



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**  
**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ & ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΗΣ**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ:**

«Μελέτη της απόκρισης των οσφρητικών υποδοχέων του δάκου της ελιάς, *Bactrocera oleae*, στην υδροξυτυροσόλη»

Ευγενία Νικολαΐδου



*Λάρισα, Φεβρουάριος 2019*

«Μελέτη της απόκρισης των οσφρητικών υποδοχέων του δάκου της ελιάς, *Bactrocera oleae*, στην υδροξυτυροσόλη»

“Study of *Bactrocera oleae* olfactory receptors’ response to hydroxytyrosol”

**Ευγενία Νικολαΐδου**

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής, του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας υπό την επίβλεψη του καθηγητή Μοριακής Βιολογίας, κ. Μαθιόπουλου Κωνσταντίνου και της διδάσκουσας Μοριακής Βιολογίας ΠΔ 407/80, κ. Τσουμάνη Κωνσταντίνας.

Τριμελής εξεταστική επιτροπή

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

**Παπαδοπούλου Καλλιόπη:** Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

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

## Ευχαριστίες

“Για ακόμα μια φορά (βρισκόμαστε) στην επιφάνεια της θάλασσας”... Η ατάκα των πειρατών στα γνωστά κόμιξ του Αστερίξ, που για πολλοστή φορά στην καριέρα τους είχαν την ατυχία να πέσουν πάνω στους Γαλάτες και τον “μολοσσό” τους. Μια φράση που με συνόδευε αυτά τα 2 πολύ δύσκολα χρόνια, κάθε φορά που η ζωή δεν έδειχνε και το πιο ευγενικό πρόσωπό της... Κάτι για να μου θυμίζει ότι παρόλο που η υγεία μου και συνάμα η ψυχολογία μου παρομοίαζε βυθισμένο καράβι, με πίστη, υπομονή και επιμονή οι σκόρπιες σανίδες θα ξαναγίνονταν ένα νέο πλοίο. Γιατί ως γνωστό, όσες φορές και να βυθιζόταν το εν λόγω καράβι, πάντα οι πειρατές εμφανίζονταν με ένα νέο στο επόμενο κεφάλαιο και την επόμενη... “ατυχή” συνάντηση με τους Γαλάτες...

### Και να που φτάσαμε στο τέλος αυτής της περιπέτειας...

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον εαυτό μου που άντεξε το λούκι και παρά την όλη ταλαιπωρία με γιατρούς, εξετάσεις και τα συναφή, είχε ακόμα μερικά λειτουργικά εγκεφαλικά κύτταρα για να ολοκληρωθεί το γράψιμο αυτής της πτυχιακής.

Εν συνεχεία, θέλω να ευχαριστήσω τους γονείς μου που έκαναν τα αδύνατα δυνατά για να βελτιωθεί η κατάσταση. Ευχαριστώ την μητέρα μου που τα παράτησε όλα και εγκαταστάθηκε στη Λάρισα για να με βοηθήσει στην αποκατάσταση. Για την ατελείωτη υπομονή της και που στεκόταν βράχος δίπλα μου. Ευχαριστώ τον πατέρα μου που δεν παραπονέθηκε που έμεινε μόνος για ένα χρόνο και με άφηνε να τον “πρήζω” με τα ενδιαφέροντά μου.

Επίσης, θέλω να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ στον επιβλέποντά μου κ. Μαθιόπουλο που εκτός από λαμπρός επιστήμονας, είναι ΑΝΘΡΩΠΟΣ με όλη τη σημασία της λέξης! Ένας πραγματικός δάσκαλος που ενδιαφέρθηκε για το πρόβλημα μου και με στήριξε ενώ δεν ήταν υποχρεωμένος να το κάνει!

Ακόμη, θέλω να ευχαριστήσω ιδιαίτερος την κ. Τσουμάνη η οποία ήταν πάντα στο πλάι μου κατά την εκπόνηση αυτής της πτυχιακής, λύνοντας τις απορίες μου και μεταλαμπαδεύοντας τις γνώσεις της! Η μάχη μας ενάντια στην “εξωγήινη εισβολή” των ακάρεων στα κουτιά των δάκων θα μου μείνει αξέχαστη!

Επιπλέον, θέλω να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα παιδιά του εργαστηρίου για την ξεχωριστή συνεισφορά τους σε αυτό το ταξίδι.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ για τους φίλους μου που παρόλο που ήμουν μουρτζούφλα τελευταία, παρέμηναν στο πλευρό μου (Αλίκη, Λένα, Ανδρέας, Μανάφας & ΣΙΑ, Στέλιος, Daniel κλπ.). Σας αγαπώ όλους!!!

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα έντομα-παράσιτα αποτελούν μια από τις πρωταρχικές απειλές για τα φυτά οικονομικού ενδιαφέροντος, επηρεάζοντας αρνητικά την παραγωγικότητά τους. Παρά τις προσπάθειες βελτίωσης της αποτελεσματικότητας των μεθόδων ελέγχου, οι σύγχρονες πρακτικές υστερούν σε ειδοειδικότητα με αποτέλεσμα να υπάρχει περιβαλλοντικός αντίκτυπος. Για αυτό το λόγο, υπάρχει αυξανόμενη ανάγκη για εναλλακτικές, φιλικές προς το περιβάλλον και ταυτόχρονα ειδοειδικές μεθόδους ελέγχου εντόμων-παρασίτων. Λαμβάνοντας υπόψη τη στενή σύνδεση μεταξύ της όσφρησης και της ικανότητας των εντόμων να εντοπίζουν τον ξενιστή/σύντροφο/πηγή τροφής τους, η μελέτη του οσφρητικού συστήματος μπορεί να συντελέσει στην επίλυση του προβλήματος. Στην παρούσα πτυχιακή πραγματοποιήθηκε μοριακή ανάλυση του οσφρητικού συστήματος του δάκου της ελιάς, *Bactrocera oleae*, που είναι το κύριο παράσιτο των ελαιόδεντρων. Η μελέτη επικεντρώθηκε σε ένα από τα σημαντικότερα μοριακά συστατικά του οσφρητικού του δάκου, τους **οσφρητικούς υποδοχείς** (odorant receptors, **ORs**). Ο δάκος είναι το μοναδικό έντομο του οποίου η ανάπτυξη συνδέεται αποκλειστικά με τον ελαιόκαρπο. Η εξειδίκευση σε ένα μόνο ξενιστή πρέπει να συνοδεύεται από αντίστοιχη ικανότητα του εντόμου να ανιχνεύει πτητικές ενώσεις, χαρακτηριστικές του ελαιόδεντρου/καρπού. Μια τέτοια ένωση είναι η **υδροξυτυροσόλη** (hydroxytyrosol). Πρόκειται για πτητική, φαινολική ένωση, παρούσα μόνο σε φυτά του γένους *Olea* και μεταβολικό παράγωγο της πιο άφθονης φαινολικής ένωσης της ελιάς, της ολευρωπαΐνης. Στόχος αυτής της εργασίας ήταν η ανάλυση της απόκρισης συγκεκριμένων γονιδίων οσφρητικών υποδοχέων του δάκου, μετά από έκθεση των εντόμων σε υδροξυτυροσόλη. Τα εξεταζόμενα γονίδια OR επιλέχθηκαν μετά από φυλογενετική ανάλυση με ομόλογους υποδοχείς άλλων συγγενικών ειδών εντόμων, βάσει δύο κριτηρίων: 1) ειδοειδικότητα όσον αφορά τον δάκο ή 2) ύπαρξη ομολογίας με γονίδια OR που κωδικοποιούν υποδοχείς που ανιχνεύουν φαινολικές ενώσεις στη *Drosophila melanogaster*. Τα γονίδια που επιλέχθηκαν ήταν τα Or63, Or63 ii, Or63 iii και Or94. Για την ανάλυση γονιδιακής έκφρασης, απομονώθηκαν από δάκους οι εξής ιστοί: κεφάλια-κεραίες, γναθικές προσακτρίδες και θώρακες. Τα αποτελέσματα διέφεραν μεταξύ των διαφορετικών γονιδίων και ιστών. Στις γναθικές προσακτρίδες δεν παρατηρήθηκε έκφραση κανενός από τα εξεταζόμενα γονίδια. Τα γονίδια Or63 ii και Or63 iii δεν εκφράζονται σε κανέναν ιστό ακόμα και μετά από έκθεση σε υδροξυτυροσόλη. Στην περίπτωση των κεφαλιών-κεραιών, το γονίδιο Or63 παρουσίασε μη στατιστικά σημαντική αύξηση έκφρασης μετά από έκθεση σε υδροξυτυροσόλη ενώ το Or94 εμφάνισε έκφραση μόνο υπό την παρουσία της υδροξυτυροσόλης. Δηλαδή, το Or94 υπερεκφράζεται παρουσία υδροξυτυροσόλης. Τέλος στους θώρακες, τόσο το Or63 όσο και το Or94 παρουσίασαν μη στατιστικά σημαντική μείωση έκφρασης μετά από έκθεση σε υδροξυτυροσόλη. Τα παραπάνω αποτελέσματα αποτελούν μια πρώτη προσέγγιση του ρόλου που διαδραματίζουν αυτά τα γονίδια στην απόκριση του δάκου στην υδροξυτυροσόλη. Ωστόσο, χρειάζεται περαιτέρω έρευνα πάνω στους ORs του δάκου για να ολοκληρωθεί η αντιστοίχισή τους με συγκεκριμένες οσμές και να ελεγχθεί η απόκρισή τους στα διάφορα πτητικά της ελιάς. Η επίλυση των παραπάνω ζητημάτων

μπορεί να συμβάλλει δραστικά στη βελτίωση των τωρινών μεθόδων καταπολέμησης εντόμων-παρασίτων ή ακόμα και να οδηγήσει στη γέννηση νέων, πιο αποτελεσματικών μεθόδων.

## ABSTRACT

Insect pests constitute a major threat for plants of economic interest and impact their productivity negatively. Although efforts have been made to increase insecticide effectiveness while keeping the environmental toll to minimum, current control methods fall short when it comes to species-specific targeting. Therefore, there is a rising need for alternative, environmental friendly and species-specific methods of insect pest control. Taking into account the close connection between olfaction and the insects' ability to pinpoint potential plant hosts/mates/food sources, the solution may lie in the olfactory system. For that reason, we conducted a molecular analysis of the olfactory system of the olive fruit fly, *Bactrocera oleae*, the prevalent insect pest of olive trees. The study was focused on one of the most, if not the most, important molecular component of the *Bactrocera oleae*'s olfactory system, the **odorant receptors** (ORs). The olive fruit fly is the only pest whose life is associated exclusively on olive fruits. That host-specific preference must come with the ability to detect volatile compounds characteristic of the olive tree/fruit. An odorant that fits the description is **hydroxytyrosol**, a volatile, phenolic compound present only in plants of the genus *Olea* and a metabolite of the most abundant phenolic compound of olives, oleuropein. In this thesis, we aimed to analyze the expression of certain *B. oleae* olfactory receptors after exposure to hydroxytyrosol. OR genes were selected after phylogenetic analysis with homologous genes of other relative insect species, based on two criteria: 1) the OR genes were species-specific to *B. oleae* or 2) the OR genes were homologous to *Drosophila melanogaster*'s genes that encode ORs, which respond to phenolic compounds. The selected genes were Or63, Or63 ii, Or63 iii and Or94. For this expression analysis, tissue was isolated from: heads-antennae, maxillary palps and thoraces. Results varied across different genes and tissues. No expression was observed in maxillary palps across all four studied genes. Genes Or63 ii and Or63 iii showed no expression in any tissues examined, even after exposure to hydroxytyrosol. In heads-antennae, Or63 presented a non-statistically significant higher expression after exposure to hydroxytyrosol, whereas Or94 showed expression only in the presence of hydroxytyrosol. In thoraces, both Or63 and Or94 presented a non-statistically significant lower expression after exposure to hydroxytyrosol. The above results offer a first glance at the role of these genes in hydroxytyrosol response. However, further research on *B. oleae*'s ORs is required in order to match them to their respective odorants and to uncover how they respond to different volatiles of the olive. The above knowledge can contribute to the improvement of existing pest control methods or even result in the development of new, more efficient ones.

## Περιεχόμενα

1	ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	7
1.1	Χημειο-αίσθηση, η αντίληψη των ενώσεων γύρω μας.....	8
1.2	Η αίσθηση της όσφρησης.....	8
1.3	Το οσφρητικό σύστημα στα έντομα.....	8
1.4	Μοριακά συστατικά του οσφρητικού συστήματος.....	10
1.4.1	Οσμοδεσμευτικές πρωτεΐνες.....	10
1.4.2	Μοριακή βάση της εξειδίκευσης των OSNs.....	12
1.4.3	Η οικογένεια των IR υποδοχέων.....	13
1.4.4	Η οικογένεια των OR υποδοχέων.....	13
1.5	Ο δάκος της ελιάς.....	22
1.5.1	Βιολογικός κύκλος.....	22
1.5.2	Εντοπισμός και επιλογή ξενιστή.....	23
1.6	Πτητικά και φαινολικά συστατικά της ελιάς.....	25
1.6.1	Ολευρωπαΐνη.....	25
1.6.2	Υδροξυτυροσόλη.....	26
2	ΣΚΟΠΟΣ.....	28
3	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	28
3.1	Στελέχη δάκου και συνθήκες διατήρησης.....	28
3.2	Έκθεση σε υδροξυτυροσόλη και απομόνωση ιστών.....	28
3.3	Απομόνωση RNA.....	29
3.4	Επεξεργασία με DNase (DNase treatment of RNA).....	31
3.5	Σύνθεση cDNA με M-MLV αντίστροφη μεταγραφάση (M-MLV Reverse Transcriptase).....	32
3.6	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR).....	33
3.6.1	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Quantitative Real Time PCR, QRT-PCR).....	35
3.7	Απόδοση ενίσχυσης (Amplification efficiency).....	37
3.8	Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αгарόζης.....	38
3.9	In silico ανάλυση.....	39
3.9.1	BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).....	39
3.9.2	MEGA6.....	40
3.9.3	Fig Tree.....	41
3.9.4	MAFFT.....	41
3.9.5	TMHMM.....	41

3.9.6	Omiga .....	42
3.9.7	PrimerQuest Tool .....	42
3.9.8	OligoAnalyzer 3.1 .....	43
4	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....	44
4.1	Φυλογενετική ανάλυση ORs δάκου .....	44
4.2	Επιλογή γονιδίων OR δάκου .....	47
4.3	Επιλογή περιοχών σχεδίασης εκκνητών για qRT-PCR.....	50
4.4	Έλεγχος εκκνητών.....	50
4.5	Ανάλυση των επιπέδων έκφρασης των τεσσάρων γονιδίων με qRT-PCR.....	52
5	ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	57
5.1	Φυλογενετική μελέτη οικογένειας ORs στο δάκο.....	58
5.2	Έλεγχος απόκρισης ORs στην υδροξυτυροσόλη.....	62
5.3	Επίλογος-Μελλοντικές προσεγγίσεις.....	65
6	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ .....	66
7	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	70

## 1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ



## 1.1 Χημειο-αίσθηση, η αντίληψη των ενώσεων γύρω μας

Η χημειο-αίσθηση (chemosensation), δηλαδή η ικανότητα των οργανισμών να ανιχνεύουν χημικές ενώσεις στο περιβάλλον τους, αποτελεί μια από τις παλαιότερες και σημαντικότερες αισθήσεις. Η παρουσία της είναι εμφανής ακόμα και σε μονοκύτταρους οργανισμούς (π.χ βακτήρια) που μπορούν να αντιλαμβάνονται χημικές περιβαλλοντικές μεταβολές και να αποκρίνονται κατάλληλα με χημειοτακτικές συμπεριφορές, όπως προσέλκυση από αυξανόμενες συγκεντρώσεις θρεπτικών (Adler, 1966) και απώθηση παρουσία βλαβερών ενώσεων (Benon and Fridovich, 1996). Κατά την εξελικτική πορεία, οι ανώτεροι οργανισμοί ανέπτυξαν την χημειο-αίσθηση σε δύο διακριτά συστήματα που διαφέρουν ως προς τη φύση των ερεθισμάτων που ανιχνεύουν:

- 1) το οσφρητικό σύστημα (olfactory system) που αναγνωρίζει πτητικά ερεθίσματα και
- 2) το γευστικό σύστημα (gustatory system) που αναγνωρίζει υδατοδιαλυτά ερεθίσματα.

