κατάφεραν να ενισχυθούν μπορούν είτε να γίνουν περισσότερες προσπάθειες αλλαγής συνθηκών (π.χ. gradient PCR) ή αν υπάρχουν διαφορές στους εκκινητές των διαφορετικών στελεχών Μεσογειακής Μύγας να σχεδιαστούν εκ νέου οι εκκινητές.

Ωστόσο, όσο κανένας από τους άλλους οσφρητικούς υποδοχείς των εντόμων αυτών δεν είναι κλωνοποιημένος, μπορεί να γίνουν νέες προσπάθειες για άλλους υποδοχείς μετά από σχεδιασμό εκκινητών για αυτούς.

## OR85c

Το γονίδιο OR85c ήταν το μοναδικό από όσα εξετάστηκαν που κλωνοποιήθηκε επιτυχώς όπως φαίνεται από την στοίχιση των αλληλουχιών. Η κλωνοποιημένη αλληλουχία, όπως

φαίνεται και από την στοίχιση με τα δεδομένα γονιδιώματος από μεσογειακή μύγα στελέχους EgII, είναι ακριβώς η ίδια.

Στην στοίχιση, βέβαια, με την αλληλουχία που διατίθεται από το γονιδίωμα μεσογειακής μύγας στελέχους ISPRa παρατηρούνται τέσσερις νουκλεοτιδικές υποκαταστάσεις μεταξύ των δύο αλληλουχιών. Τρεις στις τέσσερις είναι σιωπηλές μεταλλάξεις καθώς δεν αλλάζει το αμινοξύ που κωδικοποιείται στην πρωτεΐνη. Ωστόσο, μία μετάλλαξη είναι μη συντηρητική μετάλλαξη με λάθος νόημα καθώς από σερίνη παίρνουμε προλίνη (S33P) που έχουν διαφορετικές φυσιοχημικές ιδιότητες.

Η γονιδιακή ποικιλομορφία μεταξύ πληθυσμών ενός είδους είναι γνωστό ότι υπάρχει (Haymer, McInnis, & Archangeli, 1992). Ωστόσο είναι αξιοσημείωτο ότι σε αλληλουχία 1245bp υπάρχουν τέσσερις αλλαγές.

Ανεξάρτητα όμως από το πλήθος των μεταλλάξεων, οι μεταλλάξεις αυτές δεν εξελίσσονται βάσει της επιλογής. Ακόμη και η μετάλλαξη που δεν είναι σιωπηλή, δεν επηρεάζει τη λειτουργία του υποδοχέα γιατί πρόκειται για ένα αμινοξύ στο διαμεμβρανικό μέρος του υποδοχέα. Ειδικά για τον σκοπό αυτού του εγχειρήματος κλωνοποίησης, μέγιστης σημασίας είναι η περιοχή σύνδεσης του προσδέτη, δηλαδή η περιοχή που θα καθορίσει την ειδικότητα και ικανότητα κάποιου μορίου να προσδεθεί και να ενεργοποιήσει τον υποδοχέα στέλνοντας σήμα στον εγκέφαλο.

Επομένως, το κλωνοποιημένο γονίδιο μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε παρακάτω πειράματα στην προσπάθεια αποκωδικοποίησης του οσφρητικού της μύγας μεσογείου και τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών θα είναι γενικά. Δηλαδή, θα δίνουν πληροφορίες για κάθε στέλεχος μεσογειακής μύγας.

#### OR82a

Τα αποτελέσματα διαγνωστικών πέψεων του υποδοχέα 82a ήδη προδιαθέτουν ότι το ένθεμα που κλωνοποιήθηκε δεν πρόκειται για το γονίδιο του υποδοχέα. Όταν έγινε η πέψη με τα ένζυμα BbsI/PvuII και BbsI/BamHI δεν εμφανίστηκαν τα αναμενόμενα πρότυπα κοπής.

Όντως η αλληλούχηση του ενθέματος ανέδειξε ότι το τμήμα που κλωνοποιήθηκε δεν είναι του υποδοχέα αλλά είναι τμήμα ενός rRNA της υπομονάδας 18S του ριβοσώματος. Συγκεκριμένα από 766bp έως 1741 ενός μέρους της αλληλουχίας του γονιδίου.

#### OR67c

Τα αποτελέσματα διαγνωστικών πέψεων του υποδοχέα 67c εξίσου προδιαθέτουν ότι το ένθεμα που κλωνοποιήθηκε δεν είναι γονίδιο του υποδοχέα. Στην πέψη με τα ένζυμα BamHI/AccI το ένθεμα φαίνεται πως έχει μικρότερο μήκος από το αναμενόμενο κατά περίπου 200 bp καθώς η ζώνη αυτού είναι ανάλογη της 800bp ζώνης του ladder αντί της 1000bp ζώνης του ladder, όπου αναμενόταν.

Όντως, η αλληλούχηση του ενθέματος ανέδειξε ότι το τμήμα που κλωνοποιήθηκε δεν είναι του υποδοχέα. Μετά από αναζήτηση της ομόλογης αλληλουχίας χρησιμοποιώντας το blast φάνηκε πως είναι τμήμα της πρωτεΐνης peste (239aa-381aa).

Η πρωτεΐνη αυτή αποτελείται από 381 αμινοξέα και ανήκει στην οικογένεια CD36. Έχει ρόλο στην μυκοβακτηριακή μόλυνση. Μεσολαβεί στην μόλυνση από *M. fortuitum* και την πρόσληψη του *M. smegmatis* (Philips, Rubin, & Perrimon, 2005). Η βιολογική διαδικασία στην οποία συμμετέχει η πρωτεΐνη *peste* δεν είναι γνωστή ωστόσο σε μοριακό επίπεδο έχει προταθεί πως επιτρέπει την λειτουργία του υποδοχέα scavenger (Gaudet, Livstone, & Thomas, 2011).

### Μελλοντικές προσεγγίσεις

Η προσπάθεια κλωνοποίησης ενός αριθμού οσφρητικών υποδοχέων από cDNA *C. capitata* του στελέχους EgII κατέληξε στην επιτυχή κλωνοποίηση ενός υποδοχέα, του OR85c, ενώ ταυτόχρονα αναγνωρίστηκαν σφάλματα που η αποφυγή τους θα βελτιστοποιήσει την απόδοση του εγχειρήματος χαρακτηρισμού δομικών μορίων του οσφρητικού της μεσογειακής μύγας.

Ως αναφορά τον κλωνοποιημένο υποδοχέα, πλέον αφού βρίσκεται σε κατάλληλο φορέα rUAST μπορούν να πραγματοποιηθούν ενέσεις αυτού σε μεταλλάγματα δροσόφιλας. Με την ετερόλογη έκφραση του υποδοχέα σε στέλεχος δροσόφιλας που δεν εκφράζει τον ομόλογο OR85c υποδοχέα θα επιτρέπει την μελέτη αυτού και των προσδετών του.

Στη δροσόφιλα μπορεί να δοκιμαστεί ποικιλία προσδετών, υδατοδιαλυτών και μη, και να καταγραφεί το προφίλ ενεργοποίησης του υποδοχέα. Τα δεδομένα μιας τέτοιας ανάλυσης θα αναδείξουν τον βέλτιστο προσδέτη ή τους βέλτιστους προσδέτες του υποδοχέα.

Η δομή τόσο του υποδοχέα όσο και των βέλτιστων προσδετών του είναι πληροφορίες χρήσιμες για μοντελοποίηση καινοτόμων προσδετών. Τέτοια νέα μόρια θα έχουν την ικανότητα να ενεργοποιούν ισχυρά τους οσφρητικούς υποδοχείς και το σήμα που θα μεταδίδουν στο έντομο από την ενεργοποίηση αυτή θα καταλήγει στην προσέλκυση του εντόμου.

Μετά τον σχεδιασμό των νέων προσδετών, αυτοί σε πρώτη φάση, θα δοκιμαστούν βιοδοκιμές συμπεριφοράς σε σταθερές εργαστηριακές συνθήκες για πειραματική απόδειξη της ικανότητας προσέλκυσης. Τελικά, θα διενεργηθεί λειτουργική ανάλυση της έκφρασης των γονιδίων των οσφρητικών υποδοχέων ώστε να επιβεβαιωθεί η συμμετοχή τους στην αναγνώριση των συνθετικών οσμικών ερεθισμάτων.

Για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας της μεθόδου, αυτή πρέπει να εφαρμοστεί και στο πεδίο.

Ως αναφορά τις ανεπιτυχείς προσπάθειες σημαντικό είναι που αναγνωρίστηκε η αστοχία στους εκκινητές. Δεν λήφθηκε υπόψιν η ενδο-ειδική ποικιλομορφία των γονιδίων και οι εκκινητές σχεδιάστηκαν με δεδομένα του γονιδιώματος μεσογειακής μύγας στελέχους ISPRA. Έτσι η ενίσχυση, που ήδη δεν διέθετε τους ιδανικότερους εκκινητές, λόγω χρήσης cDNA μήτρας, έγινε περισσότερο μη ειδική. Αυτό είχε σαν αποτέλεσμα την μη ενίσχυση των γονιδίων των υποδοχέων αλλά παραπροϊόντων και μάλιστα στις περιπτώσεις των 67c και 82a κλωνοποιήθηκαν διαφορετικά τμήματα του γονιδιώματος της μεσογειακής μύγας. Συνεπώς, μελλοντικά τα πειράματα πρέπει να διεξαχθούν με εκκινητές σχεδιασμένους για το στέλεχος που χρησιμοποιείται.

## Συμπέρασμα

Λαμβάνοντας υπόψιν όλα τα παραπάνω, η κλωνοποίηση του υποδοχέα 85c ανοίγει το δρόμο για να προχωρήσουν τα πειράματα στην εισαγωγή του σε δροσόφιλα ώστε να επιτευχθεί η μελέτη του. Όσον αφορά τους υπόλοιπους υποδοχείς αρχικά πρέπει να ελεγχθεί η διαφοροποίηση των αλληλουχιών μεταξύ διαφορετικών στελεχών για να αξιολογηθεί η ομολογία των εκκινητών με τα άκρα των αλληλουχιών του στελέχους που είναι διαθέσιμο στο εργαστήριο για κλωνοποίηση. Σε περίπτωση ποικιλομορφίας θα πρέπει να σχεδιαστούν νέοι εκκινητές για τα γονίδια των συγκεκριμένων εκκινητών. Αν οι εκκινητές είναι κατάλληλοι για τα άκρα τότε μπορούν να συνεχιστούν οι προσπάθειες κλωνοποίησης με αλλαγές ίσως συνθηκών, για παράδειγμα αύξηση θερμοκρασίας για περιορισμό παραπροϊόντων. Ταυτόχρονα, μπορεί να συνεχίσει η αναζήτηση νέων οσφρητικών υποδοχέων για κλωνοποίηση.



