ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

Ηρακλής Κουτμάνης

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ

ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2023

Τίτλος Διπλωματικής Εργασίας

«Λειτουργική ανάλυση τριών μη χαρακτηρισμένων οσφρητικών αποικοδομητικών γονιδίων εστερασών στο δάκο της ελιάς, *Bactrocera oleae»*

"Functional analysis of three uncharacterized odorant degrading esterase genes in the olive fruit fly, Bactrocera oleae"

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας & Γονιδιωματικής του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, το διάστημα Σεπτέμβριος 2022 - Απρίλιος 2023 υπό την επίβλεψη του κ. Κωνσταντίνου Ματθιόπουλου, καθηγητή Μοριακής Βιολογίας και χρηματοδοτήθηκε από το Ελληνικό Ίδρυμα Έρευνας και Καινοτομίας (ΕΛ.ΙΔ.Ε.Κ.) στο πλαίσιο της Δράσης «2η Προκήρυξη ερευνητικών έργων ΕΛ.ΙΔ.Ε.Κ. για την ενίσχυση Μεταδιδακτορικών Ερευνητών/τριών» (Αριθμός Έργου: 01254) με επιστημονική υπεύθυνη τη Δρ. Χριστίνα Δράκου.

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

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

Δράκου Χριστίνα: Μεταδιδακτορική Ερευνήτρια στο Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Δαλακούρας Αθανάσιος: Δόκιμος Ερευνητής στον ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ (Μοριακή Γενετική και Αναπαραγωγή Φυτών)

Ευχαριστίες

Κατ’ αρχάς, θα ήθελα να εκφράσω την ιδιαίτερη ευγνωμοσύνη μου στα τρία μέλη της συμβουλευτικής επιτροπής μου - τον Δρ Κωνσταντίνο Ματθιόπουλο, τη Δρ. Χριστίνα Δράκου και τον Δρ. Αθανάσιο Δαλακούρα. Ευχαριστώ θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου, Δρ. Κωνσταντίνο Ματθιόπουλο, μία ξεχωριστή προσωπικότητα και ένα ιδιαίτερο πρότυπο επιστήμονα για εμένα, ο οποίος μέσω της συνεχούς επικοινωνίας και ανατροφοδότησης σε κάθε στάδιο της εργασίας, την εμπειρία του και την αστείρευτη ευρηματικότητά του, με συμβούλευσε και με καθοδήγησε στο να πάρω τις σωστές αποφάσεις τη σωστή στιγμή. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω την Αντωνία Σπανομήτρου και όλη την ομάδα του εργαστηρίου. Η επίτευξη αυτής της διπλωματικής εργασίας αποτελεί απόδειξη της συνεργασίας μας, της βαθιάς τεχνογνωσίας και της συνεπούς υποστήριξής τους. Αυτή η εργασία σηματοδοτεί όχι μόνο ένα ακαδημαϊκό επίτευγμα, αλλά και ένα ορόσημο στην προσωπική και επαγγελματική μου ανάπτυξη, που διαμορφώθηκε σε μεγάλο βαθμό από την εμπειρία που απέκτησα μέσα στο «εργαστήριο ΜΒΓ» και την εμπιστοσύνη που μου δόθηκε στη λήψη αποφάσεων.

Περίληψη

Ο δάκος της ελιάς, *Bactrocera oleae*, αποτελεί το σημαντικότερο παράσιτο της ελιάς, προκαλώντας μεγάλη μείωση στην παραγωγή κάθε χρόνο. Η ανίχνευση και η διάκριση οσμών, συμπεριλαμβανομένων των φυτικών πτητικών ενώσεων και των φερομονών του φύλου, είναι κρίσιμης σημασίας για την επιβίωση και την αναπαραγωγική επιτυχία της δάκου. Στα έντομα, οι εστεράσες που ανήκουν στα Odorant Degrading Enzymes (ODEs) συμβάλλουν στην αποικοδόμηση των οσμών, επιτρέποντας την ταχεία ανταπόκριση σε νέα χημικά σήματα και ταυτόχρονα ρυθμίζοντας την ευαισθησία των οσφρητικών υποδοχέων (ORs). Η αναστολή αυτών των ενζύμων μπορεί συμβάλλει στην ανάπτυξη νέων, πιο αποτελεσματικών και φιλικών προς το περιβάλλον μεθόδων ελέγχου των γεωργικών παρασίτων [1], όπως είναι ο δάκος της ελιάς.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε ο λειτουργικός ρόλος τριών μη χαρακτηρισμένων γονιδίων εστερασών στο δάκο της ελιάς και πιθανή σύνδεση τους με το οσφρητικό σύστημα, ως μέλη της οικογένειας ενζύμων ODEs, , τα οποία ονομάστηκαν BoIEST6, BoIEST7 και BoIEST14. Χρησιμοποιώντας δείγματα από όλα τα στάδια ανάπτυξης του εντόμου, δημιουργήσαμε αρχικά τα προφίλ γονιδιακής έκφρασης κάθε υπό μελέτη γονιδίου εστεράσης. Ύστερα, για κάθε γονίδιο εστεράσης πραγματοποιήσαμε στοχευμένα πειράματα παροδικής σίγησης (knockdown) με μικροέγχυση κατάλληλων dsRNAs και μελετήσαμε την έκφραση των εστερασών στα έντομα μετά την έγχυση. Τα αποτελέσματα των προφίλ έκφρασης οδήγησαν σε μια πρώτη εκτίμηση του πιθανού ρόλου των γονίδιων αυτών στο οσφρητικό σύστημα και στις φυσιολογικές λειτουργίες του δάκου. Τα επίπεδα σίγησης αναλύθηκαν σε σύγκριση με δείγματα ελέγχου (GFP targeting ds RNA). Για την περεταίρω διεξαγωγή πειραμάτων αντίστροφης γενετικής και τη μελέτη της επίδρασης της αναστολής των γονιδίων στη συμπεριφορά του δάκου, απαιτείται η πραγματοποίηση πειραμάτων knockdown μεγαλύτερης κλίμακας, με περισσότερα βιολογικά δείγματα, για την εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με προσδιορισμό του ποσοστού της σίγησης των γονιδίων των εστερασών BoIEST6, BoIEST7 και BoIEST14.

Λέξεις-κλειδιά: Bactrocera oleae, ένζυμα αποικοδόμηση οσμών, προφίλ γονιδιακής έκφρασης, γονιδιακή σίγηση, RNAi

Abstract

The olive fruit fly, *Bactrocera oleae*, is the most significant pest affecting olive crops, causing a substantial decrease in annual production. The ability to detect and differentiate odors, including plant volatiles and sex pheromones, is essential to the survival and reproductive success of this insect. Esterases, which belong to Odorant Degrading Enzymes (ODEs), contribute to odorant breakdown in insects, allowing for a swift response to new chemical signals while simultaneously regulating the sensitivity of olfactory receptors (ORs). Inhibiting these enzymes could contribute to the development of new, more effective, and environmentally friendly pest control methods for pests like the olive fruit fly.

In this study, we investigate the functional characterization of three previously uncharacterized esterase genes in the olive fruit fly, namely BoIEST6, BoIEST7, and BoIEST14, as part of the ODEs group. We constructed gene expression profiles for each of these esterase genes across all stages of the insect's development. Then we carried out RNAi-mediated targeted knockdown experiments by microinjecting dsRNAs of each esterase to insects, and we studied the post-injection effects on esterase expression. The resulting expression profiles provided initial insights into the potential roles of these genes in the olfactory system and the physiological functions of the olive fruit fly. Silencing levels were analyzed relative to control samples (injected with GFP-targeting dsRNA). To make further analyses, like reverse genetics experiments and study the impact of gene silencing on the behavior of the olive fruit fly, larger-scale knockdown experiments with additional biological samples are needed. This will help draw conclusions regarding the extent of silencing of the esterase genes BolEST6, BolEST7, and BolEST14.

Keywords: Bactrocera oleae, odorant degrading enzymes, expression profiles, gene silencing, RNAi

Περιεχόμενα

1 Εισαγωγή

1.1 Ο δάκος της ελιάς

Ο δάκος της ελιάς, *Bactrocera oleae*, είναι ένα είδος εντόμου που ανήκει στην τάξη των διπτέρων και στην οικογένεια Tephritidae. Είναι αναγνωρισμένος για την παρασιτική του συμπεριφορά στους καρπούς της ελιάς που χρησιμοποιεί ως ξενιστή, καθιστώντας αυτό το έντομο το πιο σημαντικό παράσιτο της ελιάς σε στον κόσμο. Ανάμεσα στους ξενιστές του, βρίσκονται τα είδη: *Oleae europea* (καλλιεργημένη και άγρια), *O. verrucosa* και *O. chrysophylla* [2]. Η κατανομή του δάκου (Εικόνα 1-1) περιορίζεται στις περιοχές που απαντώνται ελαιοκαλλιέργειες και εντοπίζεται, σήμερα, γύρω από τη λεκάνη της Μεσογείου, στη Νότια και Κεντρική Αφρική, τις Κανάριες Νήσους βορειοδυτικά της Αφρικής και τη Μέση Ανατολή. Ενώ, έχει εντοπιστεί στις ΗΠΑ, στην πολιτεία της Καλιφόρνια και επίσης στην Κεντρική Αμερική [3]. Η δράση του επηρεάζει ως επί το πλείστο τις μεσογειακές χώρες, με αποτέλεσμα απώλειες σε προϊόντα ελαιοκομίας τόσο σε ποσοτικό όσο και σε ποιοτικό επίπεδο. Ως αποτέλεσμα, εμπίπτει στην κατηγορία των εντόμων με σημαντική οικονομική αξία [2].

Εικόνα 1-1: (ι) αριστερά: *η γεωγραφική κατανομή του δάκου της ελιάς (B. oleae) στον παγκόσμιο χάρτη*, (ii) μεσαία εικόνα: *ένα ενήλικο θηλυκό άτομο B. oleae και* δεξιά (iii) *δεξιά: η προσβολή ενός καρπού ελιάς από δάκο . Πηγή: Bactrocera oleae (Rossi, 1790) in GBIF Secretariat (2021). GBIF Backbone Taxonomy. Checklist dataset https://doi.org/10.15468/39omei accessed via GBIF.org on 2022-10-01.*

1.2 Κύκλος ζωής του δάκου της ελιάς

Η μύγα της ελιάς, Bactrocera oleae, περνά από διάφορα στάδια ανάπτυξης που ποικίλλουν σε μέγεθος και διάρκεια.

- Αυγό: Τα αυγά είναι πολύ μικρά, με μήκος περίπου 0,01 mm. Ανάλογα με τις περιβαλλοντικές συνθήκες, η περίοδος επώασης διαρκεί από 1 έως 2 ημέρες.

- Προνύμφη: Μετά την εκκόλαψη, η προνύμφη περνά από τρία αναπτυξιακά στάδια. Η προνύμφη 1^{ου} σταδίου έχει αρχικό μήκος 1-2 mm. Μεγαλώνει σε μέγεθος περίπου 3-4 mm όταν εισέρχεται στο δεύτερο στάδιο και φτάνει τελικά σε μήκος 6-7 mm στο τρίτο στάδιο. Οι προνύμφες τρέφονται με τον πολτό του καρπού της ελιάς για 15 έως 20 ημέρες.

- Νύμφη: Η ώριμη προνύμφη, αφού φτάσει στην πλήρη ανάπτυξη, τρυπώνει στο έδαφος ή παραμένει μέσα στον καρπό και μετατρέπεται σε νύμφη. Το μήκος μίας νύμφης *Bactrocera oleae* είναι περίπου 4-5 mm. Το έντομο υφίσταται μεταμόρφωση στο εσωτερικό της νύμφης και μετατρέπεται σε ενήλικη μύγα. Φυσιολογικά, το στάδιο της νύμφης διαρκεί 10 έως 14 ημέρες.

- Ενήλικο: Το αρσενικό και το θηλυκό *Bactrocera oleae* έχουν διαφορετικά μεγέθη ως ενήλικα. Το μήκος των αρσενικών μυγών είναι περίπου 3-4 mm, ενώ των θηλυκών είναι περίπου 5-6 mm. Μετά την ανάδυση, οι μύγες περνούν από μια φάση ωρίμανσης πριν αρχίσουν να αναπαράγονται. Ανάλογα με στοιχεία όπως το κλίμα και η προσβασιμότητα σε πηγές τροφής, η διάρκεια ζωής του ενήλικου εντόμου μπορεί να κυμαίνεται από μερικές εβδομάδες έως μερικούς μήνες [4].

Η κατανόηση των σταδίων ανάπτυξης και της διάρκεια τους στο είδος *Bactrocera oleae* κρίνεται απαραίτητη προκειμένου να εφαρμοστούν αποτελεσματικές τεχνικές ελέγχου και διαχείρισης για τη μείωση των επιπτώσεων αυτού του παρασίτου στις ελαιοκαλλιέργειες [5].

1.3 Καταστροφή του ελαιόκαρπου

Έχει εκτιμηθεί ότι η δραστηριότητα του *B. oleae* οδηγεί σε μείωση κατά 30% στη συγκομιδή ελιάς στα μεσογειακά κράτη, ιδιαίτερα στην Ελλάδα, την Ιταλία και την Ισπανία, που αποτελούν σημαντικούς κόμβους για την εμπορική παραγωγή ελιάς [6]. Ο δάκος της ελιάς μπορεί να επιφέρει τόσο ποσοτική όσο και ποιοτική ζημιά στην ελαιοπαραγωγή. Ποσοτικά, η ζημιά προκαλείται από την αφαίρεση σημαντικής ποσότητας πολτού λόγω της δράσης της προνύμφης, με συνέπεια τη μείωση της παραγωγής ελιάς. Επίσης, λόγω της πρόωρης πτώσης των προσβεβλημένων καρπών, χάνεται ένα μέρος της απόδοσης της παραγωγής. Στις επιτραπέζιες ελιές, η ζημιά περιλαμβάνει και τα στείρα τρυπήματα που επηρεάζουν την παραγωγή. Ως ποιοτικός παράγοντας αποτελεί η σημαντική μείωση της ποιότητας του ελαιόλαδου που προέρχεται από ελιές με υψηλό ποσοστό προσβολών από προνύμφες *B. oleae* τρίτου σταδίου. Το λάδι που παράγεται από τις προσβεβλημένες ελιές έχει μεγαλύτερη οξύτητα και μικρότερη διάρκεια ζωής (σε αυτήν την περίπτωση το ελαϊκό οξύ κυμαίνεται από 2% έως 10% ανάλογα με το ποσοστό της μόλυνσης). Τέλος, λόγω της εισβολής μικροοργανισμών από τα τρυπήματα, προκύπτουν και δευτερογενείς ποιοτικές βλάβες [2].

Εικόνα 1-2: Πρόνυμφη 3^{ου} σταδίου δάκου της ελιάς μέσα σε καρπό ελιάς που έχει προσβληθεί. Πηγή: Giancarlo Dessì, 2006.

1.4 Μέθοδοι αντιμετώπισης του εντόμου

Για την αντιμετώπιση του *Bactrocera oleae έχουν αναπτυχθεί και εφαρμοστεί διάφορες τεχνικές*. Όμως, η χρήση χημικών φυτοφαρμάκων και δολωματικών παγίδων αποτελούν ουσιαστικά τις μοναδικές αποτελεσματικές μεθόδους αντιμετώπισης του δάκου της ελιάς σήμερα. Διαφορετικές κατηγορίες εντομοκτόνων έχουν χρησιμοποιηθεί για τον έλεγχο του πληθυσμού του *B. oleae*. Λόγω της αποτελεσματικότητάς τους στη θανάτωση των ενήλικων μυγών και των προνυμφών, χρησιμοποιήθηκαν τακτικά τα οργανοφωσφορικά άλατα. Αυτές οι ουσίες όμως μπορούν να βλάψουν οργανισμούς μη στόχους και έτσι να έχουν σημαντικές αρνητικές επιπτώσεις στο περιβάλλον, γεγονός που έχει οδηγήσει σε περιορισμούς ή απαγορεύσεις στη χρήση τους. Σήμερα, χρησιμοποιούνται εντομοκτόνα με πιο επιλεκτική δράση και λιγότερες περιβαλλοντικές επιπτώσεις, όπως τα πυρεθροειδή και το Spinosad. Αυτά τα φυτοφάρμακα χρησιμοποιούνται συνήθως σε σκευάσματα δολωμάτων ή ως σπρέι. Ωστόσο, ο κίνδυνος ανάπτυξης ανθεκτικότητας του *B. oleae* σε αυτά τα φυτοφάρμακα και οι επιπτώσεις τους σε πληθυσμούς ωφέλιμων ειδών εντόμων υπογραμμίζουν την ανάγκη για προσεκτική εφαρμογή και επίβλεψη κατά τη χρήση τους. Από την άλλη, η χρήση παγίδων με ουσίες δολώματα, όπως η φερομόνη των θηλυκών δάκων

1,7-dioxaspiro[5.5]undecane (Olean) που προσελκύει εκλεκτικά τα ενήλικα αρσενικά άτομα δάκου της ελιάς, αποτελεί μια φιλική προς το περιβάλλον λύση στην αντιμετώπιση του παρασίτου. Όμως, η αποτελεσματικότητα της μεθόδου δεν είναι τόσο υψηλή, ενώ επηρεάζεται από παράγοντες όπως οι κλιματικές συνθήκες, η προετοιμασία και η διατήρηση του δολώματος [7].

1.5 Ο μηχανισμός RNAi στην καταπολέμηση παρασίτων

Η παρεμβολή RNA (RNAi) είναι ένας κυτταρικός αμυντικός μηχανισμός που υπάρχει στους περισσότερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς που πυροδοτείται από την παρουσία δίκλωνου RNA (dsRNA). Ο μηχανισμός αυτός εξελίχθηκε για την προστασία των κυττάρων από προσβολές ιών ή για την καταστολή της δραστηριότητας τρανσποζονίων [8]. Η ενεργοποίηση του RNAi περιλαμβάνει αρχικά ένα ένζυμο που ονομάζεται Dicer-2 (Dcr-2), έναν τύπο ενδονουκλεάσης RNase III. Αυτό το ένζυμο κόβει το dsRNA σε μικρά (συνήθως μήκους 19-21 νουκλεοτιδίων) μικρά παρεμβαλλόμενα RNA (siRNA). Σε συνδυασμό με πρωτεΐνες που δεσμεύουν dsRNA όπως η R2D2, το Dicer-2 διευκολύνει τη μεταφορά των siRNA στο σύμπλοκο σίγησης (RISC). Εκεί, το siRNA διαχωρίζεται σε δύο αλυσίδες. Η μία αλυσίδα απορρίπτεται, ενώ η άλλη, γνωστή ως οδηγός (guide strand), διατηρείται. Χρησιμοποιώντας αυτήν την RNA αλληλουχία-οδηγό, το πλέον ενεργοποιημένο σύμπλοκο RISC ελέγχει τα κυτταρικά mRNAs. Εάν βρει μια συμπληρωματική αλυσίδα με τον οδηγό, μια πρωτεΐνη Argonaute (Ago2) εντός του συμπλέγματος RISC κόβει σε τμήματα τα αντίστοιχα μετάγραφα, αναστέλλοντας έτσι την έκφραση γονιδίου [9].

Η παρεμβολή RNA (RNAi) είναι μια τεχνική που παρέχει τη δυνατότητα για την ανάπτυξη μεθόδων μειωμένου κινδύνου για τον έλεγχο των παρασίτων. Λαμβάνοντας υπόψη τις διαειδικές νουκλεοτιδικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών ειδών, το RNAi μπορεί να παρέχει ειδο-ειδικούς τρόπους αντιμετώπισης των παρασίτων. Έτσι, το RNAi θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την επιλεκτική εξάλειψη των παρασίτων ή ξενικών εντόμων χωρίς να βλάψει τα μη στοχευόμενα είδη στοχεύοντας γονίδια που είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη ή την αναπαραγωγή του εντόμου-στόχου [10]. Αυτή η προσέγγιση υπόσχεται τον έλεγχο των γεωργικών παρασίτων, ελαχιστοποιώντας παράλληλα τις επιπτώσεις στους ωφέλιμους οργανισμούς και μειώνοντας τη χρήση χημικών φυτοφαρμάκων [11].

Η διεξαγωγή πειραμάτων RNAi σε έντομα τυπικά περιλαμβάνει την εισαγωγή των siRNA στον οργανισμό. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί μέσω διαφόρων οδών όπως η μικρο-ένεση (micro-injection), η σίτιση (feeding ή soaking) ή με διαγονιδιακά βακτήρια που θα εκφράσουν το ds RNA εντός του εντόμου. Μόλις εισέλθουν στο έντομο, τα siRNA προσλαμβάνονται από τα κύτταρα και ξεκινούν τη διαδικασία RNAi, οδηγώντας σε παροδική αποσιώπηση της έκφρασης των γονιδίων στόχων.

Συμπερασματικά, το RNAi είναι ένας ισχυρός μηχανισμός που επιτρέπει τη στοχευμένη σίγηση των γονιδίων και έχει φέρει επανάσταση στον τομέα της έρευνας των εντόμων. Η χρήση του σε πειράματα knockdown επέτρεψε τη διερεύνηση σε λειτουργίες των γονιδίων των εντόμων και παράλληλα αποσκοπεί σε πιθανές εφαρμογές στη διαχείριση των γεωργικών παρασίτων. Καθώς η κατανόηση του μηχανισμού RNAi συνεχίζεται, μπορούμε να αναμένουμε περαιτέρω προόδους και καινοτομίες στον τομέα της βιολογίας των εντόμων και του ελέγχου των παρασίτων.

1.6 Το οσφρητικό σύστημα στα δίπτερα και στον δάκο της ελιάς

Το οσφρητικό σύστημα είναι απαραίτητο στην επιβίωση και την αναπαραγωγική επιτυχία πολλών εντόμων, αποτελώντας έναν κρίσιμο μηχανισμό αντίληψης του περιβάλλοντος τους. Τα έντομα εξαρτώνται από την όσφρηση για να αντιληφθούν και να ξεχωρίσουν μία μεγάλη πληθώρα από πτητικές ενώσεις - σήματα στο περιβάλλον τους. Αν και η αντίληψη των φυτικών σημειοχημικών ενώσεων (οσμών) είναι σημαντική στην ζωή των μυγών Tephritidae, οι μηχανισμοί με τους οποίους λειτουργεί η χημειοαντίληψη δεν έχουν αποσαφηνιστεί πλήρως. Τα κύρια μοριακά συστατικά της χημειοδεκτικότητας των εντόμων έχουν εντοπιστεί κυρίως από μελέτες στην *Drosophila melanogaster*.

Για το *Bactrocera oleae* το οσφρητικό σύστημα παίζει κρίσιμο ρόλο στον εντοπισμό κατάλληλων θέσεων ωοαπόθεσης και στον εντοπισμό πιθανών συντρόφων. Σε αυτές τις ενώσεις-σήματα περιλαμβάνονται:

A. Οι φερομόνες. Αποτελούν χημικές ενώσεις που απελευθερώνονται από άτομα του ίδιου είδους και είναι απαραίτητες στην επικοινωνία των εντόμων, επάγοντας αποκρίσεις σχετικές με τη σεξουαλική έλξη, τη συμπεριφορά κατά το ζευγάρωμα και την επιλογή των θέσεων ωοαπόθεσης. Το *Bactrocera oleae*, κυρίως τα θηλυκά άτομα, παράγει την ένωση 1,7-dioxaspiro[5.5]undecane (Olean), το κύριο συστατικό της φερομόνης του φύλου που παράγεται από τους ορθικούς αδένες, προκειμένου να προσελκύσει τα αρσενικά. Επιπλέον, τα αρσενικά είναι ικανά να παράγουν την ένωση (Z)-9-τρικοζίνη (muscalure), μια ουσία που προσελκύει εκλεκτικά τα θηλυκά [12].

B. Άλλες πτητικές ενώσεις, μικρού μοριακού βάρους, που προέρχονται από πηγές τροφής, φυτά – ξενιστές, θηρευτές και άλλους περιβαλλοντικούς παράγοντες. Για παράδειγμα, η έκθεση σε μία πτητική ένωση το α-πινένιο (a-pinene), που παράγεται από τον καρπό της ελιάς, επιδρά στον δάκο της ελιάς αυξάνοντας την επιτυχία της σύζευξης (ζευγάρωμα) τόσο των αρσενικών όσο και των θηλυκών ατόμων [13].

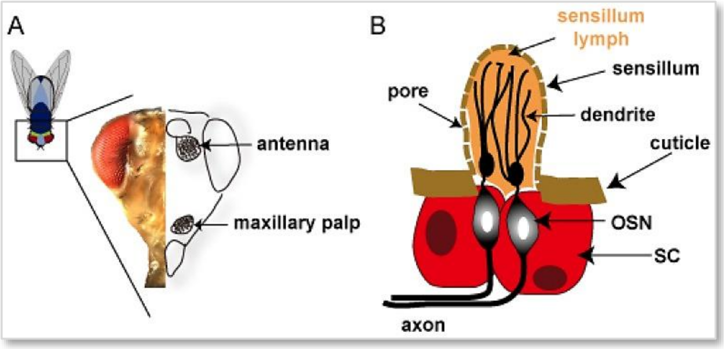
Έτσι, δεδομένης της αξίας που κατέχει το οσφρητικό στην επιβίωση και στην αναπαραγωγή του δάκου της ελιάς, η περαιτέρω μελέτη του κρίνεται σημαντική, καθώς το έντομο αυτό αποτελεί το μεγαλύτερο παράσιτο των ελαιοκαλλιεργειών, προκαλώντας αξιοσημείωτες οικονομικές απώλειες.

1.7 Οσφρητικά όργανα και οσφρητικοί νευρώνες (OSNs)

Η πρόσληψη των φερομονών, καθώς και όλων των πτητικών οσμών, στα έντομα, πραγματοποιείται στα δύο κύρια οσφρητικά τους όργανα (*Εικόνα 1-3*):

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

Τα όργανα αυτά εντοπίζονται στο κεφάλι των εντόμων και περιέχουν έναν μεγάλο αριθμό εξειδικευμένων τριχιδίων, που ονομάζονται οσφρητικά τριχίδια (sensilla),από τους πόρους των οποίων εισέρχονται τα μόρια οσμής κατά την έναρξη της αναγνώρισης τους. Τα οσφρητικά τριχίδια, διαχωρίζονται σε κατηγορίες ανάλογα με τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά και το είδος των οσμών που προσλαμβάνουν. Στις κεραίες του δάκου της ελιάς εντοπίζονται 4 μορφολογικά είδη αισθητικών τριχιδίων,: μακριά βασικωνικά τριχίδια (long basiconica sensilla), τριχοειδικά (trichoid sensilla), κοντά αυλακωτά βασικωνικά (short grooved basiconica) sensilla και στυλοκωνικά (styloconica sensilla) [14].



Εικόνα 1-3: A) Παρουσιάζονται τα κύρια οσφρητικά όργανα ενός δίπτερου: η κεραίες (antennae) και οι γναθικές προσακτρίδες (maxillary palps). B) Στο ίδιο έντομο, η δομή ενός αισθητικού τριχιδίου όπου στεγάζονται δύο οσφρητικοί νευρώνες (OSNs).