Στο πλαίσιο αυτής της εργασίας θα επικεντρωθούμε στην αίσθηση της όσφρησης με ιδιαίτερη έμφαση στο οσφρητικό σύστημα των εντόμων.

## 1.2 Η αίσθηση της όσφρησης

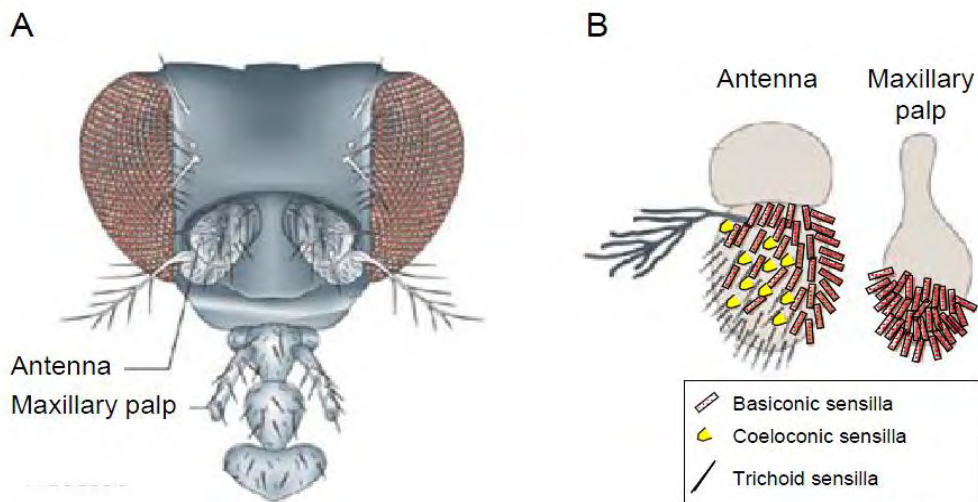
Σχεδόν όλα τα ασπόνδυλα και σπονδυλωτά μπορούν να ανιχνεύουν και να αποκρίνονται σε πτητικά χημικά του περιβάλλοντός τους, καθώς έχουν αναπτύξει μια μοναδική «χημική γλώσσα» που καθορίζει τη συμπεριφορά του οργανισμού ανάλογα με τη φύση του οσμηρού ερεθίσματος (odorant). Ταυτόχρονα, κάθε είδος ρυθμίζει το οσφρητικό του σύστημα, ώστε να διακρίνει ανάμεσα στην πληθώρα των διαφορετικών οσμών αυτές που σχετίζονται με παράγοντες απαραίτητους για την επιβίωση. Η όσφρηση διαμεσολαβεί σε αποκρίσεις όπως: η αναγνώριση και επιλογή συντρόφου, η εύρεση κατάλληλου υποστρώματος για ωοαπόθεση, ο εντοπισμός τροφής και η αποφυγή θηρευτών. Καθίσταται λοιπόν σαφές, ότι η κατανόηση της σύνδεσης ανάμεσα στο οσμηρό ερέθισμα και στην τελική απόκριση-συμπεριφορά είναι απαραίτητη για να αποκρυπτογραφήσουμε τα πολύπλοκα συστήματα επικοινωνίας της φύσης. Φυσικά, αυτό το εγχείρημα προϋποθέτει άρτια γνώση του οσφρητικού συστήματος στο σύνολό του.

## 1.3 Το οσφρητικό σύστημα στα έντομα

### *Δομή και οργάνωση του οσφρητικού*

Στα ενήλικα έντομα, οι οσφρητικοί αισθητήριοι νευρώνες (olfactory sensory neurons, OSNs) εντοπίζονται στα δύο κύρια οσφρητικά όργανα της κεφαλής, τις κεραίες (antennae) και τις γναθικές προσακτρίδες (maxillary palps) (Keil, 1999) (βλ. Εικ. 1Α). Οι δενδρίτες των οσφρητικών νευρώνων σχηματίζουν τριχοειδείς δομές γνωστές ως αισθητικά τριχίδια (sensilla), με το κάθε τριχίδιο να εμπεριέχει έναν έως πενήντα OSN ανάλογα με το είδος του εντόμου (Pellegrino, 2011).

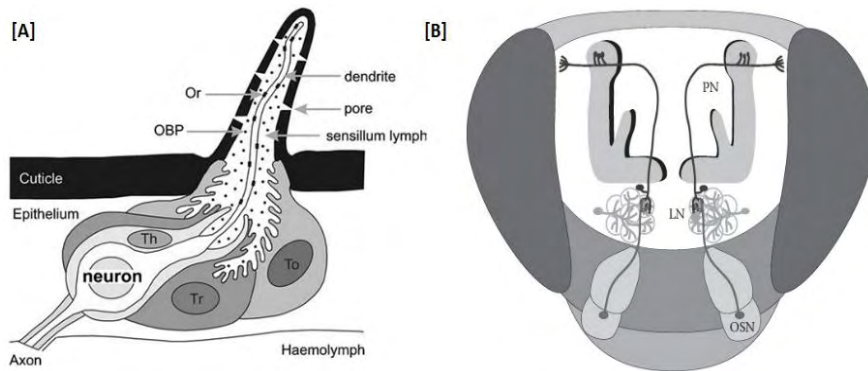




**Εικόνα 1. Ανατομία του περιφερικού οσφρητικού συστήματος των εντόμων** (Kaupp, 2010). (A) Απεικονίζεται το κεφάλι ενήλικου εντόμου *Drosophila melanogaster*. Σημαίνονται τα δύο οσφρητικά όργανα, οι κεραίες και οι γναθικές προσακτρίδες. (B) Σχηματική αναπαράσταση των διαφορετικών τύπων τριχιδίων που περιβάλλουν τα οσφρητικά όργανα στη *D. melanogaster*.

Στη δροσόφιλα, όλα τα οσφρητικά τριχίδια και οι αντίστοιχοι OSNs έχουν χαρακτηριστεί με ηλεκτροφυσιολογία ως προς τις οσμές που ανιχνεύουν και έχουν κατηγοριοποιηθεί βάσει προφίλ απόκρισης (de Bruyne et al. 2001, Yao et al. 2005, van der Goes van Naters and Carlson 2007). Έτσι, διακρίνουμε μορφολογικά και λειτουργικά τρεις κύριους τύπους αισθητικών τριχιδίων (βλ. Εικ. 1B): 1) τα βασικωνικά (basiconic), 2) τα κοιλοκωνικά (coelonic) και 3) τα τριχοειδή (trichoid). Στις κεραίες εντοπίζονται και οι τρεις τύποι ενώ στις γναθικές προσακτρίδες, που είναι ανατομικά απλούστερες, εντοπίζονται μόνο βασικωνικά αισθητικά τριχίδια. Αντίστοιχη μορφολογία και κατανομή παρουσιάζουν τα αισθητικά τριχίδια σε έντομα της οικογένειας των Tephritidae, όπως στο δάκο της ελιάς (Crtjcar et al. 1989).

Η επιφάνεια των αισθητικών τριχιδίων είναι διάτρητη από πόρους (Stocker, 2001) μέσω των οποίων εισέρχονται οι οσμές στο λεμφικό υγρό που περιβάλλει τους OSNs. Ακολούθως, τα μόρια της οσμής παραλαμβάνονται από οσμοδεσμευτικές πρωτεΐνες (odorant binding proteins, OBPs) και μεταφέρονται στην επιφάνεια των δενδριτών των OSNs όπου εδράζονται οι οσφρητικοί υποδοχείς (olfactory receptors, ORs). Η πρόσδεση της οσμής στον κατάλληλο OR οδηγεί σε ενεργοποίηση του αντίστοιχου OSN και μετάδοση του ερεθίσματος σε συγκεκριμένο σπείραμα (glomerulus) του λοβού της κεραίας (antennal lobe, AL). Ο λοβός της κεραίας έχει ανάλογη λειτουργία με τον οσφρητικό βολβό (olfactory bulb) των σπονδυλωτών και αποτελεί το πρώτο σημείο ελέγχου της όσφρησης στον εγκέφαλο των εντόμων (Strausfeld and Hildebrand, 1999). Από εκεί και πέρα, το σήμα μεταφέρεται με άλλους νευρώνες (projection neurons, PN) σε ανώτερα τμήματα του εγκεφάλου για να καταλήξουμε στην τελική απόκριση-συμπεριφορά του εντόμου.



**Εικόνα 2. Γενική οργάνωση ενός οσφρητικού τριχιδίου και του οσφρητικού συστήματος.**

[A] Απεικονίζεται το οσφρητικό τριχίδιο ενός εντόμου. Με βέλη σημαίνονται οι θέσεις των OBPs και των ORs, στη λέμφο και την επιφάνεια του δενδρίτη, αντίστοιχα (Jacquin-Joly and Merlin, 2004). [B] Σχηματική αναπαράσταση του κεφαλιού της *D. melanogaster* με τα κυκλώματα του εγκεφάλου ορατά. Παρουσιάζονται οι OSNs στις κεραίες και η προεκβολή τους στον λοβό της κεραίας (antennal lobe, AL). Επίσης, φαίνεται η αλληλεπίδραση των OSNs με τους τοπικούς νευρώνες (local neurons, LN) και τους νευρώνες προεκβολής (projection neurons, PN) που στοχεύουν τα ανώτερα τμήματα του εγκεφάλου (προσαρμογή εικόνας από Galizia and Sachse, 2010).

## 1.4 Μοριακά συστατικά του οσφρητικού συστήματος

Στη διαδικασία της όσφρησης τα επιμέρους γεγονότα, από την είσοδο της οσμής στη λέμφο έως την μεταφορά της στην επιφάνεια του OSN και την επακόλουθη ενεργοποίησή του, διαμεσολαβούνται από διακριτές ομάδες μορίων. Στον καταρράκτη μεταγωγής σήματος που συνοδεύει την αναγνώριση οσμών συμμετέχουν δύο κύριες κατηγορίες πρωτεϊνών:

- 1) **οσμοδεσμευτικές πρωτεΐνες:** εδώ ανήκουν οι πρωτεΐνες δέσμευσης φερομονών (pheromone-binding proteins, PBPs), οι πρωτεΐνες δέσμευσης γενικών οσμών (general odorant-binding proteins, GOBPs) και οι antennal specific proteins (ASPs) (Zhou, 2010).
- 2) **υποδοχείς:** περιλαμβάνουν τους οσφρητικούς και ιονοτροπικούς υποδοχείς.

### 1.4.1 Οσμοδεσμευτικές πρωτεΐνες

Οι οσμοδεσμευτικές πρωτεΐνες (odorant binding proteins, OBPs) είναι μια διαδεδομένη και πολυπληθής οικογένεια που εμφανίζεται τόσο στα σπονδυλωτά όσο και στα έντομα. Στη δροσόφιλα, 61 OBPs κωδικοποιούνται από 52 γονίδια (Larter et al. 2016) και εντοπίζονται κυρίως στη λέμφο των οσφρητικών τριχιδίων, όπου εδράζονται οι δενδρίτες των OSNs (Shanbhag et al. 2001). Αξιοσημείωτη είναι η ικανότητα τους να προσδένουν οσμηρές ενώσεις, με διαφορές όμως στην εξειδίκευση και την ευαισθησία μεταξύ διαφορετικών OBPs (Leal et al. 2005, Gong et al. 2010). Επίσης έχει παρατηρηθεί ότι διαφορετικές OBPs εκφράζονται σε διαφορετικούς τύπους αισθητικών τριχιδίων των κεραίων ενός εντόμου (Pikielny et al., 1994, Schultze et al. 2013) ενώ έχουν βρεθεί και μέλη της οικογένειας στο γευστικό σύστημα (Pikielny et al. 1994, Galindo and Smith 2001). Πρέπει να σημειωθεί ότι οι OBPs δεν εκφράζονται στους OSNs αλλά σε άλλους τύπους κυττάρων των

οσφρητικών τριχιδίων. Τα κύτταρα που εκφράζουν OBPs και μετά τις απελευθερώνουν εξωκυτταρικά στην αισθητήρια λέμφο είναι τα θεκογενή (thecogen, Th), τορμογενή (tormogen, To) και τα τριχογενή (trichogen, Tr) (Larter et al. 2016) (βλ. Εικ. 2Α).