## Παραρτήματα

Πίνακας 1: Εκκινητές για την ενίσχυση γονιδίων οσφρητικών υποδοχέων ομόλογων της δροσόφιλας.

Γονίδιο Στόχος	Ορθόλογα <i>D. Melanogaster</i>	Αλληλουχία εκκινητή	Ένζυμο περιορισμού	Μέγεθος
<i>C.c</i> <i>OR67c</i>	DmelOr67c	F: <b>CGGAATTCGCCACC</b> ATGTTGCCTGCAGCGCG R: <b>CGGCTCGAG</b> TTAATTTCTTTGTCACTG	EcoRI XhoI	1254bp
<i>C.c</i> <i>Or82a</i>	DmelOr82a	F: <b>CGGAATTCGCCACC</b> ATGAAGTATGTTTTGTTG R: <b>CGGCTCGAG</b> CTACTCAATAGATTG	EcoRI XhoI	1162bp
<i>C.c</i> <i>Or74a</i>	DmellOr35a	F: <b>CGGGATCCGCCACC</b> ATGTACTIONGATAAAGTACC R: <b>CGGCTCGAG</b> TTATCGCATTGAAGTCAG	BamHI XhoI	1291bp
<i>C.c</i> <i>Or45a</i>	DmelOr45a	F: <b>CGGAATTCGCCACC</b> ATGCTGGTACATTCTC R: <b>CGGCTCGAG</b> CTACGAAGATTGCTGATC	EcoRI XhoI	1247bp
<i>C.c</i> <i>47b</i>	DmelOr65a	F: <b>CGGAATTCGCCACC</b> ATGCTCCACGAATGCTCGG R: <b>CGGCTCGAG</b> TCAATCGTTCATGGTGCG	EcoRI XhoI	1344bp
<i>C.c</i> <i>Or85c</i>	DmelOr85c	F: <b>CGGAATTCGCCACC</b> ATGTGTGAGAACATTGAATC R: <b>CGGGATCCGCCACC</b> TTAATTACTGTACATTGTGC	EcoRI BamHI	1245bp
<i>C.c</i> <i>Or59a</i>	DmelOr59a	F: <b>CGGAATTCGCCACC</b> ATGTCATCGCTTTAATCTCG R: <b>CGGCTCGAG</b> TCATTTCATTCTTCATTATAACAGC	EcoRI XhoI	1455bp
<i>B.o</i> <i>OR67c</i>	DmelOr67c	F: <b>CGGGATCCGCCACC</b> ATGTCGCCTGAGGC R: <b>CGGCTCGAG</b> TTAGTTTCCATTGCCGC	BamHI XhoI	1294 bp
<i>B.o</i> <i>Or74a</i>	DmelOr74a	F: <b>CGGAATTCGCCACC</b> ATGTTGTATCG R: <b>CGGCTCGAG</b> TCATTTGCGCATGG	EcoRI XhoI	1762 bp
<i>B.o</i> <i>Or85c-like</i>	DmelOr85c	F: <b>CGGAATTCGCCACC</b> ATGCCAAATGTTATAAGC R: <b>CGGCTCGAG</b> TTAATTACTGTACATTGTGCGG	EcoRI XhoI	1383bp
<i>B.o</i> <i>45a-like</i>	DmelOr45a	F: <b>CGGGATCCGCCACC</b> ATGACGAATAGAAGTGC R: <b>CGGCTCGAG</b> TCACATAGTTTTCTGCTCC	BamHI XhoI	1098 bp
<i>B.o</i> <i>2a-like</i>	DmelOr2a	F: <b>CGGAATTCGCCACC</b> ATGTACTIONGAAAATC R: <b>CGGCTCGAG</b> TTATTTAAAACCTGCTTAGC	EcoRI XhoI	1182 bp
<i>B.o</i> <i>Or59a-like</i>	DmelOr59a	F: <b>CGGAATTCGCCACC</b> ATGAGCCAACCACTGAACAGC R: <b>CGGCTCGAG</b> CTACTTAACCTTCATGATGACAGC	EcoRI XhoI	1137 bp

## Αλληλουχίες γονιδίων οσφρητικών υποδοχέων

### **C.cOR67c**

**NCBI Reference Sequence: XM\_004521019**

**Μέγεθος κωδικής αλληλουχίας: 1254bp**

```
ATGTTGCCTGCAGCGCGTACCTTTGGCGAGTTCATACGCATACCAATCAGGTTTTATCAAACAATCGG
AGAAGATCTCTACGAACATCGCTCTCCACACCCGCATACGTCGTCTTATACTGAAAGCCTTGCTCTATA
TCGGTTTCCTAAACTTCAATGTACTTGTGTTGGGTGAGATTATCTACTTCGTCAAAGCCTTAAACTCCT
TCGCTACGGTTTTGGAAGCAACTGGTGTGGCGCCTTGCAATTGGGTTCTCTTTGTGGCGGATTTAAG
CAAATCGCCCTGACCGTGCATCGTCAAACCTACGCGAACATTTGGATCAAATGGAAGAGTTATTTCC
AAAACTGTACGACAGCAGGCGCAGTACAAGCTGCCGACGCGTGAACGTGTTATGCGTCGTGTAAT
GGGTGTTTTCACTACTTTGTCTAGCATACACTACCACATTCAGCGTTTATCCGGCACTCAAGGCTAC
TGTAACAATTTGGCTGTTGGGTGCGCCGACGTTTGAGCGTAATTTGGCTTTGCCATATGGTATCCAT
ATAATGCCACAGGAAAGACTTGGGTCTATTGGCTCACGTATATGGGTCAAGTGCATGGCGCTTATTT
GGCTGGTGTGGCCTTTCTCTCAGCCGATTTGATATTGGTTGCTTCAGTGACACAGCTTTGTATGCATT
TCGATTACATATCACGTTGTTGGAGGATTCGCTGGCGCATCGAAGAAGTGTGCCGAAGAGGATAT
CAAGTATTTGCAAGCATTAGTCGTGAGGCATGCCAAGTGTGTTAGAGTTGAGCGAACATGTCAACAGC
ATTTTCAGTTTCTTTACTGCTCAATTTCTGACTGCTTCGTTGACCATCTGTTTTATTGGATTTCAAG
TCACTGCTTCATCTACAGAAGACATTGTGAAATATATTATTTTCTAACTGCCTCCTTGGTGCAAGTAT
TTGTGGTCTGCTACTATGGTGATGAGCTGATGACAGCGAGTCTACGCGTTGGGGATGCGGCTTATAA
TCAAAATTGGTTTCGAATGTGATACACGATATAAACGGCTATTGATCATACTGATATTACGCAGTCAAA
AACCGCCTCGATTTCGTGCCCCACATTTCCACCAATTTCAATTAACACTTACATGAAGGTTATCAGCA
TGTCCTATCAGTTTTTCGCTTTGTTGCGCACCACCTACAGTGACAAAGGAAATTA
```

### **C.cOR82a**

**NCBI Reference Sequence: XM\_012303660.2**

**Μέγεθος κωδικής αλληλουχίας: 1162 bp**

```
ATGAAGTATGTTTTGTTGTTGTTGTTGATGATGTCGGCACAATTGCCAATGATGGATTACATTATATA
TCATATCGATGATTTGGAATTGGCGACAGCTTGCCTTAGTATTGTCTTCACCAACATACTGACCGTCA
TTAAGACTTCAACATTTTTGGCCTACAAGCGCGAGTTCAAAGTCTAATGACCGAGTTTGAGTTGATG
TATGATGAATTGCGTGGAGCGGGCGCCAAGCCTTTGCTAGTGACGGTCAATGTAGGTGCAAAACGA
TTTGTCAAACGTACTTTTTATAGCGTGTCTTGCACTGGCTTATACTTCACAATCAAACCACTGATCGGC
ATGTTTTGGGCTAAGTTTCAGGAGAAACCTTTGTTGCTGGAGCTGCCTATGCCTATGAGGTTCCCTTT
TGACTTCGAATCTACTCCCGGTTATCAAATTCCTACGTCTATACAATTTTATGATCACTATAGTTTGGT
GATGCATGCAACATCTGTGGATGGTCTATTCGTGTCAATCACCACAACTTTCGCTGGTCAATTTCAAG
CTTTGCAATATTTATAGAGACAAATACATTCAACAACTCTGAAGCACGTCTACAGAAGGAATTACGT
TTCTACGTTGAGTACCATGTGCGGCTATTGGGGCTCGCACAAAGCGTACAACGCATATTTAAGCCCA
TAATTTTTGGACAATTTCTGATGACATCGTTGCAAGTGTGTGTCATAATTTATCAGCTGGTTATGAATA
TGGGCGTTATTTATGGAATGGTTATCTATTGTACATTCCTCAGCTCAATTTTGTACAAATTGCTGATTT
ACTGTTACGGCGCTGAATTTCTCAAATTTGAGAGTTCGCCGTCGGCACAGCTGTTCAAATGTCGCA
```

GTGGTATAATTTACCGCCTCGTCATCGCCACGTTCTACGTCTGATGATGGTACGTTTCGCAGCGTGAGA  
TCATCATTAGTGCTGGCTTCTATGAGGCGTCTTTGGCCAATTTTATGAGCATTTTGAAGGCCGCCATG  
TCATATATCACTTTTATTCAATCTATTGAGTAG