Η δομή των οσφρητικών τριχιδίων, που αποτελούνται από επιδερμικό τοίχωμα με μεγάλο αριθμό πόρων μέσα από τους οποίους εισέρχονται οι οσμές, είναι πολύ συντηρημένη παρά τις σημαντικές διαφοροποιήσεις στο σχήμα των οσφρητικών οργάνων ανάμεσα στα διαφορετικά είδη εντόμων. Σε κάθε τριχίδιο μπορεί να περιέχονται οι δενδρίτες από έναν έως πέντε νευρώνες (Olfactory Sensory Neurons, OSNs). Οι άξονες των OSNs εκτείνονται ως τα σπειράματα (glomeruli) των συναπτικών κέντρων υπεύθυνων για την όσφρηση, στο λοβό
(antennal lobe) του εγκεφάλου [14].

1.8 Η πρόσληψη οσμών σε μοριακό επίπεδο

Οι φερομόνες και άλλες χημικές ουσίες εισέρχονται στη λέμφο των τριχιδίων περνώντας μέσα από πόρους στην επιδερμίδα, η οποία σχηματίζει το εξωτερικό στρώμα του τριχιδίου (sensillum). Μόλις εισέλθουν, γίνονται διαλυτές με το να δεσμεύονται σε οσμοδεσμευτικές πρωτεΐνες (Odorant Binding Proteins, OBPs), επιτρέποντάς τους να μεταφερθούν στους οσφρητικούς υποδοχείς (Olfactory Receptors, ORs). Αυτή η μεταφορά μορίων φερομόνης παρέχει προστασία έναντι των ενζύμων που αποικοδομούν οσμές (Odorant Degrading Enzymes, ODEs). Όταν μία OBP και ένα μόριο οσμής αλληλοεπιδράσουν με αρνητικά φορτισμένες θέσεις στην δενδριτική κυτταρική μεμβράνη του OSN, υφίστανται μια δομική αλλαγή που προκαλεί την απελευθέρωση του μορίου της οσμής. Η άμεση ενεργοποίηση των ORs από μόρια οσμής πυροδοτεί μια σειρά γεγονότων που έχουν ως αποτέλεσμα την παραγωγή νευρικών σημάτων (ακίδες) [15]. Τα πρώιμα στάδια της οσφρητικής επεξεργασίας (peri-receptor events), αναφέρονται σε εξωκυτταρικές διεργασίες που εμπλέκονται στην είσοδο, δέσμευση, μεταφορά και απελευθέρωση των υδρόφοβων φερομονών και άλλων ενώσεων στους υποδοχείς τους καθώς και στις δραστηριότητες μετά την αλληλεπίδραση που συνδέονται με την απενεργοποίηση των χημικών αυτών σημάτων [15].

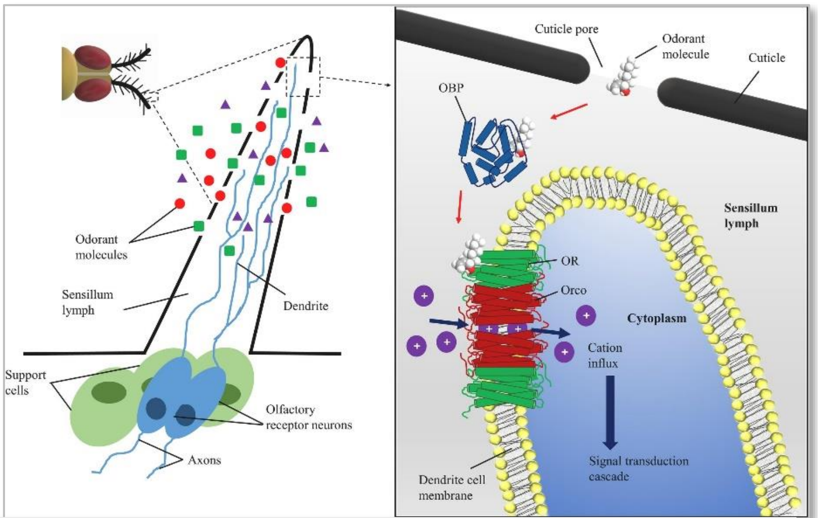
1.8.1 Οι οσμοδεσμευτικές πρωτεΐνες (OBPs)

Προτού ανιχνευθούν από τους μεμβρανικούς οσφρητικούς υποδοχείς, οι οσμές οι οποίες τυπικά είναι υδρόφοβες ενώσεις, πρέπει να περάσουν μέσα από τη λέμφο που είναι υδρόφιλο περιβάλλον και περιβάλλει τους οσφρητικούς νευρώνες (ORNs). Συγκεκριμένες πρωτεΐνες, που εκκρίνονται σε μεγάλες ποσότητες, έχει προταθεί ότι συμμετέχουν στη διευκόλυνση αυτού του σταδίου των οσφρητικών διεργασιών. Αυτές οι πρωτεΐνες, αναφέρονται ως οικογένεια OBP και παράγονται από διάφορους τύπους υποστηρικτικών κυττάρων που βρίσκονται κοντά με τους ORN [16]. Οι OBPs ανάλογα με το υπόστρωμά τους, φερομόνη ή άλλη πτητική ένωση, διακρίνονται σε Pheromone Binding Proteins (PBPs) και σε General odorant-binding proteins (GOBPs) αντίστοιχα. Οι PBPs όχι μόνο εδράζονται αποκλειστικά στα τριχίδια των κεραίων, αλλά σε κάποιες περιπτώσεις μόνο στις κεραίες των αρσενικών ατόμων. Οι GOBPs εντοπίζονται στις κεραίες και των δύο φύλων ή εντοπίζονται περισσότερο στα θηλυκά άτομα. Στο είδος *Drosophila melanogaster* (δίπτερο της οικογένειας Droshophilidae) έχει προταθεί ότι η οικογένεια των γονιδίων OBP περιλαμβάνει έως και 51 υποτιθέμενες OBPs, όμως μόλις επτά από αυτές έχει αποδειχθεί ότι εκφράζονται ειδικά στα οσφρητικά όργανα των ενηλίκων εντόμων (Obp19a, Obp57a, Obp69a, PBPRP-3, PBPRP-4, OS-E και η Obp99d), ενώ δύο έχουν εντοπιστεί στις κεραίες των ενηλίκων και στα οσφρητικά όργανα της προνύμφης *D. melanogaster* (PBPRP-5 και LUSH) [15].

1.8.2 Οσφρητικοί υποδοχείς (ORs)

Οι χημειοευαίσθητοι υποδοχείς είναι απαραίτητοι για την αναγνώριση των οσμών στους περιφερειακούς νευρώνες OSNs. Αποτελούνται από τρεις τύπους ειδικών για τα έντομα υπεροικογένειες: τους οσφρητικούς υποδοχείς (ORs), τους ιοντοτροπικούς υποδοχείς (Ionotropic Receptors, IRs) και τους γευστικούς υποδοχείς (Gustatory Receptors, GRs) που αναγνωρίζουν το CO_2 [17].

Μεταξύ αυτών των υπεροικογενειών υποδοχέων των εντόμων, οι ORs έχουν χαρακτηριστεί σχετικά καλά ως ετερομερείς δίαυλοι ιόντων που αποτελούνται από ένα συγκεκριμένο OR και έναν εξαιρετικά συντηρημένο, ανάμεσα στα διάφορα είδη εντόμων, συν-υποδοχέα Orco [15]. Οι ORs στο *Bactrocera oleae,* όπως και σε άλλα έντομα, εντοπίζονται κυρίως στις κεραίες και ειδικότερα στους νευρώνες OSNs. Συγκεκριμένα, μπορούν να εντοπιστούν στα βασικωνικά, τα τριχοειδικά, τα κοιλοκωνικά (short grooved basiconica) όπως και στα οσφρητικά τριχίδια των γναθικών προσακτρίδων και στις προνύμφες.



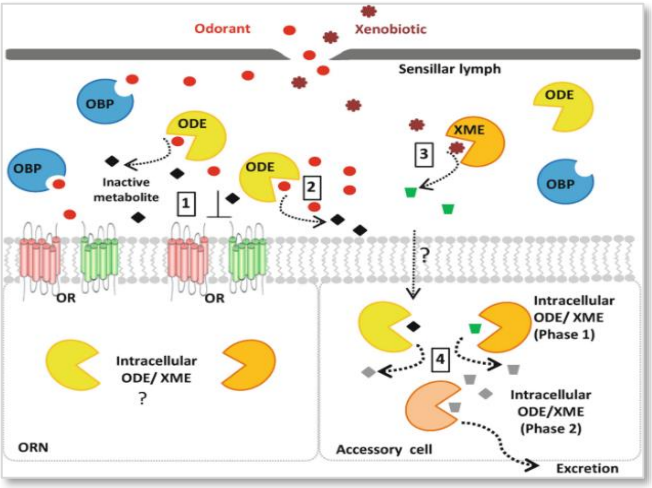
Εικόνα 1-4: *Αριστερά στην εικόνα φαίνεται η δομή ενός οσφρητικού τριχιδίου, στη Dm, με τους άξονες δύο OSNs να το διατρέχουν. Δεξιά, μηχανισμός μεταφοράς των οσμών μέσω OBPs στο σύμπλοκο OR-ORCO και η μεταγωγή-ενίσχυση σήματος που προκαλεί η αναγνώριση της οσμής από τον OR. Πηγή: Cheema et al., 2021.*

Σε κάθε οσφρητικό νευρώνα OSN εκφράζεται το γονίδιο ενός OR ή ενός IR και το γονίδιο του αντίστοιχου συνυποδοχέα του. Για τους ORs ο συνυποδοχέας Or83b ή αλλιώς Orco (Olfactory Receptor Coreceptor) είναι μοναδικός και καθολικός για όλους τους οσφρητικούς υποδοχείς και εκφράζεται σε όλους τους οσφρητικούς νευρώνες. Για τους ιοντοτροπικούς υποδοχείς, IR, το ρόλο του συνυποδοχέα διαδραματίζει η πρωτεΐνη Ir8a ή η πρωτεΐνη Ir25a [18].

Στη D. melanogaster (Dm) έχουν εντοπιστεί συνολικά 62 υποδοχείς OR, οι οποίοι προέρχονται από την έκφραση 60 γονιδίων, ύστερα από εναλλακτικό μάτισμα. Ο κάθε υποδοχέας μπορεί να συνδεθεί με περισσότερα από ένα μόρια οσμής, επομένως τα έντομα μπορούν να αντιληφθούν μία μεγάλη ποικιλία οσμών αξιοποιώντας έναν μικρό αριθμό οσφρητικών υποδοχέων. Στη *Drosophila melanogaster*, οι οσφρητικοί υποδοχείς αποτελούν προσδετο-εξαρτόμενους διαύλους ιόντων (ligand gated ion channels) και ταυτόχρονα είναι μη εκλεκτικοί δίαυλοι κατιόντων Ca2+, Na+ και K+ που ενεργοποιούνται από κυκλικά AMP/GMP [19] (**Εικόνα 1-4**). Επιπλέον, οι ORs των εντόμων δεν εμφανίζουν ομολογία με τους υποδοχείς GPCRs των θηλαστικών και αντίθετα παρουσιάζουν αντίστροφη τοπολογία στην κυτταρική μεμβράνη, με το N-τελικό άκρο τους να βρίσκεται ενδοκυτταρικά στους OSNs και το C-τελικό εξωκυτταρικά [20].

1.8.3 Τα ένζυμα αποικοδόμησης οσμών ODEs

Μια βασική διαδικασία των περι-ϋποδοχικών συμβάντων (peri-receptor events) αποτελεί ο τερματισμός του σήματος, που είναι απαραίτητος για τη διατήρηση του σωστής δυναμικότητας των οσφρητικών αποκρίσεων. Ένζυμα που βρίσκονται στη λέμφο των κεραιών, γνωστά ως ένζυμα αποικοδόμησης οσμής (ODEs), που βρίσκονται κοντά σε υποδοχείς, παίζουν δυνητικά τον ρόλο του «διακόπτη» των σημάτων διασπώντας γρήγορα τα μόρια οσμής σε ανενεργές μορφές, δηλαδή σε ενώσεις που δεν μπορούν πλέον να ενεργοποιήσουν τους υποδοχείς. Έχει προταθεί ότι αυτά τα ένζυμα βοηθούν στη διάσπαση των πλεοναζόντων οσμών στη λέμφο των οσφρητικών τριχιδίων (sensilla), προλαμβάνοντας έτσι την υπερδιέγερση των οσφρητικών υποδοχέων, ενισχύοντας την οσφρητική ευαισθησία και μειώνοντας τον θόρυβο (chemical noise). Τα ODEs μπορούν επίσης να συμμετέχουν στη συνολική διάσπαση και τον μεταβολισμό των μορίων οσμής μέσα στα sensilla, βοηθώντας στην απομάκρυνση χημικών ουσιών από τα sensilla και προστατεύοντας τους οσφρητικούς νευρώνες από δυνητικά επιβλαβή μόρια (Εικόνα 1-5**Error! Reference source not found.**). Παρά το ευρύ φάσμα των πιθανών λειτουργιών, μόνο λίγα τέτοια ένζυμα έχουν αναγνωριστεί ως ODEs στα έντομα [21].



Εικόνα 1-5: *Αριστερά της εικόνας, παρουσιάζεται οπτικά η δράση των βασικών πρωτεϊνών του οσφρητικού στους οσφρητικούς νευρώνες (OSNs) και η δράση των ενζύμων (ODEs) στο μεταβολισμό των οσμών εξωκυττάρια, ενώ δεξιά φαίνεται η έκκριση των οσμών και ξενοβιοτικών στα βοηθητικά κύτταρα (accessory cells).*

Έχουν αναγνωριστεί 4 κατηγορίες ενζύμων ODEs στα έντομα [22]:

1. Διαλυτές εξωκυτταρικές πρωτεΐνες ODEs υπάρχουν στη λέμφο των οσφρητικών τριχιδίων (εστεράσες, οξυδάσες αλδεϋδών, αλκοολικές αφυδρογονάσες κ.λπ.). Η ποικιλομορφία που παρουσιάζουν αυτά τα ένζυμα ανταποκρίνεται στις διαφορετικές λειτουργικές ομάδες των ενώσεων που αποτελούν τις φερομόνες και άλλες πτητικές οσμές.
2. Μεμβρανικά ODEs, όπως οι υδρολάση του εποξειδίου.
3. Τα κυτταροπλασματικά ODEs, ένζυμα με πολλαπλούς ρόλους που εμπλέκονται στη βιομετατροπή πιθανών ξενοβιοτικών ενώσεων καθώς και οσμών (για παράδειγμα οξυγενάσες του κυτοχρώματος P450 και S-τρανσφεράσες της γλουταθειόνης).
4. Επιδερμικά ODEs (cuticular ODEs) διασπούν φερομόνες και άλλες πτητικές ενώσεις που απορροφόνται στην κηρώδη επιδερμίδα του εντόμου (cuticle). Δεδομένου ότι αυτά τα προσροφημένα μόρια αποτελούν δευτερογενείς θέσεις απελευθέρωσης οσμών, η διάσπαση τους στην επιδερμίδα μπορεί να μειώσει σημαντικά τον χημικό θόρυβο.

Οι εστεράσες (CXEs) ως ένζυμα αποικοδόμησης οσμών (ODEs):

Τα πρώτα ένζυμα ODEs που εντοπίστηκαν στα έντομα ανήκαν σε μία οικογένεια εστερασών που εντοπίζονται στις κεραίες. Τα ένζυμα αυτά υδρολύουν εστερικούς δεσμούς, που υπάρχουν σε πολλές οσμές που προέρχονται από έντομα και φυτά, φερομόνες εντόμων, καθώς και σε φυτοφάρμακα [23]. Συγκεκριμένα, η πρώτη εστεράση (CXE) που εντοπίστηκε στις κεραίες εντόμων με δράση ενζύμου ODE ήταν η εστεράση ApolPDE, από ένα είδος λεπιδόπτερου το *Antheraea polyphemus. Η* ApolPDE εντοπίζεται στις κεραίες των αρσενικών του είδους και διασπά τη φερομόνη του φύλου E6Z11-16:OAc, που αποτελεί μία ένωση εστέρα. Στο ιαπωνικό σκαθάρι *Popilia japonica*, έχει βρεθεί επίσης, ένα ένζυμο CXE που εκφράζεται στις κεραίες των αρσενικών και είναι ικανό να αποικοδομεί την εστερική φερομόνη (R)-japonilure. Επιπλέον, ένας μεγάλος αριθμός CXEs που μπορούν να αποικοδομήσουν φυτικούς εστέρες και/ή φερομονικούς εστέρες ανακαλύφθηκε στις κεραίες των *Spodoptera littoralis* και *S. Exigua*, υποδηλώνοντας τη συμμετοχή τους στον τερματισμό του οσφρητικού σήματος [24]. Στη *D. melanogaster*, τα πιο καλά μελετημένα ένζυμα ODEs αποτελούν η εστεράση JHEdup (juvenile hormone esterase duplication) και η εστεράση 6 (Esterase 6). Αυτά τα ένζυμα διασπούν πτητικούς εστέρες παρά τη νεανική ορμόνη (Juvenile hormone) [20].

Στον δάκο της ελιάς μέχρι σήμερα δεν έχουν χαρακτηριστεί γονίδια που εκφράζουν ένζυμα ODEs. Ωστόσο, με βάση μία ανάλυση του μεταγραφώματος που πραγματοποιήθηκε σε ένα βιολογικό δείγμα pool (από 10 eggs, 4 instar larvae, 3 pupae; 4 adults) του εντόμου, μοναδική στη διεθνή βιβλιογραφία μέχρι σήμερα, που είχε στόχο των εύρεση των ξενοβιοτικών ενζύμων του δάκου της ελιάς, μέσω των οποίων το έντομο αναπτύσσει ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα και στις φυτοτοξίνες που μπορεί να υπάρχουν στο μεσοκάρπιο, αποκαλύφθηκε ότι σύμφωνα με τις αλληλουχίες των μεταγράφων υπάρχουν στο *B. oleae:* 55 γονίδια CYP, 43 GST, 15 CXE και 18 ABC μεταφορέων [25]. Οι εστεράσες (CXE) που εντοπίζονται στις κεραίες εντόμων χωρίζονται σε τρεις κύριες κατηγορίες: την ομάδα επεξεργασίας ορμονών/σημειοχημικών ενώσεων, την ομάδα διάσπασης τροφών-ξενοβιοτικών (dietary group) και τη νευροαναπτυξιακή ομάδα [26]. Η πρώτη κατηγορία, η ομάδα επεξεργασίας ορμόνων/σημειοχημικών ενέσεων, αποτελείται από εστεράσες που εκκρίνονται στην αιμολέμφο. Με βάση τη μελέτη, από τα 15 γονίδια CXE που ταυτοποιήθηκαν στο μεταγράφωμα, 3 γονίδια ανήκαν σε εκκρινόμενες εστεράσες με βάση την αλληλουχία τους. Επομένως, αυτά τα τρία γονίδια εστερασών μπορεί να αφορούν ένζυμα ODEs, που διασπούν οσμές στο οσφρητικό σύστημα του δάκου της ελιάς.

Εάν τα ένζυμα αυτά είναι υπεύθυνα για την ταχεία εξουδετέρωση των οσφρητικών σημάτων, θα μπορούσαν ενδεχομένως να έχουν εφαρμογές στη γεωργία. Για παράδειγμα, ο ορθολογικός σχεδιασμός αναστολέων αυτών των ενζύμων θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί στον έλεγχο και στη διαχείριση εντόμων-παρασίτων. Με τον τρόπο αυτό, αυτές οι ενώσεις-αναστολείς των ενζύμων ODEs θα μπορούσαν να διεισδύσουν στην λέμφο των οσφρητικών οργάνων και να αποτρέψουν την ταχεία διάσπαση μορίων οσμής, παρεμποδίζοντας έτσι τη χημική επικοινωνία μεταξύ των εντόμων ή/και με το περιβάλλον (πχ φυτά-ξενιστές) και διαταράσσοντας ουσιαστικά τη διαδικασία απενεργοποίησης του οσφρητικού σήματος που απαιτείται για την πλοήγηση των εντόμων στο περιβάλλον, η οποία καθοδηγείται από οσμές [1].

1.9 Οσφρητική «Σύγχυση» (μέθοδος ΚΟΜΦΟΥΣΙΟ)

1.9.1 Διαταραχή σύζευξης μέσω ODEs

Η σύγχυση του οσφρητικού συστήματος (olfactory confusion) στα έντομα, με στόχο συγκεκριμένα τα ένζυμα αποικοδόμησης οσμών (ODEs), είναι μια στρατηγική που αποσκοπεί να διαταράξει την κανονική λειτουργία της όσφρησης ενός εντόμου με στόχο τον έλεγχο του πληθυσμού του εντόμου. Αυτή η διαταραχή του οσφρητικού συστήματος μπορεί να επηρεάσει την ικανότητα ενός εντόμου να εντοπίζει τροφή, πιθανούς συντρόφους και κατάλληλες τοποθεσίες ωοαπόθεσης.

Μόλις οι νευρώνες (ORNs) ενός οσφρητικού υποδοχέα OR διεγερθούν από μόρια οσμής, πρέπει να διαπαστούν γρήγορα από τα ODEs για να αποτραπεί η συσσώρευση ερεθίσματος και να αποκατασταθεί η ευαισθησία του νευρώνα. Στοχεύοντας αυτά τα ένζυμα και τη διαδικασία τερματισμού του οσφρητικού σήματος, μπορεί να προκληθεί σύγχυση του οσφρητικού συστήματος στο έντομο (olfactory confusion). Αυτή η μέθοδος σύγχυσης μπορεί να περιλαμβάνει τη χρήση συνθετικών ενώσεων που είτε να αυξάνουν τη καταλυτική δραστικότητα αυτών των ενζύμων ODEs, οδηγώντας σε ταχεία διάσπαση όλων των οσμών και με αποτέλεσμα αδυναμία ανίχνευσης οσμών είτε να αναστέλλουν τη δράση των ενζύμων ODEs, αποτρέποντας τη διάσπαση των μορίων οσμής και οδηγώντας σε ένα επίμονο, με μεγάλη χρονική διάρκεια, σήμα οσμής που μπορεί επίσης να καταστήσει αδύνατη την ανίχνευση νέων οσμών [27].

Τέτοιες στρατηγικές μπορούν να αποτελέσουν μέρος μιας προσέγγισης ολοκληρωμένης διαχείρισης παρασίτων (IPM), παρέχοντας μια πιθανή εναλλακτική και φιλική προς το περιβάλλον λύση σε σχέση με τα παραδοσιακά εντομοκτόνα. Ωστόσο, η ανάπτυξη αυτών των στρατηγικών απαιτεί τη βαθιά κατανόηση της δράσης των ενζύμων ODEs και των φυσιολογικών διαδικασιών που επηρεάζουν στα έντομα.

1.9.2 Πειραματικές εφαρμογές της τεχνικής “confusion” με τη χρήση των ODEs

Λίγες μελέτες μέχρι σήμερα έχουν προσφέρει άμεσες ενδείξεις για το ειδικό ρόλο των ODEs στη ρύθμιση της συμπεριφοράς των εντόμων μετά την έκθεση σε φερομόνες του φύλου ή σε πτητικές οσμές. Έτσι, εφαρμογές της τεχνικής της οσφρητικής «σύγχυσης» με χρήση των ενζύμων ODEs βρίσκονται ακόμη σε πειραματικά στάδια, με περιορισμένες ολοκληρωμένες μελέτες να είναι διαθέσιμες στη διεθνή βιβλιογραφία. Ενδεικτικά παραδείγματα αποτελούν δύο μελέτες που έχουν διερευνήσει τις in vivo επιδράσεις της έλλειψης ενζύμων ODEs στη συμπεριφορά των εντόμων όταν εκτίθενται σε οσμές που συνήθως αποικοδομούνται από αυτά τα ένζυμα.

1. Η πρώτη μελέτη επικεντρώθηκε στον ανατολικό σκώρο φρούτων (*Grapholita molesta*), ένα σημαντικό παράσιτο των φρούτων. Με την εφαρμογή ODEs σε οπωρώνες, η ικανότητα των αρσενικών σκόρων να ανιχνεύουν τις θηλυκές φερομόνες του φύλου διαταράχθηκε, οδηγώντας σε σύγχυση (confusion) και σε μειωμένη επιτυχία ζευγαρώματος. Η εφαρμογή της τεχνικής αυτής έχει δείξει υποσχόμενη στην καταστολή των πληθυσμών των σκώρων ανατολίτικων φρούτων (*G. molesta*) και στη μείωση των ζημιών που προκαλεί στις καλλιέργειες. Επιπλέον, η αποσιώπηση των ενζύμων GmolCXE 14 και 21 σε 4^{ου} σταδίου προνύμφες του σκώρου είχε ως αποτέλεσμα μια δραματική μείωση των νευρικών αποκρίσεων τους στις οσμές που εκκρίνονται από τους ξενιστές, καθώς και σε αλλαγές στη συμπεριφορά των εντόμων [28].

2. Στη δεύτερη μελέτη παρουσιάζονται ενδείξεις ότι το ένζυμο Est-6 ενέχει σημαντικό ρόλο στη φυσιολογική δυναμικότητα της απόκρισης της φερομόνης του φύλου στην αρσενική *D. melanogaster* και στη συμπεριφορά της. Τα μεταλλάγματα Est-6 αρσενικών μυγών Dm εμφάνισαν ηπιότερη συμπεριφορά απόκρισης στη φερομόνη cVA. Συγκεκριμένα, τα μεταλλαγμένα αρσενικά εμφάνισαν έντονη μείωση στο male-male courtship, συνοδευόμενη από καθυστέρηση στην έναρξη της ερωτοτροπίας. Τα ευρήματα αυτά υποστηρίζουν το ρόλο του Est-6 ως ένζυμου αποικοδόμησης οσμών (ODE) στις κεραίες των αρσενικών *D. melanogaster* [27].

2 Σκοπός

Στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η διερεύνηση του λειτουργικού ρόλου τριών μη χαρακτηρισμένων γονιδίων εστεράσης, οι οποίες ονομάστηκαν BoIEST6, BoIEST7 και BoIEST14. Οι εστεράσες αυτές αποτελούν τις μοναδικές εκκρινόμενες εστεράσες στον δάκο της ελιάς, με βάση την αλληλουχία τους [25]. Η αποσαφήνιση του λειτουργικού ρόλου αυτών των γονιδίων μπορεί να οδηγήσει στην ανάδειξη αυτών των εστερασών ως ένζυμα ODEs και επομένως μελλοντικά στην ανάπτυξη νέων στρατηγικών που βασίζονται στην οσφρητική σύγχυση (olfactory confusion) για τον έλεγχο του παρασίτου της ελιάς *B. oleae* και έτσι βοηθώντας στην προστασία των ελαιοκαλλιεργειών. Αρχικά, με ποσοτικοποίηση της γονιδιακής έκφρασης με real time PCR σκοπός ήταν η δημιουργία των προφίλ έκφρασης των τριών γονιδίων σε όλο τον κύκλο ζωής του *B. oleae* σε εργαστηριακό πληθυσμό και άγριο πληθυσμό δάκου για να εντοπίσουμε ομοιότητες και διαφοροποιήσεις στην έκφραση των γονιδίων ανάμεσα στα στάδια του κύκλου ζωής του εντόμου στους δύο πληθυσμούς. Ύστερα, από τη μελέτη των προφίλ έκφρασης επιχειρήθηκε η παροδική σίγηση των γονιδίων αυτών, με RNAi knockdown, μέσω μικροέγχυσης dsRNA σε ομάδες εντόμων (εργαστηριακού πληθυσμού) για κάθε γονίδιο στα κατάλληλα στάδια ανάπτυξης. Τα αποτελέσματα αυτών των RNAi knockdown πειραμάτων μπορούν να συμβάλλουν στον προσδιορισμό της συμβολής των BolEST6, BolEST7 και BolEST14 στην αποικοδόμηση οσμών και τον πιθανό ρόλο τους στο οσφρητικό σύστημα του δάκου της ελιάς.