### **Δομή**

Τα μέλη της οικογένειας OBPs χαρακτηρίζονται από υψηλή διαφοροποίηση, με την ομολογία της αμινοξικής αλληλουχίας να κυμαίνεται μόλις στο 20% (Hekmat-Scafe et al. 2002). Παρά τις μεγάλες διαφορές τους, υπάρχουν δομικά χαρακτηριστικά κοινά για την πλειοψηφία των OBPs. Γενικά, οι OBPs είναι μικρές, υδατοδιαλυτές πρωτεΐνες μεγέθους περίπου 16 kDa που φέρουν μοτίβα  $\alpha$ -έλικας και ένα πεπτιδικό σινιάλο στην αρχή του μορίου τους (Zhou, 2010). Το βασικότερο χαρακτηριστικό τους, που αποτελεί και την «υπογραφή» της οικογένειας, είναι η παρουσία 6 πολύ συντηρημένων κυστεϊνών με συγκεκριμένη απόσταση ανάμεσά τους (Breer et al. 1990, Raming et al. 1990). Ο αριθμός των αμινοξέων ανάμεσα στη 2<sup>η</sup> και 3<sup>η</sup> κυστεΐνη είναι πάντα 3. Αντίστοιχα, ανάμεσα στην 5<sup>η</sup> και 6<sup>η</sup> κυστεΐνη εντοπίζονται 8 αμινοξέα. Αυτές οι κυστεΐνες είναι δομικά σημαντικές καθώς σχηματίζουν δισουλφιδικούς δεσμούς που συγκρατούν την τριτοταγή δομή του μορίου. Η τριτοταγής δομή των OBPs είναι πολύ συμπαγής χάρη στην παρουσία τριών δισουλφιδικών γεφυρών που οδηγούν στην αναδίπλωση των  $\alpha$ -ελίκων ώστε να σχηματιστεί μια κωνική κοιλότητα όπου δεσμεύονται οι οσμές (Zhou, 2010).

### **Ρόλος-Λειτουργία**

Παρά τις πολυπληθείς μελέτες, ο ακριβής ρόλος των OBPs στο οσφρητικό σύστημα δεν έχει εξακριβωθεί. Οι OBPs έχουν συνδεθεί με μια σειρά πιθανών λειτουργιών: 1) προσδένουν υδρόφοβες οσμές και συμμετέχουν στην διαλυτοποίηση και μεταφορά τους στους υποδοχείς των OSNs, διαμέσου της λέμφου 2) επιταχύνουν τον τερματισμό της οσφρητικής απόκρισης απομακρύνοντας μόρια οσμής από τους υποδοχείς ή τη λέμφο και 3) συμμετέχουν στην αναγνώριση των οσμών *in vivo* (Larter et al. 2016). Όσον αφορά την αναγκαιότητα των OBPs στην αναγνώριση των οσμών, τα δεδομένα δίστανται. Έως σήμερα μόνο μια OBP έχει εξεταστεί πλήρως ως προς τον φυσιολογικό της ρόλο στο οσφρητικό σύστημα της *Drosophila melanogaster*. Πρόκειται για την Obp76a, γνωστή ως LUSH (Xu et al. 2005, Laughlin et al. 2008, Gomez-Diaz et al. 2013). Η παρουσία της Obp76a είναι απαραίτητη για την φυσιολογική απόκριση του υποδοχέα Or67d στην φερομόνη cVA (cis-vaccenyl acetate). Διαγραφή της LUSH προκαλεί μείωση της ηλεκτροφυσιολογικής και συμπεριφορικής απόκρισης του εντόμου στην φερομόνη cVA (Ha and Smith, 2006). Ωστόσο, έχει παρατηρηθεί ενεργοποίηση του Or67d από την cVA απουσία της LUSH (Benton et al. 2007, van der Goes van Naters and Carlson 2007, Gomez-Diaz et al. 2013, Li et al. 2014). Επίσης, πειράματα ετερόλογης έκφρασης ORs σε *Xenopus oocytes* αποδεικνύουν ότι μια οσμηρή ένωση είναι ικανή να ενεργοποιεί κατευθείαν τους ORs και δεν απαιτεί την παρουσία OBPs (Wetzel et al. 2001, Sun et al. 2013, Chang et al. 2015). Όμως, αυτό δεν συνεπάγεται ότι οι OBPs είναι παθητικοί μεταφορείς της οσμής στους ORs. Αντίθετα, η επανάληψη των ίδιων

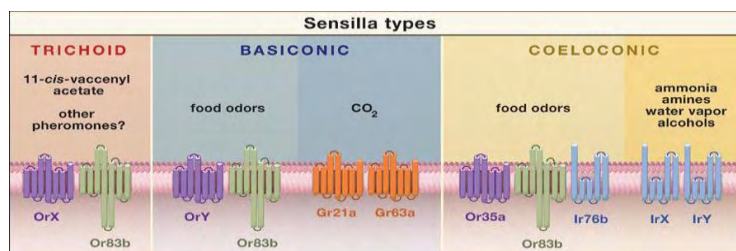
πειραμάτων παρουσία OBPs υποδεικνύει ότι παίζουν ρόλο στη ρύθμιση της ευαισθησίας, την ένταση της απόκρισης και στην εξειδίκευση των ORs ως προς τις οσμές που αναγνωρίζουν (Sun et al. 2013, Chang et al. 2015).

#### 1.4.2 Μοριακή βάση της εξειδίκευσης των OSNs

Με τα έως τώρα δεδομένα από τη δροσόφιλα φαίνεται ότι οι OSNs των βασικωνικών τριχιδίων αποκρίνονται κυρίως σε οσμές που σχετίζονται με την πηγή τροφής (de Bruyne et al. 2001, Jefferis et al. 2007), οι ενώ αυτοί των τριχοειδών σε φερομόνες (Jefferis et al. 2007, van der Goes van Naters and Carlson 2007). Ιδιαίτερη περίπτωση είναι αυτή των κοιλοκωνικών OSNs, που αποκρίνονται στην αμμωνία και σε άλλες αμίνες καθώς και σε διαφορές στην υγρασία (Yao et al. 2005). Οι OSNs μπορούν να αναγνωρίζουν την χημική ταυτότητα του οσμηρού ερεθίσματος, την ένταση του (δηλαδή τη συγκέντρωσή του) αλλά και τη διάρκεια έκθεσης. Ανάλογα με τα χαρακτηριστικά της οσμής, ο OSN μπορεί να αποκρίνεται είτε διεγερτικά είτε ανασταλτικά, μεταφέροντας έτσι μια απεικόνιση του ερεθίσματος στα ανώτερα τμήματα του εγκεφάλου.

Η διερεύνηση των προφίλ απόκρισης των διαφορετικών κλάσεων OSNs έδειξε ότι μια οσμή ενεργοποιεί συνήθως μόνο μία κλάση OSNs. Ακόμα και στις περιπτώσεις που μια οσμή ενεργοποιεί διαφορετικές κλάσεις, παρατηρείται αισθητή διαφοροποίηση σε άλλες συνιστώσες της απόκρισης. Για παράδειγμα, η ίδια οσμή ανάλογα με τη συγκέντρωσή της μπορεί να ενεργοποιεί διαφορετικούς OSNs. Οι de Bruyne et al. (2001) απέδειξαν ότι ο αιθανικός αιθυλεστέρας (ethyl acetate), πτητικό προϊόν της ωρίμανσης των φρούτων, ενεργοποιεί τους OSNs της κλάσης ab1A (ab, antennal basiconic) και της ab2A στη δροσόφιλα, με διαφορές στην ένταση της απόκρισης. Οι καμπύλες δόσης-απόκρισης φανέρωσαν ότι χαμηλότερες συγκεντρώσεις γίνονται αντιληπτές μόνο από την κλάση ab1A, ενώ οι υψηλότερες και από την ab2A. Από τα παραπάνω προκύπτει ένα εύλογο ερώτημα: ποιος είναι ο παράγοντας που προσδίδει την εξειδίκευση μιας κλάσης OSNs ως προς την αναγνώριση συγκεκριμένων μόνο οσμών; Η απάντηση άρχισε να διαμορφώνεται με τη μελέτη της μοριακής βάσης του οσφρητικού συστήματος και την ανακάλυψη δύο ανεξάρτητων οικογενειών πρωτεϊνών, που εκφράζονται στους OSN της *D. melanogaster*:

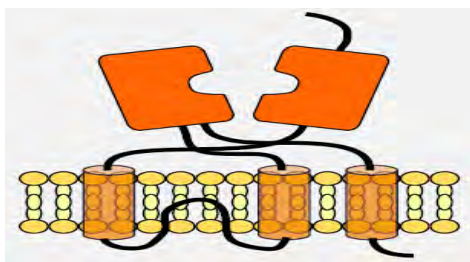
1. τους **οσφρητικούς υποδοχείς** (olfactory receptors, **ORs**) (Clyne et al. 1999, Gao and Chess 1999, Vosshall et al. 1999) και
2. τους **ιονοτροπικούς υποδοχείς** (ionotropic receptors, **IRs**) (Benton et al. 2009).



**Εικόνα 3.** Συνοπτική παρουσίαση των διαφορών, ως προς την ειδίκευση των ORs, στους διαφορετικούς τύπους αισθητικών τριχιδίων (Spletter & Luo, 2009).

### 1.4.3 Η οικογένεια των IR υποδοχέων

Οι ιονοτροπικοί υποδοχείς (IRs) των εντόμων είναι μια οικογένεια πρωτεϊνών συγγενική με τους ιονοτροπικούς υποδοχείς γλουταμινικού (iGluRs) (Benton et al. 2009). Στο γονιδίωμα της *D. melanogaster* έχουν εντοπιστεί 61 γονίδια IR. Προβλέπεται ότι τα γονίδια IR κωδικοποιούν προσδετοεξαρτώμενα κανάλια κατιόντων με τρεις διαμεμβρανικές περιοχές (Croset et al. 2010), (βλ. Εικ. 4). Οι κλασσικοί iGluRs εδράζονται στο κεντρικό νευρικό σύστημα και προσδένουν τον νευροδιαβιβαστή γλουταμινικό οξύ. Δομικά χαρακτηρίζονται από την παρουσία δύο υπομονάδων πρόσδεσης γλουταμινικού που διαχωρίζονται από ένα κανάλι ιόντων (Mayer, 2006). Παρά τη συντηρημένη δομική οργάνωση που εμφανίζουν με τους iGluRs, οι IRs δεν διαθέτουν τα κρίσιμα αμινοξικά κατάλοιπα για την πρόσδεση του γλουταμινικού (Benton et al., 2009). Όμως έναντι αυτού, φαίνεται να ανιχνεύουν πτητικά χημικά. Οι IRs εκφράζονται στους δενδρίτες των κοιλοκωνικών οσφρητικών τριχιδίων και ποτέ παράλληλα με ORs (με μια όμως εξαίρεση). Συνοψίζοντας, τα σπονδυλωτά χρησιμοποιούν τους iGluRs σαν μέσο επικοινωνίας μεταξύ νευρώνων, ενώ τα έντομα έχουν αναπτύξει επιπλέον iGluR-like γονίδια, τους IRs, σαν χημειούποδοχείς που επιτρέπουν την επικοινωνία νευρώνων με το εξωτερικό περιβάλλον.



Εικόνα 4. Προβλεπόμενη δομή ενός IR υποδοχέα στα έντομα (Hansson and Stensmyr, 2011)

### 1.4.4 Η οικογένεια των OR υποδοχέων

Οι οσφρητικοί υποδοχείς (ORs) είναι μια οικογένεια πρωτεϊνών με επτά διαμεμβρανικές περιοχές. Σε αντίθεση με τους ORs των σκωλήκων και των σπονδυλωτών, η οικογένεια των ORs των εντόμων δεν παρουσιάζει καμία ομολογία με τους υποδοχείς GPCR (G protein-coupled receptors) και εξελίχτηκε ανεξάρτητα από τους χημειούποδοχείς των άλλων ζώων (Vosshall et al. 1999). Ο αριθμός των γονιδίων-μελών διαφέρει ανάλογα με το είδος και κυμαίνεται μεταξύ 50-260 μέλη σε όλα τα είδη εντόμων που έχουν μελετηθεί έως τώρα (Nei et al. 2008). Ενδεικτικά το γονιδίωμα της *D. melanogaster* περιλαμβάνει 60 γονίδια OR (Clyne et al. 1999, Gao and Chess 1999, Vosshall et al. 1999) που κωδικοποιούν 62 ORs, με 2 ORs να είναι προϊόν εναλλακτικού ματίσματος του ίδιου γονιδίου. ORs στη δροσόφιλα εκφράζονται: i) σε όλους τους OSN των τριχοειδών αισθητικών τριχιδίων, ii) σε ένα μόνο κοιλοκωνικό OSN και iii) σε όλους τους βασικωνικούς OSN εκτός από τον νευρώνα ab1C που είναι ευαίσθητος στο διοξείδιο του άνθρακα (Couto et al. 2005, Hallem et al. 2004a).

### **«Ένας νευρώνας-Ένας υποδοχέας» (“one neuron-one receptor” rule )**

Η μοριακή και ανατομική οργάνωση της έκφρασης των ORs των εντόμων εμφανίζει ομοιότητες με αυτή των θηλαστικών. Κατά κανόνα, κάθε OSN εκφράζει μόνο ένα τύπο OR (πάντα μαζί με τον συνυποδοχέα Or83b, που θα αναλυθεί παρακάτω). Δηλαδή, φαίνεται να ισχύει το μοτίβο «ένας νευρώνας-ένας υποδοχέας» των σπονδυλωτών. Ωστόσο, ένας OSN μπορεί να συνεκφράζει έως και τρεις διαφορετικούς ORs παράλληλα με τον απαραίτητο Or83b (Galizia et al. 2010). Στη δροσόφιλα υπάρχουν 13 καταγεγραμμένες περιπτώσεις συνέκφρασης περισσότερων του ενός OR σε έναν OSN (βλ. Πίνακα 1) (Couto et al. 2005, Fishilevich and Vosshall 2005, Vosshall and Stocker 2007). Συχνά τα γονίδια των ORs που συνεκφράζονται είναι πολύ συγγενικά και πιθανότατα αποτελούν προϊόν πρόσφατου γονιδιακού διπλασιασμού (Couto et al. 2005). Η κοντινή συγγένεια αυτών των υποδοχέων συνεπάγεται ότι οι οσμές που ανιχνεύουν είναι μάλλον οι ίδιες. Άρα, σε αυτές τις περιπτώσεις ισχύει έμμεσα ο κανόνας του ενός υποδοχέα ανά OSN.