#### **C.cOR74a**

**NCBI Reference Sequence: XM\_020860376.1**

**Μέγεθος κωδικής αλληλουχίας: 1291bp**

ATGTA CTGATAAAGTACCTGGCGGAGGATGCAGATGAAAAGGAGGCCTGGCGGTCGCTCGTCAAA  
ATGTTGTATCGTCCGAGGTTGCCTAACGGTAAATTGATTCCGCTCTCTTGGCCCCTAGCAGCCTATCG  
CCTACTGAATAATATTTGTTGGCCACTACGGGATAATGCCAACCGACTGGAACGTTTATTTCGATCGCT  
TTTGCTGGGCGCTGGGTTTCTTCATATTTATACAGCACAAACGATGCCGAGCTCCGTTATATCCTTTCAA  
ATAACAACAACCTTGATCAGATGCTGATTTGTGGTCCAACCTATCTCATATTGGTTGAGGCACATTTA  
CGTGCGTTTCAGTTGGGTTTAAAGAAAAATAATTTCAAAAATTTTCTAAAGAGATATTACGCTGAAAT  
CTATATAGACAAACCAACTCATCCCAAACCTATGCAAATATACAGAAACGTTTACGTCCGATTTGGT  
TTTATTCCTTTTATATTATAGCACTCTATTTTCTATGTTATAACACCGTTAACAAATTA CTAAAAAA  
TGTA AAAAGCGCCACTCTTAAAAATGACTATCCCTTCGATATTACACCAATCCCATCTATGTGGCTGT  
GGTGCTCTCAACATCTGGGTGGGTTTACCCTAATCTCACTGGTCGCTGGCGAGGATAATACTG  
TCCGAGGTCATGCTACATTTGAATGGACGTTTCTGCTGTTACAACAGAAACTGCGCCAAAATGCGG  
ACCGTCTGCTACACAATACCGATGGCAGGTATATTGCCGATGCATTGCAAGACCAGATAATTGAGGC  
CATCGAGGAAAATGTGCGTTTATATGAATTTGCTAAGGGATTTGAGCGCGAATTCTCTTTTCGCATTT  
TCGTCAATTTATCCTTTAGTGCGGGGCTATTGTGTGTGCTGTGTTTCAAAGTGTATACGAATCCGATG  
GCTAGTTATGGCTTCATGTTTTGGATCTGTGCCAAAATTATGGAAATGATATTGGTTGGTCAATTGGG  
CTCCACAATGATTTATACCACTAATGAAGTAAGCTCGACTTTTTATGAGTGCAATTGGGAGTTGGTTT  
TAATGAAGTCCACGGATACGAAAGCTAATGTACGCCTTTTGAAAACACTAGCTTTGGCCATTAGCACT  
AGTGGGAAACCATTTGTTTAAACCGGCTTCAATTATTTAGCGTCTCCTTGACTGCTGTACTAAAGATT  
TTACAGGGTGCCGGCTCGTATTTTACTTTTCTGACTTCAATGCGATAA

#### **C.cOR45a**

**NCBI Reference Sequence: XM\_004534410.3**

**Μέγεθος κωδικής αλληλουχίας: 1247bp**

ATGCTGGTACATTCTCATTATAAAAAGCCATTCCATTTGTAGTCTTTGTGTCAGAAGGTCAACAGGCAG  
CCAAAAGATGTTCCACTCGGACTTAGTTATTAATGGATATTTTCAATTACAAAAACACTTTTCAACG  
ACTCGGAATAGATATGACGACGAGAAATGCATCCATAACGCATATATATTTTTTAGCACTACAAATTG  
TTGCTTTGGTCACTATCACTATGCCAATGGTCATTTATAGTTGTCAACATTTGCAAGAGATTGCCGAA  
GTGACCAATGCAATGGCGCCCTTATGCAAGCGACTATAACGCTTTGGAAGATCTGGCGTGTTATTT  
ACCGGCGTAAGATGATGGCGGAGTTAGTGAAGATATTTACTCGGTGTCTACAAAAGCTACAAAGC  
AGGAGTTGACTCATCTAAGACGAGAGAATAATCGTGAGCGTATTATGAATACCTTTTATTATTTCG  
GTGTTCAACACTGGCGTGTGGCGCTCATAGCACCGGTGTTGGTTAGCTTCATACAATACCTGCGTCT  
CGGTGAATTTAGCTATATTGTGGTGCTGAAAGCGACTTATCCTATAGAATTAGCGCGCCCGCTAAATT

ACGTCCTCATCTGGCTTTGGTCTGCTATAGCGATTTATGGCGTTATTTATGGTTCGGTCTCTGTAGATA  
GTCTCTACTCCTGGTATATACATAATTTGGTGGGCAATTTTAAAATACTGCAGACGAAGTTTGTCA  
GCTGAGCTAATTGCAGAAGTGAGTGAACGACGTGCCTCGATTTACTATTGCCTCGGCTATCATCAGC  
GTCTCATAACCATGTCCGAACAGCTGAATATTATTTATCAACCAATAGTTTTGGTGCAATTTTCATTAA  
ATGCTTTACAAATATGTTTTCTGGCTTATCAAATTTGGTAGCGGCGATGTGGCAGTGGTCGATTTACCA  
TTTTGTTCCATTATCATGACGTGGTGGCATCCAATTGATGATCTATTGTTATGGTGGACAGTATTG  
CAGAATGAGAGTGAAAACGTTGCAAAGTTTATTTCTCAAACAATCAATTCAACAATTTGGCCAATTGA  
CTTGCGCAAAGTACTGTTATTCTCAATGGCGCGCTCAACGACCTTGAAATTGACTGGAATATTTT  
TCGATGTAGACTTGCCTATTTTTATGGGTTTGGCGCACTGCAGGTTTCGTATGTGACGCTCTTACGC  
AGCGTAGATCAGCAATCTTCGTAG

### **C.cOR47b**

**NCBI Reference Sequence: XP\_020713417.1**

**Μέγεθος κωδικής αλληλουχίας: 1344bp**

ATGCTCCACGAATGCTCGGACAAATCAACCATCAGCAACACCATTTTCAACCATCAGTCTTATCGACG  
ACGCAGCCGTAATATTCCTCAAGCAAATTAGAAACCATTTTGGCGCAATTCGCACACTGAAGGAG  
ATGTTACTCTCGGGTGATGCTGCTCACCCGTCGCACACTTGTGTACTATGTTTCGTGCTTATATAAGA  
TACTCGGCTTGTGGCCGTCGCAACGTGGTGTGGAGCAGCCATGTACTATGCATACAATGTGCTAA  
TTATGACCGTTTTAGTTTTCTTTGTGGCAACCATTATTGCTGATCTTTATGTGGCGAGCAGCGACTTCG  
TGCTTTTGGGCGAGGATTTGGTCGTGGCCTTGGGCTTTACTTGATTCTCTTCAAATGATACTCTTC  
GTATGAGCACTGCTGACGTGATGTAATCGTTGACGAGTTCGATGCTTGCACATGAAATTCGCACG  
AGACACATCCGATAGCCCGCATATTAGACGGATACGACAATTGCAAAGAAGTTTTTTTTGGGTGAA  
GCTTCTTTCTCTGCGGTTTTTTCTTTCTCAGTCTCTTTCTTTTGTGCAATGAGCCTACAACCGTACT  
CACACATCAAGCATTACCTTTTCGTTGTGTTTTCCCTTTGGACTCCACGATCCGGATAAGCATCACAT  
TACATTTGTCTGCGTCTACGCATTTCAATGCTTTTGCACGCTCTATATGTTGGTATCCATAGTGGTGAT  
GGATTCTCTGGGTGGCAACTCTTCAATCAGACAACATTGAATTTGCAAATTCTATGCGAGAGTATAC  
GTCATATTGGTTACGCTGGTGGTTCGCTCAACCACAATAACAGAAGCCGTTTTGTGGCGAGAAGTGG  
AGAGAATGTGGAGTTTCATGTGAAAATCATAGAGTTAGTGGATGGCATAAATCACACCTTCTATTGG  
AATTATGTCTCACAATGGGCGGAGCACTTTTCATGATCTGCTTACGCGCTTTTGAAGCACTCTTGGC  
AAAAGACCAACCAATGGTGGCTATGAAATTTCAAACCTACATGTTCTCCGCTTTTATGCAGCTCTTCTA  
CTGGTGTTCATGGGCAATCGGACTTATTATGATTCCATGGAGGTGGCCACGGCAGCGTATGAGGTT  
TACGCTTGGTATGAGCATTCCCGCGTCTGCAGCGGAATCTGTTGTTTCATGATTAACGCGCTCAGA  
AGCCTTTGGAGTTTCGTTCAAAGCCGTTTTTCGGCTTTACATTCGCCTCGTTCAACAGCATTCTAAGCA  
CATCTACTCTACTTTGCTTTGCTACGCACCATGAACGATTGA

### **C.cOR59a**

**NCBI Reference Sequence: XM\_020857082.1**

**Μέγεθος κωδικής αλληλουχίας: 1236 bp**

ATGTCATCGCTTTAATCTCGTCGTCCTCGTCGCCATCGCCATCGCCGTCGCCGTCGCCGTCGCC  
GTCGCCGTTGCCGTTCCCGTTACCGCAGCGACTTGCAGCAACTGCAGTTGATACCCGCTCATTTTTCA

AACTACATTGGGCGTGCTTTAAAGTACTCGGTGTCGTCGCACCCACCGGGATGTCTTTACCTCGTC  
TACTCTGTGCTGCTGCATTTGCTCGTCAATCTGTGCTACCCTCTGCATCTCGCCCTGATGCTATTCAGA  
AGCCCCAATTCCTCGGCTAATATTCAAATCTCGCGGTGTGCGTAACCTGCATGGCATGCAGTGTGA  
AATTCGTCATTTACACCATGAAAATGTGGCGCATACTGAGTTGGAGTCCATCGTTGCCGCGTTGGA  
TGCACGTGCCTGCAGTCCACGTGAACGTGGTTATTTCTAAAGTTGCGCAAAGATATGCGCCGCATT  
ACTATTGGTTTTCTCAGCATTTACGCGTTTGTGCGGCGTGACGGCAGAGTTGATGTTTTTTTTGTAAT  
GAACATAATTTGTTGTATCCGGCATGGTTCCGTTTCGATTGGCGTGCCAGCAAGTTGAAGTTTTACGC  
GGCGCATTTTTATCAAATTGTCGGCATCTCTATCTCCTGCTGCAGAATTCGTAAATGATTGCTTTCC  
CACGATGGCATTGGCGCTGCTGTGCGGCGCACATCAAATTGCTTGGTATTAGAGTTTCGCAAATTGGC  
CATGAGGGCGAAAAGTTTGATGCAAATGAGTTGGAGTTGTTGCGTTGCATCAAGGATCAGGAGCAC  
TTGTTCAACATGCTCAACACCATACAAAATATTATCTCCCTGCCAATGTTTCTTCAATTTACCGTTACTG  
CAATCAACATCTGTCTGGCCATGGCTGCATTATCTTCTTCGTCGATGCGCCATTGATCGATTATACT  
ATTTGGCATATTTCTCTCCATGCCCTGGAGATATTTCCACCTGTTACTACGGCACGGACTTTCAAT  
TACTTTTCGAGACTCTGCACATTGAGATGTATGCGAGTAATTGGGTAGAGCAGACACAGAAATTTG  
CAAGCATATGATACTCTTCAATGAGCGTTTCGTTAAAGAAGGAGTTGCCATGGCTGGTGGTATGATA  
CGCATTCAATTTGGATACGTTTCGATCGACCTGTAAGGGGGCTTACTCGTTGTTGGCTGTTATAATGAA  
GATGAATGAATGA