3 Υλικά και Μέθοδοι

3.1 Εργαστηριακές συνθήκες

Ο εργαστηριακός πληθυσμός των εντόμων δάκου της ελιάς, που χρησιμοποιήθηκε για τη διεξαγωγή των Πειραμάτων, προέρχεται από το εργαστηριακό στέλεχος «Δημόκριτος» του Εθνικού Κέντρου Έρευνας Φυσικών Επιστημών (Nuclear Research Centre, Athens, Greece). Τα έντομα είχαν εκτραφεί στο εντομοτροφείο του εργαστηρίου Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής, του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, όπου διατηρούνταν σε σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας, υγρασίας (25 ± 1 °C, 55 ± 5% RH αντίστοιχα) και τεχνητής φωτοπεριόδου 14h φως/10h σκοτάδι (14/10h light/dark). Τόσο οι προνύμφες όσο και τα ενήλικα εκτράφηκαν με τυπικές τεχνητές δίαιτες [29], ενώ χρησιμοποιήθηκαν κώνοι παραφίνης ως υποστρώματα ωοαπόθεσης. Ο εργαστηριακός πληθυσμός του Bactrocera oleae χρησιμοποιείται στην έρευνα του δάκου της ελιάς κυρίως λόγω της καλύτερης ανάπτυξης του σε ελεγχόμενες συνθήκες.

Ο άγριος πληθυσμός δάκου της ελιάς, που χρησιμοποιήθηκε για τη δημιουργία προφίλ γονιδιακής έκφρασης, προέρχεται από δειγματοληψίες εντόμων στο Ν. Μαγνησίας (Θεσσαλία, 2022). Τα έντομα του άγριου πληθυσμού εκτράφηκαν σε θερμοκρασία δωματίου (room temperature; RT), με φυσική φωτοπερίοδο. Η ωοαπόθεση πραγματοποιούνταν σε καρπούς ελιάς που τοποθετούνταν καθημερινά στο κλουβί για όσο διάστημα διήρκησαν τα πειράματα. Οι προνύμφες τράφηκαν με το μεσοκάρπιο της ελιάς, ενώ τα ενήλικα με τεχνητή δίαιτα [30].

3.2 Βιοπληροφορική ανάλυση

3.2.1 Σχεδιασμός Εκκινητών για real time PCR

Ο σχεδιασμός των εκκινητών έγινε με τα προγράμματα software: PrimerQuest της IDT (2022. Integrated DNA Technologies, Inc.) και Primer BLAST (Ye J et al, 2012). Ως PCR template χρησιμοποιήθηκαν οι αλληλουχίες των μεταγράφων των γονιδίων-στόχων που αποκτήθηκαν από τη βάση δεδομένων του NCBI. Τα ονόματα των μεταγράφων, (NCBI Reference Sequences and version), ήταν: XM_036359186.1, XM_014242565.2 και XM_014247516.2 για τα γονίδια των εστερασών τα οποία εφόσον δεν έχουν μελετηθεί ξανά, ονομάστηκαν Bactrocera oleae Esterase 6, 7 και 14 ή αλλιώς BolEST6, BolEST7 και BolEST14 αντίστοιχα.

Βήματα για τον σχεδιασμό/ επιλογή ζεύγους εκκινητών:

- Το μήκος των εκκινητών ορίζεται συνήθως μεταξύ 18-30 βάσεις. Εκκινητές με μικρό μήκος έχουν μεγαλύτερη εξειδίκευση.
- Η θερμοκρασία Tm τοποθετείται μεταξύ 50-65°C και η διαφορά μεταξύ των Tm του εμπρόσθιου και του οπίσθιου εκκινητή ενός ζεύγος μικρότερη από 3°C.
- Με το Oligoanalyzer Tool ελέγξαμε τις υπόλοιπες ιδιότητες των πιθανών εκκινητών, δηλαδή το GC content των εκκινητών (ιδανικά μεταξύ 40-60%), τις δευτεροταγείς δομές από σχηματισμό ομοδιμερών και σε ποια θερμοκρασία είναι σταθερά (ιδανικά ΔG> -9 kcal/mol), για το σχηματισμό θερμοσταθερών ετεροδιμερών (ιδανικά ΔG> -9 kcal/mol). Το πρόγραμμα Primer BLAST αποδίδει παρόμοια ζεύγη εκκινητών. Χρησιμοποιήθηκαν και τα δύο προγράμματα για επαλήθευση.
- Στοίχιση των εκκινητών στο πρόγραμμα BLASTn, ώστε να ελεγχθεί αν οι εκκινητές συνδέονται με μεγάλη εκλεκτικότητα στην επιθυμητή αλληλουχία του γονιδίου στόχου, με βάση το score στο αποτέλεσμα της στοίχισης. Ιδανικά τα επιθυμητά hits έχουν τιμές e-value <0,05 και Per. identity >99%.
- Αφού ελεγχθεί ότι ένα ζεύγος εκκινητών συνδέεται μόνο με το επιθυμητό γονίδιο-στόχο, ελέγχουμε ότι το ζεύγος εκκινητών ενισχύει μία περιοχή εξονίου.
- Η διαδικασία επαναλαμβάνεται για τους qPCR εκκινητές που θα χρησιμοποιηθούν για τον προσδιορισμό της έκφρασης των γονιδίων-στόχων και για τους dsRNA εκκινητές που θα χρησιμοποιηθούν για το RNAi silencing.
- Για να εξασφαλιστεί ο διαχωρισμός των πειραμάτων RNAi και qPCR, συνιστάται η επιλογή εκκινητών T7 που στοχεύουν σε διαφορετική περιοχή του γονιδίου σε σύγκριση με τους εκκινητές qPCR. Αυτό αποτρέπει οποιαδήποτε παρεμβολή μεταξύ του dsRNA που χρησιμοποιείται για το knockdown και των εκκινητών qPCR που χρησιμοποιούνται για ανάλυση έκφρασης.
- Τέλος, στο 5’ άκρο των dsRNA εκκινητών προσθέτουμε την αλληλουχία T7 για το in vitro transcription.

3.2.2 Αναζήτηση δομικών περιοχών - σηματοδοτικών πεπτιδίων

Το Protter και το SignalP είναι εργαλεία που χρησιμοποιούνται στην ανάλυση πρωτεϊνών για διαφορετικούς σκοπούς. Το Protter (Version 1.0) χρησιμοποιήθηκε για την οπτικοποίηση και τον σχολιασμό χαρακτηριστικών των πρωτεϊνικών αλληλουχίων των εστερασών, βοηθώντας στην αναγνώριση δομικών στοιχείων, περιοχών και μοτίβων [31]. Το SignalP (Version 5.0) χρησιμοποιήθηκε για την πρόβλεψη και την ανάλυση σηματοδοτικών πεπτιδίων (signal peptides), βοηθώντας στην κατανόηση των διαδικασιών στόχευσης και έκκρισης πρωτεΐνης [32]. Οι αλληλουχίες πρωτεϊνών των εστερασών που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή τη μελέτη ελήφθησαν από το NCBI μέσω αυτόματης πρόβλεψης της πρωτεϊνικής αλληλουχίας από την νουκλεοτιδική αλληλουχία.

Γονίδιο	NCBI Reference Sequence
BoIEST6 (esterase-5B)	XP_036215079.1
BoIEST7 (bile salt-activated lipase)	XP_014098040.2
BoIEST14 (venom carboxylesterase-6)	XP_014102991.1

3.3 Απομόνωση ολικού RNA (RNA isolation)

Η απομόνωση RNA αποτελεί το πρώτο βήμα για την ανάλυση γονιδιακής έκφρασης με μεθόδους μοριακής βιολογίας, όπως η ποσοτική PCR, καθώς επιτρέπει τον ποσοτικό προσδιορισμό και τον χαρακτηρισμό των mRNA, παρέχοντας πληροφορίες για τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων σε ένα συγκεκριμένο βιολογικό σύστημα.

Πραγματοποιήσαμε απομόνωση RNA και σύνθεση cDNA για την ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης μέσω PCR πραγματικού χρόνου για όλα τα βιολογικά δείγματα των πειραμάτων της μελέτης. Για τη δημιουργία των προφίλ γονιδιακής έκφρασης, συνολικά συλλέξαμε 42 βιολογικά δείγματα από άγριους δάκους της ελιάς και 47 βιολογικά δείγματα από τον εργαστηριακό πληθυσμό. Για τη μελέτη της παροδικής αποσιώπησης της έκφρασης των εστερασών BoIEST6, BoIEST7 και BoIEST14 χρησιμοποιήσαμε συνολικά 46 βιολογικά δείγματα. Τα δείγματα περιγράφονται πιο αναλυτικά στο κεφάλαιο Αποτελέσματα (Κεφάλαιο 4.3).

Η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε για την απομόνωση RNA περιγράφεται ως εξής:

Τα δείγματα (ιστός, οργανισμός ή pool οργανισμών) αφού συλλεχθούν τοποθετούνται σε διάλυμα Extrazol® (QIAGEN, Blirt S.A.), ομογενοποιούνται και τοποθετούνται στους -80°C για να διατηρηθεί το RNA. Η ποσότητα του Extrazol διαφέρει ανάλογα με τον όγκο που καταλαμβάνουν τα δείγματα (min. 20μl). Χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο απομόνωσης «PROTOCOL FOR RNA ISOLATION USING EXTRAzol», με τροποποιήσεις [33].

Βήματα για RNA isolation:

1. Ομογενοποίηση του δείγματος με έμβολο (pestle).
2. Ξέπλυμα pestle και προσθήκη Extrazol μέχρι τα 200μL.
3. Ανάδευση του δείγματος (Vortex)
4. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου (RT) για 5 λεπτά
5. Φυγοκέντρηση για 10 λεπτά σε 14.000rpm, στους 4°C
6. Λήψη υπερκειμένου σε καινούριο σωληνάριο (tube)
7. Προσθήκη 0,1X Chloroform – 0014272 και καλό ανακάτεμα για >15 sec.
8. Επώαση σε RT για 10 λεπτά
9. Φυγοκέντρηση στους 4°C, 14.000rpm, 15 λεπτά
10. Μεταφορά υπερκειμένου σε νέο tube
11. Προσθήκη 0,5 X ισοπροπανόλης + 2μL γλυκογόνο (glycogen, 0.05-1 μg/μL)
12. Επώαση σε RT για 10 λεπτά
13. Φυγοκέντρηση στους 4°C, 14.000rpm, 30 λεπτά
14. Αφαίρεση υπερκειμένου και πλύση με 200μl EtOH 70% v/v
15. Φυγοκέντρηση στους 4°C, 14.000rpm, 10 λεπτά
16. Αφαίρεση της EtOH και στέγνωμα (air-dry) μέχρι την πλήρη εξάτμιση της αιθανόλης
17. Επαναδιάλυση σε 23 μl H_2O.
18. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης του RNA με μέτρηση 1μl RNA στη συσκευή Q3000 UV Spectrophotometer (Quawell Technology, Inc).

3.4 Επεξεργασία με DNase (DNase treatment)

Παρασκευή RNA χωρίς ίχνη μορίων DNA. Χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο DNase I - RNase-free (Thermo Scientific™). Η δεοξυριβονουκλεάση έχει τη δυνατότητα να πέπτει μονόκλωνα και δίκλωνα μόρια DNA δημιουργώντας μονονουκλεοτίδια/ ολιγονουκλεοτίδια με ελεύθερες με 5'-φωσφορικές και 3'-OH ομάδες.

Υλικά:

Διάλυμα RNA	
Ένζυμο DNase I	1 U ενζύμου καταλύει 1 μg πλασμιδιακού DNA σε 10 min στους 37 °C.
Ρυθμιστικό διάλυμα (Buffer) ενζύμου DNase I	10 mM Tris-HCl, 2.5 mM MgCl2, 0.5 mM $CaCl_2$, pH 7.6 σε θερμοκρασία 25°C
RNaseOUT™	Stock Conc. 100 mM, Stock 5000 Units
Αποστειρωμένο dd H_2O	

Βήματα της επεξεργασίας με DNase:

1. Για αντίδραση όγκου 30 μl μετρούμε μέχρι τα 7-8 ug RNA στο φασματοφωτόμετρο Quawell
2. Για 30 μl αντίδρασης χρησιμοποιήσαμε 3 μl 10x buffer, 1 μl DNAse I, 0,5 μl RNase out και συμπληρώσαμε με ddH2O ανάλογα με τον όγκο των δειγμάτων.
3. Αφού βάλαμε τα ένζυμα, κάναμε vortex (3 sec) και πολύ σύντομη φυγοκέντρηση (λόγω του ότι περιέχουν γλυκερόλη -να αναμιχθεί με το νερό). Μετά απευθείας dry bath στους 37 °C για 1 ώρα.
4. Μετά το waterbath τα τοποθετήσαμε στον πάγο και βάλαμε 135 μl Ammonium Acetate 7,5M και 235 μl ddH2O (WFI).
5. Προσθήκη 400 μl phenol/chloroform, σε κάθε δείγμα και κάνω vortex για 30 sec -1 min. Φυγοκεντρώ στα 14.000 rpm, 5 min 4 C. Ανάλογα με τη συγκέντρωση και την καθαρότητα του δείγματος μπορεί να μειωθεί ο όγκος της αντίδρασης.
6. Αφαίρεση 400 μl από το υπερκείμενο και τοποθέτηση σε άδειο tube.
7. Προσθήκη 1000 μl 100% ice cold EtOH, ανακίνηση και τοποθέτηση στους -80 C για >1 ώρα.
8. Φυγοκέντρηση των δειγμάτων για 30 min, 14.000rpm, 4°C. Αφαίρεση όλου του υπερκείμενου χωρίς να διαταραχθεί η πελέτα.
9. Προσθήκη 500 μl 70% ice cold EtOH. Φυγοκέντρηση στις 14.000 rpm, 10 λεπτά, 4 °C.
10. Αφαίρεση υπερκειμένου χωρίς να διαταραχθεί η πελέτα, ύστερα spin down και αφαίρεση (με πιπέτα) των υπολειμμάτων αιθανόλης. Στέγνωμα των δειγμάτων (με ανοιχτά καπάκια) για τουλάχιστον 10 λεπτά.
11. Επαναδιάλυση με ddH_2O σε όγκο 11 μl. Τοποθέτηση στους 55 °C για 5 λεπτά για να επαναδιαλυθεί η πελέτα με το καθαρό RNA. Έντονο vortex για 1 min και μετά spin down. Αποθήκευση στους -80C.

3.5 Σύνθεση cDNA με αντίστροφη μεταγραφή

Ανάλογα με το στόχο του πειράματος, το cDNA μπορεί να κατασκευαστεί με διάφορα είδη εκκινητών (primers) όπως: random hexamers, gene specific και oligo-dT. Στην προκειμένη χρησιμοποιήσαμε oligo-dT εκκινητές προκειμένου να μετατρέψουμε σε cDNA μόνο τα ώριμα mRNA μετάγραφα στα οποία περιέχονται τα γονίδια που μελετήσαμε. Οι oligo-dT primers προσδένονται στις poly-A ουρές των μεταγράφων mRNA.

Υλικά:

Ολικό RNA (DNA free) του βιολογικού δείγματος	1000 ng
Oligo dT primers	50 mM
dNTPs mix	10 mM
Ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση	M-MLV Reverse Transcriptase (200 U/μL)
Ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμου (5X)	5X First strand buffer
Rnase out	Stock Conc. 100 mM, Stock 5000 Units

Βήματα αντίστροφης μεταγραφής in vitro:

1. Από κάθε δείγμα υπολογίσαμε 1000 ng RNA (στο Quawell) και το διαλύσαμε σε 10 μl.
2. Σε κάθε αραιωμένο δείγμα προσθέσαμε 1 μl από 50 mM oligo-dT primers και 1μl από 10mM dNTPs. Επώαση στους 65°C για 5 λεπτά και αμέσως μετά στον πάγο για 10 λεπτά.
3. Τελικός όγκος διαλύματος 20 μl. Σε κάθε δείγμα προσθέσαμε 4 μl buffer 5x, 2 μl DTT (100 mM), 0,5μl Rnase out (40U/μl) και 1 μl MMLV-RT (200 U/μl).
4. Vortex, spin down και προσθήκη 8 μl από το mix σε κάθε δείγμα. Επώαση στους 37°C για 2 ώρες.
5. Μετά τις 2 ώρες, προσθήκη 380 μl ddH2O και αποθήκευση του cDNA στους -20 °C.

3.6 Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR σε πήκτωμα αγαρόζης

Ηλεκτροφόρηση για ποιοτικό και ημι-ποσοτικό έλεγχο των προϊόντων της PCR ή από qPCR σε πήκτωμα αγαρόζης 2% w/v, με 3,6 μl EtBr (10 mg/mL) ανά 100 mL πηκτής αγαρόζης. Σε κάθε ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιήσαμε 2 μl Ladder (100bp EnzyQuest) για τον προσδιορισμό του μεγέθους των προϊόντων. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιούνταν σε τάση 110-120V για 45 λεπτά περίπου και σε κάθε πηγάδι της πηκτής τοποθετούταν 18 μl διαλύματος (15 μl qPCR single reaction Volume + 3 μl 6X Dye Blue). Σε κάθε ηλεκτροφόρηση για ένα γονίδιο χρησιμοποιήσαμε αρνητικό δείγμα ελέγχου (NTC) από την αντίδραση qPCR για τον έλεγχο της εκλεκτικότητας της αντίδρασης και την ύπαρξη παραπροϊόντων ή επιμολύνσεων.

Υλικά:

1.	Ρυθμιστικό διάλυμα TBE 5X	(1L: 54g Tris-base, 20mL EDTA 0,5M (pH:8), 27,5g Boric acid)
2.	Αγαρόζη	
3.	Ladder	100bp EnzyQuest
4.	Διάλυμα φόρτωσης (Loading buffer) 10X	(0,25% μπλε της βρωμοφαινόλης, 0,25% κυανούν της ξυλόλης, 15% φικκόλη σε νερό)
5.	Βρωμιούχο αιθίδιο	

3.7 Απομόνωση μορίων DNA από πηκτή αγαρόζης (Gel extraction)

Απομόνωση στοχευμένων θραυσμάτων DNA. Ύστερα από ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης, τα επιθυμητά θραύσματα DNA μπορούν να αναγνωριστούν με βάση τα διακριτά χαρακτηριστικά τους, όπως το μέγεθος ή την ένταση της ζώνης, σε υπεριώδες φως. Η διαδικασία επιτρέπει επιλεκτικά την απομόνωση και την ανάκτηση αυτών των αλληλουχιών DNA από θραύσματα πηκτής αγαρόζης, ώστε οι αλληλουχίες να χρησιμοποιηθούν σε αναλύσεις όπως η μεταγραφή in vitro με T7 εκκινητές. Για την απομόνωση χρησιμοποιήσαμε το εμπορικό kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Takara Bio U.S.A, Inc).

Η διαδικασία της απομόνωσης DNA από τζελ αγαρόζης πραγματοποιήθηκε, ώστε να συλλέξουμε τις αλληλουχίες των γονιδίων στόχων BolEST6, BolEST7 και BolEST14 καθώς και του γονιδίου GFP που αποτέλεσε αρνητικό δείγμα ελέγχου της σίγησης και επομένως τη βάση για τη σίγαση του γονιδίου στόχου.

Βήματα για gel extraction:

1. Μέτρηση πηκτής (gel) σε mg στο tube. Για κάθε 100 mg gel (<2% w/v) και προσθήκη 200 μl Buffer NTI.
2. Επώαση στους 50 °C για 5-10 λεπτά και ανάδευση κάθε 2-3 λεπτά μέχρι να διαλυθεί τελείως το gel.
3. Δέσμευση DNA (Bind DNA) στη στήλη: Τοποθέτηση της στήλης σε tube συλλογής 2 mL (collection tubes) και φορτώνουμε μέχρι 700 μl διαλύματος στη στήλη. Φυγοκεντρούμε για 30 sec στα 11000

x g. Απόρριψη του υπερκειμένου και επανάληψη με το υπόλοιπο διάλυμα αν υπάρχει.
4. Πλύση (Wash silica membrane): Προσθήκη 700 μl buffer NT3 στη στήλη. Φυγοκέντρηση για 30 sec, 11000 x g. Απόρριψη υπερκειμένου. Επανάληψη από το βήμα της φυγοκέντρησης, αλλά για 5 min.
5. Στέγνωμα της στήλης από το washing buffer NT3: Επώαση για 2-5 min, 70 °C με ανοιχτά καπάκια και φυγοκέντρηση για 5 min, 11000 x g.
6. Έκλουση DNA (elusion): Τοποθέτηση της στήλης σε tube 1,5 mL. Έκλουση με 40 μl ddH_2O. Επωάζουμε για 5 min. σε RT. Φυγοκέντρηση για 1 min, 11000 x g.
7. Μέτρηση (στη συσκευή Quawell Q3000) συγκέντρωσης DNA (ng/μl) από 1 μl διαλυμένου DNA.

3.8 Σύνθεση δίκλωνου RNA (dsRNA)

Για τη σύνθεση δίκλωνου RNA από μήτρα DNA (DNA template) κάναμε in vitro μεταγραφή σύμφωνα με το πρωτόκολλο «T7 in vitro transcription» [Thermo Fisher Scientific. (n.d.). T7 RNA Polymerase: Protocol.] Η διαδικασία της μεταγραφής πραγματοποιήθηκε χάρη στο ένζυμο T7 RNA polymerase (Thermo Scientific™). Το ένζυμο είναι DNA dependent και πολυμερίζει με μεγάλη ειδικότητα RNA από δίκλωνο ή μονόκλωνο DNA με φορά 5' → 3'. Η RNA polymerase του βακτηριοφάγου T7 χρησιμοποιεί τον υποκινητή T7 για να συνδεθεί με τη μήτρα DNA (template) και αρχίζει τη σύνθεση RNA μετά το κωδικόνιο GGG του T7 υποκινητή. Το ένζυμο αποθηκεύεται σε θερμοκρασία από -25°C ως -15°C. Αντίστοιχα, στις ίδιες συνθήκες αποθηκεύεται και το ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης 5X transcription buffer. 1 U ενζύμου πολυμερίζει 1 nmol AMP σε πολυνουκλεοτιδική αλυσίδα σε 60 min στους 37 °C. Υπό αυτές τις συνθήκες διατήρησης το ένζυμο μετατρέπει περίπου 10 ng RNA ανά 1 ng DNA.

Πρωτόκολλο για όγκο αντίδρασης 50 μl:

5X transcription buffer	10 μl
ATP/GTP/CTP/UTP mix, 10 mM each	10 μl (2 mM Conc.)
Γραμμικό DNA template	1 ug
RNase out	1,25 μl (50 U)
T7 RNA polymerase	1,5 μl (30 U)
ddH_2O	Μέχρι τα 50 μl

Βήματα in vitro μεταγραφής:

1. Μέτρηση 1 μg DNA template στη συσκευή Quawell και προσθήκη κατάλληλης ποσότητας master mix και ddH_2O σύμφωνα με το πρωτόκολλο.
2. Επώαση στους 37 °C για 1 ώρα.
3. Αφαίρεση DNA με προσθήκη 2 μl (2 U) DNase I, ανάδευση και επώαση για 15 λεπτά στους 37 °C.
4. Απενεργοποίηση της DNase I με το πρωτόκολλο απομόνωσης RNA φαινόλης/χλωροφόρμιο.
    - Προσθήκη dd H_2O μέχρι τα 200 μl.
    - Προσθήκη 1X phenol/chloroform και φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 5 λεπτά στους 4 °C.
    - Αφαίρεση 52 μl από το υπερκείμενο και τοποθέτηση σε νέο tube.
    - Προσθήκη 2,5X 100% ice cold EtOH, ανακίνηση και προσθήκη 2 μl γλυκογόνο. Κατακρήμνιση στους -80 °C για >1 ώρα.
    - Φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 30 λεπτά στους 4 °C και ύστερα αφαίρεση υπερκειμένου.
    - Προσθηκη 250 μl 70% ice cold EtOH και φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 10 λεπτά στους 4 °C.
    - Αφαίρεση του υπερκειμένου. Στέγνωμα πελέτας, tubes με ανοιχτά καπάκια για 10 λεπτά σε

RT.

- Επαναδιάλυση σε 15-25 μl ddH_2O, ανάλογα με την επιθυμητή συγκέντρωση του RNA.

3.9 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

Η PCR, ή η Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης, είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική στη μοριακή βιολογία που επιτρέπει την ενίσχυση (πολλαπλασιασμό) ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA σε μία συσκευή -τον κυκλικό θερμοποιητή. Αναπτύχθηκε τη δεκαετία του 1980 από τον Kary Mullis και έχει φέρει επανάσταση σε διάφορους τομείς όπως η γενετική, η ιατροδικαστική και η ιατρική διάγνωση [34].

Η τεχνική PCR περιλαμβάνει τα ακόλουθα βασικά στοιχεία και βήματα:

- **Μήτρα DNA (template):** Το τμήμα DNA που περιέχει την αλληλουχία στόχο που πρέπει να ενισχυθεί -γονιδιωματικό DNA, cDNA ή DNA που απομονώνεται από κύτταρα ή ιστούς (≤100 ng cDNA ή ≤250 ng gDNA ανά 50 μl αντίδρασης) .
- **Εκκινητές**: Οι εκκινητές είναι σύντομες αλληλουχίες DNA (μήκους περίπου 18-30 νουκλεοτιδίων) που είναι συμπληρωματικές προς τις συγκεκριμένες περιοχές που πλαισιώνουν την αλληλουχία DNA στόχο. Λειτουργούν ως σημεία εκκίνησης για τη σύνθεση DNA. Στην PCR, χρησιμοποιούνται συνήθως δύο εκκινητές (εμπρόσθιος και οπίσθιος), ένας για κάθε κλώνο του DNA.
- **DNA Πολυμεράση:** Η DNA πολυμεράση είναι ένα ένζυμο που συνθέτει νέους κλώνους DNA προσθέτοντας νουκλεοτίδια στην αναπτυσσόμενη αλυσίδα. Μια θερμοσταθερή πολυμεράση DNA, όπως η πολυμεράση Taq που προέρχεται από βακτήρια Thermus aquaticus, χρησιμοποιείται συνήθως στην PCR.
- **Νουκλεοτίδια:** Τα νουκλεοτίδια είναι τα δομικά στοιχεία του DNA. Είναι οι μεμονωμένες μονάδες που συνθέτουν τους κλώνους του DNA. Κατά τη διάρκεια της PCR, χρειάζονται και τα τέσσερα νουκλεοτίδια (A, T, C και G) για τη σύνθεση του DNA.

Το πρωτόκολλο της αντίδρασης φαίνεται στο σχήμα Πίνακας 3-2.

Η τεχνική PCR αποτελείται από τρία κύρια βήματα, τα οποία επαναλαμβάνονται σε κύκλους (25-40 κύκλοι) για να επιτευχθεί εκθετική ενίσχυση του DNA (

Πίνακας 3-1).