### **«Ο OR κάνει τον νευρώνα»**

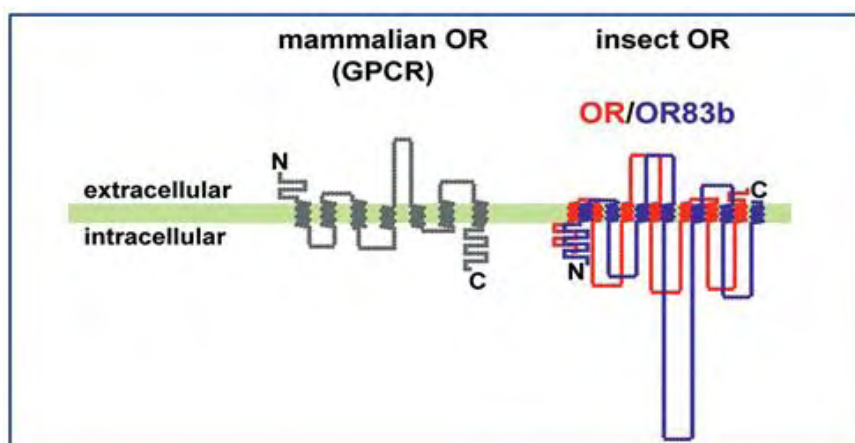
Ο τύπος των υποδοχέων OR που εκφράζει ο OSN καθορίζει την εξειδίκευσή του ως προς το φάσμα οσμών που αναγνωρίζει (Hallem et al. 2004a). Για αυτό το λόγο, OSNs που εκφράζουν τον ίδιο τύπο OR τείνουν να συγκλίνουν στο ίδιο σπείραμα του λοβού της κεραίας (antennal lobe, AL). Έχουν αναφερθεί και περιπτώσεις που OSNs με τους ίδιους υποδοχείς νευρώνουν δύο διαφορετικά σπειράματα. Αντίστοιχα, υπάρχουν και OSNs που ενώ εκφράζουν διαφορετικούς ORs συγκλίνουν στο ίδιο σπείραμα (Fishilevich and Vosshall, 2005). Επιπλέον, το κάθε σπείραμα νευρώνεται μόνο από μια συγκεκριμένη κλάση OSNs (Couto et al. 2005). Αυτή η διάταξη επιτρέπει τη συγκέντρωση της περιφερικής αντιπροσώπευσης πανομοιότυπων ή συγγενικών οσμών σε ένα κοινό κέντρο για καλύτερη ρύθμιση της απόκρισης.

Organ	Receptor 1	Receptor 2	Receptor 3
Antenna	Or10a	Gr10a	
Antenna	Or19a	Or19b	
Antenna	Or22a	Or22b	
Antenna	Or33a	Or56a	
Antenna <sup>+</sup>	Or33b	Or47a	
Antenna	Or33b	Or85a	
Antenna	Or49a	Or85f	
Antenna	Or65a	Or65b	Or65c
Antenna	Or69aA	Or69aB	
Antenna	Or85b*	Or98b*	
Maxillary palp	Or33c	Or85e	
Larval dorsal organ <sup>+</sup>	Or33b	Or47a	
Larval dorsal organ	Or94a	Or94b	

**Πίνακας 1. Περιπτώσεις συνέκφρασης διαφορετικών ORs στον ίδιο OSN** (Vosshall and Stocker, 2007): Παρουσιάζονται όλες οι γνωστές περιπτώσεις συνέκφρασης πολλαπλών ORs σε έναν OSN στην δροσόφιλα. Αναγράφεται το οσφρητικό όργανο στο οποίο ανήκει ο κάθε OSN καθώς και οι ORs που εκφράζονται κάθε φορά. Με (+) σημαίνονται περιπτώσεις που παρατηρούνται τόσο στις κεραίες του ενηλίκου όσο και στο ραχιαίο όργανο της προνύμφης. Με (\*) πιθανή αλλά όχι εμπεριστατωμένη συνέκφραση (Couto et al., 2005).

#### 1.4.4.1 Δομή των ORs

Η οικογένεια των ORs χαρακτηρίζεται από την παρουσία επτά διαμεμβρανικών περιοχών στο πρωτεϊνικό μόριο. Όλοι οι ORs εμφανίζουν αντίστροφη τοπολογία στη μεμβράνη σε σχέση με τους υποδοχείς GPCR (Benton et al. 2006, Wistrand et al. 2006, Lundin et al. 2007). Δηλαδή, το αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης OR είναι στραμμένο προς το κυτταρόπλασμα ενώ το καρβοξυτελικό άκρο βρίσκεται εξωκυτταρικά (βλ.Εικόνα5). Ο λειτουργικός υποδοχέας σχηματίζεται με ετερομερισμό (αγνώστου στοιχειομετρίας) μεταξύ ενός εξειδικευμένου τυπικού OR και του απαραίτητου συνυποδοχέα Or83b (Vosshall et al. 2000, Larsson et al. 2004, Benton et al. 2006).

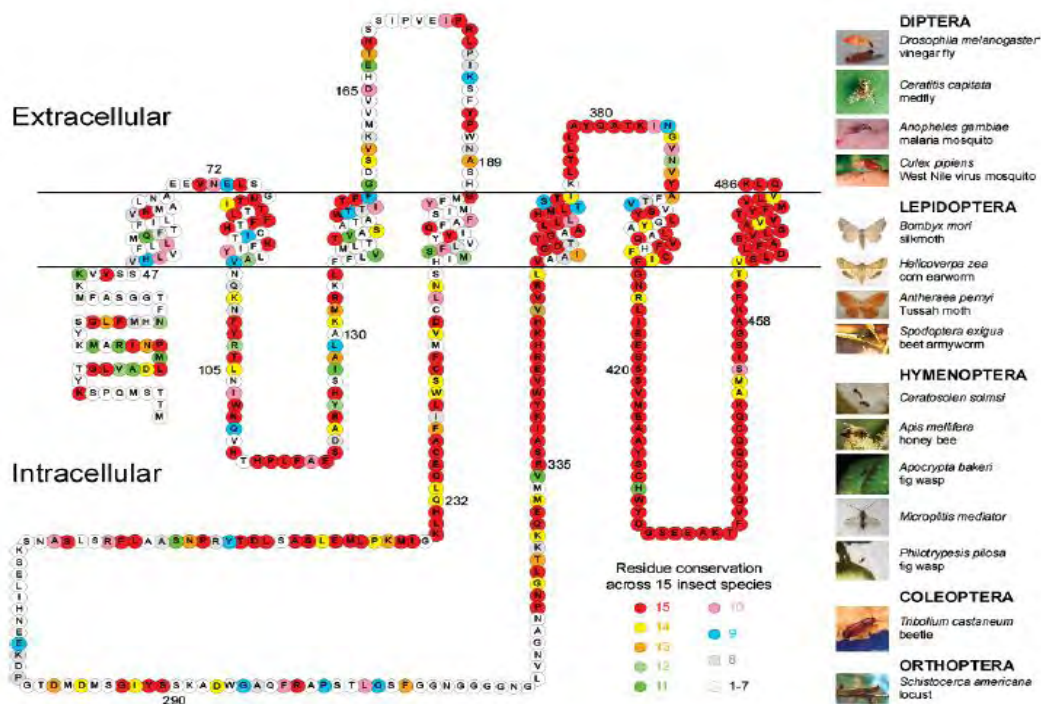


Εικόνα 5. Δομή και τοπολογία των ORs στα θηλαστικά και στα έντομα (Benton et al.2006)

Αξιοσημείωτη είναι η μεγάλη διαφοροποίηση στην αμινοξική αλληλουχία μεταξύ των ORs. Το φαινόμενο παρατηρείται τόσο εντός του ίδιου είδους όσο και εκτός αυτού (Clyne et al. 1999, Vosshall et al. 1999, Hill et al. 2002). Στη δροσόφιλα, το ποσοστό ομολογίας μεταξύ των μελών της οικογένειας είναι χαμηλό και κυμαίνεται από 15% έως 30% (Vosshall, 2003). Παρά όλες τις διαφορές στην αμινοξική αλληλουχία, έχουν ταυτοποιηθεί αμινοξικά μοτίβα κοινά για τους περισσότερους ORs. Βιοπληροφορικές αναλύσεις με τη χρήση του προγράμματος MEME (Multiple Em for motif elicitation) ανέχνευσαν 3 τέτοια μοτίβα στο καρβοξυτελικό άκρο των περισσότερων ORs, συμπεριλαμβανομένου και του Or83b (Miller et al. 2008, Ray et al. 2014). Μάλιστα, αυτά τα μοτίβα φαίνεται να είναι συντηρημένα και μεταξύ ORs διαφορετικών ειδών εντόμων, πράγμα που υποδηλώνει λειτουργική σημασία. Εικάζεται ότι τα μοτίβα του C-τελικού άκρου συμμετέχουν σε αλληλεπιδράσεις υποδοχέα-υποδοχέα και ενδέχεται να είναι σημαντικά για τον ετερομερισμό OR-Or83b (Miller et al. 2008). Επίσης, έχει αποδειχθεί ότι ORs που εμφανίζουν ευαισθησία σε ίδιες ή παραπλήσιες ενώσεις διαθέτουν κοινά αμινοξικά μοτίβα μικρού μήκους στο αμινοτελικό άκρο. Οι Ray et al. (2014) ταυτοποίησαν 20 τέτοια μοτίβα (μήκους 10-40 αμινοξέων) χαρακτηριστικά για ORs που αποκρίνονται σε φαινολικές ενώσεις. Και στην περίπτωση των N-τελικών μοτίβων εμφανίζεται διαειδική συντήρηση, όπως αποκαλύπτουν συγκρίσεις με ORs άλλων εντόμων που αποκρίνονται στις ίδιες ενώσεις.

### OR83b (ORCO), μια ιδιαίτερη περίπτωση

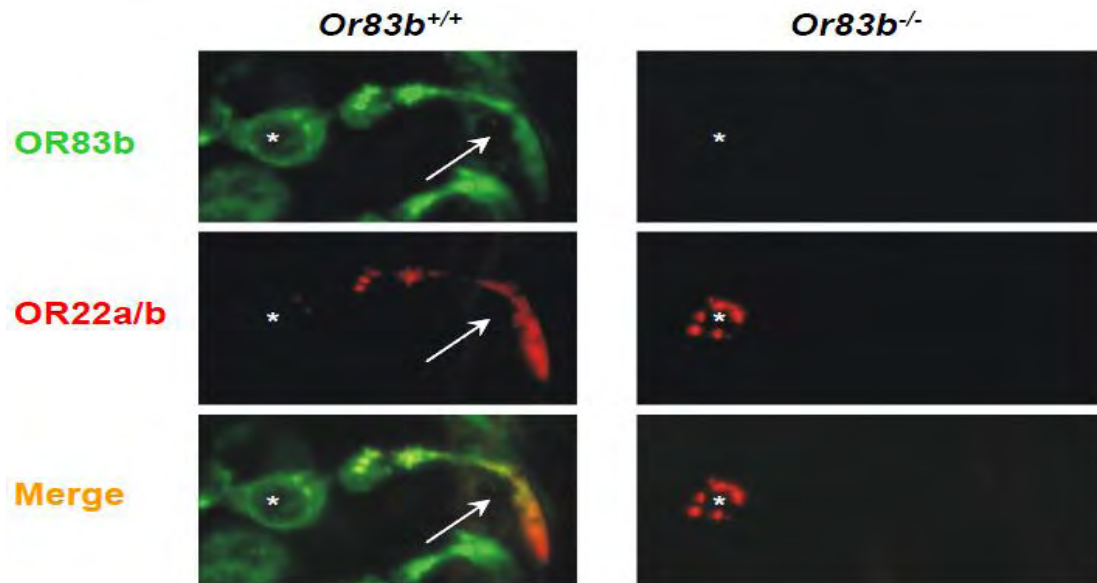
Ο Or83b (γνωστός ως ORCO, Odorant receptor co-receptor) διαφέρει από τους άλλους οσφρητικούς υποδοχείς καθώς εκφράζεται σε όλους τους OSN παράλληλα με τον εξειδικευμένο OR κάθε νευρώνα (Vosshall et al. 2000, Larsson et al. 2004, Benton et al. 2006). Επιπλέον, είναι ο μοναδικός OR που δεν συμμετέχει στην αναγνώριση συγκεκριμένης οσμής (Dobritsa et al. 2003, Hallem et al. 2004a) και του οποίου η αμινοξική αλληλουχία είναι τρομερά συντηρημένη μεταξύ των ειδών. Εντυπωσιακό είναι το γεγονός ότι η αμινοξική αλληλουχία του Or83b διατηρεί κατά μέσο όρο 75% ομολογία (Grimaldi and Engel, 2005) μεταξύ 15 ειδών εντόμων, που διαφέρουν εξελικτικά κατά 350 εκατομμύρια χρόνια! (βλ. Εικ. 6) Μάλιστα, η ομολογία είναι τόσο μεγάλη που ορθόλογα γονίδια Or83b άλλων ειδών μπορούν να αντικαταστήσουν λειτουργικά αυτό της δροσόφιλας (Jones et al. 2005, Krieger et al. 2003). Όλα τα παραπάνω υποδεικνύουν ότι ο Or83b παίζει σημαντικό και συντηρημένο ρόλο στο οσφρητικό σύστημα των εντόμων. Πράγματι, ο Or83b είναι υποχρεωτικός συνυποδοχέας που αλληλεπιδρά με τον συμβατικό OR και είναι υπεύθυνος για την στόχευση του ετερομερούς συμπλόκου OR/Or83b στη μεμβράνη των δενδριτών του OSN (βλ. Εικ. 7). Η παρουσία του Or83b είναι απαραίτητη και επαρκής για να επιτευχθεί η μεμβρανική στόχευση και λειτουργική έκφραση των ORs σε όλους τους OSN *in vivo* (Benton et al. 2006). Συγκεκριμένα, ο Or83b ελέγχει τη στόχευση και λειτουργία όλων των βασικωνικών και τριχοειδών ORs στην ενήλικη δροσόφιλα καθώς και όλων των ORs της προνύμφης. Η μόνη κλάση OSNs που δεν εκφράζει τον Or83b είναι αυτή που αναγνωρίζει το διοξείδιο του άνθρακα και εκφράζει τους γευστικούς υποδοχείς Gr21a και Gr63a (Suh et al. 2004, Benton et al. 2006, Faucher et al. 2006).



Εικόνα 6. Snake plot του Or83b της *Drosophila melanogaster* (Grimaldi and Engel, 2005):

Το κάθε αμινοξύ χρωματίζεται ανάλογα με το βαθμό ομολογίας ανάμεσα στα 15 είδη εντόμων που εξετάζονται (φαίνονται στο δεξιό τμήμα της εικόνας).





**Εικόνα 7. Ο Or83b είναι απαραίτητος για τη μεμβρανική στόχευση του Or22a/b στον δενδρίτη του OSN** (προσαρμογή εικόνας από Benton et al. 2006): Απεικόνιση ανοσοϊστοχημείας φθορισμού σε τομές κεραίων ενηλίκου εντόμου δροσόφιλας. Με πράσινο σημαίνεται ο Or83b ενώ με κόκκινο ο Or22a/b. Η αριστερή στήλη ανήκει σε έντομα αγρίου τύπου ενώ η δεξιά σε έντομα knockout για τον Or83b. Με αστερίσκο επισημαίνεται το κυτταρικό σώμα του σφρητικού νευρώνα (OSN).