### **C.cOR85c**

**NCBI Reference Sequence: XM\_012303108.2**

**Μέγεθος κωδικής αλληλουχίας: 1245bp**

ATGTGTGAGAACATTGAATCATTGAAGCCTTTCTACGCATTCCCAGCTTCTTCTATCGTAGTGTGGC  
GTTGATCTTTGGAACACAAATGGTGGGTCGATACAACGGTTTATTTTCTATTTTGGCTTTTTGAATGTC  
AATTTGTGGCTACTCTCCGAACTAATTTTTGCCATCATAACTGTCAGTGAGAACTTCATACAAGCCACC  
ATGACACTCTCCTATGCTGGCTTTGTGCTCGTTGGCTCTATAAAAATGTACTTTATGTGGCGAAAAAA  
AACAGAGATGACACAATTTCTCAAACCTCATGGATGAAAATTTCCCGCGCACAGCCGAACAACAAAAA  
ATGATGAACTTACGACGACACTTTCGGCAAAGTACGATTGTTATGAGCGGCTTTGCATTGATTTTCAT  
GATACTCATCTGGACGTATAATCTCTATCCCTTCATGCAACGACAAATCTACGATTGTTGGCTGGATA  
CGCGCAGTATCAATAAAACACTACCTTATGAGAGCTATATACCATGGAATTGGCACAATCATTGGAG  
TTTCTATTTGTATTATGTTTTGCAAAGTATTGCGGGTTATCATTCCGCTGCGGGGCAGATCGCTAGCG  
ATTTGGTCTTATGTGCCATGGCTACACAAATGATCATGCATTATGAGTATGTTTCACACAAGATAAGA  
AGTAGATATAGGGGAGAGCGAAAGTGTGTGGACAGCAAAGCGTTAGTTGCCTGAATGCGTTAAAT  
CATTGGACGGAGGAGCAAGTGGCAACGCATAAGGATATGAGGTGGCTTTGCGAAACAATAGCCTAT  
CATTCCAATCTATTGAGCTTATCCGATGTTATGAATGATGTATTAGGTGTACCGTTGTTAGTAAACTTC  
ATGACTTCGTCTTTTGTCAATTTGCTTTGTGGGCTTCAAATGACAATGGACGCCGAGCCGGATTATAT  
GGTTAAGCTGTTTCTTTTCTATTTTCATCGCTAGCGCAAATCTACTTGATTTGCCATTATGGACAGCT  
ACTTATCGATGCGAGTATCAATGTAGCTGCAGCTGTATACGATCAGGATTGGTTTCGATTTGAATGTG  
CGTTATCAACATATGCTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT  
ATTTTGTGCGCATCTCTCGTGGCACCTTGACTGATATTATGCAAATTCCTACAAGTTCTTTACGCTCA  
TTCGTACAATGTACAGTGATTAA

### C.cOR85c

>CAJHJT010000001.1:94392600-94393974 *Ceratititis capitata* strain EGII genome assembly, contig: scaffold\_1, whole genome shotgun sequence

**Μέγεθος κωδικής αλληλουχίας: 1245bp**

ATGTGTGAGAACATTGAATCATTTGAAGCCTTTCTACGTATTCCCAGCTTCTTCTATCGTAGTGTGGC  
GTTGATCTTTGGAATACAAATGGTGGGCCGATACAACGGTTTATTTTCTATTTTGGCTTTTGAATGTC  
AATTTGTGGCTACTCTCCGAACTAATTTTTGCCATCATAACTGTCAGTGAGAACTTCATACAAGCCACC  
ATGACACTCTCCTATGCTGGCTTTGTGCTCGTTGGCTCTATAAAAATGTACTTTATGTGGCGAAAAAA  
AACAGAGATGACACAATTTCTCAAACCTCATGGATGAAAATTTCCCGCGCACAGCCGAACAACAAAAA  
ATGATGAACTTACGACGACACTTGC GGCAAAGTACGATTGTTATGAGCGGCTTTGCATTGATTTTCAT  
GATACTCATCTGGACGTATAATCTCTATCCCTTCATGCAACGACAAATCTACGATTGTTGGCTGGATA  
CGCGCAGTATCAATAAAACACTACCTTATGAGAGCTATATACCATGGAATTGGCACAATCATTGGAG  
TTTCTATTTGTATTATGTTTTGCAAAGTATTGCGGGTTATCATTCCGCTGCGGGGCAGATCGCTAGCG  
ATTTGGTCTTATGTGCCATGGCTACACAAATGATCATGCATTATGAGTATGTTTCACACAAGATAAGA  
AGTAGATATAGGGGAGAGCGAAAGTGTGTGGACAGCAAAAGCGTTAGTTGCCTGAATGCGTTAAAT  
CATTGGACGGAGGAGCAAGTGGCAACGCATAAGGATATGAGGTGGCTTTGCGAAACAATAGCCTAT  
CATTCCAATCTATTGAGCTTATCCGATGTTATGAATGATGTATTAGGTGTACCGTTGTTAGTAACTTC  
ATGACTTCGCTTTTTGTCATTTGCTTTGTGGGCTTCAAATGACAATGGACGCCGAGCCGGATTATAT  
GGTTAAGCTGTTTCTTTTCTATTTTCATCGCTAGCGAAATCTACTTGATTGCCATTATGGACAGCT  
ACTTATCGATGCGAGTATCAATGTAGCTGCAGCTGTATACGATCAGGATTGGTTCGATTTGAATGTG  
CGTTATCAACATATGCTGGTGCTGGTGGTTGCCCGCGCCCAAAAACCAGCAATGTTGAAGGCAACAA  
ATTTTGTGCGCATCTCTCGTGGCACCTTGACTGAT

### B.oOR67c

**NCBI Reference Sequence: XM\_014239493.2**

**Μέγεθος κωδικής αλληλουχίας: 1294 bp**

ATGTCGCCTGAGGCACGAACCTTCAACGAATTCCTACGCATTCTATCAGTTTTTACCAGACAATCGG  
TGAGGATCTCTATGAGCATCGCTCACCATATCGCATAACGACTGTTGCACAAGTCACTGCTCTACA  
TCGGTTTTCATCAATTTCAATATGCTTGTGTTGGGTGAGATTATTTACTTCGTAAAAGCTTTGAACTCGT  
TTGCTACCGTTTTGGAGGCAACCGGTGTGGCGCCATGTATTGGTTTCTCCTTTGTAGCTGATTTAAG  
CAGATCGCCATGACGGTGCATCGTGAAACCTTGCCTGAACATTTGGATCAAATGGAAGAGTTATTTT  
CAAAAACCGCTATGCAGCAAGTTGAATACAAATTGCCACAACGCGAACGTGTTATGCGACGTGTGAT  
GGCCATTTTACGTTACTCTGCTTGGCGTACACATCTACGTTCAAGTCTTTATCCGGCGCTTAAGGCTTC  
CGTACAATACTGGCTTTTGGGTGCGCCATTGTTTGTAGCGTAATTTCCGGCTTTGCCATATGGTATCCAT  
ATAATGCCACAGAGAAGACTTGGGTCTACTGGGTACGTATATGGGTCAAGTGCATGGCGCATATTT  
GGCTGGGGTGGCTTTTCTCTCGGCCGATCTGATATTGGTGGCCTCGGTGACACAGCTTTGTATGCAC  
TTCGATTACATTTACGTTGCCTAGAAGAATTTGGAGGCGCTTCGCAGAAGGGAAGTGCGCAAGAG  
GATTTACAATATTTGCAAGCCTTAGTGGTGAACATGCCAAGTGTGGAGTTGAGCGAACATGTCA  
ACTGCATTTTCAAGTTTCTTTACTACTGAATTTCTAACCCTTCGTTGACCATCTGTTTTATTGGATT  
TCAAATGACTGCTTCGTCTACAGAAGATATTGAAAATATATTTTTTTCTAACGGCCTCGTTGGTCCA

AGTGTGGTCTGCTATTATGGTGATGAACTGATGACAGCGAGCCAACGCGTCGGCGATGCGGC  
CTATAACCAGAACTGGTTCGATTGTGACAGACGTTATAAACAGCTTTTAAACAATAATAATGCGGA  
GTCAAAGCCAGCTTCTATTCGTGCACCCACATCCCACCAATTCGTTTCGTAATATATGAAGGTTA  
TCAGCATGTCCTATCAATTTTTGCGCTTTTGCCTACCACCTACAGCGGCAATGGAACTAA