1) **Αποδιάταξη**: Το πρώτο βήμα περιλαμβάνει θέρμανση του μίγματος αντίδρασης σε υψηλή θερμοκρασία, συνήθως γύρω στους 95°C. Αυτό προκαλεί το ξετύλιγμα της διπλής έλικας του DNA, διαχωρίζοντας τους δύο κλώνους και σπάζοντας τους δεσμούς υδρογόνου μεταξύ τους. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό δύο μονόκλωνων μορίων DNA.
2) **Υβριδοποίηση:** Το μίγμα της αντίδρασης στη συνέχεια ψύχεται σε χαμηλότερη θερμοκρασία, συνήθως γύρω στους 50-65°C. Κατά τη διάρκεια αυτού του σταδίου, οι εκκινητές συνδέονται (ανόπτονται) με τις συμπληρωματικές αλληλουχίες τους στο μονόκλωνο εκμαγείο DNA. Οι εκκινητές παρέχουν ένα σημείο εκκίνησης για τη σύνθεση DNA.
3) **Επέκταση (ενίσχυση):** Η θερμοκρασία αυξάνεται στο βέλτιστο εύρος για την DNA πολυμεράση (72°C). Η DNA πολυμεράση συνθέτει νέους κλώνους DNA προσθέτοντας νουκλεοτίδια στους εκκινητές σε κατεύθυνση 5' έως 3'. Αυτή η διαδικασία επεκτείνει τους κλώνους του DNA, χρησιμοποιώντας το αρχικό τμήμα DNA ως οδηγό. Κάθε κύκλος διπλασιάζει την ποσότητα του DNA, με αποτέλεσμα την εκθετική ενίσχυση της αλληλουχίας στόχου.

Πίνακας 3-1: Τα τρία βασικά βήματα της τεχνικής PCR με τον κύκλο θερμοκρασίας PCR, τον αριθμό των κύκλων και τη χρονική διάρκεια κάθε θερμοκρασίας του κύκλου.

Step	Temperature	Duration	Cycles
Αρχική αποδιάταξη	92-95 °C	3 min	1
Αποδιάταξη	92-95 °C	30 sec	~35
Υβριδισμός	Tm – 5 °C	20-30 sec	
Ενίσχυση	72 °C	1 kb/ min	
Τελική ενίσχυση	72 °C	1 kb/ min	1

Πίνακας 3-2: Πρωτόκολλο της αντίδρασης PCR με το ένζυμο KAPA DNA Taq polymerase.

Component	STOCK	Final Conc.	One Reaction Volume (20μl)
10X KAPA Taq Buffer + MgCl2	**10X**	**1X**	2
dNTP mix	**10mM**	**0,2mM each**	0,4
Primer F	**10μM**	**0,4μM**	0,8
Primer R	**10μM**	**0,4μM**	0,8
KAPA DNA Taq polymerase	**5 U/μL**	**0,5 U**	0,1
PCR-grade Water			14,9
TOTAL MIX			19
DNA template		**As required**	1

3.10 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time PCR)

Η PCR πραγματικού χρόνου ή quantitative PCR (qPCR) αποτελεί μια τεχνική της μοριακής βιολογίας η οποία επιτυγχάνει τον ακριβή προσδιορισμό της αρχικής ποσότητας DNA ή RNA που βρίσκεται σε ένα δείγμα, καθώς και στη σύγκριση των ποσοτικών τιμών της ίδιας αλληλουχίας μεταξύ διαφορετικών δειγμάτων. Η αρχές λειτουργίας της μεθόδου είναι ίδιες με αυτές της PCR -περιέχει δηλαδή τα ίδια 3 στάδια (αποδιάταξη, υβριδοποίηση και ενίσχυση) και χρησιμοποιούνται τα ίδια σχεδόν υλικά, αλλά επιπλέον μας δίνει τη δυνατότητα να παρακολουθούμε την πορεία ενίσχυσης των τμημάτων κατά τη διάρκεια της αντίδρασης, σε πραγματικό χρόνο (Εικόνα 3-1).

Αυτό οφείλεται σε φθορίζουσες ενώσεις που προστίθενται στο διάλυμα και των οποίων η ένταση φθορισμού είναι ανάλογη της αρχικής ποσότητας template στο δείγμα. Κάθε φθορίζουσα ένωση που χρησιμοποιείται για αντίδραση real time PCR έχει τις δικές της αρχές. Στα πειράματα μας χρησιμοποιήσαμε την φθορίζουσα χρωστική SYBR Green και το ένζυμο KAPA SYBR® FAST DNA Polymerase για το πρωτόκολλο της αντίδρασης (Πίνακας 3-3). Η SYBR Green ενσωματώνεται μόνο σε δίκλωνα μόρια που συντίθενται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης παράγοντας φθορισμό, η ένταση του οποίου είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του παραγόμενου προϊόντος και κατά επέκταση της αρχικής ποσότητας στο διάλυμα. Το κύριο μειονέκτημα της χρωστικής αυτής ως σύστημα ανίχνευσης είναι ότι ενσωματώνεται σε οποιοδήποτε δίκλωνο μόριο δημιουργείται, εκτός του μορίου-στόχου, συμπεριλαμβάνοντας και διμερή των εκκινητών ή ενισχυμένα μη ειδικά προϊόντα της αντίδρασης που οδηγούν σε αύξηση του συνολικού φθορισμού. Η ποσοτικοποίηση του αρχικού δείγματος υπολογίζεται μέσω της τιμής Cq (ή Ct), που αποτελεί τον αριθμό των κύκλων που απαιτούνται για να ξεπεράσει το προϊόν το όριο ανίχνευσης φθορισμού (threshold). Η τιμή αυτή είναι αντιστρόφως ανάλογη της αρχικής ποσότητας DNA.

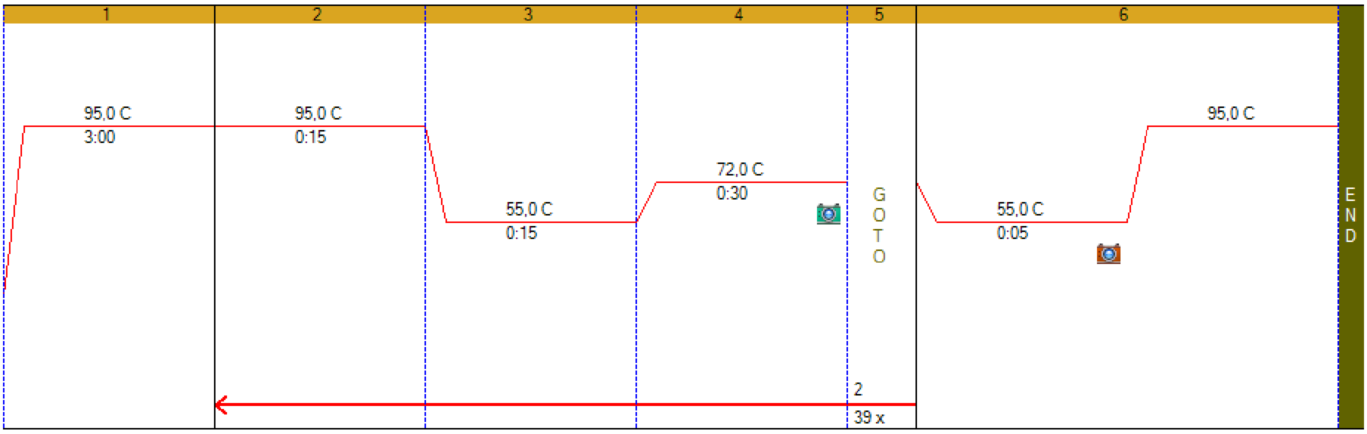
Για την αξιόπιστη σύγκριση των επιπέδων mRNA σε διαφορετικά δείγματα απαραίτητη είναι και η διαδικασία κανονικοποίησης (normalization) των τιμών έκφρασής τους. Της αντιστάθμισης δηλαδή πειραματικών σφαλμάτων, που μπορεί να οφείλονται είτε στο χειρισμό των δειγμάτων (όπως η εισαγωγή διαφορετικών τελικών ποσοτήτων cDNA από το κάθε δείγμα στην αντίδραση), είτε στις διαφορετικές αποδόσεις των αντιδράσεων αντίστροφης μεταγραφής αλλά και της ίδιας της PCR. Για την κανονικοποίηση των τιμών η πιο συνήθης μέθοδος είναι η παράλληλη ενίσχυση ενός η περισσότερων γονιδίων σταθερής έκφρασης (housekeeping genes, HKGs), που θα λειτουργήσουν ως εσωτερικός μάρτυρας και θα αποτελέσουν ουσιαστικά τα γονίδια αναφοράς, δηλαδή το μέτρο αναφοράς μεταξύ διαφορετικών δειγμάτων. Τελικά η ποσότητα της αλληλουχίας στόχου προσδιορίζεται ως προς την έκφραση του γονιδίου αναφοράς (σχετική έκφραση). Η σχετική ποσοτικοποίηση πραγματοποιείται με τη μέθοδο σύγκρισης των Ct (ΔΔCt) [35]. Στην παρούσα διαδικασία, οι τιμές Ct για την ανάλυση όλων των δεδομένων της Real-Time PCR δόθηκαν από το πρόγραμμα CFX Manager Software (Bio-Rad CFX96).

Η τυπική ή πρότυπη καμπύλη (standard curve) χρησιμοποιείται στην αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας του ζεύγους εκκινητών στην qPCR. Για τη δημουργία της καμπύλης χρησιμοποιούνται σειρά γνωστών συγκεντρώσεων gDNA ή cDNA. Οι αποκλίσεις από την αναμενόμενη κλίση (slope) μπορεί να υποδεικνύουν προβλήματα με την ειδικότητα ή την αποτελεσματικότητα της ενίσχυσης. Κατά σύμβαση αποδεκτές τιμές απόδοσης ενίσχυσης κυμαίνονται μεταξύ 90-110 %. Η πρότυπη καμπύλη είναι πολύτιμο εργαλείο για τη βελτιστοποίηση του σχεδιασμού των εκκινητών και την επιλογή των πιο αποτελεσματικών εκκινητών, διασφαλίζοντας ακριβή και αξιόπιστη ποσοτικοποίηση σε πειράματα με PCR πραγματικού χρόνου.

Το μέγεθος του προϊόντος της αντίδρασης της Real-Time PCR κυμαίνεται μεταξύ 80-150 bp, ώστε να επιτευχθεί ειδικότητα και υψηλή απόδοση της ενίσχυσης. Η ειδικότητα της ενίσχυσης μπορεί να διαπιστωθεί μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης μέσω της καμπύλης αποδιάταξης (melting curve analysis). Με την καμπύλη αποδιάταξης προσδιορίζεται η θερμοκρασία τήξης (Tm) των προϊόντων της αντίδρασης. Έτσι, πολλές φορές, από την παρουσία δύο ή περισσότερων διακριτών κορυφών στην καμπύλη αποδιάταξης διαπιστώνεται τελικά ο τυχόν σχηματισμός διμερών των εκκινητών ή μη ειδικών προϊόντων [36].

Υλικά:

- Template (cDNA ή gDNA)
- Εκκινητές (forward και reverse primers)
- KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (2X) Universal
- ddH_2O



Εικόνα 3-1: Τα βασικά βήματα της real time PCR. Παρουσιάζεται ο κύκλος θερμοκρασίας της PCR- στην προκειμένη είναι 95°C - 55°C - 72°C, ο αριθμός των κύκλων (x40) και τη χρονική διάρκεια κάθε θερμοκρασίας του κύκλου. Εικόνα από το πρόγραμμα Bio-Rad CFX Manager. Τα πρωτόκολλα της ενίσχυσης των γονιδίων παρουσιάζονται στο κεφάλαιο Παράρτημα.

Πίνακας 3-3: Πρωτόκολλο παρασκευής αντίδρασης PCR πραγματικού χρόνου, όγκου 20μl.

Component	Volume Per Reaction (μl)
Supermix (2 x)	**7,500**
10 μM Forward Primer (SYBR_target_1)	**0,300-0,450**
10 μM Reverse Primer (SYBR_target_1)	**0,300-0,450**
Template	**(4,00)**
Water	**2,600 – 2,900**
Total Volume (Excluding Template)	**11,000**

3.11 Παροδική αποσιώπηση γονιδιακής έκφρασης (RNA silencing)

Στην παρούσα εργασία η αποσιώπηση των γονιδίων πραγματοποιήθηκε μέσω μικροέγχυσης του dsRNA σε προνύμφες $3^{ου}$ σταδίου (L3 larvae), ενήλικα έντομα $2^{ης}$ ημέρας (Day 2) και $4^{ης}$ ημέρας (Day 4) με χρήση του μηχανήματος Nanoject II, (Πίνακας 3-4).

Υλικά:

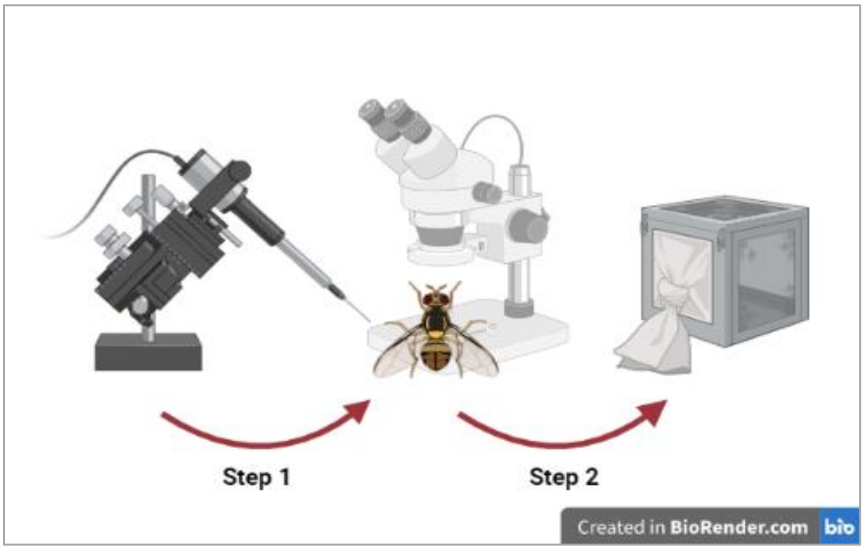
- Αιθανόλη 70% v/v
- Mineral oil
- Υδατικό διάλυμα dsRNA

Βήματα για μικροέγχυση:

1. Καθαρισμός όλων των εξαρτημάτων του Nanoject II με αιθανόλη 70%.
2. Επιλογή γυάλινης βελόνας, τύπου borocilicate, και άνοιγμά της, ώστε να εξέλθει διάλυμα ds RNA με τη μικροέγχυση.
3. Γέμισμα της βελόνας με mineral oil – αποφυγή φυσαλίδων στο γέμισμα.
4. Τοποθέτηση της βελόνας στο μηχάνημα.
5. Εισαγωγή ~1-2 μL από το διάλυμα dsRNA (Conc. 5 μg/μl) στη βελόνα.
6. Αναισθητοποίηση των εντόμων σε πάγο και τοποθέτηση τους σε στερεοσκόπιο.
7. Έγχυση 64,4 nL dsRNA στην αιμολέμφο τους με εισαγωγή της βελόνας στην ελαστική περιοχή του

θώρακα, κάτω από το φτερό τους.

8. Παρακολούθηση της ανάκαμψης των εντόμων μετά την μικροέγχυση και επιβεβαίωση πως τα έντομα επιβίωσαν της διαδικασίας και τέλος εισαγωγή τους σε ειδικά κλουβιά για την παρακολούθηση της εξέλιξης τους (Εικόνα 3-2).



Εικόνα 3-2: Μικροέγχυση ds RNA σε ενήλικα άτομα δάκου της ελιάς με Microinjector II. Βήμα 1(step 1): Μικρόέγχυση κατάλληλης ποσότητας ds RNA (64,4 nl) κάτω από στερεοσκόπιο. Βήμα 2 (step 2): τοποθέτηση των βιολογικών δειγμάτων με το ds RNA σε κλουβί εντόμων (διαστάσεις 33x33x33).

Πίνακας 3-4: Παρουσίαση βιολ.δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα knock-down. Στήλη αριστερά: αναπτυξιακό στάδιο των βιολογικών δειγμάτων. Μεσαία στήλη: ds RNA που χρησιμοποιήθηκε στην μικροέγχυση. Στήλη δεξιά: αριθμός βιολ. δειγμάτων που έγινε η μικροέγχυση / ds RNA.

Developmental Stage	***ds RNA***	***Injected biol. samples***
Προνύμφη $3^{ου}$ σταδίου (L3 larva)	BoIEST6	14
	GFP	6
	BoIEST14	9
	A GFP	5
Day 2 mature adult (after immergence)	BoIEST7	10 females, 5 males
	GFP	5 females, 3 males
Day 4 mature adult (after immergence)	BoIEST7	5 females, 5 males
	GFP	2 females, 3 males

3.12 Στατιστική ανάλυση

Το Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας παρέχει σε όλα τα μέλη του το πρόγραμμα στατιστικής επεξεργασίας IBM SPSS Statistics στην έκδοση 29. Έτσι, έγινε ολοκληρωμένη στατιστική ανάλυση και οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιώντας το εργαλείο software IBM SPSS Statistics (IBM Corp. Released in 2022. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 29.0. Armonk, NY: IBM Corp.) για τα δεδομένα των προφίλ έκφρασης των τριών εστερασών του δάκου: BoIEST6, BoIEST7 και BoIEST14 (ξεχωριστά για τους δύο πληθυσμούς: άγριος και εργαστηριακός) και επίσης για τα σύνολα δεδομένων της παροδικής σίγησης. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε το Student's t-test (unpaired) για την ανάλυση σημαντικών διαφορών σε απλές συγκρίσεις μεταξύ δύο μέσων τιμών. Η μονόδρομη (one way) ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) και το post-hoc τεστ με τη μέθοδο Least Significant Difference (LSD) χρησιμοποιήθηκαν για την εξέταση σημαντικών διαφορών όταν έγιναν πολλαπλές συγκρίσεις μεταξύ των διάφορων μέσων τιμών δειγμάτων. Η τυπική απόκλιση (SD) και οι μέσες τιμές χρησιμοποιούνται για την έκφραση όλων των δεδομένων από τα προφίλ έκφρασης και την παροδική αποσιώπηση των γονιδίων που εξετάστηκαν. Το επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε στο $p < 0,05$.

4 Αποτελέσματα

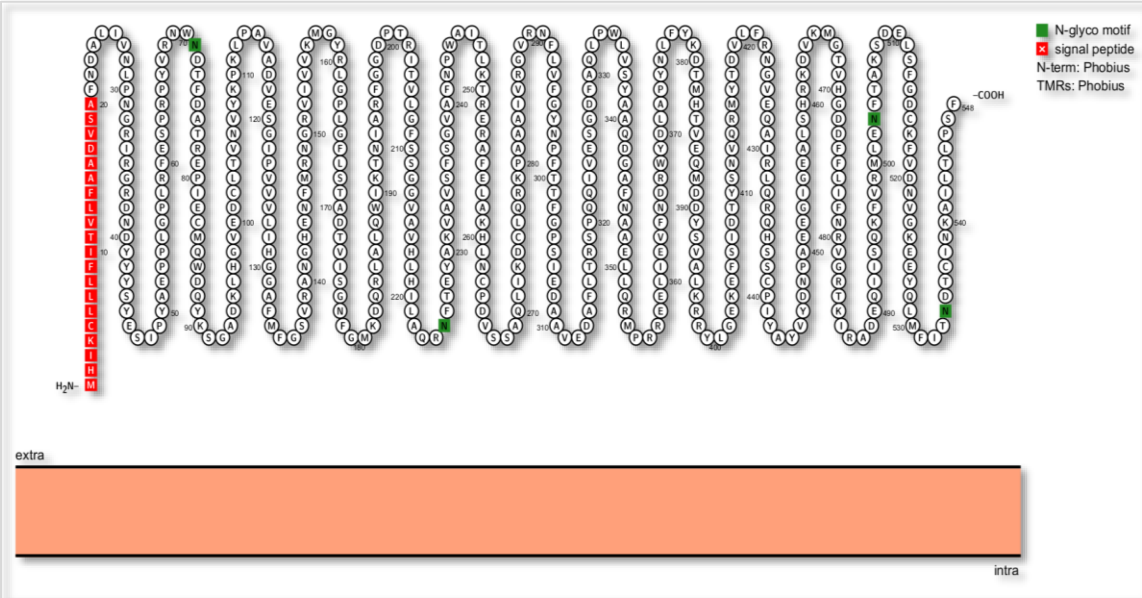
4.1 Αναζήτηση σηματοδοτικών πεπτιδίων στις πρωτεΐνες των τριών εστερασών

Σκοπός αυτής της ανάλυσης είναι η αναζήτηση σηματοδοτικών πεπτιδίων στις πρωτεΐνες-στόχους. Η παρουσία αυτών των σηματοδοτικών πεπτιδίων μπορεί να υποδηλώνει ότι οι πρωτεΐνες προορίζονται για το εξωκυτταρικό περιβάλλον. Αυτό έχει ενδιαφέρον καθώς τα ένζυμα αποικοδόμησης οσμών (ODEs), βρίσκονται συνήθως στις εξωκυτταρικές περιοχές και συγκεκριμένα βρίσκονται στη λέμφο των οσφρητικών τριχιδίων.

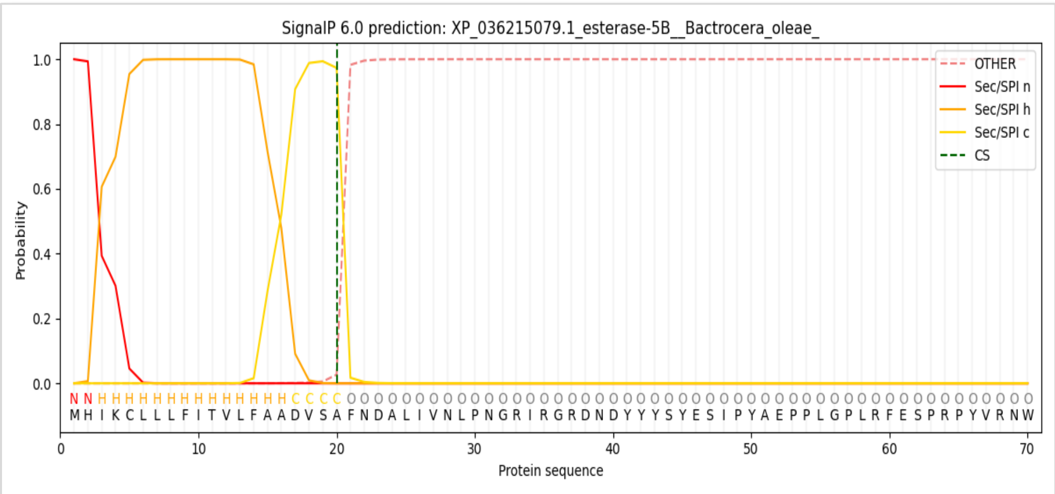
Χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Protter, εντοπίσαμε ότι η πρωτε*ΐνη που παράγεται από το* BolEST6 περιέχει μία ακολουθία σηματοδοτικού πεπτιδίου (signal peptide) στο N-τελικό άκρο της. Έτσι είναι πιθανόν η συγκεκριμένη πρωτεΐνη να εκκρίνεται ή να βρίσκεται στον εξωκυττάριο χώρο. Το αποτέλεσμα της ανάλυσης επαληθεύτηκε και από το πρόγραμμα Signal IP, όπου σύμφωνα με την πολυπεπτιδική αλληλουχία της πρωτεΐνης του γονιδίου BolEST6, στο N-τελικό άκρο της φάνηκε η ύπαρξη σηματοδοτικού πεπτιδίου, με πιθανότητα 1,0. Ενδεικτικά, η οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων ύστερα από τη βιοπληροφορική ανάλυση της πεπτιδικής ακολουθίας του γονιδίου BolEST6 στα δύο προγράμματα που χρησιμοποιήσαμε παρουσιάζεται στις ακόλουθες εικόνες (**Error! Reference source not found.** και **Error! Reference source not found.**).

Κατά την ανάλυση της πεπτιδικής αλληλουχίας του γονιδίου BolEST14, λάβαμε αντίστοιχα αποτελέσματα που υποδεικνύουν την παρουσία ενός σηματοδοτικού πεπτιδίου. Η ανάλυση αποκάλυψε υψηλή πιθανότητα 0,8 , υποδηλώνοντας ότι αυτή η πεπτιδική ακολουθία πιθανότατα λειτουργεί ως εκκριτικό σήμα ή σήμα μεταφοράς της πρωτεΐνης.

Η ανάλυση της πεπτιδικής αλληλουχίας του γονιδίου BolEST7 αποκάλυψε την παρουσία ενός σηματοδοτικού πεπτιδίου. Ωστόσο, η πιθανότητα ήταν μικρότερη, περίπου 0,3. Αυτό υποδηλώνει ένα πιθανό σηματοδοτικό πεπτίδιο για έκκριση ή διακίνηση πρωτεΐνης, αν και με μειωμένη εμπιστοσύνη σε σύγκριση με αλληλουχίες με υψηλότερες πιθανότητες πεπτιδίου σήματος.



Εικόνα 4-1: Από το πρόγραμμα Protter: Απεικόνιση της εστεράσης BoIEST6 μαζί με την αλληλουχία εκκριτικού πεπτιδίου (signal peptide) στην αμινοτελική ουρά της πρωτεΐνης.



Εικόνα 4-2: Οπτικοποίηση της ανάλυσης από το πρόγραμμα Signal IP. Εμφάνιση σηματοδοτικού πεπτιδίου (signal peptide) στο N-τελικό άκρο της πρωτεΐνης που κωδικοποιείται από το γονίδιο BoIEST6, με πιθανότητα (probability) 1,0.

4.2 Σύνθεση εκκινητών για ποσοτική PCR και RNAi σίγηση

4.2.1 Αλληλουχίες των εκκινητών (primers) των γονιδίων - στόχων

Στην παρούσα μελέτη σχεδιάσαμε τους εκκινητές για την αποσιώπηση της έκφρασης μέσω RNAi για τα γονίδια των εστερασών BoIEST6, BoIEST7 και BoIEST14 του δάκου. Επίσης, σχεδιάσαμε διαφορετικούς εκκινητές για την ποσοτικοποίηση της έκφρασης των γονιδίων-στόχων πριν και μετά την αποσιώπηση της έκφρασής τους μέσω real time PCR, όπως φαίνονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 4-1).