#### 1.4.4.2 Ρόλος των ORs

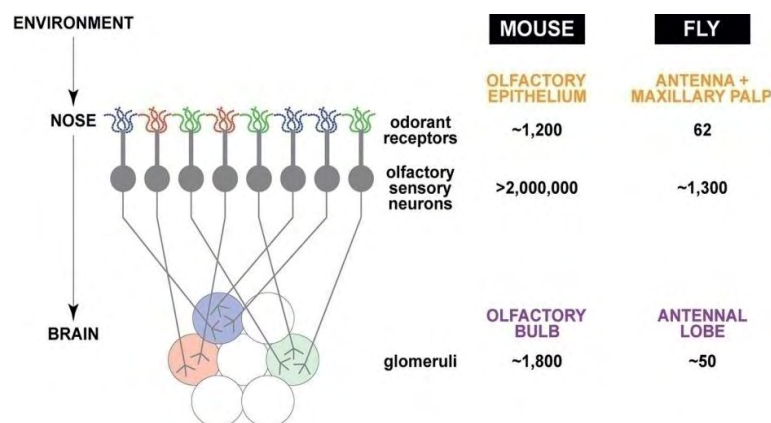
Οι ORs εκτελούν δύο αλληλένδετους ρόλους:

- 1) είναι υπεύθυνοι για τη διάκριση των οσμών και την εξειδικευμένη ενεργοποίηση των OSNs.

Όπως προαναφέρθηκε, η εξειδίκευση ενός OSN σε συγκεκριμένες οσμές καθορίζεται από τον/τους OR που εκφράζει. Έτσι, εξασφαλίζεται η ενεργοποίηση μόνο νευρώνων που διαθέτουν τον κατάλληλο υποδοχέα. Η εξειδίκευση των ORs (ως προς το φάσμα των οσμών που αναγνωρίζουν) διαφέρει σημαντικά. Με την ολοκλήρωση των χαρτών αντιστοίχισης οσμής-OR-OSN στη δροσόφιλα (Dobritsa et al. 2003, Hallem et al. 2004a, de Bruyne et al. 1999, 2001), διαπιστώθηκε ότι υπάρχουν ORs που ανιχνεύουν μόνο μία ή πολύ λίγες οσμές. Αντίστοιχα, υπάρχουν ORs που αναγνωρίζουν ευρύ φάσμα οσμών. Επιπλέον, η ίδια οσμή μπορεί να ενεργοποιεί περισσότερους από έναν ORs με διαφορές όμως στη συγγένεια υποδοχέα-προσδέτη και κατά επέκταση στην ευαισθησία του OR (Hallem and Carlson, 2006). Πειράματα διαγραφής ολόκληρων OSNs σε προνύμφες έδειξαν ότι η απώλεια ενός OR επηρεάζει την αντίληψη μόνο μικρής ομάδας οσμών και πολλές φορές καλύπτεται λειτουργικά από άλλους ORs (Fishilevich et al. 2005). Αυτό το φαινόμενο αφορά κυρίως οσμές σχετικές με παράγοντες απαραίτητους για την επιβίωση (π.χ οσμές συνδεδεμένες με την πηγή τροφής). Η αλληλοεπικάλυψη του φάσματος σημαντικών οσμών μεταξύ διαφορετικών ORs δείχνει μια τάση για συνεργιστική δράση και εξασφαλίζει ότι η απώλεια ενός OR δεν θα είναι θανατηφόρα για το έντομο.

2) διαμεσολαβούν στη μεταφορά του πτητικού χημικού μηνύματος και δρουν ως ρυθμιστές της απόκρισης.

Η πρόσδεση της πτητικής ένωσης και η επακόλουθη ενεργοποίηση του OR αποτελεί το πρώτο βήμα αναγνώρισης μιας οσμής. Με την ενεργοποίηση του OR, το οσμηρό ερέθισμα τροποποιεί την δραστηριότητα του οσφρητικού νευρώνα, αυξάνοντας ή αναστέλλοντας την. Με αυτό τον τρόπο ξεκινά η μετατροπή του εξωκυτταρικού χημικού μηνύματος σε ενδοκυτταρικό ηλεκτρικό, που παίρνει τη μορφή δυναμικών ενέργειας (action potential). Η αλλαγή στο δυναμικό του OSN γίνεται αντιληπτή από ανώτερα τμήματα του εγκεφάλου, τα οποία με τη σειρά τους ρυθμίζουν την τελική απόκριση-συμπεριφορά του οργανισμού.



Εικόνα 8. Μετάδοση οσμηρού ερεθίσματος στο περιφερικό οσφρητικό σύστημα θηλαστικών και εντόμων (Benton, 2006).

#### 1.4.4.3 Μηχανισμοί λειτουργίας των ORs

##### Μοντέλα αναγνώρισης οσμών

Η ικανότητα ορισμένων ORs να αποκρίνονται σε ευρύ φάσμα οσμών έχει εμπεριστατωθεί από πολλές μελέτες. Όμως, ο μηχανισμός βάση του οποίου το πεπερασμένο ρεπερτόριο ORs ενός οργανισμού δύναται να αναγνωρίζει τεράστιο αριθμό ενώσεων, παραμένει άγνωστος. Έκτοτε, έχουν προταθεί διάφορα μοντέλα με δύο αντίπαλες θεωρίες να παραμένουν στο προσκήνιο έως και σήμερα.

##### ➤ Δομική θεωρία της όσφρησης

Υποδοχείς που αναγνωρίζουν πολλές οσμές αντιλαμβάνονται ως επί το πλείστον δομικά όμοιες ενώσεις (Hallem and Carlson, 2006). Έχοντας ως βάση παρόμοιες παρατηρήσεις, διατυπώθηκε η δομική θεωρία της όσφρησης (shape theory). Στη θεωρία αυτή ο οσμηρός χαρακτήρας καθορίζεται από το μοριακό σχήμα, μοριακό μέγεθος και τις λειτουργικές ομάδες της πτητικής ένωσης (Vosshall, 2015). Έχει προταθεί ότι συγκεκριμένες περιοχές (odotopes) των πτητικών μορίων αλληλεπιδρούν με τους υποδοχείς σύμφωνα με το μοντέλο «κλειδί-κλειδαριά» και η αναγνώριση της μοριακής τους δομής είναι επαρκής για τη διαφοροποίηση των οσμών (Axel, 2005). Ωστόσο, δεν έχει ολοκληρωθεί έως σήμερα καμία μορφή της δομικής θεωρίας που να καλύπτει όλες τις περιπτώσεις εμφάνισης συγγένειας οσμής-OR. Οι πολυπληθείς προσπάθειες σύνδεσης δομικών χαρακτηριστικών με συγκεκριμένες οσμές δίνουν ορισμένα αντικρουόμενα αποτελέσματα.

### ➤ **Θεωρία των μοριακών δονήσεων**

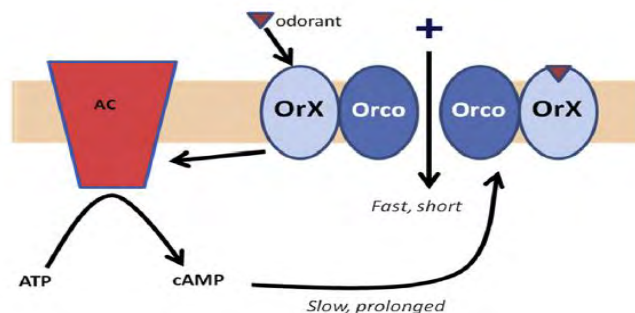
Υπάρχουν περιπτώσεις που ο ίδιος OR αναγνωρίζει χημικές ενώσεις με τελείως διαφορετική μοριακή δομή. Το γεγονός αυτό οδήγησε στην διατύπωση ενός άλλου μοντέλου αναγνώρισης οσμών που βασίζεται στη μοριακή δόνηση των ενώσεων (vibration theory). Σύμφωνα με αυτή τη θεωρία οι δονήσεις όλων των ατόμων ή συγκεκριμένων λειτουργικών ομάδων συνεισφέρουν στην αναγνώριση των οσμών (Turin, 1996) και ενώσεις με παρόμοια φάσματα δόνησης αναμένεται να προκαλούν παρόμοιες αποκρίσεις (Turin, 2002). Πειράματα με ραδιενεργά ισότοπα υδρογόνου σε μύγες *D. melanogaster* (Franco et al. 2011) και σε μέλισσες (Gronenberg et al. 2014) έδειξαν ικανότητα διαφοροποίησης ανάμεσα στις φυσιολογικές και δευτεριομένες ενώσεις. Μάλιστα, οι δευτεριομένες ενώσεις προκαλούσαν αντίθετη απόκριση σε σχέση με τις αντίστοιχες μη δευτεριομένες. Δηλαδή, τα έντομα μπορούσαν να διακρίνουν μεταξύ φαινομενικά δομικά πανομοιότυπων ενώσεων βάση του φάσματος δόνησης (Franco et al. 2011). Ωστόσο, η θεωρία των μοριακών δονήσεων δεν έχει πλήρως εμπεριστατωθεί, καθώς ενδέχεται προσμίξεις κατά τη διαφορική παρασκευή των ισωτόπων να επηρεάζουν την απόκριση των εντόμων. Επίσης, εκκρεμεί και η εκτέλεση πειραμάτων όπου δομικά διαφορετικές ενώσεις με παρόμοιο όμως φάσμα δόνησης θα προκαλούν την ενεργοποίηση των ίδιων ORs.

### **Μηχανισμοί μεταγωγής σήματος των ORs**

Με την πρόσδεση του κατάλληλου οσμικού μορίου στο ετερομερές σύμπλεγμα Orco/OrX (όπου X οποιοσδήποτε τυπικός OR), έχουμε ενεργοποίηση του υποδοχέα και έναρξη μεταγωγής σήματος μέσω δύο οδών σηματοδότησης: 1) μια γρήγορη, σύντομη **ιοντοτροπική** και 2) μια αργή, παρατεταμένη **μεταβοτροπική** (βλ. Εικ. 9).

### ➤ **Ιοντοτροπική σηματοδότηση**

Το σύμπλεγμα Orco/OrX θεωρείται ότι σχηματίζει ένα προσδετοεξαρτώμενο, μη ειδικό κανάλι κατιόντων. Το κανάλι είναι διαπερατό από ιόντα  $Ca^{+2}$ ,  $Na^{+}$  και  $K^{+}$  (Sato et al.2008, Wicher et al.2008, Nakagawa and Vosshall.2009). Στην ιοντοτροπική σηματοδότηση η αλληλεπίδραση της οσμής με τον OrX προκαλεί άμεσο άνοιγμα του καναλιού και γρήγορη ροή κατιόντων προς το εσωτερικό του κυττάρου. Αυτός ο μηχανισμός μεταγωγής σήματος είναι ο πρωταρχικός στους ORs των εντόμων και δεν εξαρτάται από σηματοδότηση G-πρωτεϊνών (Sato et al. 2008, Smart et al. 2008, Yao and Carlson. 2010).



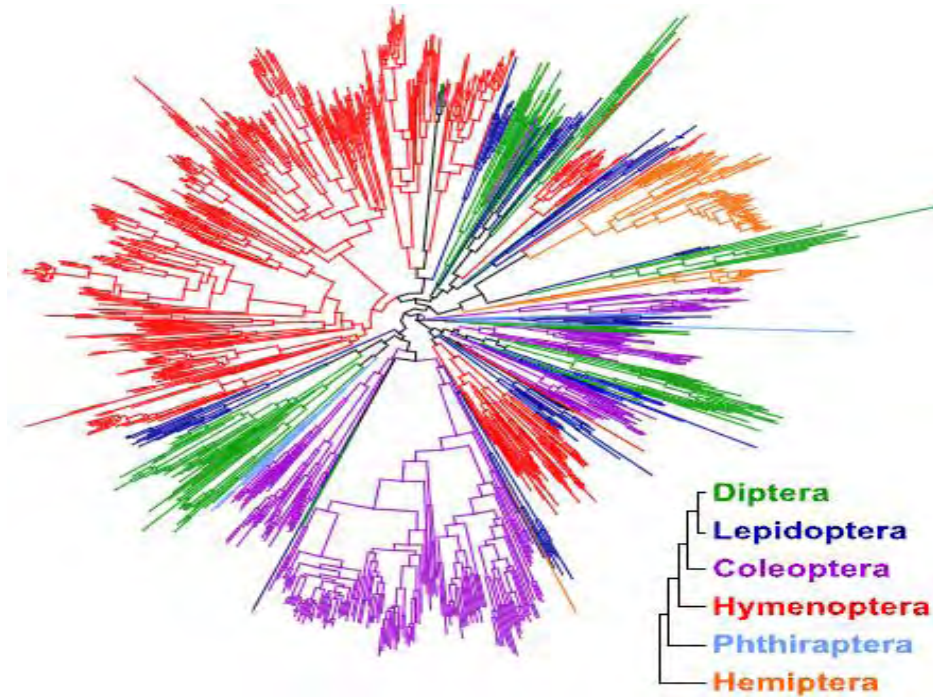
**Εικόνα 9.** Σύνοψη της μεταγωγής σήματος από τους οσφρητικούς υποδοχείς των εντόμων (Carragher et al.2015): Παρουσιάζονται τα δύο μονοπάτια σηματοδότησης που ενεργοποιούνται από την πρόσδεση της οσμής στην υπομονάδα OrX του συμπλέγματος Orco/OrX. Το γρήγορο, σύντομο ιοντοτροπικό μονοπάτι και το αργό, παρατεταμένο μεταβοτροπικό.