#### **B.oOR74a**

**NCBI Reference Sequence: XM\_014236173.2**

**Μέγεθος κωδικής αλληλουχίας: 1762 bp**

ATGTTGTATCGTCCGCGTTGGAAAACGGCAAGTTGATTCCACTTTCTTGGCCCGTAGCTGCCTATCG  
ACTCTTGAATCATGTATGCTGGCCACTGCAAGATGACGCAAGCTGGCTGCAGCGTCTGTTTCGATCGA  
TTCTTTGGGCGTTTCGGTTTCTTCATATTTATGCAACACAACGATGCTGAGCTGCGTTATATAATTCGC  
AATAATAATAATCTGGATGAGATGCTAATTTGTGGACCAACGATATCTGATTCTAGTTGAGATTCACTT  
ACGTGCCTTTCAGTTAGGCTTAAAGAAGGAGGCATTCAAGCGTTTCTTGCAGAAATTTTATGCTGAAA  
TCTATATAGATCAGTCATCTCACTCCAAACTCTATGCAAATATACAGAAACGTTTGCCTCCGATTTGGT  
TTAATCCCTATTATATTTAGCACTCTATCCTCTTACGTAATAATGCCGTTAATTAATTATCTGAATAA  
TGTCAAAGTACCGCTCTACAAAATGTATTATCCGTTTCGACATCACGCCAATCCGATTTACGTGGCCA  
TTGTGTTATCAAACATTTGGGTGGGATTCACCGTGATCACCATGGTCTCTGGCGAGGACAACATACT  
ATCCGAAGTGTGCTACATCTAAATGGACGTTTCTGCTACTGCAACAGAAACTGCGTCAAGATGCT  
GATCGTTTGTGTCATATAGTAGACGAAAGAAATATTGCTGATGAACTTCGACGTCAGATTATCGAAG  
CTGTTGAAGAAAATGTTTCGCTGTACAAATTTGCTGAAGATTTTGGAGCGAGAATTTCTTTTCGCTAT  
TTGTCAGTTTGTCTTTAGTGCCGGTTGCTATGTGTAAGTTGATAACGAATCCGATG  
GCTAGTTTGGTTTCATATTTGGATTTGCGCTAAAATTTATGAAATGATTTTGGTTGGCCAGTTAGG  
ATCGACGGTGATTTACACAACAACTAACGAAATGAGTTTCTACTTTCTACGAATGCAATTTGGGAGTTGGTT  
TACTAAAGTCTGGAGATACGAAATCAAATGTGCGTCTAATGAAAACATTGCTTTTAGCGATCAGCACT  
AGTCAGAAACCATTTGTTTGGACCGTTTCAAATATTTAGTATCTTTGGCGGCTGTTTTGAAGATA  
TTGCAGGGCGCAGGTTTCATATTTACGTTTCTAACATCCATGCGCAAATGA

#### **B.oOR85c-like**

**NCBI Reference Sequence: XM\_036373024.1**

**Μέγεθος κωδικής αλληλουχίας: 1383bp**

ATGCCAAATGTTATAAGCTTCGAAGCCTTCTTACGTATACCAAGTTTTTTTTATCGCAGCGTTGGCGTT  
GACTTGTGGAACACTAATGGCGGTCCACTCCAGAATGCTGTATTTACTTCGGCTTGATTAATCTTAA  
CATCTGGCTACTTTCCGAAGTATTTCTCAGTTTTAATGGTCAGTAAGAATTTCATACAAGCAACTAT  
GACGCTTTCTTATGCTGGTTTTGTAAGTTCGCTGCTACCATAAAAATGTTCTATATGCGGCGTAAGAAAG  
CCGAGATGACACGTTTTCTGCAGCTTATGTATACCATATTTCCACACACTGAGCCGCAGCAGAAAATG  
ATGAACTTGCCTAGGCACTTGTGTCAATGCACGATTGTAATGAGCGGCTTTGCAACAATCTTCATGCT  
ACTTATTTGGACCTACAATCTTTATCCATATATGCAACGTCAAATCTACGATTGTTGGTTGCAAGTGCG  
CAGTGTTAAACAAAACGCTGCCCTATGAGAGCTATATCCTTGGAAATTGGCATGATCATTGGAGTTTCT  
ATCTTTACTATACTTTACAAAGCATCGCTGGCTATCATTGCGCTTCGGGACAGATTGCTAGTGATTTG  
GTATTATGTGCTATGGCGACGCAAATTTATGCATTATGAGTATGTTGCACAGACGATAACTGAGT

ATCGACCGCAATTAGTTGATTGTA AAAATTCGAGAGCGCCGAGGCTTAATGCGAGAGCGAGCAAAG  
CTTATTGCAAGGATATGAAATTTCTTTGCGACATAATTGCATATCATGCCAATATTTTGAGTTTGTCCG  
ACATCATGAATGAAGTTTTGGGTGTGCCATTGTTGGTGAACCTTTATGACTTCGTCATTTGTAATTTGCT  
TTGTCCGCTTCCAAATGACTATGGACGCTGAACCGACTATATGGTTAAGTTGTTTCTTTTCTCTTTT  
CGTCGCTGATTCAAATTTACTTAATTTGCCATTACGGGCAGCAACTGATCGATGCGAGTAGCAATGTA  
GCTCGAGCCATTTACAATCACGATTGGATCCATTACATGTCCATTATCAACGTATGCTGGTGTAGT  
CGCCGCGAGAGCTCAAAGCCAGCAATGTTAAAGGCTACAAGCTTCGTGCATATCTCTCGTGGTACG  
TTAACAGATATAATGCAAATTTCTATAAAATTTCTTCACTCTCATCCGCACAATGTACAGTAATTA

### **B.oOR45a-like**

**NCBI Reference Sequence: XM\_014242599.1**

**Μέγεθος κωδικής αλληλουχίας: 1098 bp**

ATGACGAATAGAAGTGCTCGGGTGACCCAAATATATTTTTGACTCTACAAATCATCGCTTTGAGCAC  
CATTCTTATTCCATTTGCGGTTTATAGTTGGCAACACATGCAGGAGATTGTGCGAGGTAACCAATGCAA  
TGCGCCTTTTATGCAGGCTACCATATCGCTTTGGAAGATTTGGCGAGTCATTTATAGACGTAAGCAA  
ATGGCGGAAATGGTAGAGAATATTTATATGATATCGGCCAAAGCCTCGACTAAGGAGCTAACTCACT  
TGATTCAAGAGAATAATCGCGAGCGGCTAATGAATACAGCTTACTACTCGGTATTGATTACTGG  
CATGCTGGCGCTCACAGCTCCC GTTCTGGTCAGCTTCATACAGTATCTGCGCTTCGGCGAATTCAGTT  
ATATTGTGGTGCTCAAGGGCACCTATCCGATCGATTATGCGCGCCCGCTAACTACTTTCTGATATGG  
CTGTGGAGCGCAGCTGCAATCTATGGCGTCATTTATGGCTCAGTCTCTGTGGATAGCCTCTACTCTTG  
GTATATACACAACCTAGTCGGAACTTTAAAATACTTCAGTCGAAATTGGTCACAGCCGAGTGGGCA  
ACCGATTTGAGTGAACGTCGCGAAGAGATTTATTATTGTATTGCGTATCATCAGCGCATTATTGCGAT  
GACCGAGCAATTAATATTATTTATCAGCCTATAGTTTTTGTGCAATTCTACTAAACGCCTTGCAGAT  
CTGTTTTCTAGCCTATCAGATTGGCAGCGGTGTTGTGGACACGGTGGATTACCATTCTATTCTTGT  
CATGATTTCCGTTGGGCATACAGCTGATGATCTATTGCTATGGCGGTCAGCATTTCAGAAATGAGAGC  
GTAAATGTTTGAAGTCCATTTATCAGACTATAAACTCGTCGTCCTGGCCGAACGAGCTTCGTAAAGT  
TCTGTTAATCTCGATGATGCGCGCACAGAAACCCAGCAAACCTGACTGGCATATTTTTCGATGTTGACT  
TGCCGCTCTTTTATGGGTTTGGCGCACTGCTGGTTCTTATGTGACTCTTTGCGAAGTGTGGAGCAG  
AAAATATGTGA

### **B.oOR2a-like**

**NCBI Reference Sequence: XM\_014233463.1**

**Μέγεθος κωδικής αλληλουχίας: 1182 bp**

ATGCTACTGAAAATCAATAGCTGGGATGCTTTCAAGTACCACTGGCGCGTCTGGGACTTAAGTGGCT  
TTCGAGGACCGCAGAAACAATCAGCTTGGTATATTCCTTATAAGTTGTACACAATTGCAATAACATTA  
TTATTTCCGATCTACTACCCTACATGTTTTACGGTGGAGAGTTTGTAGCAGATAACCTGAACGACTTT  
TGCGAAGTGATCTACATAGCCATGGCCGACTTGACACTTAACATCAAGTTCCTCACATTATTTATTGT  
ACGTCGACAATTGTTGGAGCTCAGACCGATACTTAAGCGCTTAGACGCACGTGCGAAAAGTAAAA  
AGAAATTATTGTTCTACAGGATGGCATTAAATTCGGCTAAGAAATGTTTTCTAATCATTTTACGACTATT  
TTATAGCGCCTTCGTCACCAGTCAGTTAATGGTTATTTTCTCATCAGAAACACGTCTCATGTATCCAGC



CTGGTATCCCTTCGATTATCAGGCATCAAAGATCAAGTTTTGGATTGCGTATGGTTATCAAACGCTTG  
GGTTTCTAGTACAATGCACACAAGCCTGCTCGGTAGACACCTATCCGCAAGCCTATATGCGTGTCTT  
ACCGCCACATTTCGGGCGCTATCGCTACGCATCGAACGAATCGGTCGTAAAAATTCAGCAGCGCTT  
CTTCAGAGTTTATGTGCTTAAAAAAGAGGAAATGAAAGGAAATTATAATGAGCTCGTGTGCATGCAT  
CAAGGATCACAAAACGATCATAGAACTGTTTTCGACCATACAAAAACCTATCTCCGGCACATCTATTG  
CTCAGTTCGTTTGTACTGGGGTGGCCAGTGCACCATAGGGGTTTATATGCTGTATGTTGGCTTAAAT  
ATTTCTATTATGTTGAATATGGCCGTCTTCTTCGTATCAGTCACAATGGAAACTCTAATCCTTTGCTATT  
ATGGCGACCTGTTCTGTCAGGAATGCGAGGAGCTTCAAATGCCATTTACAATTGCAATTGGACAGT  
TCAGAGCAGTGAATTTAAAAAGGCATTGTGTTTCTTCTTCTCCGCTCGCAGCGTGTGAACGTCTTAA  
TGGCGGGCAATTGGATACCAGTAAAACTGCCAACATTTGTAATGGTAATGAAATCATCTTACTCCATA  
TTCACTCTGCTAAGCAGTTTTAAATAA