Πίνακας 4-1: Οι αλληλουχίες των εκκινητών που σχεδιάστηκαν για την ποσοτικοποίηση της έκφρασης και οι εκκινητές με την ακολουθία T7 (σημασμένη με κόκκινο χρώμα) που σχεδιάστηκαν για την in vitro μεταγραφή και δημιουργία ds RNA για την παροδική σίγηση της έκφρασης των εστερασών BoIEST6, BoIEST7 και BoIEST14. Στον πίνακα φαίνεται *επίσης το μήκος της αλληλουχίας του τμήματος που ενισχύεται (amplicon size) και η θερμοκρασία τήξης (Tm).*

Primer Name	Sequence	Length	Tm [°C]	Product (bp)
BolEST6-qPCR-F	**CATTGAAGATGCCGCTGTTG**	**20**	**54,8**	**101**
BolEST6-qPCR-R	**CATACGACACTAGCCAAGGTAAT**	**23**	**54,3**	
BolEST6-T7-F	**TAATACGACTCACTATAGGGAGA TCG GTT CAG TGC GTG CTA AT**	**20**	**56,9**	**199**
BolEST6-T7-R	**TAATACGACTCACTATAGGGAGA GGA TCA CCA GCA AAA CGT GC**	**20**	**57**	
BolEST7-qPCR-F	**TTGGGGGCAGACTTCTATGC**	**20**	**57,3**	**126**
BolEST7-qPCR-R	**ATCCTCAGTCGCATCCAAAAC**	**21**	**55,3**	
BolEST7-T7-F	**TAATACGACTCACTATAGGGAGA GAC ATT GGG ATT CTT GGC TTT G**	**22**	**54,6**	**287**
BolEST7-T7-R	**TAATACGACTCACTATAGGGAGA CTG CTT GTC TAT CGC TCA ATC T**	**22**	**54,7**	
BolEST14-qPCR-F	**ATCTTCGATGCGACCTTC**	**18**	**52,1**	**119**
BolEST14-qPCR-R	**TCC TTC TCT GTG GGC AAA TC**	**20**	**54,8**	
BolEST14-T7-F	**TAATACGACTCACTATAGGGAGA CTC TTC TCC GAT GCT CTA ACG**	**21**	**54,7**	**343**
BolEST14-T7-R	**TAATACGACTCACTATAGGGAGA GCT GAC GCT TGA AAC TGA AAG**	**21**	**54,7**	

4.2.2 Αποδόσεις ενίσχυσης προϊόντος των εκκινητών της qPCR

Για τον υπολογισμό της αποτελεσματικότητας ενός ζεύγους εκκινητών σε PCR πραγματικού χρόνου (qPCR) χρησιμοποιήθηκε μια πρότυπη ή αλλιώς τυπική καμπύλη. Αρχικά, παρασκευάσαμε μια σειρά από αραιώσεις (1:10, 1:50, 1:250) από gDNA (*B. oleae* Male), με αρχική ποσότητα 30ng/uL. Κάθε αραίωση στη συνέχεια υποβλήθηκε σε qPCR χρησιμοποιώντας τους εκκινητές που μας ενδιαφέρουν. Οι τιμές του κατωφλίου κύκλου (Ct) καταγράφονταν για κάθε αραίωση από το πρόγραμμα Bio-Rad CFX Manager. Στη συνέχεια, δημιουργήθηκαν τυπικές καμπύλες χρησιμοποιώντας την λογαριθμική τιμή (log) του συντελεστή αραίωσης του προτύπου gDNA έναντι των αντίστοιχων τιμών Ct. Εκτέλεση της ανάλυσης γραμμικής παλινδρόμησης στα δεδομένα τυπικής καμπύλης και προσδιορισμός της κλίση της γραμμής (slope).

Η απόδοση των εκκινητών (primer efficiency) υπολογίστηκε από τον τύπο: Απόδοση (E) = (10^(-1/slope) - 1) * 100%. Μια απόδοση εκκινητή 100% υποδεικνύει ότι η ενίσχυση της αλληλουχίας-στόχου διπλασιάζεται σε κάθε κύκλο.

Στα πειράματά μας, προσδιορίσαμε ότι οι αποδόσεις των εκκινητών για την ποσοτικοποίηση της έκφρασης των 3 εστερασών και των γονιδίων αναφοράς είναι εντός του αποδεκτού εύρους 90-110%. Αυτό δείχνει ότι οι εκκινητές αποδίδουν αποτελεσματικά, με αποτέλεσμα τον αξιόπιστο και ακριβή ποσοτικό προσδιορισμό της αλληλουχίας-στόχου και συνεπώς και του γονιδίου. Οι αποδόσεις εκκινητών εντός αυτού του εύρους διασφαλίζουν ότι η ενίσχυση PCR είναι συνεπής και αξιόπιστη, επιτρέποντας ισχυρή και ουσιαστική ανάλυση δεδομένων σε πειράματα PCR σε πραγματικό χρόνο. Οι αποδόσεις των εκκινητών παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα (Πίνακας 4-2).

Πίνακας 4-2: Η αποδόσεις (E) των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της σχετικής έκφρασης των 3 εστερασών BolEST6, BolEST7 και

BolEST14 στον δάκο της ελιάς, μέσω qPCR.

Primer pair name	Efficiency (%)
BolEST6-qPCR	109,6
BolEST7-qPCR	105,2
BolEST14-qPCR	104,6
RPL19_3	96,3
14-3-3 zeta	100,3
GAPDH	93,9

4.3 Περιγραφή της έκφρασης των γονιδίων BolEST6, BolEST7 και BolEST14

Η ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης πραγματοποιήθηκε μέσω Real Time PCR για τα τρία γονίδια σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια του εντόμου, συνθέτοντας το προφίλ γονιδιακής έκφρασης του κάθε γονιδίου. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε η σύγκριση αυτών των προφίλ έκφρασης μεταξύ δύο πληθυσμών εντόμων: άγριου και εργαστηριακού πληθυσμού. Η μελέτη της λειτουργικότητας των γονιδίων αυτών μας ενδιαφέρει στον άγριο δάκο, ωστόσο η μελέτη του άγριου δάκου στο εργαστήριο ενέχει πολλές δυσκολίες. Για τον λόγο αυτό, προτιμάται η χρήση του εργαστηριακού στελέχους δάκου «Δημόκριτος» το οποίο είναι προσαρμοσμένο στη διαβίωση στο εργαστήριο. Όμως, η προσαρμογή αυτού του στελέχους στο εργαστήριο έχει επηρεάσει τη γενετική του σύσταση και τις συχνότητες αλληλομόρφων ξενοβιωτικών γονιδίων [37], διαδικασίες με τις οποίες σχετίζονται και τα ένζυμα ODEs. Ο στόχος μας ήταν να προσδιορίσουμε εάν υπήρχε σημαντική επικάλυψη ή ομοιότητα στα μοτίβα έκφρασης αυτών των γονιδίων στους δύο πληθυσμούς εντόμων. Εάν παρατηρούσαμε υψηλό βαθμό ομοιότητας, αυτό θα δικαιολογούσε τη μετέπειτα έρευνα αποκλειστικά στο εργαστηριακό στέλεχος, απλοποιώντας και εξορθολογίζοντας έτσι τις μετέπειτα πειραματικές μας διαδικασίες.

Για να αποκτήσουμε μία πιο ισχυρή κατανόηση των προφίλ γονιδιακής έκφρασης των τριών εστερασών στο δάκο της ελιάς- χρησιμοποιήσαμε τρία ή περισσότερα δείγματα ανά στάδιο ανάπτυξης του εντόμου, όπου αυτό ήταν δυνατόν.

Συγκεκριμένα, το σύνολο δεδομένων για τη δημιουργία των προφίλ έκφρασης των 3 γονιδίων των εστερασών στον εργαστηριακό πληθυσμό αποτελείται από τα ακόλουθα δείγματα:
3 βιολογικά δείγματα αβγών (ή αλλιώς έμβρυα) - 24 ώρες μετά την ωοαπόθεση (40-50 αβγά στο κάθε βιολ. δείγμα), 4 βιολογικά δείγματα προνύμφης $1^{ου}$ σταδίου (8 L1 instar larvae σε κάθε δείγμα), 4 βιολ. δείγματα προνύμφης $2^{ου}$ σταδίου (3 L2 instar larvae/ δείγμα), 4 προνύμφες $3^{ου}$ σταδίου (L3 instar larvae), 4 νύμφες $1^{ης}$ ημέρας (D1 pupae), 4 νύμφες $3^{ης}$ ημέρας (D3 pupae),4 νύμφες $6^{ης}$ ημέρας (D6 pupae), 5 θηλυκά $1^{ης}$ ημέρας (D1 females), 5 αρσενικά $1^{ης}$ ημέρας (D1 males), 5 ώριμα θηλυκά (mature females, D7) και 5 ώριμα αρσενικά (mature males, D7).

Αντίστοιχα, το σύνολο δεδομένων για τον άγριο πληθυσμό, περιλαμβάνει:
1 δείγμα αβγών (40-50 αβγά), 4 βιολ. δείγματα προνύμφης $2^{ου}$ σταδίου (3 L2 instar larvae/ δείγμα), 4 προνύμφες $3^{ου}$ σταδίου (L3 instar larvae), 4 νύμφες $1^{ης}$ ημέρας (D1 pupae), 4 νύμφες $3^{ης}$ ημέρας (D3 pupae), 4 νύμφες $6^{ης}$ ημέρας (D6 pupae), 5 θηλυκά $1^{ης}$ ημέρας (D1 females), 5 αρσενικά $1^{ης}$ ημέρας (D1 males), 5 ώριμα θηλυκά (mature females, D30) και 5 ώριμα αρσενικά (mature males, D30).

Αρχικά από τα βιολογικά δείγματα κάθε πληθυσμού απομονώθηκε RNA και στη συνέχεια κάναμε επεξεργασία με DNAse για την αποικοδόμηση τυχόν τμημάτων DNA που ανακτήθηκαν ταυτόχρονα κατά τη διάρκεια απομόνωσης RNA. Τέλος, μετρήσαμε 1000 ng από κάθε δείγμα και με αντίστροφη μεταγραφή in vitro (in vitro reverse transcription) συνθέσαμε δίκλωνο cDNA, το οποίο χρησιμοποιήσαμε για τη σχετική ποσοτικοποίηση της έκφρασης των γονιδίων στην real time PCR.

Για την ποσοτικοποίηση της έκφρασης των γονιδίων-στόχων χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές qPCR. Αντίστοιχα, η ποσοτικοποίηση των γονιδίων αναφοράς έγινε με τους εκκινητές των οποίων η αλληλουχία φαίνεται στον πίνακα (Πίνακας 4-3). Τα γονίδια αναφοράς που επιλέξαμε αρχικά για τη σχετική ποσοτικοποίηση ήταν το GAPDH, RPL19 και το 14-3-3 zeta. Η χρήση περισσότερων από ένα γονίδια αναφοράς για την κανονικοποίηση της έκφρασης ενός γονιδίου-στόχου έχει φανεί ότι μπορεί να αποδώσει καλύτερα τις πραγματικές διαφορές στην έκφραση του γονιδίου-στόχου ανάμεσα σε διαφορετικά βιολογικά δείγματα [38]. Ένα γονίδιο αναφοράς στην qPCR πρέπει να παρουσιάζει σχετικά χαμηλή τιμή Ct, αντικατοπτρίζοντας τη σταθερή και άφθονη έκφραση σε όλα τα δείγματα που αναλύονται. Τα γονίδια αναφοράς επιλέχθηκαν βάση της σταθερότητας στην έκφραση τους στον δάκο της ελιάς, σύμφωνα με σχετική μελέτη που πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογία και Γονιδιωματικής του Παν. Θεσσαλίας για τον προσδιορισμό κατάλληλων γονιδίων αναφοράς σε είδη εντόμων της οικογένειας Tephritidae [39].

Πίνακας 4-3: Οι αλληλουχίες των εκκινητών (primers) που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των γονιδίων αναφοράς στην real time PCR.

Γονίδιο αναφοράς	*Όνομα εκκινητή*	*Αλληλουχία εκκινητή (5'→3')*
RPL19	RPL19 forward	ACGTCTTAATACTCGTTGAC
	RPL19 reverse	GCAAGAACACAGAAGCTC
GAPDH	GAPDH forward	GGTGTCTTTACAACAATCG
	GAPDH reverse	TAGATACGACCTTCATGTCAG
14-3-3 zeta	14-3-3 forward	GTCTTCTCGACAAACACC
	14-3-3 reverse	CCACCTCAGCTAAATACC

Η διαδικασία της σχετικής ποσοτικοποίησης έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο σύγκρισης των Ct (ΔΔCt) [35]. Η τιμή της έκφρασης των γονιδίων στόχων ($Cq_{\text{gene of interest}}$) ενός δείγματος συγκρίνεται με τη γεωμετρική μέση τιμή των γονιδίων αναφοράς του ίδιου δείγματος ($Cq_{\text{reference gene}}$), όπως φαίνεται στον μαθηματικό τύπο (4-1).

$$\text{Για κάθε δείγμα, } 2^{-\frac{Cq\ (gene\ of\ interest)}{GeoMean\ Cq\ (reference\ genes)}} \tag{4-1}$$

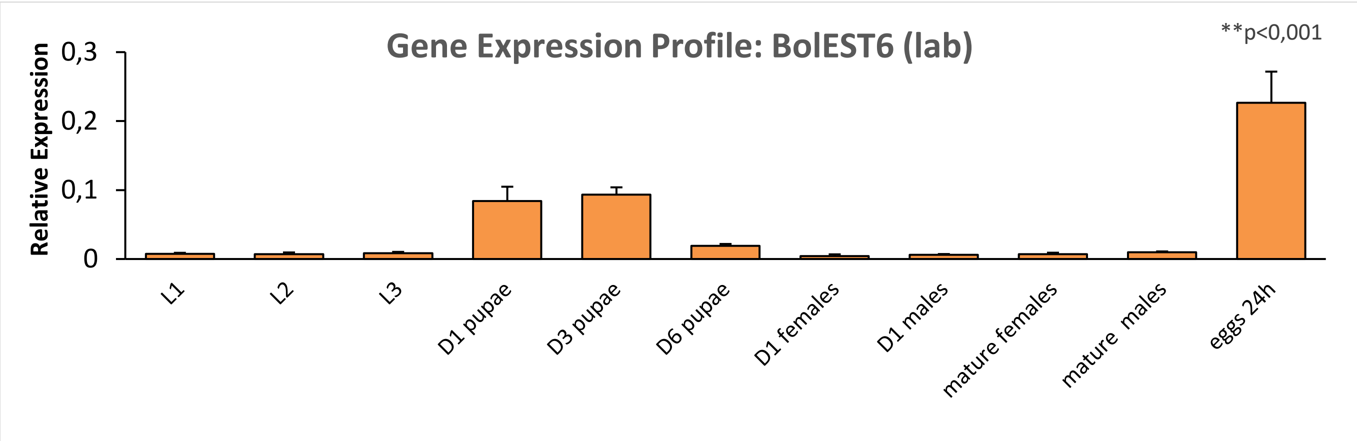
Τελικά, για τον υπολογισμό της σχετικής έκφρασης και τη δημιουργία των προφίλ έκφρασης των τριών εστερασών, αφαιρέθηκαν οι τιμές του γονιδίου αναφοράς 14-3-3 zeta καθώς κρίθηκε ότι η μέση τιμή Cq ανάμεσα σε όλα τα δείγματα ήταν αρκετά πιο υψηλή από τα άλλα δύο γονίδια αναφοράς ,πράγμα που μπορούσε να αλλοιώσει τις τιμές της σχετικής έκφρασης και κατά συνέπεια τα προφίλ έκφρασης. Συγκεκριμένα, στον εργαστηριακό πληθυσμό η μέση τιμή Cq των γονιδίων RPL19, GAPDH και 14-3-3 zeta ήταν: 20.63, 20.63 και 24.35 αντίστοιχα. Κατά αντιστοιχία, οι μέσες τιμές Cq που παρατηρήθηκαν στον άγριο πληθυσμό ήταν: 20.37, 19.88 και 23.24. Τα τελικά σύνολα δεδομένων που χρησιμοποιήθηκαν στη δημιουργία των προφίλ έκφρασης παρουσιάζονται στο Παράρτημα (Κεφάλαιο 6).

Στην επόμενη ενότητα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τη δημιουργία των προφίλ έκφρασης των γονιδίων BolEST6, BolEST7 και BolEST14. Ενώ, η σημασία των αποτελεσμάτων και οι πιθανοί λόγοι για τη διαμόρφωσή τους μελετώνται στο κεφάλαιο της συζήτησης.

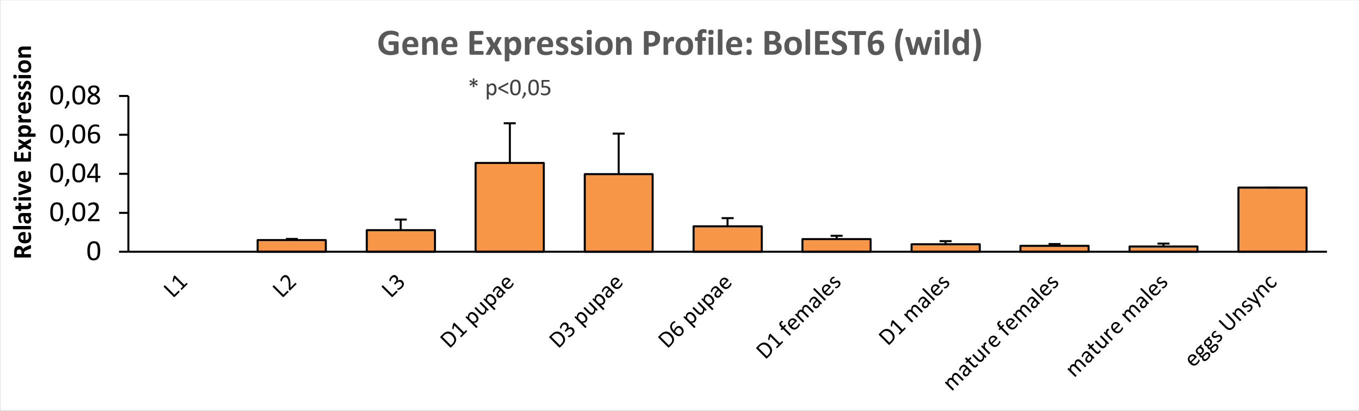
4.3.1 Επίπεδα έκφρασης του BolEST6

Στο προφίλ έκφρασης του γονιδίου BolEST6 στον εργαστηριακό πληθυσμό (Γράφημα 4-1), η post hoc ανάλυση αποκάλυψε στατιστικά σημαντικές διακυμάνσεις στις μέσες τιμές της έκφρασης του γονιδίου μεταξύ των διαφορετικών αναπτυξιακών σταδίων. Συγκεκριμένα, αυξημένη έκφραση παρατηρείται στα στάδια νύμφη 1ης ημέρας (Day 1 pupae) και νύμφη 3ης ημέρας (Day 3 pupae), με p value < 0,05 και στους δύο πληθυσμούς. Ενώ, η υψηλότερη έκφραση του γονιδίου BolEST6 στον εργαστηριακό πληθυσμό ανιχνεύεται κατά το στάδιο του εμβρύου (eggs 24h), με p value< 0,001.

Το πρότυπο έκφρασης του γονιδίου BolEST6 στον άγριο πληθυσμό (Γράφημα 4-2) παρουσιάζει ομοιότητα με αυτό του εργαστηριακού πληθυσμού. Και οι δύο πληθυσμοί εμφανίζουν συγκρίσιμα μοτίβα έκφρασης, με υψηλότερα επίπεδα έκφρασης να παρατηρούνται στο στάδιο της νύμφης 1ης ημέρας (Day 1 pupae), τέλος της νύμφης 3ης ημέρας (Day 3 pupae) και του εμβρύου. Συγκεκριμένα, η έκφραση του γονιδίου BolEST6 και στους δύο πληθυσμούς εμφάνισε υψηλή έκφραση στο πρώτο στάδιο της ανάπτυξης (eggs), ενώ ύστερα στο στάδιο της προνύμφης (L1, L3 και L3 instar) η έκφραση μειώθηκε ραγδαία. Ύστερα, μία απότομη αύξηση της έκφρασης στο στάδιο D1 pupae και D3 pupae, ενώ μετά παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της έκφρασης στα επόμενα στάδια της ανάπτυξης.



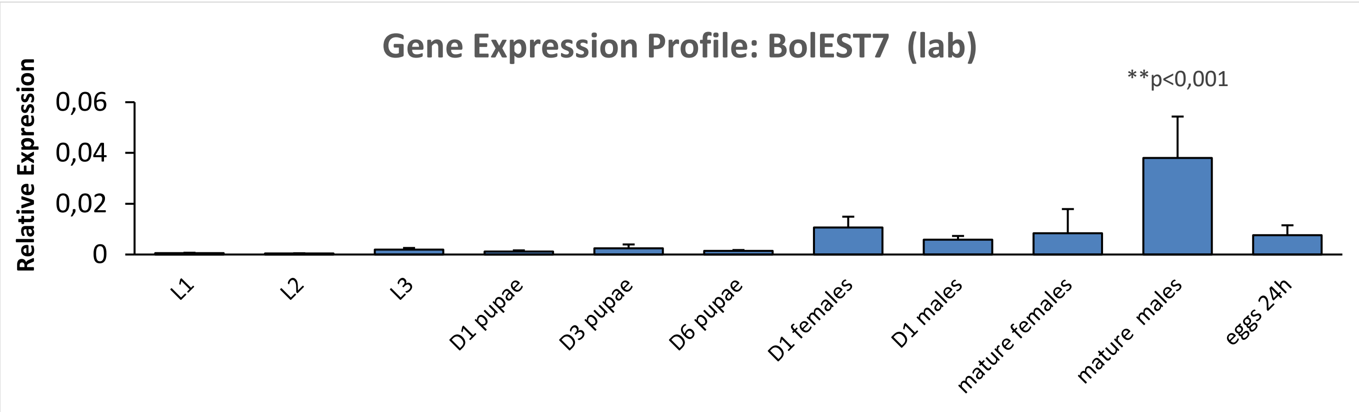
Γράφημα 4-1: Το ραβδόγραμμα αναπαριστά το προφίλ έκφρασης του γονιδίου BolEST6, στον εργαστηριακό πληθυσμό. Φαίνονται τα διαφορετικά επίπεδα έκφρασης μεταξύ διαφορετικών αναπτυξιακών σταδίων του δάκου της ελιάς. Το ύψος στήλης υποδεικνύει τη μέση τιμή (average) της σχετικής έκφρασης του γονιδίου, ενώ παράλληλα φαίνεται και η τυπική απόκλιση (mean +SD). Στο αναπτυξιακό στάδιο του αβγού (eggs 24h) παρουσιάζεται η μεγαλύτερη σχετική έκφραση και στατιστική σημαντικότητα p<0,001. Στα στάδια D1 pupa και D3 pupa μικρότερη έκφραση, με τιμή p<0,05.



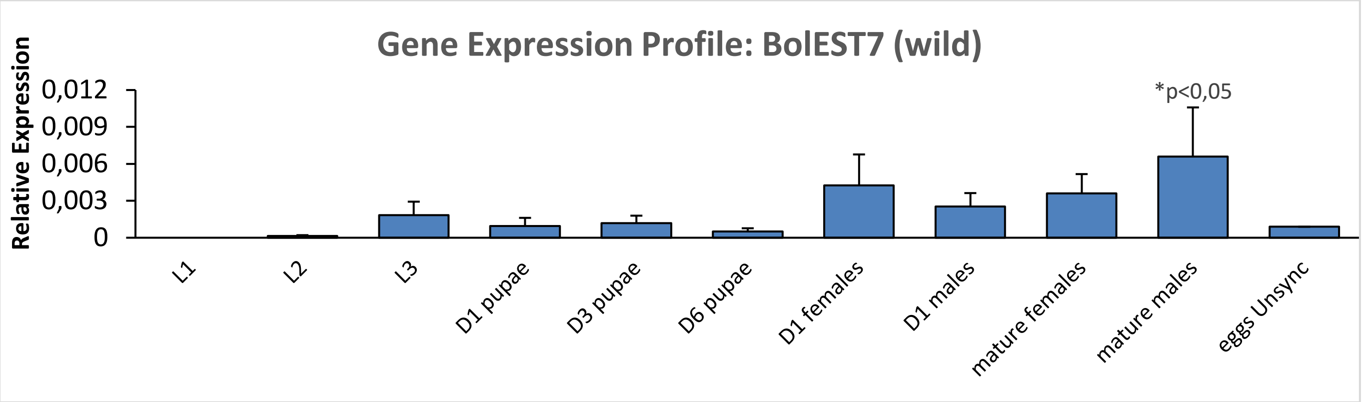
Γράφημα 4-2: Αναπαράσταση του προφίλ έκφρασης του γονιδίου BolEST6, στον άγριο πληθυσμό. Στον άξονα x: αναπτυξιακά στάδια (δείγματα), στον άξονα y: τα επίπεδα έκφρασης. Το ύψος στήλης υποδεικνύει τη μέση τιμή (average) της σχετικής έκφρασης του γονιδίου, ενώ παράλληλα φαίνεται και η τυπική απόκλιση (mean +SD). Η μεγαλύτερη σχετική έκφραση παρουσιάζεται στο αναπτυξιακό της νύμφης 1ης ημέρας (D1 pupae) με στατιστική σημαντικότητα p<0,05.

4.3.2 Επίπεδα έκφρασης του BolEST7

Στο προφίλ έκφρασης του γονιδίου BolEST7 στον εργαστηριακό πληθυσμό (Γράφημα 4-3), τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης παρατηρήθηκαν στα ενήλικα άτομα, με μεγαλύτερη έκφραση να εμφανίζεται στα ώριμα αρσενικά (D7 males, p<0,001). Παρόμοια τάση έκφρασης του γονιδίου εμφάνισε και ο άγριος πληθυσμός του δάκου της ελιάς (Γράφημα 4-4). Τα επίπεδα έκφρασης στα υπόλοιπα αναπτυξιακά στάδια μπορεί να ποικίλλουν, αλλά παραμένουν σε χαμηλά επίπεδα. Η υψηλή έκφραση στα ενήλικα αρσενικά μπορεί να υποδηλώνει ότι το BolEST7 μπορεί να συνδέεται με το οσφρητικό σύστημα των ώριμων αρσενικών ή μπορεί ακομά να συμβάλλει σε άλλες λειτουργίες που σχετίζονται με το φύλο, όπως αναπαραγωγικές διεργασίες. Αυτά τα ευρήματα υπογραμμίζουν τη σημασία του BolEST7 στη βιολογία και την ανάπτυξη ενήλικων αρσενικών εντόμων *B. oleae*.



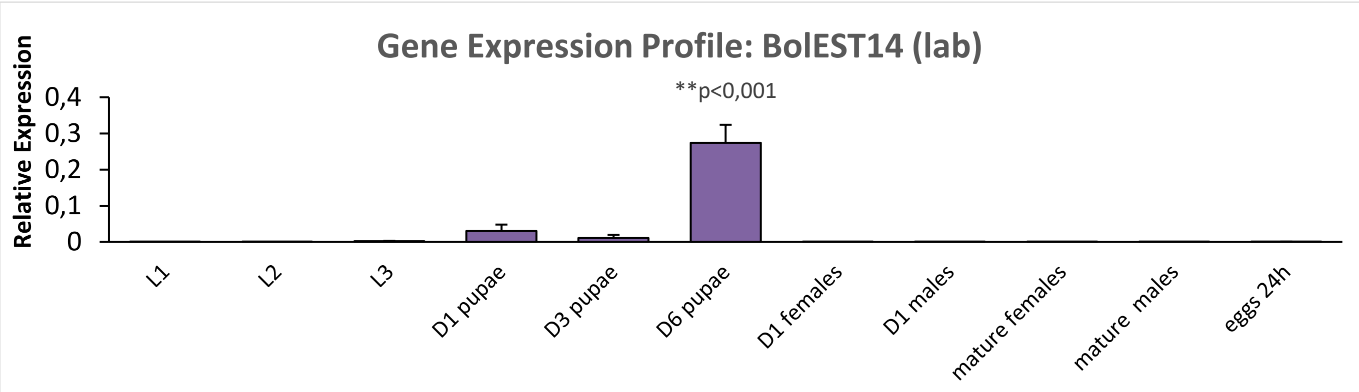
Γράφημα 4-3: Αναπαράσταση δεδομένων σχετικής γονιδιακής έκφρασης του γονιδίου BolEST7 στον εργαστηριακό πληθυσμό. Στον άξονα x: αναπτυξιακά στάδια (δείγματα), στον άξονα y: τα επίπεδα έκφρασης. Το ύψος στήλης υποδεικνύει τη μέση τιμή (average) της σχετικής έκφρασης του γονιδίου, ενώ παράλληλα φαίνεται και η τυπική απόκλιση (mean +SD). Η μεγαλύτερη σχετική έκφραση παρουσιάζεται στο αναπτυξιακό στάδιο ώριμων αρσενικών (D7 males), με στατιστική σημαντικότητα p<0,001.