#### ➤ **Μεταβοτροπική σηματοδότηση**

Παρά τις δομικές ομοιότητες των ORs των εντόμων με τους GPCRs (7 διαμεμβρανικές περιοχές), έχει αποδειχθεί ότι οι ORs εξελίχθηκαν ανεξάρτητα και δεν παρουσιάζουν καμία αμινοξική ομολογία με τους ORs των σπονδυλωτών και των νηματωδών ή οποιασδήποτε άλλης κλάσης GPCR υποδοχέων. Αντίστοιχα, δεν έχουν εντοπιστεί θέσεις πρόσδεσης G-πρωτεϊνών ούτε στον Orco, ούτε σε κανέναν συμβατικό OR των εντόμων. Ωστόσο, υπάρχουν δεδομένα που υποστηρίζουν την ύπαρξη μεταβοτροπικών μονοπατιών σηματοδότησης, όπου συμμετέχουν G-πρωτεΐνες/δεύτεροι διαβιβαστές, που ρυθμίζουν την λειτουργία των ORs στα έντομα. Στο μεταβοτροπικό μονοπάτι, το άνοιγμα του καναλιού ιόντων προκαλείται έμμεσα καθώς η πρόσδεση της οσμής στον OrX ενεργοποιεί μια αδενυλική κυκλάση (AC) που παράγει cAMP (Wicher et al.2008). Εν συνεχεία, το cAMP αλληλεπιδρά με τον Orco και παρατείνει τον χρόνο που παραμένει το κανάλι ανοιχτό (Sargsyap et al. 2011). Επιπλέον, μπορεί να εμπλέκονται και άλλοι δεύτεροι διαβιβαστές που εξαρτώνται από σηματοδότηση G-πρωτεϊνών όπως φωσφοϊνοσιτίδια, PLC, DAG κλπ. Όμως, σε όλες τις περιπτώσεις η ενεργοποίηση του μεταβοτροπικού μονοπατιού φαίνεται να λειτουργεί επικουρικά-παράλληλα με το ιοντοτροπικό και δεν είναι απαραίτητη για την οσφρητική απόκριση. Πιθανότατα έχει ως στόχο την ενίσχυση του σήματος σε χαμηλές συγκεντρώσεις του οσμηρού ερεθίσματος (Nakagawa and Vosshall. 2009). Πράγματι, *in vivo* πειράματα στη *D. melanogaster* έδειξαν ότι η μείωση/διαγραφή των επιπέδων  $G_{aq}$  (Kain et al. 2008, Kalidas and Smith. 2002), PLCβ (Kain et al.2008), DAG (Kain et al.2008) ή IP3 (Gomez-Diaz et al.2006) σε OSNs ενηλίκων μειώνει τις φυσιολογικές και συμπεριφορικές αποκρίσεις σε οσμές χωρίς όμως να τις εξαλείφει πλήρως. Στα έντομα, η παρεμπόδιση της σηματοδότησης που εξαρτάται από G-πρωτεΐνες προκαλεί πολύ ήπιο φαινότυπο στο οσφρητικό σύστημα υποδηλώνοντας ότι παίζει μόνο ρυθμιστικό ρόλο αυξάνοντας την ευαισθησία των ORs (Chatterjee et al., 2009).

#### **1.4.4.4 Εξέλιξη των γονιδίων ORs**

Οι ORs των εντόμων αποτελούν μια μεγάλη οικογένεια γονιδίων με υψηλά επίπεδα διαφοροποίησης. Μεταξύ διαφορετικών τάξεων εντόμων δεν υπάρχουν κοντινά ορθόλογα (με εξαίρεση τον συνυποδοχέα Orco) και συντηρημένες υποοικογένειες υποδοχέων (βλ. Εικ. 10). Ακόμα και εντός της ίδιας οικογένειας, ο αριθμός των ORs διαφέρει ανάλογα με το έντομο. Η οικογένεια των ORs χαρακτηρίζεται από ειδοειδικές επεκτάσεις ενός γονιδίου ή μιας υποοικογένειας γονιδίων (Hansson and Stensmyr, 2011). ORs που έχουν πρόσφατα διπλασιαστεί αποκτούν νέες λειτουργίες μέσω θετικής φυσικής επιλογής, πιθανώς εξαιτίας νέων αναγκών για την επιβίωση όπως αλλαγή ξενιστή ή εξειδίκευση σε ένα μόνο είδος ξενιστή (Gardiner et al. 2008). Με τις ίδιες διαδικασίες μπορούν να αναιρεθούν προηγούμενες προσαρμογές στο ρεπερτόριο των χημειούποδοχέων και να έχουμε απώλεια γονιδίων OR που δεν εξυπηρετούν πια ένα λειτουργικό ρόλο.



**Εικόνα 10.** Φυλογενετικό δέντρο των υποδοχέων ORs των διαφορετικών τάξεων εντόμων (Hansson and Stensmyr, 2011): Το παραπάνω δέντρο κατασκευάστηκε βάσει 1069 γονιδίων OR προερχόμενα από 9 διαφορετικά είδη εντόμων που ανήκουν σε 6 διαφορετικές τάξεις, με χρήση του προγράμματος FastTree βασιζόμενοι σε στοίχιση MAFFT-nsi.

Στην τάξη των διπτερών (Diptera), ανάλυση του ρεπερτορίου ORs των πέντε πιο συγγενικών ειδών της *D. melanogaster* έδειξε ότι είδη που εξειδικεύονται σε λίγες πηγές τροφής εξελίσσονται ταχύτερα στην οικογένεια των ORs (McBride et al. 2007). Τα συγγενικά, μη εξειδικευμένα είδη παρουσίαζαν μεν πιο αργή εξέλιξη των ORs αλλά το ποσοστό μετατροπής παλαιών ORs σε ψευδογονίδια παρέμενε σταθερό σύμφωνα με ανάλυση δώδεκα ειδών δροσόφιλας (Gardiner et al. 2008). Δηλαδή, η απώλεια γονιδίων ORs δεν οφείλεται αποκλειστικά σε εξελικτικές πιέσεις και οικολογική εξειδίκευση αλλά υπόκειται και σε έλεγχο γενετικής παρέκκλισης (genetic drift), ιδιαίτερα σε είδη με μικρό πληθυσμό. Χαρακτηριστική περίπτωση απώλειας ORs λόγω περιβαλλοντικής προσαρμογής αποτελεί το είδος *Drosophila sechellia*, ενδημικό στο αρχιπέλαγος των Σεϋχελλών. Το συγκεκριμένο είδος αναπαράγεται και διατρέφεται αποκλειστικά στο ενδημικό φρούτο *Morinda*, που είναι τοξικό για την πλειοψηφία των δροσοφιλιδών (Lavista-Llanos et al. 2014). Στην *D. sechellia* έχει χαθεί ένας συγκεκριμένος τύπος οσφρητικού τριχιδίου ενώ παράλληλα υπάρχει δραματική αύξηση σε ένα άλλο τύπο τριχιδίου. Ο ενισχυμένος τύπος τριχιδίου εκφράζει OSNs με ORs, που εξειδικεύονται σε οσμές του μοναδικού ξενιστή του εντόμου. Αντίθετα, το απολεσθέν οσφρητικό τριχίδιο εξέφραζε ORs συμβατούς με οσμές που δεν απαντώνται στο φρούτο *Morinda* (Stensmyr et al. 2003b, Dekker et al. 2006). Παρόμοιες προσαρμογές του οσφρητικού συστήματος παρατηρούνται και στα κουνούπια του γένους *Culex*. Τα είδη που έχουν ως ξενιστές πτηνά, εμφανίζουν αύξηση OSNs που εκφράζουν εξειδικευμένους ORs για το nonanal (πτητικό συστατικό, χαρακτηριστικό των πουλιών), σε σύγκριση με είδη διατρεφόμενα με θηλαστικά. Μάλιστα, η ευαισθησία ανίχνευσης συναγωνίζεται αυτή

των φερομονικών ORs και πιθανότατα δίνει την δυνατότητα μακρινού εντοπισμού του ξενιστή (Syed and Leal. 2009). Επομένως, το ρεπερτόριο των ORs εξελίσσεται ώστε να είναι συμβατό με τις οσμές-κλειδιά που αντιπροσωπεύουν τις ειδοειδικές προτιμήσεις ξενιστή του κάθε εντόμου. Ωστόσο, διαφορετικές προσαρμογές στο περιβάλλον δεν προκαλούν απαραίτητα μεγάλες αναδιατάξεις στο οσφρητικό σύστημα, ιδίως μεταξύ συγγενικών ειδών. Για παράδειγμα, οι OSNs των μεγάλων βασικονικών τριχιδίων εμφανίζουν πολύ συντηρημένη λειτουργία και στα 9 μέλη των υποειδών *melanogaster* παρόλο που αυτά κατοικούν σε πολύ διαφορετικά οικοσυστήματα (Stensmyr et al. 2003b). Πιθανότατα αυτοί οι OSNs εκφράζουν ORs που ανιχνεύουν κοινές ενώσεις γενικού ενδιαφέροντος. Αντίστοιχα, το ρεπερτόριο ORs που ανιχνεύει οσμές συνδεδεμένες με ζύμες και μικρόβια (βασική τροφή σχεδόν όλων των δροσοφιλίδων, ανεξαρτήτως προτίμησης) φαίνεται να είναι λειτουργικά συντηρημένο στα διάφορα είδη δροσοφιλίδων (Stensmyr et al. 2003b, de Bruyne et al. 2010, Stokl et al. 2010).

Συνοψίζοντας, το οσφρητικό σύστημα αντικατοπτρίζει τις ανάγκες που θέτει η ειδοειδική οικολογία του κάθε εντόμου. Μετατόπιση σε ένα νέο ξενιστή ή εξειδίκευση σε ένα μόνο είδος ξενιστή οδηγεί σε αντίστοιχες αλλαγές στο ρεπερτόριο των ORs. Οι εξελικτικές προσαρμογές του οσφρητικού που έχουν παρατηρηθεί περιλαμβάνουν επέκταση ή συρρίκνωση/απώλεια συγκεκριμένων υποοικογενειών ORs. Συγκεκριμένα ευνοούνται ORs που είναι εξειδικευμένοι στην ανίχνευση καίριων οσμών του ξενιστή/πηγής τροφής.

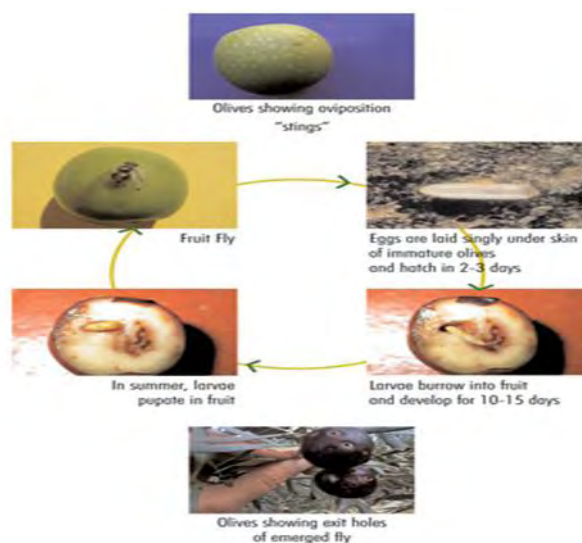
## 1.5 Ο δάκος της ελιάς

Ο δάκος (*Bactrocera oleae*), της οικογένειας των Tephritidae, είναι ευρέως γνωστός ως το σημαντικότερο παράσιτο της ελιάς (*Olea europaea*). Πρόκειται για ένα ολομετάβολο, δίπτερο έντομο με έντονη παρασιτική δραστηριότητα στον καρπό της ελιάς. Αυτή του η δράση σε συνδυασμό με την επέκταση των καλλιεργειών ελαιόδεντρων σε χώρες πέρα της Μεσογείου, καθιστά τον δάκο πρωταρχική απειλή για την παραγωγή ελιάς παγκοσμίως.

### 1.5.1 Βιολογικός κύκλος

Τα θηλυκά άτομα *B. oleae* αποθέτουν τα αυγά τους στον καρπό της ελιάς μέσω οπής που δημιουργούν με τον ωothήτη τους. Κατά προτίμηση εναποτίθεται ένα αυγό ανά καρπό (Burrack et al. 2009), καθώς η παρουσία νύγματος από τον ωothήτη και ουσιών που εκκρίνονται ως αποτέλεσμα αποτρέπει άλλα άτομα να ωοαποθέσουν στον ίδιο καρπό. Εντός δύο-τριών ημερών, από κάθε αυγό εκκολάπτεται μια προνύμφη (larva) που διατρέφεται στο εσωτερικό του καρπού. Οι προνύμφες του είδους είναι μονοφάγες, δηλαδή τρέφονται αποκλειστικά με τον ελαιόκαρπο (Byron and Gillett-Kaufman, 1999). Το στάδιο της προνύμφης διαρκεί γύρω στις είκοσι ημέρες (Rice 2000) και ακολούθως το έντομο μπαίνει στο στάδιο της νύμφης σχηματίζοντας βομβύκιο (pupa). Ανάλογα με τις περιβαλλοντικές συνθήκες ο χρόνος ανάπτυξης των

βομβυκίων διαφέρει, ενώ η βομβυκίωση μπορεί να γίνει εντός ή εκτός του καρπού (στο έδαφος).



Εικόνα 11. Κύκλος ζωής του δάκου της ελιάς (*Bactrocera oleae*)

### 1.5.2 Εντοπισμός και επιλογή ξενιστή

Η βιολογική επιτυχία των τεφριτιδών (Tephritidae) οφείλεται στις συμπεριφορικές προσαρμογές σύμφωνα με τις προτιμήσεις ωοαπόθεσης του θηλυκού (Fletcher 1987). Συνήθως υπάρχει θετική συσχέτιση ανάμεσα στην επιλογή τόπου ωοαπόθεσης και στην επίδοση της προνύμφης. Η επιλογή ξενιστή βασίζεται σε πολύπλοκους μηχανισμούς συμπεριφοράς που ενσωματώνουν οσφρητικά, οπτικά και γευστικά δεδομένα σε συνδυασμό με φυσικά χαρακτηριστικά όπως το χρώμα, σχήμα και ελαστικότητα/υφή του καρπού (Malheiro et al. 2015). Η όλη διαδικασία φαίνεται να ρυθμίζεται από τη βραχεία μνήμη (short term memory) (Prokopy et al. 1989, Liu et al. 2015). Πληθώρα ερευνών δείχνουν ότι οι μύγες του γένους *Bactrocera* βασίζονται σε μεγάλο βαθμό σε οσμηρά ερεθίσματα για τον εντοπισμό του ξενιστή (Siderhurst and Jang. 2006, Jayanthi et al. 2012, Biasazin et al. 2014). Οι καρποί και τα φύλλα των φυτών-ξενιστών θεωρούνται ως κύριες πηγές προσελκυστικών πτητικών ενώσεων. Ωστόσο, η έρευνα έχει επεκταθεί και συμπεριλαμβάνει πτητικά από μη-ξενιστές όπως βακτήρια και μύκητες που διαβιούν πάνω στον ξενιστή, περιττώματα από πτηνά ακόμα και ανθρώπινη ουρία (Piñero et al. 2003, Robacker et al. 2009). Ηλεκτροφυσιολογικές μελέτες υποδεικνύουν ότι οι μύγες των φρούτων είναι ευαίσθητες σε πτητικές οργανικές ενώσεις όπως μονοτερπένια, καρβοξυλικά οξέα, αλκοόλες, κετόνες και εστέρες, πολλές από τις οποίες είναι χαρακτηριστικές των ώριμων φρούτων (Jayanthi et al. 2012, Biasazin et al. 2014).

#### **Όσφρηση και επιλογή ξενιστή του *Bactrocera oleae***

Υπάρχουν τέσσερις τύποι αλληλεπιδράσεων που ρυθμίζουν την επιλογή ξενιστή στο δάκο της ελιάς: (1) οσφρητική προσέλκυση, (2) χημειοτακτική προσέλκυση, (3) οσφρητική απώθηση και (4) χημειοτακτική απώθηση (Scarpati et al. 1993). Στο πλαίσιο αυτής της εργασίας θα επικεντρωθούμε στις οσφρητικές αλληλεπιδράσεις.