**B.oOR59a-like**

**NCBI Reference Sequence: XM\_014241890.1**

**Μέγεθος κωδικής αλληλουχίας: 1137 bp**

ATGAGCCAACCAGTGAACAGCAACGCCTTTTTTAAAATCCACTGGTTGGGCTTTCGTATCTGCGGTG  
GCGACTTATCCGTGAATAAATATCGCTTGGTCTATTTGGCGTACGCACTTATGGTCACTGCGCTGGTG  
ACTTTTTGCTATCCGCTGCATCTGGCGTTGGCGCTTTCCGCAACGGTTCAGTAGCCGGCAATATTA  
GAATCTCGCTGTGTGCGTCACCTGTATCGCCTGTAGTTTCAAATTCCTGATTTATACGCGGAAGTTGG  
GGATTATGCGCGAGATTGAGCAGACTTTTCGGAACTGGATTTCGCGCGTGAGCAGCGAGGTAGAAC  
GCAAATATTTTGCTTGGATGCGCATAAGCGTAAGGAATGTCGTCTCTGTATTTCTGTGTGCCTATGCT  
GCGGTGCGTGTGACGGCAGAGCTGGCATTCTCTTAAGCAAAGAGCGCAGTCTGCTATATCCGGCAT  
GGTTTCCGCTCGATTGGCGTGCATCCACACGAAATTTCTACGTGGCAAACGTGTACCAATTCGTTGGT  
ATTTCTATCAGATTTTCCAAAACCTCATTAAACGATACCTTTCCACCCATAACCTGTTGCCTGCTGTCG  
GGTCATATAAAGTTGCTCGGCATTCGTGTATCTCGTATTGGCTATGATTGTGTACGTCTGCAGGATAA  
TGAGCGGGAGCTAGTGCATTGCATCAAGGATCAGAAAAATCTATACAAGCTATTTCGATCTGCTGCAA  
GAGGTTATGTCTTGGCCGATGTTCAATTCAGTGTACCGCCTTCAATATCTGCGTGGCCATGGTT  
GTGATGCTGTTTTACGTAGATACACCGTTTCAACGTCTATACTACTTGATATATTTTCATATCCATGCCT  
CTGCAAATTTTTCCATTTGCTATTATGGCAGCAGCCTTCAGCTTCTCTTCCGGCCAACTACAGTACGAA  
GTATTTGCTGTAATTGGACCGATCAAACCTCGGCGTTTCAAGAAGCAAATGATGCTTTTACGGAGC  
GCGCTTTAAAAACTACCACGGCTTGGCCGGTGGCATGATCAAATACATCTCGACACCTTCTTCGCC  
ACCGTTAAGGGCGCTTATTCGCTTTTTGCTGTCATCATGAAGGTTAAGTAG

Πίνακας 2: Βέλτιστοι προσδέτες (Best ligands) οσφρητικών υποδοχέων της δροσόφιλας και οι ιδιότητες τους

Οσφρητικός υποδοχέας	Best ligand	Ιδιότητες προσδέτη	Βιβλιογραφία
Or67c	ethyl lactate	Φρουτώδες άρωμα	National Center for Biotechnology Information (2022). PubChem Compound Summary for CID 7344, Ethyl lactate. Retrieved June 23, 2022 from <a href="https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ethyl-lactate">https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ethyl-lactate</a> .
Or82a	geranyl acetate	Φρουτώδες άρωμα	National Center for Biotechnology Information (2022). PubChem Compound Summary for CID 1549026, Geranyl acetate. Retrieved June 23, 2022 from <a href="https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Geranyl-acetate">https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Geranyl-acetate</a> .
Or74a	1-heptanol	Φρουτώδες άρωμα	National Center for Biotechnology Information (2022). PubChem Compound Summary for CID 8129, 1-Heptanol. Retrieved June 23, 2022 from <a href="https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1-Heptanol">https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1-Heptanol</a> .
Or45a	Pentyl acetate	Φρουτώδες άρωμα	National Center for Biotechnology Information (2022). PubChem Compound Summary for CID 12348, Pentyl acetate. Retrieved June 23, 2022 from <a href="https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Pentyl-acetate">https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Pentyl-acetate</a> .
Or47b	(S)-(+)-carvone	Άφθονο σε έλαια από σπόρους κύμινου (Carum carvi), στο δυόσμο (Mentha spicata) και στον άνηθο	National Center for Biotechnology Information (2022). PubChem Compound Summary for CID 7439, Carvone. Retrieved June 23, 2022 from <a href="https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Carvone">https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Carvone</a> .
Or85c	3-octanol	strong, oily-nutty, herbaceous	National Center for Biotechnology Information (2022). PubChem Compound Summary for CID 11527, 3-Octanol. Retrieved June 23, 2022 from <a href="https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3-Octanol">https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3-Octanol</a> .
Or59a	2 methylphenol	Εντοπίζεται σε φυτά και στο καστόριο*	National Center for Biotechnology Information (2022). PubChem Compound Summary for CID 335, o-Cresol. Retrieved June 23, 2022 from <a href="https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/o-Cresol">https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/o-Cresol</a> .
Or35a	1-heptanol, 1-hexanol	Φρουτώδες	National Center for Biotechnology Information (2022). PubChem Compound Summary for CID 8103, 1-Hexanol. Retrieved June 23, 2022 from <a href="https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1-Hexanol">https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1-Hexanol</a> .
Or2a	3-hydroxy-2-butanone	Βουτυρώδες	National Center for Biotechnology Information (2022). PubChem Compound Summary for CID 179, Acetoin. Retrieved June 23, 2022 from <a href="https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Acetoin">https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Acetoin</a> .

\*ελαιώδες υγρό που παράγεται από τους μοσχολόγους αδένες και των δύο φύλων του Κάστορα και χρησιμοποιείται στην αρωματοποιία

Source: DoOR database

Συναρμολόγηση αναγνώσεων αλληλούχησης (Assembly) με την χρήση της πλατφόρμας Geneious

## 2 reads from OR85c/pBS assembled using Geneious

```
1           10           20           30           40           50
|           |           |           |           |           |
GGSKACTMTATAGGGCGATTGGAGCTCCACCGCGGTGGCGGCCGCTCTAG
AACTAGTGGATCCCCCGGGCTGCAGGAATTCGCCACCATGTGTGAGAACA
TTGAATCATTTTGAAGCCTTTCTACGTATTCACAGCTTCTTCTATCGTAGT
GTTGGCGTTGATCTTTGGAATASRMMTGRTSKKNNGAWRCAWSKGKYKAT
YWYCNAYTKNNTGGCTTTNNGANTGTCAATTKRNGNCTACTCTCCGANC
TANTTTTNGSCATCATAACTGTCAGTGAGANCTNCATMCANGCNASCATG
ACACTNCTNTATGCTGSCCTTNGTGCTCGTNGNCTCTATAAAAANTGTACTT
TATGTGNCGAAAAAACAAGATGACACANTTTCTCAANCTCATGGATG
AANTTTTNCCGCGCACAGCCGAACANCAAAAANTGATGAACTTACGACGA
CACTTGCGGCAGAAAGTACGATTGTTATGAGCGGCTTTGCATTGATTTTCAT
GATACTCATCTGGACGTATAATCTCTATCCCTTCATGCAACGACAAATCT
ACGATTGTTGGCTGGATACGCGCAGTATCAATAAAAACTACCTTATGAG
AGCTATATAACCATGGAATTGGCACAATCATTGGAGTTTCTATTTGTATTA
TGTTTTGCAAAGTATTGCGGGTATCATTCCGCTGCGGGCAGATCGCTA
GCGATTTGGTCTTATGTGCCATGGCTACACAAATGATCATGCATTATGAG
TATGTTTACACAAGATAAGAAGTAGATATAGGGGAGAGCGAAAGTGTGT
GGACAGCAAAAGCGTTAGTTGCCTGAATGCGTTAAATCATTGGACGGAGG
AGCAAGTGGCAACGCATAAAGGATATGAGNTGGCTTTGCGAAACAATAGCC
TATCATTCCAATCTATTGAGCTTATCCGATGTTATGAATGATGTATTAGG
NGTACCGTTGTTAGTAANCTTCATGACTTCGTCTTTNGTCATTNGCTTNG
TGGGCTNCNAANTGACANTGGACGCCGAGCCGGATTATATGGTNANGCTG
TTTTTTTTTNTATTTTCATCGCTAGCGCAANTCTACTNGATTNGCCATNA
TGNACAGCTACTNATCGATGCGAGTATCAATGTANCTGCAGCTGTATACG
ATCAGNATNGRITTCGAWTNGAATGTGCGTTATCAACATNNGCTGGTNCTG
GNGGTTGCCCCGNGCCRAAAACCAGCAATGTTGAAGGCMACNAAATTTTG
TGCGCATCTCTCGTGGCACCTTGACTGATATTATGCAAATTTTCCTACAAG
TTCTTTTACACTCATTTCGTACAATGTACAGTGATTAACGAGGGGGGGCC
CGGTACCAGCTTTTGTCCCTTTTAGTGAGGTATYRGKCCG
```

## 2 reads from OR67c assembled using Geneious

```
1           10           20           30           40           50
|           |           |           |           |           |
CSSMCYYYYYKAAWTWACCCCTTCACTWAAGGGAACAAAAGCTGGTACCGG
GCCCCCCTCGAGTTAATTTCCCTTTGTCACTTTTTTCCCTGCATAAAGTCT
ATTTAAATTTTTTTAATCTTTTGATTTTCAATTTTCAAGCTCACTAAATA
ACAATAAATCAATTAATAATAATATTAACGGTTATAACAATAACTAATAT
TGGTTTTCAATAATATTTTATATATAATAATATCTCCGTACCATCTCTT
CTCATTACACAGCCTTTACGAGGACGTACCACGTGTCTACTTTCCGCTCAT
CTGGTTCGAACAGAAAGTGCGCATAACACCCGAACTCGCTTCCGATTTAC
AGTTGTTACCGAAAATCCTGATGGGCGGACAAATCTTCGCTTGCAATTTGC
TTCGGCGTCGGTCTCATACTGCTGTGCTGGTACCCAATTGAAATCTCTCTG
CACACGWCWMCSTTCGGKYGAWYKSARMTCYAYSSCGRYGRCGGCMGSTS
WARAWSTNNAGYRGANNNNNNTCMCMGKGYTGMAGNNNNGANNNATYSG
CCACCNNNNNATGTKGYMTKMANNNATAWTWAAACMWTGNNTASYTEACN
CGYTRYWNGANNNNNKCKWACCAMTNGGCWNNATSSCGRCRATKGYAYC
KMAANCRGAGNAYRAMTGAGARTGKYRCTNCAGNTRASANNNNAYRGMYG
NNMAASCRMCRTNNTANNGTAGWAATKNNSTKAWTKAWTNMATTRYSWGM
```