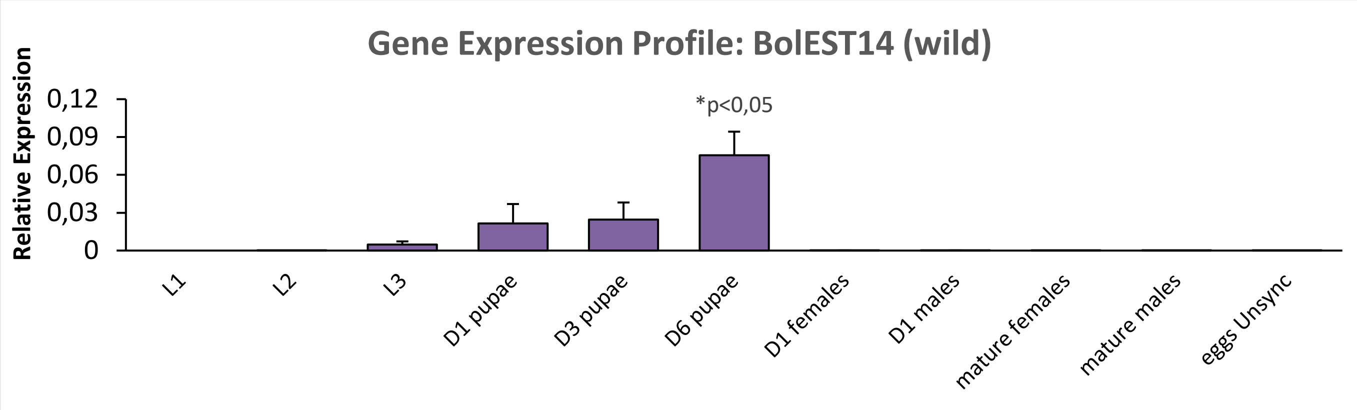
Γράφημα 4-4: Αναπαράσταση δεδομένων σχετικής γονιδιακής έκφρασης του γονιδίου BolEST7 στον άγριο πληθυσμό. Στον άξονα x: αναπτυξιακά στάδια (δείγματα), στον άξονα y: τα επίπεδα έκφρασης. Το ύψος στήλης υποδεικνύει τη μέση τιμή (average) της σχετικής έκφρασης του γονιδίου, ενώ παράλληλα φαίνεται και η τυπική απόκλιση (mean ±SD). Η μεγαλύτερη σχετική έκφραση παρουσιάζεται στο αναπτυξιακό των ώριμων αρσενικών (mature males, D30) με στατιστική σημαντικότητα $p<0,05$.

4.3.3 Επίπεδα έκφρασης του BolEST14

Τόσο στον εργαστηριακό όσο και στον άγριο πληθυσμό, η ανάλυση του προφίλ έκφρασης του γονιδίου BolEST14 έδειξε ένα σταθερό πρότυπο (Γράφημα 4-5, Γράφημα 4-6 αντίστοιχα). Η έκφραση του BolEST14 στα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια του εμβρύου και της προνύμφης είναι πολύ χαμηλή, ενώ στον άγριο πληθυσμό φαίνεται να υπάρχει μία μικρή έκφραση στα στάδια της νύμφης 1ης και 3ης ημέρας και τελικά να κορυφώνεται η έκφραση στο στάδιο της νύμφης 6ης ημέρας. Στα ενήλικα άτομα δεν παρατηρήθηκε έκφραση του γονιδίου. Τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης λοιπόν, παρατηρήθηκαν στο στάδιο της νύμφης 6ης ημέρας (Day 6 pupae), εμφανίζοντας σημαντική κορυφή σε σχέση με όλα τα άλλα στάδια ($p < 0,001$ στον εργαστηριακό πληθυσμό και $p < 0,05$ στον άγριο). Αυτό το μοτίβο υποδηλώνει ενδεχομένως έναν κεντρικό ρόλο για το γονίδιο BolEST14 κατά τη διάρκεια του σταδίου της βομβυκίωσης, υποδεικνύοντας την πιθανή εμπλοκή του σε κρίσιμες αναπτυξιακές διαδικασίες ή ρυθμιστικούς μηχανισμούς ειδικούς για αυτό το στάδιο ζωής του εντόμου.



Γράφημα 4-5: Προφίλ έκφρασης του γονιδίου BolEST14 στον εργαστηριακό πληθυσμό. Η μεγαλύτερη σχετική έκφραση παρουσιάζεται στο αναπτυξιακό της νύμφης 6ης ημέρας (D6 pupae) με στατιστική σημαντικότητα $p<0,001$. Άξονας x: αναπτυξιακά στάδια (δείγματα), στον άξονα y: τα επίπεδα έκφρασης. Το ύψος στήλης υποδεικνύει τη μέση τιμή (average) της σχετικής έκφρασης του γονιδίου, ενώ παράλληλα φαίνεται και η τυπική απόκλιση (mean ±SD).

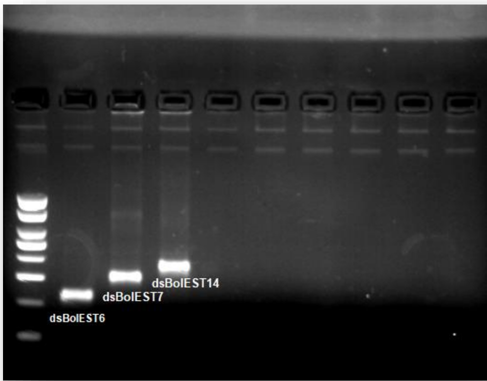


Γράφημα 4-6: Προφίλ έκφρασης BolEST14 στον άγριο πληθυσμό. Η μεγαλύτερη σχετική έκφραση παρουσιάζεται στο αναπτυξιακό της νύμφης 6ης ημέρας (D6 pupae) με στατιστική σημαντικότητα p<0,05. Στον άξονα x: αναπτυξιακά στάδια (δείγματα), στον άξονα y: τα επίπεδα έκφρασης. Το ύψος στήλης υποδεικνύει τη μέση τιμή (average) της σχετικής έκφρασης του γονιδίου, ενώ παράλληλα φαίνεται και η τυπική απόκλιση (mean ±SD).

4.4 Παροδική σίγηση των γονιδίων

Μετά την κατασκευή των προφίλ έκφρασης για τα τρία συγκεκριμένα γονίδια, το επόμενο βήμα στην ανάλυσή μας περιλάμβανε τη διεξαγωγή πειραμάτων knockdown. Η παρεμβολή RNA (RNA interference) είναι μια ισχυρή μέθοδος για στοχευμένη σίγηση γονιδίων με σκοπό τη λειτουργική ανάλυση τους. Ο στόχος αυτών των πρωταρχικών πειραμάτων knockdown ήταν να αξιολογήσουν τη παροδική σίγηση των γονιδίων, μετρώντας τα επίπεδα έκφρασης των δειγμάτων στα κατάλληλα στάδια ανάπτυξης, αφού εγχύθηκαν με δίκλωνο RNA (dsRNA).

Για τη δημιουργία των dsRNA των γονιδίων στόχων αρχικά πραγματοποιήθηκε μία αντίδραση PCR, όπου χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα cDNA δάκου, από τα δείγματα του εργαστηριακού πληθυσμού του συνόλου δεδομένων των προφίλ έκφρασης. Το cDNA ενισχύθηκε με χρήση εκκινητών, που έφεραν στο 5' άκρο την αλληλουχία του υποκινητή RNA πολυμεράσης, προερχόμενης από τον βακτηριοφάγο T7, όπως φαίνονται στον πίνακα (Πίνακας 4-1). Ύστερα με in vitro μεταγραφή, η πολυμεράση αναγνωρίζοντας τον υποκινητή της στα άκρα της αλληλουχίας στόχου, μεταγράφει το προϊόν της ενίσχυσης του cDNA σε RNA. Τα προϊόντα της PCR και της in vitro μεταγραφής ηλεκτροφορήθηκαν με σκοπό την εκτίμηση της συγκέντρωσης τους και την επιβεβαίωση της απουσίας παραπροϊόντων. Η παραπάνω διαδικασία ακολουθήθηκε για τα, προς εξέταση, γονίδια των εστερασών: BolEST6, BolEST7 και BolEST14 όπου αφού παράχθηκαν τα dsRNA του εκάστοτε γονιδίου έγινε εισαγωγή τους εντός των εντόμων με μικροέγχυση. Τα έντομα στα οποία πραγματοποιήθηκε η ένεση παρουσιάζονται στον πίνακα της προηγούμενης ενότητας (Πίνακας 3-4). Για να εξεταστεί η επιτυχία της μεθόδου απομονώθηκε το ολικό RNA από τα έντομα αφού πρώτα έφτασαν στο κατάλληλο στάδιο ανάπτυξης, δηλαδή σε αυτό που παρατηρήσαμε στις αναλύσεις των προφίλ έκφρασης πως υπάρχει αύξηση της έκφρασης του γονιδίου-στόχου. Ενώ παράλληλα, οι ίδιες συνθήκες έγχυσης, συλλογής εντόμων και απομόνωσης RNA ακολουθήθηκε και στα έντομα κάθε πειράματος που εγχύθηκαν με το dsRNA το οποίο στόχευε στο γονίδιο GFP (δείγματα ελέγχου).



Εικόνα 4-3: Ποιοτικός έλεγχος του μεγέθους των dsBolEST6, dsBolEST7 και dsBolEST14 με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης (1,5 %).

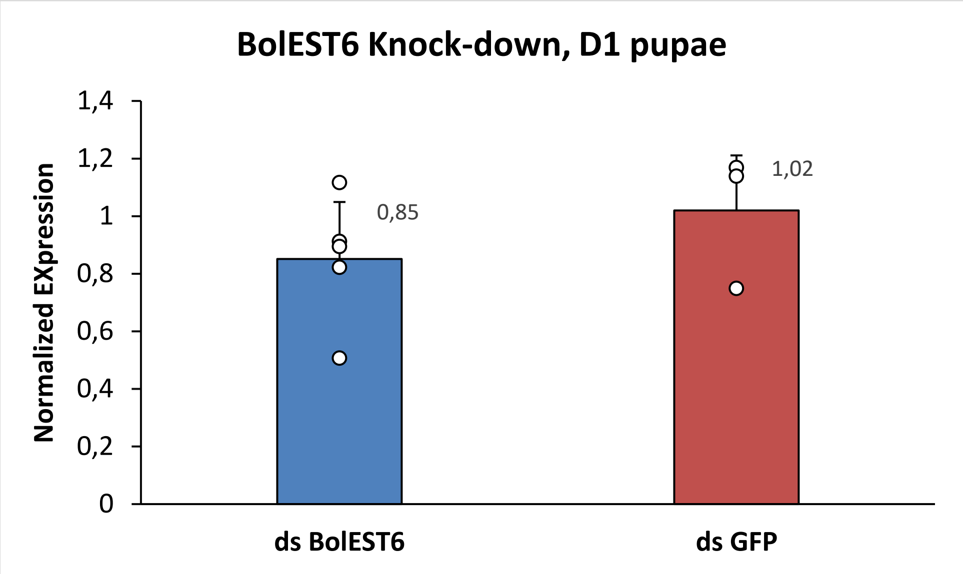
Στη συνέχεια, αφού απομονώθηκε RNA, εξετάστηκαν τα επίπεδα έκφρασης των 3 αυτών γονιδίων με Real-Time PCR, σε σχέση με την έκφραση των γονιδίων αναφοράς, όπως έγινε για τη δημιουργία των προφίλ έκφρασης. Έπειτα, για κάθε πείραμα knockdown ενός γονιδίου, μετρήσαμε τα σχετικά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου-στόχου σε σύγκριση με τη μέση σχετική έκφραση της ομάδας ελέγχου (control group) σύμφωνα με τις αρχές της μεθόδου Livak [35]. Η ομάδα ελέγχου αποτελούνταν από δείγματα στα οποία έγινε ένεση dsRNA που στοχεύει την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (GFP), η οποία δεν υπάρχει στο γονιδίωμα του είδους *Bactrocera oleae* και δεν περιμένουμε αλλαγή στην έκφραση του γονιδίου-στόχου, λειτουργώντας ως negative control group. Αυτή η συγκριτική ανάλυση, όπως φαίνεται στον τύπο (4-2), μας επέτρεψε να εκτιμήσουμε την έκταση της γονιδιακής σίγησης ποσοτικοποιώντας τα σχετικά επίπεδα έκφρασης, ενώ παράλληλα αποτέλεσε ένα πολύτιμο μέσο για την αξιολόγηση του αντίκτυπου της γονιδιακής σίγησης στην έκφραση των γονιδίων-στόχων.

$$\text{Για κάθε δείγμα, } 2^{-\frac{\Delta Cq\ (dsRNA\ treated)}{Average\ \Delta Cq\ (\ control\ samples)}} \qquad (4\text{-}2)$$

4.4.1 Αποσιώπηση του γονιδίου BolEST6

Για τον προσδιορισμό της αποσιώπησης του BolEST6, η έκφραση του γονιδίου μετρήθηκε μία μέρα μετά τη μικροέγχυση σε προνύμφες 3^{ου} σταδίου, δηλαδή στο αναπτυξιακό στάδιο της νύμφης 1^{ης} ημέρας, όπου είχε παρατηρηθεί υψηλή έκφραση του γονιδίου σύμφωνα με το προφίλ έκφρασης. 24 ώρες μετά την μικρόεγχυση επιβίωσαν 13/14 ds BolEST6 δείγματα και 5/5 ds GFP δείγματα. Το σύνολο δεδομένων προς ανάλυση της σίγησης περιείχε τελικά: 5 ds BolEST6 δείγματα και 3 ds GFP δείγματα.

Τα αποτελέσματα έδειξαν μείωση της έκφρασης του γονιδίου της τάξης του 15% σε σχέση με τα δείγματα ελέγχου. Ωστόσο, η στατιστική ανάλυση με Student's t-test (unpaired) έδειξε μια τιμή p value = 0.359, υποδηλώνοντας ότι η παρατηρούμενη μείωση δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Στο παρακάτω γράφημα (Γράφημα 4-7) παρουσιάζονται οι τιμές της σχετικής έκφρασης των εντόμων του πειράματος knockdown του γονιδίου BolEST6. Στην αποσιώπηση της έκφρασης του BolEST6 αναλύθηκαν τελικά 5 βιολ. δείγματα ds BolEST6 και 3 δείγματα ds GFP. Τιμές έκφρασης (2^-ΔΔCq) πολύ μεγαλύτερες και πολύ μικρότερες από 1 SD θεωρήθηκαν ακραίες τιμές και αφαιρέθηκαν, καθώς η μέση τιμή σε ένα μικρό αριθμό δειγμάτων επηρεάζεται από τις ακραίες τιμές.



Γράφημα 4-7: Το ραβδόγραμμα αναπαριστά τα δεδομένα της σχετικής έκφρασης του γονιδίου BolEST6 σε νύμφες 1ης ημέρας – 1 ημέρα μετά από μικροέγχυση dsRNA. Όλα τα δείγματα συγκρίνονται με τη μέση τιμή των δειγμάτων αναφοράς (GFP treated δείγματα). Ο άξονας x αντιπροσωπεύει τις πειραματικές συνθήκες: dsRNA BolEST6 και ds GFP. Ο άξονας y αντιπροσωπεύει τα σχετικά επίπεδα έκφρασης (2^-ΔΔCq). Κάθε ράβδος αντιστοιχεί στη μέση τιμή της έκφρασης (mean ±SD), με το ύψος της να υποδεικνύει το fold change στην έκφραση σε σχέση με τη μέση τιμή των δειγμάτων αναφοράς. Μέση σχετική έκφραση για άτομα με ds RNA για το BolEST6 και για το GFP: 0,85 και 1,01 αντίστοιχα.

4.4.2 Αποσιώπηση του γονιδίου BolEST7

Για το knockdown του γονιδίου bolEST7 χρησιμοποιήθηκαν ώριμα αρσενικά και θηλυκά έντομα (7ης ημέρας). Η δόση του bolEST7-targeting dsRNA που παραδόθηκε ήταν 64,4 nL και η συγκέντρωση του διαλύματος dsRNA καθορίστηκε σε 5000 ng/L.

Πραγματοποιήθηκαν δύο πειράματα: τρεις ημέρες και πέντε ημέρες μετά την ένεση για την αξιολόγηση του βαθμού της παροδικής αποσιώπησης. Αυτά τα διαστήματα επιλέχθηκαν για να δώσουν στο μηχανισμό RNAi των εντόμων αρκετό χρόνο για να λειτουργήσει.

5 ημέρες μετά την ένεση με dsRNA:

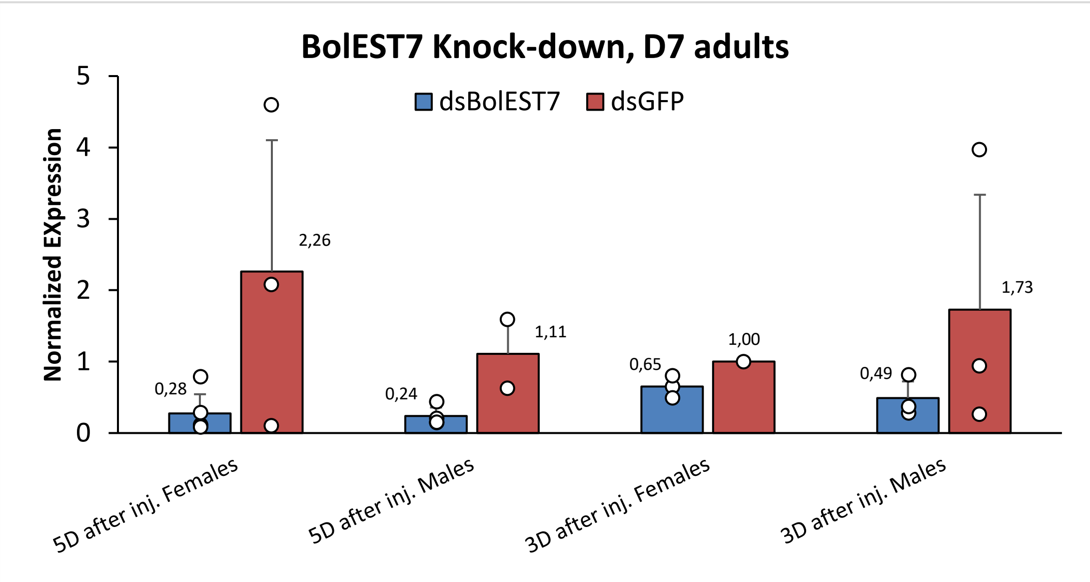
24 ώρες μετά την μικρόεγχυση επιβίωσαν 9/10 θηλυκά και 5/5 αρσενικά ds BolEST7 δείγματα και 5/5 θηλυκά και 2/3 αρσενικά ds GFP δείγματα. Το σύνολο δεδομένων προς ανάλυση της σίγησης περιείχε τελικά: 5 θηλυκά και 5 αρσενικά ds BolEST7 δείγματα και 3 θηλυκά και 2 αρσενικά ds GFP δείγματα ελέγχου.

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης αποκάλυψαν σημαντική μείωση της γονιδιακής έκφρασης. Στα αρσενικά έντομα, όπου σύμφωνα με το προφίλ έκφρασης του γονιδίου εμφανίστηκε η υψηλότερη γονιδιακή έκφραση, η μείωση της έκφρασης ήταν 76% σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, με τιμή p= 0,158. Στα θηλυκά έντομα σημειώθηκε μείωση 72%, σε σύγκριση με τη μέση έκφραση της ομάδας ελέγχου (p = 0,133). Αυτά τα ευρήματα υποδεικνύουν τη σημαντική επίδραση της έγχυσης με ds RNA με τη μείωση της έκφρασης του γονιδίου BolEST7 τόσο στα αρσενικά όσο και στα θηλυκά ώριμα έντομα και δικαιολογούν περαιτέρω έρευνα για την κατανόηση των λειτουργικών επιπτώσεων αυτής της μειωμένης έκφρασης. Τα δεδομένα της σχετικής έκφρασης του γονιδίου BolEST7 σε ώριμα θηλυκά και αρσενικά έντομα 7ης ημέρας (5 ημέρες μετά την μικροέγχυση) παρουσιάζονται στο γράφημα Γράφημα 4-8. Τιμές έκφρασης (2^-ΔΔCq) πολύ μεγαλύτερες και πολύ μικρότερες από 1 SD θεωρήθηκαν ακραίες τιμές και αφαιρέθηκαν, καθώς η μέση τιμή σε ένα μικρό αριθμό δειγμάτων επηρεάζεται από τις ακραίες τιμές.

3 ημέρες μετά την ένεση:

24 ώρες μετά την μικρόεγχυση επιβίωσαν 4/5 θηλυκά και 5/5 αρσενικά ds BolEST7 δείγματα και 1/2 θηλυκά και 3/3 αρσενικά ds GFP δείγματα. Το σύνολο δεδομένων προς ανάλυση της σίγησης περιείχε τελικά: 4 θηλυκά και 5 αρσενικά ds BolEST7 δείγματα και 1 θηλυκό και 3 αρσενικά ds GFP δείγματα ελέγχου.

Τα αποτελέσματα έδειξαν σημαντική μείωση της γονιδιακής έκφρασης, με μείωση 36% στα ώριμα θηλυκά σε σύγκριση με το δείγμα ελέγχου. Ομοίως, στα ώριμα αρσενικά, η έκφραση έδειξε μείωση 51% σε σύγκριση με τη μέση έκφραση της ομάδας ελέγχου (p= 0,195). Καθώς η τιμή p για τη διαφορά στην έκφραση μεταξύ των δύο ομάδων ώριμων αρσενικών (BolEST7-targeting και GFP-targeting ds RNA) ήταν 0,195 απαιτείται περαιτέρω έρευνα για την επικύρωση αυτών των ευρημάτων και την αποσαφήνιση των λειτουργικών επιπτώσεων των παρατηρούμενων μειώσεων στην έκφραση του γονιδίου BolEST7. Οι τιμές της έκφρασης του γονιδίου BolEST7 σε ώριμα θηλυκά και αρσενικά έντομα 7^{ης} ημέρας (3 ημέρες μετά την μικροέγχυση) φαίνονται στο γράφημα Γράφημα 4-8. Τιμές έκφρασης (2^-ΔΔCq) πολύ μεγαλύτερες και πολύ μικρότερες από 1 SD θεωρήθηκαν ακραίες τιμές και αφαιρέθηκαν, καθώς η μέση τιμή σε ένα μικρό αριθμό δειγμάτων επηρεάζεται από τις ακραίες τιμές.

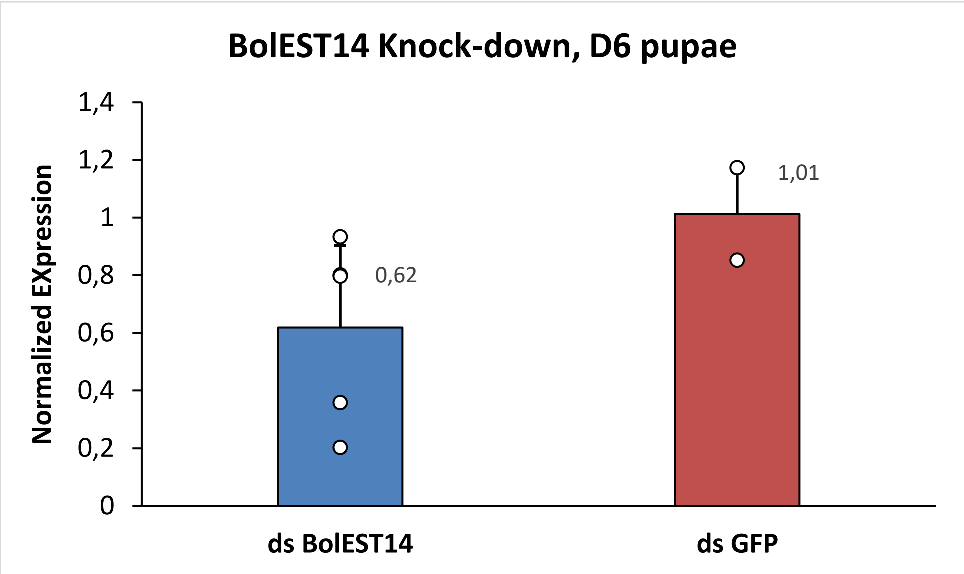


Γράφημα 4-8: Δεδομένα της σχετικής έκφρασης του γονιδίου BolEST7 σε ώριμα θηλυκά και αρσενικά άτομα 7ης ημέρας – 5 και 3 ημέρες μετά την μικροέγχυση dsRNA. Άξονας y: σχετικά επίπεδα έκφρασης (2^-ΔΔCq). Κάθε ράβδος αντιστοιχεί στη μέση τιμή της έκφρασης (mean ±SD), με το ύψος της να υποδεικνύει το fold change στην έκφραση σε σχέση με τη μέση τιμή των δειγμάτων αναφοράς. Όλα τα δείγματα συγκρίνονται με τη μέση τιμή των δειγμάτων αναφοράς (GFP treated δείγματα). Μέση σχετική έκφραση για θηλυκά άτομα με dsRNA για το BolEST7 και για το GFP: 0,28 και 2,26 αντίστοιχα (p=0,133). Για τα αρσενικά άτομα οι τιμές σχετικής έκφρασης ήταν αντίστοιχα: 0,24 και 1,11 αντίστοιχα (p=0,158). Η μέση έκφραση των θηλυκών με dsRNA για το BolEST7 και για το GFP: 0,65 και 1,00 αντίστοιχα. Μέση σχετική έκφραση για αρσενικά άτομα με dsRNA για το BolEST7 και για το GFP: 0,49 και 1,73 αντίστοιχα (p value= 0,195).

4.4.3 Αποσιώπηση του γονιδίου BolEST14

Η έκφραση του γονιδίου BolEST14 μετρήθηκε 6 ημέρες μετά την ένεση του dsRNA σε 3^{ου} σταδίου προνύμφες, δηλαδή στο στάδιο της νύμφης 6ης ημέρας, όπου σύμφωνα με το προφίλ έκφρασης του γονιδίου φάνηκε η υψηλότερη γονιδιακή έκφραση. 24 ώρες μετά την μικρόεγχυση επιβίωσαν 8/9 ds BolEST14 δείγματα και 5/5 ds GFP δείγματα. Το σύνολο δεδομένων της σίγησης προς ανάλυση περιείχε τελικά: 7 ds BolEST6 δείγματα και 3 ds GFP δείγματα.