Έχει παρατηρηθεί ότι δεν πλήττονται εξίσου όλες οι ποικιλίες εμπορικής ελιάς (*O. europaea*). Μάλιστα, στις ίδιες εδαφοκλιματικές συνθήκες, κάποιες ποικιλίες είναι περισσότερο ανθεκτικές σε προσβολή, ενώ άλλες προτιμώνται δεόντως από το δάκο (Iannotta et al. 2007). Βασική διαφορά των ποικιλιών – που αποτελεί παράγοντα κρίσιμο για την επιλογή τους ως ξενιστή του δάκου – είναι το προφίλ των δευτερογενών μεταβολιτών του καρπού και ιδιαίτερα οι πτητικές ενώσεις που εκλύονται από τον ξενιστή-δέντρο.

#### **Πτητικές ενώσεις των φύλλων**

Οι Malheiro et al. (2016) απέδειξαν ότι η προσβολή της ελιάς εξαρτάται από τα επίπεδα τολουενίου στα φύλλα των ποικιλιών. Υψηλότεροι τίτλοι τολουενίου σχετίζονται θετικά με υψηλότερα επίπεδα προσβολής από δάκο, πιθανότατα λόγω της οσφρητικής προσέλκυσης που ασκεί αυτή η ένωση (Scarpati et al. 1993, Malheiro et al. 2015). Ακόμη, πειράματα ηλεκτρογραφήματος κεραιών σε δάκους και των δύο φύλλων (συζευγμένους και μη) έδειξαν ισχυρότερη απόκριση σε πτητικές ενώσεις των φύλλων, ιδίως σε συζευγμένους αρσενικούς (Liscia et al. 2013). Αυτά τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι πτητικές ενώσεις προερχόμενες από τον ξενιστή αναγνωρίζονται από το δάκο, με τα φύλλα να ασκούν μεγαλύτερη επίδραση από αντίστοιχες ενώσεις των καρπών.

#### **Πτητικές ενώσεις των καρπών**

Πρόσφατες έρευνες απεκάλυψαν ότι ο τραυματισμός του καρπού από την προνύμφη του δάκου επάγει την παραγωγή αιθυλενίου (Alagna et al. 2015). Από οικολογική άποψη η παραγωγή αιθυλενίου μπορεί να σηματοδοτεί την παρουσία προνυμφών στον καρπό, απωθώντας άλλα θηλυκά από το να ωοαποθέσουν και έτσι να αυξάνονται οι πιθανότητες πετυχημένου κύκλου ζωής για τις προνύμφες. Από την άλλη πλευρά, η παραγωγή αιθυλενίου αυξάνεται και κατά την ωρίμανση των καρπών της ελιάς και μπορεί να δείχνει ότι η ελιά είναι σε τέτοιο στάδιο ωρίμανσης που μειώνονται οι πιθανότητες επιβίωσης των προνυμφών. Παρομοίως, οι πτητικές ενώσεις (E)-2-hexenal και hexanal (που απελευθερώνονται μετά από τραυματισμό του καρπού) είναι υπεύθυνες για την οσφρητική απώθηση του θηλυκού δάκου από ελιές με νύγμα και προκαλούν αισθητή αναστολή της ωοαπόθεσης (Scarpati et al. 1993).

#### **Πτητικές ενώσεις από μικρόβια**

Σημαντικό ρόλο φαίνεται να διαδραματίζουν μικροβιακοί παράγοντες στην επιλογή τόπου ωοαπόθεσης του δάκου. Πράγματι, βακτήρια και μύκητες συμμετέχουν στην πολύπλοκη σχέση δάκου-ελιάς (Liscia et al. 2013), σε συνδυασμό με επιφυτικές κοινότητες που σχετίζονται με την επιβίωση των ενηλίκων (Sacchetti et al. 2008). Οι Sacchetti et al. (2008) έδειξαν τη σχέση της μύγας και των επιφυτικών βακτηρίων που διαβιούν πάνω στα φύλλα της ελιάς: ενήλικα άτομα *B. oleae* τρέφονται με αυτά τα βακτηριακά στρώματα και μεταφέρουν βακτήρια σε άλλα φυτά. Η προσέλκυση του δάκου από πτητικές ενώσεις προερχόμενες από βακτηριακό εκχύλισμα *Pseudomonas putida* έχει αποδειχθεί με ηλεκτρογραφήματα και συμπεριφορικές μελέτες (Sacchetti et al. 2007, Liscia et al. 2013). Πρέπει να τονιστεί ότι η ένταση και το προφίλ των



αποκρίσεων διαφέρει ανάλογα με το φύλο και την φυσιολογική κατάσταση των δάκων. Μάλιστα, τα συζευγμένα θηλυκά/αρσενικά αποκρίνονται πολύ ισχυρότερα σε πτητικά των βακτηρίων σε σχέση με τα μη συζευγμένα (Liscia et al. 2013).

## 1.6 Πτητικά και φαινολικά συστατικά της ελιάς

Οι καρποί της ελιάς εμπεριέχουν πληθώρα δευτερογενών μεταβολιτών, με βασικότερες ομάδες τις φαινολικές ενώσεις, τα τερπένια και τις στερόλες. Οι πτητικές ενώσεις των φύλλων και των καρπών περιλαμβάνουν κυρίως εστέρες, αλκοόλες και τον αρωματικό υδρογονάνθρακα τολουένιο. Πολλές από τις πτητικές ενώσεις της ελιάς παίζουν ρόλο στην αλληλεπίδρασή της με το δάκο (βλ. Πίνακα 2).

Πτητική ένωση	Προέλευση ένωσης	Απόκριση ώριμων θηλυκών
Τολουένιο	Φύλλα / καρποί ελιάς μέσης ωρίμανσης	<b>Προσέλκυση</b>
ethylbenzene	>>	<b>Προσέλκυση</b> / Ενεργοποίηση ωοαπόθεσης (ασθενής)
α-πινένιο	Φύλλα (υψηλή συγκέντρωση) / καρποί ελιάς μέσης ωρίμανσης	<b>Προσέλκυση</b> (ασθενής)/ Ενεργοποίηση ωοαπόθεσης ( <b>ισχυρή</b> )
ο-/ρ- ξυλένιο	Φύλλα / καρποί ελιάς μέσης ωρίμανσης	Ενεργοποίηση ωοαπόθεσης (ασθενής)
n-οκτάνιο	>>	<b>Προσέλκυση</b> (ασθενής)>>
(E)-2-hexenal	Συνθλιμμένοι/τραυματισμένοι καρποί ελιάς	<b>Απόθιση</b> ( <b>ισχυρή</b> )/ Αναστολή ωοαπόθεσης ( <b>ισχυρή</b> )
hexanal	>>	<b>Απόθιση</b> / Αναστολή ωοαπόθεσης
Υδροξυτυροσόλη	Φύλλα / καρποί ελιάς	<b>Απόθιση</b>

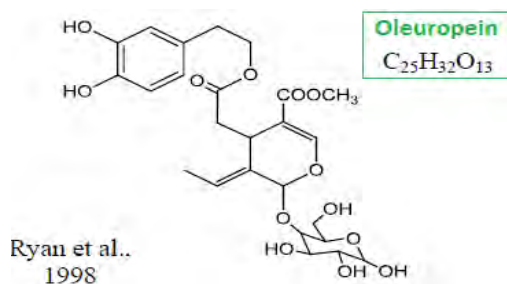
Πίνακας 2. Πτητικές ενώσεις της ελιάς με βιολογική σημασία για το δάκο (Τροποποίηση από Scarpati et al. 1993, Liscia et al. 2013).

### 1.6.1 Ολευρωπαΐνη

Η ολευρωπαΐνη (oleuropein) είναι η κυριότερη φαινολική ένωση της ελιάς και μπορεί να φτάσει συγκεντρώσεις έως 140 mg/g ξηρής μάζας σε μη ώριμες ελιές και 60– 90 mg/g στα φύλλα (Syed Haris Omar.2010).Είναι υπεύθυνη για την πικρή γεύση του καρπού και η συγκέντρωση της μεταβάλλεται ανάλογα με την ποικιλία της ελιάς, το στάδιο ωρίμανσης και τις περιβαλλοντικές συνθήκες στις οποίες εκτίθεται το δέντρο.

#### Χημική δομή

Η ολευρωπαΐνη ανήκει στα σεκοϊριδοειδή (secoiridoids). Είναι εστέρας της (3,4-διυδροξυφαινυλ)-αιθανόλης (κοινώς γνωστή ως υδροξυτυροσόλη) και έχει τον ελαιοσιδικό σκελετό που είναι κοινός στους σεκοϊριδοειδείς γλυκοζίτες (βλ. Εικ. 12). Πρόκειται για μη πτητική ένωση με σημείο βρασμού μεταξύ 712.9-832.9° C.



**Εικόνα 12.** Χημική δομή της ολευρωπαΐνης (Ryan et al. 1998)

### ***Γνωστές δράσεις***

Η ολευρωπαΐνη εμπειριστατωμένα συμμετέχει στην ρύθμιση της ωοαπόθεσης του δάκου της ελιάς προκαλώντας ισχυρή χημειοτακτική απώθηση (Lo Scalzo et al. 1994, Soler-Rivas et al. 2000). Σε αυτή της τη δράση οφείλονται διαφορές στα επίπεδα προσβολής διαφορετικών ποικιλιών ελαιόδεντρων. Υπάρχει θετική συσχέτιση μεταξύ της συγκέντρωσης της ολευρωπαΐνης και της πιθανότητας μη προσβολής της ελιάς (Iannotta et al. 2006a, 2007d). Πράγματι, όσο υψηλότερη είναι η συγκέντρωσή της τόσο λιγότερο είναι το ποσοστό προσβολής από δάκο. Επιπλέον, η ολευρωπαΐνη δρα ως αντιβιοτικό προστατεύοντας το δέντρο από βακτηριακές/μυκητιακές προσβολές (Noce et al. 2014) και συμμετέχει στην επιλογή των συμβιωτικών βακτηρίων που απαιτούνται για την ανάπτυξη της προνύμφης (Mazzini and Vita. 1981). Υψηλά επίπεδα ολευρωπαΐνης παρεμποδίζουν την ανάπτυξη των πρώιμων σταδίων του δάκου, ιδίως των αυγών και της προνύμφης πρώτου σταδίου (first instar larva) (Noce et al. 2014).

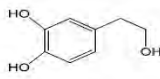
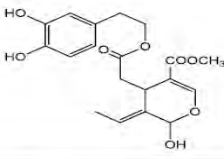
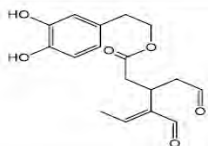
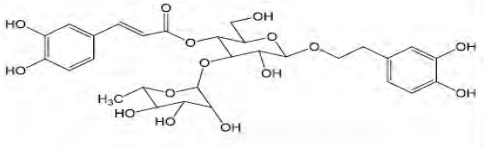
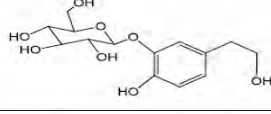
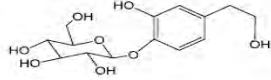
### **1.6.2 Υδροξυτυροσόλη**

Η υδροξυτυροσόλη (hydroxytyrosol) απαντάται μόνο σε φυτά του γένους *Olea* και περιλαμβάνεται στις κύριες φαινολικές ενώσεις της ελιάς. Εντοπίζεται τόσο στα φύλλα όσο και στους καρπούς του δέντρου σε συγκεντρώσεις που δεν ξεπερνούν τα 4 mg/g ξηρής μάζας. Η σύνθεση της γίνεται είτε απευθείας μέσω του δευτερογενούς μεταβολισμού του φυτού, είτε μέσω φυσικής υδρόλυσης της ολευρωπαΐνης (υπό κατάλληλες περιβαλλοντικές συνθήκες) (Soler-Rivas et al. 2000). Σε αντίθεση με άλλους δευτερογενείς μεταβολίτες, η υδροξυτυροσόλη παρουσιάζει σχετικά σταθερές συγκεντρώσεις μεταξύ διαφορετικών ποικιλιών ελιάς και σταδίων ωρίμανσης του καρπού (Alagna et al. 2012).

### ***Δομή και φυσικοχημικά χαρακτηριστικά***

Η υδροξυτυροσόλη ανήκει στις φαινολικές αλκοόλες. Απαντάται είτε σε ελεύθερη μορφή (3,4-DHPEA), είτε σε εστεροποιημένη: i) με ελενολικό οξύ προς σχηματισμό ολευρωπαΐνης ή της αγλυκονικής της μορφής (3,4-DHPEA-EA) ή της δικαρβοξυμεθυλικής αγλυκονικής μορφής (3,4-DHPE-EDA), ii) με καφεϊκό οξύ προς σχηματισμό βερμπασκόζης (verbascoside) και iii) σε γλυκοσιδική μορφή ως γλυκοζίτης υδροξυτυροσόλης (hydroxytyrosol glucoside) (βλ. Πίνακα 3). Σε ορισμένα πειράματα καθορισμού των φαινολικών ενώσεων της ελιάς, η υδροξυτυροσόλη δεν αντιμετωπίζεται ως πτητική. Ωστόσο, λαμβάνοντας υπόψη τα φυσικοχημικά

χαρακτηριστικά της ένωσης, όπως το σημείο βρασμού και την τάση/πίεση ατμών, η ελεύθερη υδροξυτυροσόλη είναι ξεκάθαρα πτητική. Συγκεκριμένα, η υδροξυτυροσόλη έχει σημείο βρασμού 174°C που την καθιστά πτητική σύμφωνα με την κατηγοριοποίηση πτητικότητας οργανικών ενώσεων της EPA (Environmental Protection Agency of United States). Επιπλέον, είναι γνωστό ότι η πτητικότητα εξαρτάται από την τάση ατμών και όσο αυτή αυξάνεται τόσο χαμηλότερο είναι το σημείο βρασμού. Η υδροξυτυροσόλη έχει τάση ατμών περίπου στα 0,3 mm Hg , πρακτικά ίση με το δωδεκάνιο. Βάση της κατηγοριοποίησης πτητικότητας των Vδ και Morris (2014), το δωδεκάνιο με σημείο βρασμού 216 °C και τάσης ατμών 0,3 mm Hg είναι πτητικό. Επομένως, βάση της ίδιας κατηγοριοποίησης η υδροξυτυροσόλη με σημείο βρασμού 174 °C και τάσης ατμών 0,3 mm Hg είναι σίγουρα πτητική.