GAASTGCTNATNNNNNNNNNNNGWTGATRTNATSTSNTSCTYGWRWKKST  
 ARTAMTTAWMTWGTWTRKMTNGCKTWYTGGYCWANCAWTCKTCCTRCNNN  
 NNNNNTRYGTRCNNSTTTAWNNCATTANCTNNCARATYTTNNNWTKTWT  
 SAAAAAAWAYAMAAWWWTGTATWWYTANNNNATTTSTWNTTYTTARAN  
 NASTAMTTACATAMATATKTATGTANNAKTASTYTWWRAAAANNNASAAA  
 TNNNNNTARWWATACAWTTKTWTRTTTTTTTTNNNNNNNNRAAAATNTGA  
 GNAWWTGTNNNTAAWGRCAYNASWWGKACGWWTRTTTSSKSCARARAKSY  
 AGMCARWMMRYATAAATTAYTASWMRYACWAGCAYWCNNATRMATCAANCA  
 TCNNNNNNNNNNNAGCASTNNNTSKCANNNCAYAAATNNNTWYTCAYTMA  
 YGTSATTWSYWCTAANNNGYTYGCKGMCgyTYRTTMCWGTNNCAAYMCTS  
 TSAWTTNNCYMCGATTTTCGGTACAATTGTCGGCATTTCGCCATTGGTACG  
 CTCCAACAACGGTGAACATCCAATGTTTTATTATTAATAACCACATTTG  
 TTGGTGGCCGATTTTTCAACTCTTCAACACTTGTGAATTTTGTCTGCTTG  
 ACATTTTCACCTGCCGTCGTCGGCATAGATTTGAGTTCAACCGAACGTTG  
 ACGTGTGCAGAGATTTTCATTGGTACCAGCACAGCAGTATGAGACCGACGC  
 CGAGCAATGCAGCGAGATTTGTCCGCCATCAGATTTTCGTACACTGTAAT  
 CGAGCGAGTCGGTGTATGCSCACTTCTGTGACRATGAGCGAGTAGACCG  
 TGTWCGTCTCGTAGCTKGAATGAARAATGGTACGGAAATTTATTATTAATA  
 TTTATGGAAACGATTAGATCGTAACGTAAGTATATCATGATTATGCCATT  
 AAGGGA

**2 reads from 82a assembled using Geneious**

1	10	20	30	40	50

TCGTTTCAAGTAACGCMAGGCTTCCAGTCAAGGCGTGTATGACGGCAKGA  
 CTGRATCGATCYAMTAKRGKCGAWTKGAGCTCCACCGGNTGGCGKNGC  
 TCTAGAAGTGTGGATCCCCGGGCTGCAGNANTKCNANGTTCATGTGAN  
 CAGTTNCAGTNCACANTCCNANGCATGAAAGTGGTNCAGCGNTTACCCG  
 NACCTCTCGGTCTAGGAAATACACGTNGATACTTTCATNGTAGCGCGGT  
 GCAGCCCAGGACATCTAAGGGCATCACAGACCTGTTATTGCTCAATCTCG  
 TTAGTGTAGACGCAATTNGTCCATTTAAGAAGCTAGTGTCCTTATAATG  
 GGACAAACCAACAGGTACGACTCCACTTATATAAACACATTCAAAACACTT  
 GTACATTCAGATGCACGCATGAATGAAGGCTATATAAGCTTCAACACCA  
 TAATCCTGAAAGCATCTATTTAATATATTTGAGTCTCGTTCGTTATCGGA  
 ATTAACCAGACAAATCACTCCACGAACTAAGAACGGCCATGCACCACCAC  
 CCATAGATTCGAGAAAGAGCTATCAATCTGTCTTACACGCTTATGTTCCG  
 ACCTGGTAAGTTTTTCCCGTGTGGGTCAAATTAAGCCGAGGCTCCACTC  
 CTGGTGGTGCCTTCCGTCAATTCCTTTAAGTTTCAGCTTTGCAACCATA  
 CTTCCCCCGGAGCCCCAAAAGCTTTGGTTTTCCCGGAAGCGACTGAGAGAG  
 CCATAGTAGTAGCTACACCCAATTGCTAGCTGGCATCGTTTATGGTTAGA  
 ACTAGGGCGGTATCTGATCGCCTTCGAACCTCTAACTTTCGTTCTTGATT  
 AATGAAAACATCTTTGGCAAATGCTTTCGCTTAAGTTAGTCTTACGACGG  
 TCCAAGAATTTACCTCTCGCGTCGTAATACTAATGCCCCAAAACGCTT  
 CTATTAATCATTACCTCTTGATCTAAAANCCAATGAAAGTAGAACAGAGG  
 TCTTATTTTATTATTCCATGCACAAANTATTCAGGCATTNGGAGCCTGCT  
 TNAAGCACTCTAATTNGTNCAAAGTANTNGTACCGNCCNACANCANCACT  
 CGACGANGAGANCTGACTCGAGGGGGGGCCNGNTACNAGCTTTTGTGCC  
 TTWANTGAGGKTANTSCAGCSTGCCGTATYCATGTCWGTGATCTGGGTG  
 CATGGATCGTCAATCCAACATCGATCGARCTAATGTTAAGCCTTG

**2 reads from OR85c assembled using Geneious**

1	10	20	30	40	50
---	----	----	----	----	----

| | | | |  
CCWWYWTTYAAMAGCCAAAGTTGACACGTCGCTAAGCGAAAAGGCTAAGCA  
AATAAACAAGCGCAGCTGAACAAGCTAAACAATCTGCAGTAAAGTGCAAG  
TTAAAGTGAATCAATTTAAAAGTAACCAGCAACCAAGTAAATCAACTGCAA  
CTACTGAAATCTGCCAAGAAGTAATTATTGAATACAAGAAGAGAACTCTG  
AATAGGGAATTGGGAATTCGCCACCATGTGTGAGAACATTGAATCATTG  
AAGCCTTTCTACGTATTCCCAGCTTCTTCTATCGTAGTGTGGCGTTGAT  
CTTTTGAATACAAATGGTGGGCCGATACAACGGTTTATTTTTCTATTTTGG  
CTTTTTGAATGTCAATTTGTGGCTACTCTCCGAACTAATTTTTTGCCATCA  
TAACTGTCAGTGAGAACTTCATACAAGCCACCATGACACTCTCCTATGCT  
GGCTTTGTGCTCGTTGGCTCTATAAAAAATGTACTTTATGTGGCGAAAAAA  
AACAGAGATGACACAATTTCTCAAACCTCANTRKMTSAANRKKWTCMSRSK  
YWCRGYMSARCRACAANMAATGATGAACNTTACGACGACACTTGCGGCGMA  
AGTACGATNGTNATGAGNCGGCTTNGCATNGATTTTCATGATACTNCATC  
TGNACGTATAATCTCTATCCCTNCATGCANCGACAAANTCTACGATNGTT  
GGCTGGATACGCGCAGTATCAATAAAAACACTACCTTATGAGAGCTATATA  
CCATGGAANTTGGCACAATCATTGGAGTTTCTATTTGTATTATGTTTTGC  
AAAGTATTGCGGGTTATCATTCGGCTGCGGGGCAGATCGCTAGCGATTTG  
GTCTTATGTGCCATGGCTACACAAATGATCATGCATTATGAGTATGTTTC  
ACACAAGATAAGAAGTAGATATAGGGGAGAGCGAAAAGTGTGTGGACAGCA  
AANGCGTTAGTTGCCTGAATGCGTTAAATCATTGGACGGAGGAGCAAGTG  
NCAACGCATAAGNATATGAGNTGGCTTTGCGAAACANTAGCCTATCATTC  
CAATCTATTGAGCTNATCNGATGTNATGANTGATGTATTANGGTGTACNG  
TNGTNAGTAANCTNCATGACTNCGTCTTTNGTCATTTGCTTTGNGGGCTT  
CCANNTGACANTGRACGCNGAGCCGNATNATRTRRKYRWKCTKTYWCTTT  
TCMTMKYYTNAKCGCYMRYRYMWMCTACTTGATTTGCCATTATGGACAG  
CTACTTATCGATGCGAGTATCAATGTAGCTGCAGCTGTATACGATCAGGA  
TTGGTTCGATTTGAATGTGCGTTATCAACATATGCTGGTGCTGGTGGTTG  
CCCGCGCCCAAAAACCAGCAATGTTGAAGGCAACAAATTTTGTGCGCATC  
TCTCGTGGCACCTTGACTGATATTATGCAAATTTCTTACAAGTTCTTTAC  
ACTCATTCGTACAATGTACAGTGATTAACCTCGAGGGTACCTCTAGAGGAT  
CTTTGTGAAGGAACCTTACTTCTGTGGTGTGACATAATTGGACAACTAC  
CTACAGAGATTTAAAGCTCTAAGGTAAATATAAAATTTTTAAGTGTATAA  
TGTGTTAAACTACTGATTCTAATTGTTTGTGTATTTTAGATTCCAACCTA  
KGGAACTGATGAATGGGAGCAGTGGTGGAAATGCCTTTAATGAGGAAAACC  
TGTTTTGCTCAGAAARAAATKKCMWYYK