Η ανάλυση αποκάλυψε σημαντική μείωση της γονιδιακής έκφρασης κατά 38%, αν και η τιμή p= 0,09 δείχνει μια τάση προς τη στατιστική σημαντικότητα, αλλά δεν πληροί το συμβατικό όριο (συνήθως ορίζεται σε $p < 0,05$). Αυτά τα ευρήματα υποδηλώνουν ότι η αποσιώπηση του γονιδίου BolEST14 έχει τη δυνατότητα να επηρεάσει τα επίπεδα έκφρασής του, γεγονός που δικαιολογεί περαιτέρω έρευνα για την επικύρωση και την κατανόηση των λειτουργικών επιπτώσεων αυτής της μείωσης. Τα δεδομένα της έκφρασης μετά την παροδική σίγηση του BolEST14 παρουσιάζονται στο παρακάτω γράφημα Γράφημα 4-9. Τιμές έκφρασης (2^-ΔΔCq) πολύ μεγαλύτερες και πολύ μικρότερες από 1 SD θεωρήθηκαν ακραίες τιμές και αφαιρέθηκαν, καθώς η μέση τιμή σε ένα μικρό αριθμό δειγμάτων επηρεάζεται από τις ακραίες τιμές.



Γράφημα 4-9: Το ραβδόγραμμα αναπαριστά τα δεδομένα της σχετικής έκφρασης του γονιδίου BolEST14 σε νύμφες 6ης ημέρας – 6 ημέρες μετά από μικροέγχυση dsRNA. Φαίνεται μία τάση μείωσης της έκφρασης στην ομάδα ds BolEST14 treated, όμως χωρίς δυνατή στατιστική σημαντικότητα (p=0,09). Όλα τα δείγματα συγκρίνονται με τη μέση τιμή των δειγμάτων αναφοράς (GFP treated δείγματα). Άξονας x: πειραματικές συνθήκες: dsRNA BolEST14 και ds GFP. Άξονας y: σχετικά επίπεδα έκφρασης (2^-ΔΔCq). Κάθε ράβδος αντιστοιχεί στη μέση τιμή της έκφρασης (mean ±SD), με το ύψος της να υποδεικνύει το fold change στην έκφραση σε σχέση με τη μέση τιμή των δειγμάτων αναφοράς. Μέση σχετική έκφραση για άτομα με dsRNA για το BolEST14 και για το GFP ήταν: 0,62 και 1,01 αντίστοιχα.

5 Συζήτηση

5.1 Ανάλυση των προφίλ έκφρασης στους δύο πληθυσμούς

Συνοπτικά, από τη σύγκριση των προφίλ έκφρασης ανάμεσα στους δύο πληθυσμούς δάκου της ελιάς για τα τρία γονίδια εστεράσης, διαπιστώθηκε ότι τα μοτίβα έκφρασης ανά γονίδιο παρουσιάζουν μεγάλη ομοιότητα ανάμεσα στους δύο πληθυσμούς, ενώ επίσης στον εργαστηριακό πληθυσμό η σχετική έκφραση των γονιδίων στόχων ήταν υψηλότερη. Το δεύτερο, οφείλεται τεχνικά στο γεγονός ότι στον εργαστηριακό πληθυσμό η έκφραση των γονιδίων στόχων ήταν μεγαλύτερη κατά μέση τιμή Cq και η έκφραση του γονιδίου αναφοράς GAPDH, σε μέση τιμή Cq, ήταν μικρότερη σε σχέση με τον άγριο πληθυσμό. Συγκεκριμένα, στον εργαστηριακό πληθυσμό, οι μέσες τιμές Cq για όλα τα βιολ. δείγματα για όλα τα γονίδια ήταν: 26.83, 28.96, 31.83, 20.63, 20.63 για τα γονίδια BoIEST6, BoIEST7, BoIEST14, RPL19 και GAPDH αντίστοιχα. Ενώ, οι αντίστοιχες τιμές Cq στον άγριο πληθυσμό δάκου της ελιάς, ήταν: 27.02, 29.51, 31.84, 20.37, 19.88 για τα γονίδια BoIEST6, BoIEST7, BoIEST14, RPL19 και GAPDH.

5.1.1 BoIEST6

Προφίλ έκφρασης:
Τα προφίλ έκφρασης του γονιδίου BoIEST6 στους δύο πληθυσμούς έδειξαν αξιοσημείωτη επικάλυψη στα πρότυπα τους, παρά την διαφορετική προέλευσή τους (εργαστηριακός – άγριος πληθυσμός). Αυτό το εύρημα επισημαίνει ότι η λειτουργική ανάλυση του γονιδίου BoIEST6, είναι δυνατόν να πραγματοποιηθεί πειραματικά σε εργαστηριακό δάκο της ελιάς όπου οι πληθυσμοί του είναι περισσότερο σταθεροί σε εργαστηριακές συνθήκες ανάπτυξης.

Το γονίδιο BoIEST6 εμφάνισε υψηλή έκφραση μόνο κατά τη διάρκεια των σταδίων "Νύμφη 1ης ημέρας", "Νύμφη 3ης ημέρας" και "αβγά", με το στάδιο των αβγών να παρουσιάζει την υψηλότερη έκφραση στον εργαστηριακό πληθυσμό. Στον άγριο πληθυσμό υπήρχε μόλις ένα δείγμα αβγών (eggs unsynchronized), λόγω αδυναμίας συλλογής αβγών από τους άγριους δάκους. Επομένως η σύγκριση της έκφρασης του γονιδίου σε αυτό το στάδιο ανάμεσα στους δύο πληθυσμούς δεν ήταν εφικτή. Έτσι, σύμφωνα με τα ευρήματα από τα προφίλ έκφρασης, μπορεί τελικά η έκφραση του BoIEST6 να είναι απαραίτητη σε πρώιμες αναπτυξιακές διεργασίες του δάκου της ελιάς, ιδίως κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης και των πρώιμων σταδίων νύμφης, σύμφωνα με αυτό το συγκεκριμένο πρότυπο έκφρασης. Ωστόσο, απαιτούνται περισσότερα πειράματα, με περισσότερα δείγματα στο στάδιο του εμβρύου από άγριο πληθυσμό για τον προσδιορισμό της λειτουργικότητας του συγκεκριμένου ενζύμου στο δάκο της ελιάς, αρχικά μέσω RT qPCR.

Δεδομένα από άλλα έντομα:
Μέσω BLASTP αναζητήσαμε ομόλογες αμινοξικές αλληλουχίες του γονιδίου BoIEST6 σε άλλα συγγενικά είδη εντόμων με τον δάκο της ελιάς στη βάση δεδομένων του NCBI. Συγκεκριμένα, αναζητήσαμε στο NCBI ομόλογες αλληλουχίες για ένα άλλο μελετημένο έντομο της οικογένειας Tephritidae, το είδος *Zeugodacus cucurbitae* (melon fly), για το οποίο έχει πραγματοποιηθεί πρόσφατα, το 2020, μία Genome-wide ανάλυση γονιδιακής έκφρασης για όλα τα αναπτυξιακά στάδια του εντόμου [40]. Η ομόλογη πρωτεΐνη του *Z. cucurbitae* που ανακτήθηκε είχε ταυτότητα 88,5 % (και e value = 0.0) με την BoIEST6 του δάκου της ελιάς. Η πρωτεΐνη αυτή (NCBI Reference Sequence: XP_011196064.1) επίσης είναι μη χαρακτηρισμένη λειτουργικά και εμφανίζει μεγαλύτερη έκφραση στο στάδιο της νύμφης 1^{ης} ημέρας.

5.1.2 BoIEST7

Προφίλ έκφρασης:
Τα προφίλ έκφρασης του γονιδίου BoIEST7 στους δύο πληθυσμούς εντόμων (εργαστηριακός και άγριος) έδειξαν μεγάλη επικάλυψη στα πρότυπα τους, παρά την διαφορετική προέλευσή τους. Υποδηλώνοντας ότι η λειτουργική ανάλυση του γονιδίου BoIEST7, μπορεί να πραγματοποιηθεί πειραματικά σε εργαστηριακό δάκο της ελιάς όπου οι πληθυσμοί του είναι περισσότερο σταθεροί σε εργαστηριακές συνθήκες ανάπτυξης.

Συνοπτικά τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης παρατηρήθηκαν στα ενήλικα άτομα, με μεγαλύτερη έκφραση να εμφανίζεται στα ώριμα αρσενικά (D7 males). Σε πρώτο στάδιο αυτό υποδηλώνει ότι η λειτουργία της εστεράσης BolEST7 είναι σημαντική στην ενήλικη ζωή του εντόμου και συγκεκριμένα των αρσενικών. Η εστεράση BolEST7, εφόσον εκφράζεται στα ενήλικα αρσενικά, θα μπορούσε να αποτελεί ένζυμο αποικοδόμησης οσμών του φύλου ή άλλων πτητικών ενώσεων που είναι σημαντικές για την επιβίωση και την αναπαραγωγή του δάκου της ελιάς. Έτσι, για την εξαγωγή πιο ουσιαστικών συμπερασμάτων της λειτουργικότητας του ενζύμου BolEST7 από πειράματα προσδιορισμού της έκφρασης με RT qPCR κρίνεται απαραίτητο να γίνει η ποσοτικοποίηση της έκφρασης του γονιδίου στα όργανα του οσφρητικού των ενήλικων εντόμων (πχ στις κεραίες και στις γναθικές προσακτρίδες) ή/και στην επιδερμίδα όπου μπορούν να συναντηθούν ένζυμα ODEs και η έκφραση να προσδιοριστεί σε σύγκριση με την έκφραση του γονιδίου σε άλλους ιστούς που δεν αναμένουμε να συναντήσουμε ένζυμα ODEs.

Δεδομένα από άλλα εντόμα:
Αντίστοιχα με το γονίδιο BolEST6, αναζητήσαμε ομόλογες πρωτεϊνικές αλληλουχίες του BolEST7 στο *Z. cucurbitae. Η ομόλογη πρωτεΐνη του Z. cucurbitae που ανακτήθηκε είχε ταυτότητα 86,13 % (και e value = 0.0) με την BolEST7 του δάκου της ελιάς. Η πρωτεΐνη αυτή (NCBI Reference Sequence: XP_011185977.1) επίσης είναι μη χαρακτηρισμένη λειτουργικά και εμφανίζει μεγαλύτερη έκφραση στα ενήλικα έντομα (day 5), με τα αρσενικά να εμφανίζουν λίγο μεγαλύτερη από τα θηλυκά.*

5.1.3 BolEST14

Προφίλ έκφρασης:
Τα προφίλ έκφρασης του γονιδίου BolEST14 στους δύο πληθυσμούς εντόμων (εργαστηριακός και άγριος) έδειξαν μεγάλη επικάλυψη στα πρότυπα τους, παρά την διαφορετική προέλευσή τους. Υποδηλώνοντας ότι η λειτουργική ανάλυση του γονιδίου BolEST14, μπορεί να πραγματοποιηθεί πειραματικά σε εργαστηριακό δάκο της ελιάς όπου οι πληθυσμοί του είναι περισσότερο σταθεροί σε εργαστηριακές συνθήκες ανάπτυξης.

Η έκφραση του BolEST14 ήταν χαμηλή σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια του εντόμου, με εξαίρεση τα στάδια της νύμφης 1^{ης} και 3^{ης} ημέρας που σημειώθηκε μικρή έκφραση και στο στάδιο της νύμφης 6ης ημέρας όπου εκεί η έκφραση ήταν υψηλή και κορυφώθηκε. Έτσι, η εστεράση BolEST14 μπορεί να είναι ένα σημαντικό ένζυμο κατά την βομβυκίωση του εντόμου και τη μεταμόρφωση του από νύμφη σε ενήλικο έντομο δάκου της ελιάς.

Δεδομένα από άλλα εντόμα:
Κατά αντιστοιχία με την αναζήτηση ομόλογων πρωτεϊνικών αλληλουχιών στο *Z. cucurbitae* για τα BolEST6 και BolEST7 του δάκου, η ομόλογη αλληλουχία του BolEST14 στο *Z. cucurbitae* (*NCBI Reference Sequence:* XP_011182807.1, ταυτότητα 94,5% και e value 0,0) είχε την υψηλότερη έκφραση στο στάδιο της νύμφης 1^{ης} ημέρας. Ενώ, η BolEST14 είχε την υψηλότερη έκφραση στο στάδιο της νύμφης 6^{ης} ημέρας.

5.2 Παροδική σίγηση των γονιδίων-στόχων
Από τα πειράματα RNAi knockdown που πραγματοποιήσαμε σε άτομα δάκου με μικροέγχυση 64,4 nL, συγκέντρωσης 5 μg/μl, προκύπτουν ορισμένα συμπεράσματα, τα οποία θα αναπτυχθούν για κάθε γονίδιο εστεράσης ξεχωριστά.

Παροδική σίγηση του BolEST6: Στις νύμφες 1^{ης} ημέρας, το γονίδιο της εστεράσης BolEST6 παρουσίασε μικρή μείωση της έκφρασης του σε σχέση με αυτήν των δειγμάτων ελέγχου που ενέθηκαν με GFP-targeting ds RNA. Η μείωση ήταν 15% κατά μέσο όρο σε σχέση με την ομάδα ελέγχου ($p > 0,05$). Αυτό μπορεί να οφείλεται σε ανεπιτυχή μικροέγχυση, στον μικρό αριθμό βιολογικών δειγμάτων ή σε άλλους παράγοντες, όπως η συγκέντρωση που απαιτείται για τη σίγηση του συγκεκριμένου γονιδίου ή ακόμα στο γεγονός ότι η αποσιώπηση της έκφρασης τους γονιδίου BolEST6 μετρήθηκε μόλις μία μέρα μετά την μικροέγχυση και ενδεχομένως να μην έδρασε αποτελεσματικά ο μηχανισμός RNAi στα έντομα. Έτσι, αρχικά κρίνεται απαραίτητο να επαναληφθούν τα ίδια πειράματα για τον προσδιορισμό της σίγησης του BolEST6 στις νύμφες πρώτης ημέρας, μία μέρα μετά την μικροέγχυση με dsRNA, αναλύοντας μεγαλύτερο αριθμό knockdown βιολογικών δειγμάτων.

Παροδική σίγηση του BolEST7: Στα αρσενικά έντομα 7ης ημέρας 5 ημέρες μετά την μικροέγχυση παρατηρήθηκε συνολικά η υψηλότερη αποσιώπηση της έκφρασης του γονιδίου BolEST7, με 76% μείωση στην έκφραση του γονιδίου BolEST7 σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Ακολούθησε η μείωση της έκφρασης των θηλυκών 5 ημέρες μετά την μικρόεγχυση (72% μείωση στην έκφραση σε σχέση με την ομάδα ελέγχου), η μείωση των αρσενικών 3 ημέρες μετά την μικροέγχυση (51% σε σχέση με την ομάδα ελέγχου) και τέλος των θηλυκών 3 ημέρες μετά την μικροέγχυση (36% σε σχέση με το δείγμα ελέγχου). Φάνηκε επομένως ότι η σίγηση του γονιδίου BolEST7 ήταν υψηλότερη στα αρσενικά άτομα και ειδικότερα όταν μετρήθηκε 5 ημέρες μετά τη μικροέγχυση. Ωστόσο, ο αριθμός των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για τα πειράματα RNAi knockdown ήταν μικρός, η στατιστική σημαντικότητα ήταν >0,05 σε όλες τις συγκρίσεις μέσων τιμών και έτσι για την επανάληψη των knockdown πειραμάτων με μικροέγχυση, υπό τις ίδιες συνθήκες μικροέγχυσης (injecton: 64,4 nL ds RNA, conc. 5 μg/μl), απαιτούνται περισσότερα βιολογικά δείγματα που θα μπορούσαν αποσαφηνίσουν καλύτερα την επίδραση του RNAi στην έκφραση του γονιδίου BolEST7.

Παροδική σίγηση του BolEST14: Στις νύμφες 6ης ημέρας, 6 ημέρες μετά την μικροέγχυση, η σίγηση του γονιδίου BolEST14 είχε μειωθεί κατά 38% σε σχέση με την έκφραση του στην ομάδα ελέγχου (GFP treated). Η στατιστική σημαντικότητα αυτής της σύγκρισης μέσω t-test ήταν $p=0,09$ κοντά στην απαιτούμενη σημαντικότητα του 5%. Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι η μείωση 38% που σημειώθηκε στις νύμφες 6ης ημέρας για το BolEST14 ήταν πιθανότατα πραγματική και ο μηχανισμός RNAi λειτούργησε. Παρ' όλα αυτά κρίνεται σημαντική η επανάληψη των knockdown πειραμάτων υπό τις ίδιες συνθήκες (injecton: 64,4 nL ds RNA, conc. 5 μg/μl) ώστε να ελεγχθεί η επίδραση του μηχανισμού RNAi στην έκφραση του γονιδίου BolEST14 και η επιτυχία της μεθόδου με μεγαλύτερη ασφάλεια.

5.3 Συμπεράσματα από την μικροέγχυση

Η μικροέγχυση (microinjection) αποτελεί την πιο διαδεδομένη μέθοδο εισαγωγής του dsRNA στη μοριακή εντομολογία, καθώς το dsRNA εισχωρεί απευθείας στη λέμφο του εντόμου και ταυτόχρονα είναι ακριβής η ποσότητα του dsRNA που εισάγεται στα δείγματα εντόμων. Οι άλλες κύριες μέθοδοι εισαγωγής του dsRNA στα έντομα είναι δια της στοματικής οδού μέσω της τροφής και της εμβάπτισης (soaking) του εντόμου με διάλυμα dsRNA. Η μέθοδος εισαγωγής dsRNA με εμβάπτιση αποτελεί εύκολη στον χειρισμό, προκαλεί λιγότερη ζημιά στο έντομο και αποτελεί μία πιο φυσική μέθοδο εισαγωγής dsRNA στο σώμα του εντόμου, αλλά είναι λιγότερο ακριβής, λόγω της διάσπασης του dsRNA στο έντερο (midgut) των εντόμων και της δυσκολίας στον προσδιορισμό της ποσότητας dsRNA που εισήλθε μέσω της στοματικής οδού [41].

Σε γενικές γραμμές, η μέθοδος της μικροέγχυσης dsRNA ποσότητας 64,4 nL και συγκέντρωσης 5 μg/μl είχε επιτυχία στην περίπτωση του γονιδίου BolEST7 και ενδεχομένως στο BolEST14. Στην περίπτωση της μειωμένης σίγησης που σημειώθηκε στο γονίδιο BolEST6 τα αίτια που μπορεί να οδήγησαν σε αυτό το αποτέλεσμα μπορεί να είναι αρκετά εκτός από αυτά που αναφέρθηκαν ήδη, δηλαδή στο μικρό αριθμό βιολογικών δειγμάτων για knockdown και στο χρόνο που μετρήθηκε η σίγηση (1 μέρα μετά την μικρο-έγχυση).

Η επιτυχία της μεθόδου της μικροέγχυσης dsRNA σε έντομα είναι πολλές φορές σχετική με το είδος του εντόμου, τον τύπο του ιστού που πραγματοποιήθηκε η έγχυση ή ακόμα το ίδιο το γονίδιο. Αρχικά, ορισμένα είδη εντόμων είναι πιο δεκτικά στην εισαγωγή dsRNA από άλλα. Επιπλέον, ομόλογοι ιστοί δεν είναι το ίδιο διαπερατοί σε κάθε οργανισμό. Το ίδιο ισχύει και για τους ιστούς του ίδιου οργανισμού, να μπορεί δηλαδή το διάλυμα dsRNA μέσω της λέμφου να προσεγγίσει έναν ιστό, αλλά όχι έναν άλλο. Ο κάθε ιστός μπορεί να εκφράζει σε διαφορετικά επίπεδα τα γονίδια ενεργοποίησης του μηχανισμού RNAi, οπότε ακόμα και αν εισέλθει η απαραίτητη ποσότητα dsRNA και φτάσει στον ιστό να μη δράσει το RNAi. Σε ό,τι αφορά το ίδιο γονίδιο, η εισαγωγή του dsRNA του γονιδίου στους κατάλληλους ιστούς του εντόμου μπορεί να επηρεαστεί, από τα δομικά χαρακτηριστικά του και το μήκος του dsRNA. Μικρότερα μόρια dsRNA μπορεί να αποικοδομηθούν πιο εύκολα και γρήγορα σε σχέση με μεγαλύτερα. Επιπλέον, η είσοδος του dsRNA και η έναρξη της αποσιώπησης μπορεί να προκαλέσει την άμεση ανατροφοδότηση των μηχανισμών μεταγραφής του γονιδίου στα κύτταρα και να ξεκινήσει η έκφραση του γονιδίου-στόχου σε βαθμό που να παρατηρηθεί κατά την ποσοτικοποίηση ακόμα και υπερέκφραση αντί για την αναμενόμενη αποσιώπηση. Γνωρίζουμε επίσης ότι η μικροέγχυση είναι πιο αποτελεσματική σε κάποια αναπτυξιακά στάδια των εντόμων και σε άλλα λιγότερο. Τέλος, είναι δυνατόν οι πολυμορφισμοί της αλληλουχίας του γονιδίου στόχου των εντόμων να επηρεάζουν την εφαρμογή της μεθόδου του RNAi [41].

5.4 Επίλογος – Μελλοντικές Προοπτικές

Τα παραπάνω πειραματικά δεδομένα αποτέλεσαν μία πρώτη προσπάθεια λειτουργικού χαρακτηρισμού τριών πιθανών ενζύμων αποικοδόμησης οσμών στο δάκο της ελιάς, που ονομάστηκαν BolEST6, BolEST7 και BolEST14. Αρχικά κατασκευάσαμε τα προφίλ γονιδιακής έκφρασης για αυτά τα γονίδια εστεράσης σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια του εντόμου, χρησιμοποιώντας δύο πληθυσμούς εντόμων, έναν εργαστηριακό και έναν άγριο πληθυσμό, όπου παρατηρήσαμε παρόμοια μοτίβα έκφρασης μεταξύ των δύο πληθυσμών. Αυτό το εύρημα επισημαίνει ότι η λειτουργική ανάλυση αυτών των γονιδίων, είναι δυνατόν να πραγματοποιηθεί πειραματικά σε εργαστηριακό δάκο της ελιάς όπου οι πληθυσμοί του είναι περισσότερο σταθεροί σε εργαστηριακές συνθήκες ανάπτυξης (βλ. Κεφάλαιο 4.3)

Συγκεκριμένα από τα τρία γονίδια, η εστεράση BolEST7 έδειξε την υψηλότερη έκφραση στα ενήλικα έντομα, ιδιαίτερα στα αρσενικά. Αυτό μπορεί να υποδηλώνει ότι το BolEST7 συνδέεται όντως με το οσφρητικό σύστημα των ώριμων αρσενικών και μπορεί ακόμα να συμβάλλει σε λειτουργίες που σχετίζονται με το φύλο, όπως την αναγνώριση ατόμων του αντίθετου φύλου. Αυτά τα ευρήματα υπογραμμίζουν τη σημασία του BolEST7 για τα ενήλικα αρσενικά έντομα *B. oleae* και δικαιολογούν περεταίρω μελέτη για την αποσαφήνιση του λειτουργικού του ρόλου. Πολλές φορές, στην αντιμετώπιση παρασίτων στοχεύεται το οσφρητικό σύστημα των αρσενικών εντόμων και παρεμβάλλεται η ικανότητα τους να βρίσκουν συντρόφους ή/και να αναπαράγονται. Το γονίδιο BolEST7 σύμφωνα με αυτά τα αποτελέσματα αποτελεί υποψήφιο γονίδιο ODE που θα μπορούσε να συμβάλλει αποτελεσματικά στην αντιμετώπιση του δάκου της ελιάς μέσω της τεχνικής της οσφρητικής σύγχυσης (confusion) ή να συμβάλλει στην περεταίρω αποσαφήνιση των μηχανισμών του οσφρητικού συστήματος. Το οσφρητικό σύστημα των εντόμων σήμερα αποτελεί εντατικό αντικείμενο μελέτης και ένα πολύτιμο εργαλείο, καθώς η στόχευση του μπορεί να οδηγήσει σε νέες, ειδο-ειδικές και πιο αποτελεσματικές μεθόδους ελέγχου των γεωργικών παρασίτων. Από την άλλη, το BolEST6 έδειξε σημαντική έκφραση κατά τα στάδια του αυγού και της νύμφης 1ης και 3ης ημέρας, υποδηλώνοντας πιθανό ρόλο στην ανάπτυξη των εντόμων. Επίσης, το BolEST14 παρουσίασε υψηλά επίπεδα έκφρασης κατά το στάδιο της νύμφης 6ης ημέρας, υποδεικνύοντας τη συμμετοχή του σε αυτό το αναπτυξιακό στάδιο. Αν και αποτελούν πιθανά γονίδια ODEs, τα δύο αυτά γονίδια μπορεί να έχουν ευρύτερες λειτουργίες στη φυσιολογία του εντόμου που σχετίζονται είτε με την ανάπτυξη (το BolEST6) είτε με την μεταμόρφωση (τα BolEST6 και BolEST14).

Τέλος, πραγματοποιήσαμε πειράματα knock down για τα γονίδια BolEST6, BolEST7 και BolEST14 μέσω μικροέγχυσης dsRNA. Από τα τρία γονίδια, η παροδική σίγηση φαίνεται να έδρασε περισσότερο στο γονίδιο BolEST7, όπου σημειώθηκε κατά μέσο όρο 77% σίγηση στην έκφραση των αρσενικών ατόμων. Ενώ, από την άλλη η αποσιώπηση του γονιδίου BolEST14 έδειξε μείωση στην έκφραση κατά 38% και 14% στην έκφραση του BolEST6. Προτείνεται, έτσι, η διεξαγωγή πειραμάτων knockdown μεγαλύτερης κλίμακας με ένα ευρύτερο αριθμό βιολογικών δειγμάτων. Αυτό θα βοηθήσει να εξάγουμε συμπεράσματα σχετικά με την έκταση της σίγησης για τα BolEST6, BolEST7 και BolEST14.

Μελλοντικές προοπτικές

- Για την περεταίρω αποσαφήνιση της έκφρασης εστεράσης που μελετήσαμε κρίνεται απαραίτητη η πραγματοποίηση περισσότερων πειραμάτων RT-qPCR, με βιολογικά δείγματα από διαφορετικούς ιστούς του B. oleae – στοχεύοντας την αναζήτηση του ιστού με υψηλότερη έκφραση του του γονιδίου στόχου, πχ για το γονίδιο BolEST7, που ως πιθανό ένζυμο αποκοδόμησης οσμών θα αναμέναμε να εκφράζεται περισσότερο σε ιστούς του οσφρητικού συστήματος (πχ στις κεραίες).
- Νέα πειράματα knockdown στα ένζυμα ODEs για πρόκληση confusion στον δάκο της ελιάς. Υστερα, αξιολόγηση του confusion και της επίδρασης του μέσω συμπεριφορικών και ηλεκτροφυσιολογικών πειραμάτων EAG (Electroantennography).
- Πειράματα in vitro αποικοδόμησης οσμών από απομονωμένα ένζυμα ODEs του δάκου, με έμφαση στο πιθανό ένζυμο ODE, BolEST7. Στόχος, η εύρεση συνθετικών μορίων αναστολέων των ODEs και πρόκληση confusion στο δάκο της ελιάς (πχ με πειράματα συγγένειας). Με απώτερο στόχο, τη χρήση αυτών των συνθετικών μορίων για την πρόκληση confusion του δάκου της ελιάς ως μία μέθοδο για την αντιμετώπιση και τον έλεγχο του πληθυσμού του για την προστασία των ελαιοκαλλιεργειών.