## Βιβλιογραφία

- Ache, B., & Young, J. (2005). Olfaction: diverse species, conserved principles. *Neuron*, 48(3), 417-430.
- Altschul, S. F. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*, 215(3), 403-410.
- Atkinson, P. W., & Michel, K. (2002). What's buzzing? Mosquito genomics and transgenic mosquitoes. *Genesis*, 32(1), 42-48.
- Benton, R., Sachse, S., Michnick, S., & Vosshall, L. (2006). Atypical membrane topology and heteromeric function of Drosophila odorant receptors in vivo. *PLoS Biology*.
- Bouchard, C. (2015). *Progress in Molecular Biology and Translational Science* (1st edition εκδ., Τόμ. 135). Academic Press.
- Bray, S., & Amrein, H. (2003). A Putative Drosophila Pheromone Receptor Expressed in Male-Specific Taste Neurons Is Required for Efficient Courtship. *Neuron*, 39(6), 1019-1029.
- Carey, J., Papadopoulos, N., Müller, H., Katsoyannos, B., Kouloussis, N., Wang, J., . . . Liedo, P. (2008). Age structure changes and extraordinary lifespan in wild medfly populations. *Aging Cell*, 7(3): 426-437.
- Couto, A., Alenius, M., & Dickson, B. J. (2005). Molecular, Anatomical, and Functional Organization of the Drosophila Olfactory System. *Current Biology*, 15(17), 1535-1547.
- Dobritsa, A., Van der Goes van Nater, W., Warr, C., Steinbrecht, R., & Carlson, J. (2003). Integrating the molecular and cellular basis of odor coding in the Drosophila antenna. *Neuron*, 37:827– 841.
- FAO. (2021). *The impact of disasters and crises on agriculture and food security: 2021*. FAO.
- 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.
- Gaudet, P., Livstone, M., & Thomas, P. (2011). Gene Ontology annotation inferences using phylogenetic trees. *GO Reference Genome Project. Brief. Bioinform.*, 12(5): 449--462.
- Hallem, E., Dahanukar, A., & Carlson, J. (2006). Insect odor and taste receptors. *Annu. Rev. Entomol.*, 51, 113-135.
- Hallem, E., Ho, M., & Carlson, J. (2004). The molecular basis of odor coding in the Drosophila antenna. *Cell*, 117:965-979.
- Haniotakis, G., Kozyrakis, E., & Bonatsos, C. (1986). Control of the olive fruit fly, *Dacus oleae* Gmel. (Dipt., Tephritidae) by mass trapping: Pilot scale feasibility study. *Journal of Applied Entomology*, 101, 343–52.
- Hansson, B. S., & Stensmyr, M. C. (2011). Evolution of Insect Olfaction. *Neuron*.

- Haymer, D., McInnis, D., & Archangeli, L. (1992). Genetic variation between strains of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*, detected by DNA fingerprinting. *Genome*, 35(3), 528–533. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.1139/g92-077>
- Jefferis, G. S., Potter, C. J., Chan, A. M., Marin, E. C., Rohlffing, T., Maurer Jr, C. R., & Luo, L. (2007). Comprehensive Maps of *Drosophila* Higher Olfactory Centers: Spatially Segregated Fruit and Pheromone Representation. *Cell*, 128(6), 1187-1203.
- Jin, X., Ha, T., & Smith, D. (2008). SNMP is a signaling component required for pheromone sensitivity in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(31), 10996-11001.
- Katsoyannos, P. (1992). Olive pests and their control in the Near East.
- Krieger, J., Klink, O., Mohl, C., Raming, K., & Breer, H. (2003). A candidate olfactory receptor subtype highly conserved across different insect orders. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol.*, 189:519–26.
- Laissue, P. P., & Vosshall, L. B. (2008). The olfactory sensory map in *Drosophila*. In *Brain development in Drosophila melanogaster*. Springer New York, 104.
- Lance, D. R., & McInnis, D. O. (2005). Biological basis of the sterile insect technique. In *Sterile Insect Technique*. Springer Netherlands, 69-94.
- Larsson, M., Domingos, A., Jones, W., Chiappe, M., Amrein, H., & Vosshall, L. (2004). Or83b encodes a broadly expressed odorant receptor essential for *Drosophila* olfaction. *Neuron*, 43:703–14.
- Laughlin, J. D., Ha, T. S., Jones, D. N., & Smith, D. P. (2008). Activation of pheromone-sensitive neurons is mediated by conformational activation of pheromone-binding protein. *Cell*, 133(7), 1255-1265.
- Leftwich, P., Koukidou, M., Rempoulakis, P., Gong, H.-F., Zacharopoulou, A., Fu, G., . . . Lukas, A. (2014). Genetic elimination of field-cage populations of Mediterranean fruit flies. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 281(1792), 20141372. doi:<https://doi.org/10.1098/rspb.2014.1372>
- Liquido, L. J., Shinoda, L., & Cunningham, R. T. (1991). Host plants of the Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) : an annotated world review. *Entomological Society of America*, (77), 1-52.).
- Liu, R., Lehane, S., He, X., Lehane, M., Hertz-Fowler, C., Berriman, M., . . . Zhou, J. (2010). Characterisations of odorant-binding proteins in the tsetse fly *Glossina morsitans morsitans*. *Cellular and molecular life sciences*, 67(6), 919-929.
- Lundin, C., Kall, L., Kreher, S., Kapp, K., Sonnhammer, E., Carlson, J., . . . Nilsson, I. (2007). Membrane topology of the *Drosophila* OR83b odorant receptor. *FEBS Letters*, 5601-5604.
- Mullis K.B., F. F. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction.

- Neumann, E., Schaefer-Ridder, M., Wang, Y., & Hofschneider, P. (1982). Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. *The EMBO journal*, 1(7), 841.
- Pelosi, P., Zhou, J., Ban, L., & Calvello, M. (2006). Soluble proteins in insect chemical communication. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 63(14), 1658-1676.
- Philips, J., Rubin, E., & Perrimon, N. (2005). "Drosophila RNAi screen reveals CD36 family member required for mycobacterial infection." *Science*, 309:1251-1253.
- Robertson, H., Warr, C., & Carlson, J. (2003). Molecular evolution of the insect chemoreceptor gene superfamily in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of National Academy of Sciences Suppl 2*, 14537-14542.
- Rytz, R., Croset, V., & Benton, R. (2013). Ionotropic Receptors (IRs): Chemosensory Ionotropic Glutamate Receptors in *Drosophila* and beyond. *Insect biochemistry and molecular biology*, 1-10.
- Sambrook, F. M. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Second ed.).
- Sargsyan, V., Getahun, M., Lavista Llanos, S., Olsson, 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, L., & Touhara, K. (2008). Insect olfactory receptors are heteromeric ligand-gated ion channels. *Nature*, 452, 1002-1006.
- Sgaramella, V. & (1978). Use of the T4 Polynucleotide Ligase in The Joining of Flush-Ended DNA Segments Generated by Restriction Endonucleases. *European Journal of Biochemistry*, , 86(2), 531-537.
- Steinbrecht, R. (1998). Odorant-binding proteins: expression and function. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 855, 323–332. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1998.tb10591.x>
- Tegoni, M., Campanacci, V., & Cambillau, C. (2004). Structural aspects of sexual attraction and chemical communication in insects. *Trends in biochemical sciences*, 29(5), 257-264.
- Thein, S. L. (1986). The use of synthetic oligonucleotides as specific hybridization probes in the diagnosis of genetic disorders. *Human genetic diseases: A practical approach*, 33-50.
- Tomaselli, S., Crescenzi, O., Sanfelice, D., AB, E., Wechselberger, R., Angeli, S., . . . Picone, D. (2006). Solution structure of a chemosensory protein from the desert locust *Schistocerca gregaria*. *Biochemistry*, 45(35), 10606- 10613.
- Vermeulen, A., & Rospars, J. P. (2004). Why are insect olfactory receptor neurons grouped into sensilla? The teachings of a model investigating the effects of the electrical interaction between neurons on the transepithelial potential and the neuronal transmembrane potential. *European Biophysic Journal*, 33(7), 633-643.



- Vogt, R. (2003). Biochemical diversity of odor detection: OBPs, ODEs and SNMPs. *Insect pheromone biochemistry and molecular biology*, 391-445.
- Vogt, R., & Riddiford, L. (1981). Pheromone binding and inactivation by moth antennae. *Nature*, 161-163.
- Vosshall, L., Amrein, H., Morozov, P., Rzhetsky, A., & Axel, R. (2006). A spatial map of olfactory receptor expression in the *Drosophila* antenna. *Cell*, 725-736.
- 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, 1007-1011.
- Winstrand, M., Käll, L., & Sonnhhammer, E. (χ.χ.). A general model of G protein-coupled receptor sequences and its application to detect remote homologs. *Protein science*, 15 (3) 509-521.
- Yao, C., & Carlson, J. (2010). Role of G-proteins in odor-sensing and CO<sub>2</sub>-sensing neurons in *Drosophila*. *Journal of Neuroscience*, 4562-72.
- Τζανακάκης, Μ. Ε. (1995). *Εντομολογία*. Studio University Press.

## Εικόνες

[Εξώφυλλο] Αρσενικός Δάκος Ελιάς (αριστερά) από C. Pradera, Barcelona, (2017), Θηλυκή Μύγα Μεσογείου από C. Pradera, Barcelona, (2011)

- [1] Αριστερή φωτογραφία από Peggy Greb, *USDA Agricultural Research Service, Bugwood.org*. Δεξιά φωτογραφία από *Okinawa Prefectural Fruit Fly Eradication Project Office*.
- [2] Ha, Tal & Smith, Dean. (2009). Odorant and Pheromone Receptors in Insects. *Frontiers in cellular neuroscience*. 3. 10. 10.3389/neuro.03.010.2009.
- [3] Perisse, Emmanuel & Burke, Christopher & Huetteroth, Wolf & Waddell, Scott. (2013). Shocking Revelations and Saccharin Sweetness in the Study of *Drosophila* Olfactory Memory. *Current biology : CB*. 23. R752-63. 10.1016/j.cub.2013.07.060.
- [4] Spletter, M. L., & Luo, L. (2009). A New Family of Odorant Receptors in *Drosophila*. *Cell*, 136(1), p. 24.
- [5] Design of a Repellent Against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Using in silico Simulations With AaegOBP1 Protein - *Scientific Figure on ResearchGate*. Available from: [https://www.researchgate.net/figure/Mechanism-of-reception-of-odorants-in-insects-Adapted-from-Guo-and-Smith-2017-and-Leal\\_fig1\\_336926907](https://www.researchgate.net/figure/Mechanism-of-reception-of-odorants-in-insects-Adapted-from-Guo-and-Smith-2017-and-Leal_fig1_336926907) [accessed 28 Jun, 2022]
- [6] Benton, R. (2006). On the ORigin of smell: odorant receptors in insects. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 63(14), p. 1581