Αυτές οι επακόλουθες έρευνες θα συμβάλουν στη γνώση μας για τις λειτουργίες αυτών των πιθανών οσφρητικών αποικοδομητικών γονιδίων εστερασών και τις επιπτώσεις τους στη συμπεριφορά και τη βιολογία της δάκου της ελιάς, ενώ ταυτόχρονα θα συμβάλουν στην ανάπτυξη νέων αποτελεσματικών μεθόδων για την αντιμετώπιση του εντόμου στοχεύοντας το οσφρητικό του σύστημα και συγκεκριμένα τα ένζυμα αποικοδόμησης οσμών, μέσω της τεχνικής «confusion».

6 Βιβλιογραφικές Αναφορές

[1] E. Plettner, «Insect pheromone olfaction: new targets for the design of,» *Curr. Med. Chem,* τόμ. 9(10), p. 1075–85, 2002.

[2] Daane και Johnson, «Olive Fruit Fly: Managing an Ancient Pest in Modern Times,» *Annual Review of Entomology,* τόμ. 55, pp. 151-169, 2010.

[3] Rice, «Olive fruit fly populations measured in central and southern California,» *California Agriculture,* τόμ. 57.4, pp. 122-127, 2003.

[4] Tsitsipis, 1977.

[5] S. Marchi, «owards understanding temporal and spatial dynamics of Bactrocera oleae (Rossi) infestations using decade-long agrometeorological time series,» *Int J Biometeorol,* τόμ. 60, pp. 1681-1694, 2016.

[6] A. Montiel Bueno και O. Jones, «Alternative methods for controlling the olive fly, Bactrocera oleae, involving semiochemicals,» *IOBC wprs Bulletin,* τόμ. 25.9, pp. 147-156, 2002.

[7] G. E. Haniotakis, «Olive pest control: Present status and prospects,» *Comptes rendus de la réunion,* τόμ. 28(9), pp. 1-9, 2005.

[8] D. J. Obbard, K. H. Gordon, A. H. Buck και F. M. Jiggins, «he evolution of RNAi as a defence against viruses and transposable elements,» *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.,* τόμ. 364, p. 99–115, 2008.

[9] K. I. A. S. H. a. S. M. C. Okamura, «Distinct roles for argonaute proteins in small RNA-directed RNA cleavage pathways,» *Genes Dev,* τόμ. 18, p. 1655–1666, 2004.

[10] S. Whyard, A. D. Singh και S. Wong, «Ingested double-stranded RNAs can act as species-specific insecticides,» *Insect Biochem. Mol. Biol.,* τόμ. 39, p. 824–832, 2009.

[11] B. Mamta και Rajam, «RNAi technology: a new platform for crop pest control,» *Physiol Mol Biol Plants.,* Τόμ. %1 από %223,3, pp. 487-501, 2017.

[12] A. e. a. Canale, «Behavioural and electrophysiological responses of the olive fruit fly, Bactrocera oleae (Rossi)(Diptera: Tephritidae), to male-and female-borne sex attractants,» *Chemoecology,* τόμ. 23, pp. 155-164, 2013.

[13] C. D. Gerofotis, S. I. Charalampos και N. T. Papadopoulos, «Aromatized to Find Mates: α-Pinene Aroma Boosts the Mating Success of Adult Olive Fruit Flies,» *PLos One,* 2013.

[14] A. e. a. Liscia, «Behavioral and electrophysiological responses to volatile organic compounds from the host plant and bacterial filtrate,» *Journal of insect physiology,* Τόμ. %1 από %259,7, pp. 705-716, 2013.

[15] S. Schulz, The chemistry of pheromones and other semiochemicals II, τόμ. 2, Springer Science & Business Media, 2005.

[16] M. Rützler και L. J. Zwiebel, «Molecular biology of insect olfaction: recent progress and conceptual models,» *Journal of Comparative Physiology A,* τόμ. 191, pp. 777-790, 2005.

[17] C. Gomez Diaz, F. Martin και et al., «The Two Main Olfactory Receptor Families in Drosophila, ORs and IRs: A Comparative Approach,» *Frontiers in Cellular Neuroscience,* τόμ. 12, 2018.

[18] H. R. Schmidt και R. Benton, «Molecular mechanisms of olfactory detection in insects: Beyond receptors,» *Open Biology,* τόμ. 10 (10), 2020.

[19] D. Wicher, . R. Schafer, R. Bauernfeind και M. Stensm, «Drosophila odorant receptors are both ligand-gated and cyclic-nucleotide-activated cation channels,» *Nature,* τόμ. 452 (7190) , pp. 1007-1011, 2008.

[20] R. Benton, «Atypical membrane topology and heteromeric function of Drosophila odorant receptors in vivo,» *PLoS biology,* τόμ. 4.2, 2006.

[21] T. Chertemps και M. Maïbèche, «Odor degrading enzymes and signal termination,» σε *Insect Pheromone Biochemistry and Molecular Biology*, Academic Press, 2021, pp. 619-644.

[22] V. R. G., «Molecular basis of pheromone detection in insects.,» σε *In Comprehensive Insect Physiology Biochemistry Pharmacology and Molecular Biology*, τόμ. 3, London, 2005, p. 753–804.

[23] R. Vogt, «Molecular basis of pheromone detection in insects,» *Comp. Mol. Insect Sci.,* 2005.

[24] L. Z. e. al., «Transcriptomic Identification and Expression Profile Analysis of Odorant-Degrading Enzymes from the Asian Corn Borer Moth, Ostrinia furnacalis,» *Insects,* τόμ. 13, αρ. Chemosensory Genes in Insects, 2022.

[25] N. Pavlidi, . D. Wannes, S. Rombauts, A. Chrisargiris, T. Van Leeuwen και J. Vontas, «Analysis of the Olive Fruit Fly Bactrocera oleae Transcriptome and Phylogenetic Classification of the Major Detoxification Gene Families,» *PLos One,* 2013.

[26] C. Claudianos , H. Ranson , . R. Johnson, S. Biswas , M. Schul και et al., «A deficit of detoxification enzymes: pesticide sensitivity and environmental response in the honeybee,» *Insect Mol Biol.,* τόμ. 15(5), p. 615–636, 2006.

[27] T. Chertemps, «A carboxylesterase, Esterase-6, modulates sensory physiological and behavioral response dynamics to pheromone in Drosophila,» *BMC Biology,* 2012.

[28] H. Wei, «Odorant degrading carboxylesterases modulate foraging and mating behaviors of Grapholita molesta,» *Chemosphere,* τόμ. 270, 2021.

[29] M. E. Tzanakakis, A. P. Economopoulos και J. A. Tsitsipis, «Rearing and nutrition of the olive fruit fly. 1. Improved larval diet and simple containers,» *Journal of economic entomology,* τόμ. 63(1), 1970.

[30] H. Genc, «Modified Agar-Based Diet for Small Scale Laboratory Rearing of Olive Fruit Fly, Bactrocera Oleae (Diptera: Tephritidae),» *The Florida Entomologist,* τόμ. 91, p. 651–656, 2008.

[31] U. Omasits, «Protter: interactive protein feature visualization and integration with experimental proteomic data,» *Bioinformatics,* τόμ. 30, αρ. 6, p. 884–886, 2014.

[32] A. Armenteros, «ignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks,» *Nat Biotechnol,* τόμ. 37, p. 420–423, 2019.

[33] Blirt, Total RNA extraction protocol, 2017.

[34] M. KB, «The unusual origin of the polymerase chain reaction,» *Scientific American,* p. 56–61, 1990.

[35] L. KJ, K. Livak και T. D. Schmittgen, «Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method,» *Methods,* τόμ. 25, αρ. 4, pp. 402-8, 2001.

[36] D. Z, «uMELT: prediction of high-resolution melting curves and dynamic melting profiles of PCR products in a rich web application,» *Bioinformatics,* τόμ. 27, pp. 1019-20, 2011.

[37] M. Loukas, «Genetic Changes in Artificially Reared Colonies of the Olive Fruit Fly (Diptera: Tephritidae),» *Annals of the Entomological Society of America,* p. 159–165, 1985.

[38] Vandesompele, «Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes,» *Genome Biol,* 2002.

[39] E. Sagri, P. Koskinioti, M. E. Gregoriou, K. Tsoumani, Y. Bassiakos και K. Mathiopoulos, «Housekeeping in Tephritid insects: the best gene choice for expression analyses in the medfly and the olive fly,» *Scientific Reports,* τόμ. 7, αρ. 1, pp. 1-9, 2017.

[40] D. Wei, «Genome-wide gene expression,» *Nature,* 2020.

[41] R. Katoch, «RNAi for Insect Control: Current Perspective and Future Challenges,» *ppl Biochem Biotechnol,* 2013.

[42] P. Neuenschwander και S. Michelakis, «Factors affecting the susceptibility of fruits of different olive varieties to attack by Dacus oleae (Gmel.)(Dipt., Tephritidae),» *Zeitschrift für angewandte Entomologie,* τόμ. 100(1-5), pp. 174-188, 1985.

[43] F. Nardi και A. Carapelli, «Population structure and colonization history of the olive fly, Bactrocera oleae (Diptera, Tephritidae)».

[44] T. M, «Small scale rearing: Dacus oleae.,» τόμ. 3, pp. 105-118, 1989.

[45] Gregoriou, M.-E. Gregoriou και K. D. Mathiopoulos, «Knocking down the sex peptide receptor by dsRNA feeding results in reduced oviposition rate in olive fruit flies,» *Archives of Insect Biochemistry and Physiology,* τόμ. 104, αρ. 2, 2020.

[46] A. Fire, «Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans,» *Nature,* pp. 806-811, 1998.

[47] C. Cruz και et al., «RNA Interference-Mediated Knockdown of Male Fertility Genes in the Queensland Fruit Fly Bactrocera tryoni (Diptera: Tephritidae),» *Insects,* τόμ. 96 (3), 2018.

7 Παράρτημα

7.1 Πρωτεϊνικές αλληλουχίες των BolEST6, BolEST7 και BolEST14

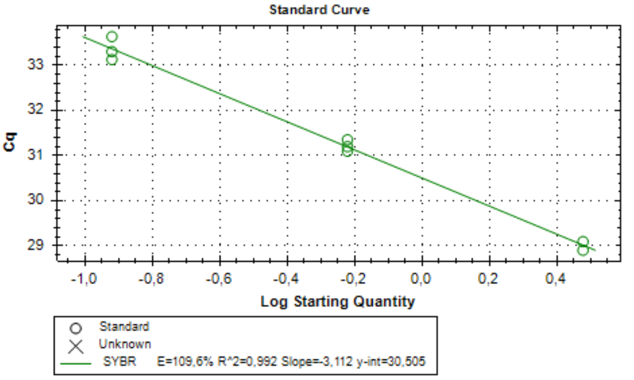
Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται σε μορφή FASTA οι πρωτεϊνικές αλληλουχίες των γονιδίων BolEST6, BolEST7 και BolEST14 που χρησιμοποιήθηκαν στην βιοπληροφορική ανάλυση, όπως συγκεντρώθηκαν από τη βάση δεδομένων του NCBI.

BolEST6	>XP_036215079.1 esterase-5B [Bactrocera oleae] MHIKCLLLFITVLFAADVSAFNDALIVNLPNGRIRGRDNDYYYSYESIPYAEPPLGPLRFESPRPYVRNW NDTFDATREPIECMQWDQYKSGADKLHGVEDCLTVNVYKPKLPAVADVESGIPVVVLIHGGAFMFGSVRA NGHENFMRNGRVIVVKMGYRLGPLGFLSTADTVISGNFGMKDQRLALQWIKTNIARFGGDPTRITVLGFS SGGVAVHLHILAQRNFTEYAKVAVSFSGVAFNPWAITLKTRERAFELAKHLNCPDVSSAQLIKDCLQRKP AAAIVRGVRNFLVFGYNPFTTFGPSIEDAAVEDAFLTRSPQQIVESGDFAQLPWLVSYAAQDGAFNAAEL LQRMPRREELIEVFNDRWYDLAPYNLFYKDTMHTVEQMDDYSVALKRRYLGEKEFSIDTYSNVQRMYTDV LFRNGVEQAIRLQRQHSSCPIYAYVYDNPAEEGIGEALSHRKDVKMGTVHGDDFFLIFNRVGRTKIRADE QIISQKFVRMLENFTAKSDELSFGDCKFVDNVGKEEYQLMFITNDTCINKAILTLPSF
BolEST7	>XP_014098040.2 bile salt-activated lipase [Bactrocera oleae] MKIQLCNIIGIAVVAAALHCAIAIQVNTALGKILGTTLKSRLGADFYAFRGIRYAQSPVGELRFQNPKPY PAWKPTVLDATEDGPMCPQLTENITDLSEDCLRLNIYTKDLYTKKPVVVYLHPGGFYGLSAQSKNFAGPE NLMDRNIVLVTLNYRLGTLGFLALGSAEAPGNAGLKDQVEALRWIQSHIRNFGGDPNAVTLFGYSAGSFS IGLHLMSPMSKELFHRGIMMSASPLGQFIYESRQKRLSDRQAELLNCPKEPSSDLVKCLKKKTMMDFVNT SAEMFDFNWNPVLNWMPVIEEDFGQERFLLENPYKTIQSSNIQRVPIIIGITEYEFIGGAYYLQKNETTR RWLNEEFEKYAPIVLMYERDSLRSRNISKTMRSIYLANATLELPNTLDSFGKLYSDGIIGFEYHRFLDLI SRLTTVYTYLFTYKGRYSHFTYNNEVYGAVHHDELLYLLHVPVKTPLFKKTDPEDVVIENLTRMWAEFAK NGDPNNATDEYLKDFKWPPYTEDKKSYLVIGKDLDIKEGGIFTQHFQIWDELFPVPKFA
BolEST14	>XP_014102991.1 venom carboxylesterase-6 [Bactrocera oleae] MWILHCLRKVTAFCLIAVLVLASGTNGEDNNTAEGLDRELSDMVLTTALGKIRGTLLPSQVGRNFYAFRG IPYAKPPVGALRFKPPEPVDQWFDIFDATFDGPRCPQPGLYSDDVSEDCLRVNIYTRDLPTEKEPNVKKP

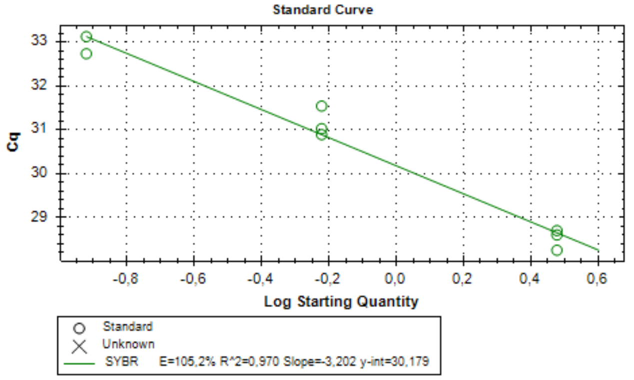
	VIVFIHPGGFYALSGQSKNFAGPQYFMDRNILLVTFNYRLGSLGFMSTGTEEALGNMGLKDQVMLLRWVK LHISRFGGDPNSVTLLGYGAGAISITLHMVSPMSKNLFHKAIIMSGSATGQWPLPVEQLNLAVRQAALLH CTTENLSDMMSCLNSKHYLEYANTLPHMFEFGRNNPLILWKPVIEPDYGQERFLIEDPVRSYQNGNFMKI PIITGMTKDEFAGQAISILESSRLLKTLAHNFEQIAPICFLYSANSPRSQNISMELKNAYFGRESLEYAG TLQPMVELFSDALTGFGVHRFVHLAARLTKVYYYRFSFQGQRSHIYYPTNKPFGVVHHDDLMYLFVEPSV SRMFTEDDREYQIVDKLTRMFTAFAYKGDPNKQSDEKLRDIRWRAFSFKRQHYLDIGEEIVLREGLNTHR YEVWKRLFPLNWKRQSKHDLLDYE

7.2 Πρότυπες καμπύλες εκκινητών για την Real Time PCR

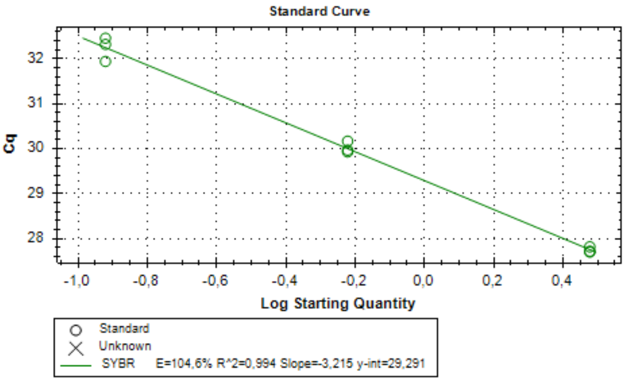
Οι πρότυπες καμπύλες όπως αποδόθηκαν από το πρόγραμμα Bio-Rad CFX Manager (Version 3.1) και οι αποδόσεις (E) των εκκινητών που υπολογίστηκαν για την ποσοτικοποίηση της γονιδιακής έκφρασης παρουσιάζονται στις παρακάτω εικόνες. Στην Εικόνα 7-1 παρουσιάζεται το γράφημα της πρότυπης καμπύλης και κάτω από το γράφημα δίνεται η απόδοση (E) για την ποσοτικοποίηση της έκφρασης του γονιδίου BolEST6. Η πρότυπη καμπύλη των εκκινητών για το BolEST7, BolEST14, RPL19, GAPDH και 14-3-3 zeta παρουσιάζονται αντίστοιχα στην Εικόνα 7-2, Εικόνα 7-3, Εικόνα 7-4, Εικόνα 7-5 και Εικόνα 7-6.



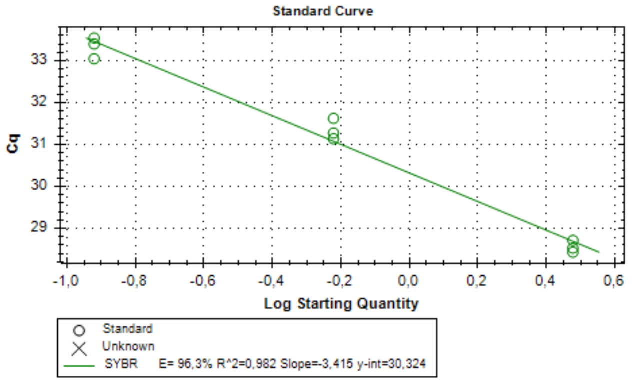
Εικόνα 7-1



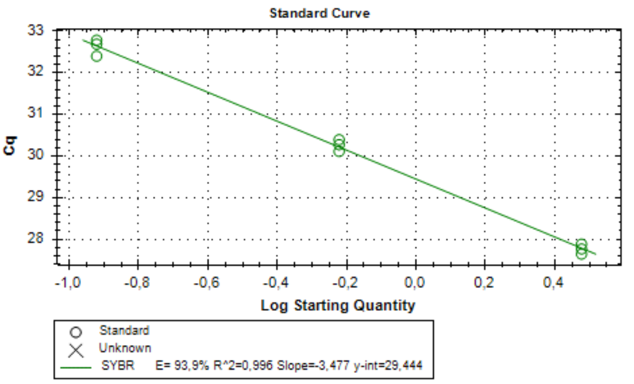
Εικόνα 7-2



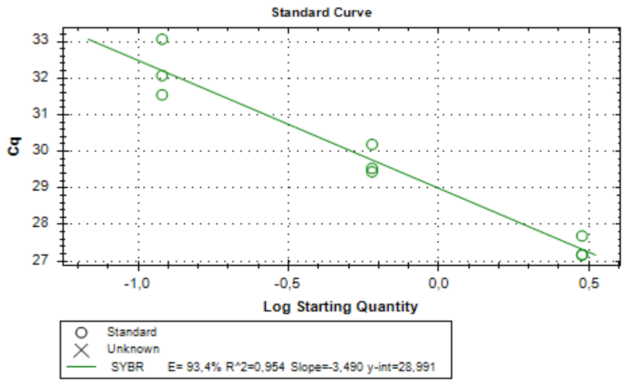
Εικόνα 7-3



Εικόνα 7-4



Εικόνα 7-5



Εικόνα 7-6

7.3 Αλληλουχίες Amplicon από τα σχεδιασμένα σετ εκκινητών

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι αλληλουχίες των προϊόντων ενίσχυσης των γονιδίων-στόχων που παράγονται από τα ζεύγη εκκινητών που σχεδιάστηκαν για την ποσοτικοποίηση της έκφρασης τους με real time PCR.

Πίνακας 7-1: Οι αλληλουχίες (5’→ 3’) των προϊόντων ενίσχυσης από τα ζεύγη εκκινητών που σχεδιάστηκαν για την ποσοτικοποίηση της έκφρασης των γονιδίων BolEST6, BolEST7 και BolEST14.

BolEST6 (PCR product: 101 bp) CATTGAAGATGCCGCTGTTGAGGATGCATTTTTGACGCGCTCACCTCAGCAGATAGTGGAATC AGGTGATTTTGCCCAATTACCTTGGCTAGTGTCGTATG
BolEST7 (PCR product: 126 bp) TTGGGGGCAGACTTCTATGCATTCCGAGGCATACGCTATGCGCAATCGCCTGTTGGAGAATTA CGCTTTCAGAACCCCAAACCATATCCGGCTTGGAAGCCAACAGTTTTGGATGCGACTGAGGAT
BolEST14 (PCR product: 119 bp) ATCTTCGATGCGACCTTCGATGGACCACGTTGTCCGCAGCCGGGTCTTTACAGCGACGATGTT TCAGAGGATTGTTTACGTGTCAACATCTACACACGTGATTTGCCCACAGAGAAGGA

Κατά την in vitro μεταγραφή με την T7 πολυμεράση, μαζί με το προϊόν της real time PCR (amplicon) της επιθυμητής αλληλουχίας μεταγράφεται και ένα μέρος της αλληλουχίας του υποκινητή T7. Πιο συγκεκριμένα η μεταγραφή από το ένζυμο T7 αρχίζει στη βάση G που είναι υπογραμμισμένη στην T7 αλληλουχία, όπως φαίνεται στη συνέχεια, εδώ: TAATACGACTCACTATA**G**GGAGA. Επομένως το μήκος των αλληλουχιών των δίκλωνων RNA (ds RNA) είναι αυτό που φαίνεται στον επόμενο πίνακα (Πίνακας 7-2) και 12 ζεύγη βάσεων συνολικά από την αλληλουχία T7. Ακολουθεί ο πίνακας με τις αλληλουχίες των προϊόντων ενίσχυσης (με real time PCR) των εκκινητών με την ακολουθία T7 στο 5’ άκρο τους, Οι αλληλουχίες αυτές χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία ds RNA μέσω in vitro transcription.

Πίνακας 7-2: Οι αλληλουχίες (5’→ 3’) των προϊόντων ενίσχυσης από τα ζεύγη εκκινητών που σχεδιάστηκαν για την παροδική αποσιώπηση της έκφρασης με (RNAi knockdown) για τα γονίδια BolEST6, BolEST7 και BolEST14.

BolEST6 (PCR product: 199 bp) TCGGTTCAGTGCGTGCTAATGGTCATGAGAATTTTATGCGTAACGGACGTGTAATAGTTGTGAA AATGGGTTATCGCTTGGGTCCTTTGGGTTTTCTTAGTACTGCAGATACCGTTATATCGGGTAATT TCGGTATGAAGGATCAACGTTTGGCGCTGCAATGGATCAAGACGAATATCGCACGTTTTGGTG GTGATCC
BolEST7 (PCR product: 287 bp) GACATTGGGATTCTTGGCTTTGGGCAGCGCTGAGGCACCTGGCAATGCTGGTTTGAAAGACC AAGTTGAAGCGCTACGTTGGATTCAGAGTCATATTCGTAACTTCGGTGGGGATCCAAATGCTGT AACACTTTTCGGCTACAGCGCCGGTAGTTTTAGTATTGGCTTACATTTGATGTCGCCCATGTCA AAAGAATTATTCCACCGCGGCATTATGATGAGTGCATCGCCATTGGGACAATTCATTTACGAATC GCGGCAGAAAAGATTGAGCGATAGACAAGCAG
BolEST14 (PCR product: 343 bp) CTCTTCTCCGATGCTCTAACGGGTTTCGGCGTCCATCGCTTTGTACATTTGGCGGCGCGTTTG ACCAAAGTCTACTACTATCGTTTCAGCTTTCAGGGGCAACGCAGCCATATTTATTATCCAACTAA TAAACCCTTTGGTGTTGTACATCATGATGATCTGATGTATTTATTTGTGGAACCATCTGTTAGCC GCATGTTCACTGAGGACGATCGAGAATACCAAATTGTTGATAAGCTAACGAGAATGTTCACAGC ATTCGCTTATAAAGGCGATCCCAACAAGCAAAGTGACGAAAAGTTGCGCGATATACGTTGGCG CGCTTTCAGTTTCAAGCGTCAGC

7.4 Πρωτόκολλα αντίδρασης Real Time PCR

Η ενίσχυση σε PCR σε πραγματικού χρόνου διεξήχθη χρησιμοποιώντας το ακόλουθο πρόγραμμα θερμικού κύκλου: αρχική αποδιάταξη (denaturation) στους 95,0°C για 3', ακολουθούμενη από denaturation step στους 95,0°C για 15". Το στάδιο υβριδοποίησης (annealing) πραγματοποιήθηκε στους 55,0°C για 15", και η επέκταση (extension) έλαβε χώρα στους 72,0°C για 30", κατά τη διάρκεια των οποίων λήφθηκε μια ανάγνωση πλάκας για τη μέτρηση του φθορισμού. Τα βήματα 2 έως 5 επαναλήφθηκαν για συνολικά 39 κύκλους, με αποδιάταξη στους 95,0°C για 15", υβριδοποίηση στους 55,0°C για 15" και επέκταση στους 72,0°C για 30" με ανάγνωση πλάκας σε κάθε κύκλο. Μετά τους κύκλους ενίσχυσης, διεξήχθη ανάλυση καμπύλης αποδιάταξης (melting curve analysis) αυξάνοντας σταδιακά τη θερμοκρασία από 55,0°C σε 95,0°C σε βήματα των 0,5°C, με κάθε βήμα να διαρκεί 5". Οι αναγνώσεις των πλακών ελήφθησαν σε κάθε αύξηση της θερμοκρασίας. Το πρωτόκολλο PCR σε πραγματικό χρόνο ολοκληρώθηκε μετά την ανάλυση της καμπύλης αποδιάταξης.

Για την ενίσχυση του γονιδίου BolEST14 με real time PCR χρησιμοποιήθηκε το ίδιο πρωτόκολλο με τη διαφορά στη θερμοκρασία υβριδοποίησης που ήταν 57,0°C.

Η συγκέντρωση των εκκινητών για την ενίσχυση και την ποσοτικοποίηση της έκφρασης των γονιδίων BolEST6, BolEST7, BolEST14, RPL19 και 14-3-3 zeta ήταν για κάθε εκκινητή στο master mix μίας αντίδρασης 200 nM (0,3 μl per reaction). Για το γονίδιο GAPDH ήταν αντίστοιχα 300 nM (0,45 μl per reaction).