Hydroxytyrosol / 3,4-DHPEA / DOPET	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub>	MW 154		Servilli et al., 2004
Oleuropein aglycone / 3,4-DHPEA-EA	C <sub>19</sub> H <sub>22</sub> O <sub>8</sub>	378		Servilli et al., 2004
3,4-DHPEA-EDA / Dialdehydic form of decarboxymethyl elenolic acid linked to hydroxytyrosol / DOA	C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> O <sub>6</sub>	320		Servilli et al., 2004
Verbascoside / Acteoside	C <sub>29</sub> H <sub>36</sub> O <sub>15</sub>	624		Innocenti et al., 2006
Hydroxytyrosol glucoside	C <sub>14</sub> H <sub>20</sub> O <sub>8</sub>	316	<p><i>Option 1</i></p>  <p><i>Option 2</i></p> 	Obied et al. 2007a

**Πίνακας 3.** Χημική δομή της ελεύθερης υδροξυτυροσόλης (3,4-DHPEA) και των διαφόρων εστέρων της : παρουσιάζονται οι χημικοί τύποι καθώς και το μοριακό βάρος (MW) των απεικονιζόμενων ενώσεων.

### Γνωστές δράσεις

Η υδροξυτυροσόλη συμπεριλαμβάνεται στις ενώσεις υπεύθυνες για τη χημειοτακτική απόθεση του θηλυκού δάκου από καρπούς που φέρουν νύγμα (Vita and Barbera 1976, Scarpati et al. 1993). Επίσης, έχει συσχετιστεί με ισχυρή αντιοξειδωτική δράση (Riachy et al. 2011a). Δεδομένων της πτητικότητάς της και της υψηλής συγκέντρωσής της στα φύλλα της ελιάς, η υδροξυτυροσόλη πιθανότατα αποτελεί οσφρητικό σήμα σχετικό με την ελιά. Όμως, δεν έχουν μελετηθεί αναλυτικά οι αλληλεπιδράσεις αυτής της ένωσης με το δάκο της ελιάς, σε αντίθεση με την ολεουρωπαΐνη.

## 2 ΣΚΟΠΟΣ

Ο δάκος της ελιάς είναι εμπεριστατωμένα μια από τις μεγαλύτερες απειλές για την εμπορική ελιά παγκοσμίως. Όπως προαναφέρθηκε, τα έντομα αυτά βασίζονται σε μεγάλο βαθμό στο οσφρητικό σύστημα για τον εντοπισμό και την επιλογή του ξενιστή τους. Επιπλέον, γνωρίζουμε ότι η ειδοειδική οικολογική προσαρμογή – ιδίως σε μονοφάγα έντομα – αντικατοπτρίζεται στο ρεπερτόριο των γονιδίων ORs. Επομένως, είναι αναμενόμενη η ύπαρξη ORs ειδοειδικών για τον δάκο που θα αποκρίνονται σε πτητικά της ελιάς, όπως είναι η υδροξυτυροσόλη. Δεδομένου ότι υπάρχει διαθέσιμο το γονιδίωμα του δάκου, το γονιδίωμα συγγενικών ειδών εντόμων καθώς και διαθέσιμα προφίλ πτητικών ενώσεων της ελιάς, μπορούμε να προβούμε σε μελέτη των γονιδίων ORs του δάκου. **Σκοπός** της εν λόγω πτυχιακής εργασίας είναι:

- 1) η φυλογενετική μελέτη των γονιδίων ORs του δάκου για εύρεση πιθανών ειδοειδικών υποδοχέων που αποκρίνονται στην υδροξυτυροσόλη και
- 2) ο έλεγχος της απόκρισης των πιθανών ειδοειδικών ORs στην υδροξυτυροσόλη, μέσω ανάλυσης έκφρασης γονιδίων με qReal-Time PCR.

Απώτερος στόχος των παραπάνω είναι η αντιστοίχιση υποδοχέων-οσμηνού ερεθίσματος για καλύτερη κατανόηση της σχέσης του δάκου με τον ξενιστή του και μελλοντική χρήση τους για τον έλεγχο του εντόμου αυτού.

## 3 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 3.1 Στελέχη δάκου και συνθήκες διατήρησης

Στα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν δάκοι του εργαστηριακού στελέχους 'Δημόκριτος'. Το στέλεχος διατηρείται σε ξύλινα κλουβιά με φωτοπερίοδο φως/σκοταδιού 14:10 ωρών, θερμοκρασία  $25 \pm 1$  °C και σχετική υγρασία  $60 \pm 10\%$ .

### 3.2 Έκθεση σε υδροξυτυροσόλη και απομόνωση ιστών

Την ημέρα της έκδυσης (eclosion) τα ενήλικα έντομα τοποθετούνται σε ξεχωριστά κλουβιά ανάλογα με το φύλο. Τα κλουβιά είναι γειτονικά έτσι ώστε τα έντομα να έχουν προσυζευκτική επικοινωνία, χωρίς ωστόσο να συζευχθούν. Την 8<sup>η</sup> μέρα μετά την έκδυση, θηλυκά παρθένα άτομα (unmated virgin) τοποθετούνται σε κοινό κλουβί με αρσενικά άτομα ίδιας ηλικίας (αρσενικοί 8<sup>ης</sup> ημέρας μετά την έκδυση). Στο κοινό κλουβί προστίθενται και ώριμοι αρσενικοί δάκοι ανεξαρτήτως ηλικίας για να αυξηθεί η επιτυχία της σύζευξης. Σύζευξη πραγματοποιείται τις ημέρες 8-12 (μετά την έκδυση). Την 13<sup>η</sup> ημέρα συλλέγονται οι συζευγμένες θηλυκές και δημιουργούνται τέσσερις δεξαμενές (pool) των τριών ατόμων και τέσσερα pool των δύο ατόμων.

**Έκθεση:** Την 13<sup>η</sup> μέρα μετά την έκδυση γίνεται η έκθεση στην υδροξυτυροσόλη.

## Κεφαλή

- Δύο βιολογικά δείγματα (pool 3 ατόμων το καθένα) εκτίθενται για 20 λεπτά στην υδροξυτυροσόλη, η οποία χορηγείται με πιπέτα στην κεφαλή κάθε εντόμου (**1 μl υδροξυτυροσόλη** συγκέντρωσης **7,7 ng/ μl** ανά έντομο).
- Δύο βιολογικά δείγματα **control** (pool 3 ατόμων το καθένα) εκτίθενται για 20 λεπτά σε **1 μl ακετόνης**. Η ακετόνη ήταν ο διαλύτης με τον οποίο πραγματοποιήθηκε η αραιώση της υδροξυτυροσόλης.

## Θώρακας

- Δύο βιολογικά δείγματα (pool 2 ατόμων το καθένα) εκτίθενται για 20 λεπτά στην υδροξυτυροσόλη, η οποία χορηγείται με πιπέτα πάνω στην εσωτερική πλευρά του θώρακα κάθε εντόμου (**1 μl υδροξυτυροσόλη** συγκέντρωσης **7,7 ng/ μl** ανά έντομο).
- Δύο βιολογικά δείγματα **control** (pool 2 ατόμων το καθένα) εκτίθενται για 20 λεπτά σε **1 μl ακετόνης**.

**Απομόνωση ιστών:** Μετά την έκθεση ακολουθεί αναισθητοποίηση των εντόμων στους 4°C για 2 λεπτά για να ακινητοποιηθούν και εν συνεχεία απομονώνονται:

1. Στοματικά μέρη και γναθικές προσακτρίδες από κάθε pool 3 ατόμων. Οι ιστοί κάθε βιολογικού δείγματος τοποθετούνται ξεχωριστά σε 20 μl TRI.
2. Κεφάλια με τις κεραίες (χωρίς στοματικά μέρη και γναθικές προσακτρίδες) από κάθε pool 3 ατόμων. Οι ιστοί κάθε βιολογικού δείγματος τοποθετούνται ξεχωριστά σε 20 μl TRI.
3. Θώρακες (χωρίς να συμπεριλαμβάνονται τα πόδια) από κάθε pool 2 ατόμων. Οι ιστοί κάθε βιολογικού δείγματος τοποθετούνται ξεχωριστά σε 40 μl TRI.

### **3.3 Απομόνωση RNA**

Οι μέθοδοι απομόνωσης που βασίζονται στη χρήση οργανικών διαλυτών (organic extraction methods) θεωρούνται το “χρυσό στάνταρ” της προετοιμασίας RNA. Σε αυτές τις διαδικασίες, το δείγμα αρχικά ομογενοποιείται σε φαινολικό διάλυμα και έπειτα φυγοκεντρείται. Κατά τη φυγοκέντρωση, το δείγμα διαχωρίζεται σε τρεις φάσεις: 1) μια κάτω οργανική φάση που περιέχει μετουσιωμένες πρωτεΐνες και λιπίδια, 2) μια μεσαία φάση που περιέχει το γενωμικό DNA και 3) μια πάνω υδατική φάση στην οποία βρίσκεται το RNA. Η υδατική φάση ανακτάται και το RNA απομονώνεται με κατακρήμνιση (σε διάλυμα αλκοόλης) και ακολουθεί επαναδιαλυτοποίηση. Αυτές οι μέθοδοι έχουν ως προτέρημα την ταχύτατη μετουσίωση των νουκλεασών και τη σταθεροποίηση του RNA. Ωστόσο, κάνουν χρήση χλωριούχων οργανικών ενώσεων που βλάπτουν το περιβάλλον και είναι δύσκολο να αυτοματοποιηθούν.

Στα πλαίσια αυτής της πτυχιακής ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο απομόνωσης RNA με χρήση του TRI Reagent®.

### **Υλικά**

- TRI reagent ή εναλλακτικά TRIzol
- BCP (1-bromo-3-chloropropane)
- Ισοπροπανόλη
- Αιθανόλη [75%]
- H<sub>2</sub>O

### **Μέθοδος**

Η διαδικασία απομόνωσης RNA περιλαμβάνει 5 βήματα:

#### **1) Ομογενοποίηση ιστών**

- Ομογενοποίηση ιστών σε 50 μl TRI με χρήση πλαστικού εμβόλου (pestle). Προσθήκη TRI ώστε ο τελικός όγκος του δείγματος να είναι 300 μl.
- Ειδικά για τους θώρακες (ιστός με σκληρά τμήματα), γίνεται φυγοκέντρηση του ομογενοποιημένου στα 12.000 g για 5 min ώστε να απομακρυνθούν τα υπολείμματα. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο σωληνάκι (tube).

#### **2) Διαχωρισμός φάσεων**

- Το ομογενοποίημα αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min.
- Προστίθενται 30 μl BCP (βάση σχέσης 0,1 ml BCP/1 ml TRI) και γίνεται έντονη ανακίνηση των δειγμάτων (χωρίς vortex).
- Το προκύπτον διάλυμα αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 3 min.
- Φυγοκέντρηση του διαλύματος στα 12.000 g για 15 min σε θερμοκρασία 4°C.
- Προκύπτει τριφασικό διάλυμα όπως προαναφέρθηκε.

#### **3) Κατακρήμνιση RNA**

- Η υδατική φάση που περιέχει το RNA μεταφέρεται σε νέο tube (απομακρύνονται η μεσόφαση που περιέχει το DNA και η οργανική φάση που περιέχει πρωτεΐνες).
- Προστίθενται 150 μl ισοπροπανόλης (βάσει της σχέσης 0,5 ml ισοπροπανόλης /1 ml TRI).
- Επώαση του διαλύματος για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Φυγοκέντρηση του διαλύματος στα 12.000 g για 10 min σε θερμοκρασία 4°C.

#### **4) Καθαρισμός RNA**

- Απομάκρυνση υπερκείμενου και προσθήκη 300 μl αιθανόλης συγκέντρωσης 75%. Ακολουθεί vortex.
- Φυγοκέντρηση του διαλύματος στα 7500 g για 5 min σε θερμοκρασία 4°C.

- Επανάληψη της πλύσης με απομάκρυνση του υπερκείμενου και εκ νέου προσθήκη 300 μl αιθανόλης συγκέντρωσης 75%.

### 5) Διαλυτοποίηση RNA

- Απομάκρυνση της αιθανόλης με πιπέτα και στέγνωμα/ξήρανση του ιζήματος για 10 min στον κλίβανο.
- Προσθήκη 8 μl H<sub>2</sub>O ώστε να ενυδατωθεί το RNA.
- Ακολουθεί vortex για 30 min.

### 3.4 Επεξεργασία με DNase (DNase treatment of RNA)

Το ολικό RNA που απομονώθηκε, επρόκειτο να μετατραπεί σε cDNA και να χρησιμοποιηθεί σε ποσοτική Real-Time PCR. Για να είναι ακριβή τα αποτελέσματα, έπρεπε να εξασφαλιστεί η μη επιμόλυνση του δείγματος RNA με DNA. Για αυτό γίνεται χρήση DNάσης (δεοξυριβονουκλεάση), ενζύμου που καταλύει την υδρόλυση των φωσφοδιεστερικών δεσμών του DNA και προκαλεί την αποικοδόμηση του.

#### Υλικά

- DNάση (Invitrogen)
- Buffer DNάσης (10X)
- DNase free H<sub>2</sub>O
- DNase Inactivation Buffer (διάλυμα απενεργοποίησης του ενζύμου)

#### Μέθοδος

Οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν για μια αντίδραση DNάσης παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα:

Υλικά	Ποσότητες
<b>RNA</b>	8 μl
<b>DNase</b>	0,2 μl (0,4 units)
<b>Buffer [10X]</b>	1 μl [1X]
<b>DNase free H<sub>2</sub>O</b>	0,8 μl
Τελικός όγκος	10 μl

- Το διάλυμα της αντίδρασης επωάζεται στους 37°C για 25 min ώστε να ολοκληρωθεί η αποικοδόμηση του DNA.
- Ακολούθως, προστίθεται inactivation buffer (βάσει αναλογίας 1 μl inactivation buffer/ 10 μl αντίδρασης) που σταματάει την δράση της

DNάσης. Καθώς το δείγμα θα χρησιμοποιηθεί για αντίστροφη μεταγραφή και qRT-PCR, πρέπει να μην περιέχει ενεργή DNάση που μπορεί να αποικοδομήσει το DNA που θα παραχθεί.

- Φυγοκέντρηση στα 11.000 g για 2 min. Ανακτάται το υπερκείμενο και μεταφέρεται σε νέα tubes.

### 3.5 Σύνθεση cDNA με M-MLV αντίστροφη μεταγραφάση (M-MLV Reverse Transcriptase)

Η σύνθεση DNA με μήτρα ένα μόριο RNA, μέσω αντίστροφης μεταγραφής, παράγει μια συμπληρωματική αλυσίδα DNA (cDNA). Το cDNA είναι πολύ πιο σταθερό μόριο από το RNA και μπορεί να διατηρηθεί ανέπαφο για μεγάλο χρονικό διάστημα. Οι αντίστροφες μεταγραφάσες (reverse transcriptases, RTs) χρησιμοποιούν ως μήτρα το RNA και έναν μικρό εκκινητή, συμπληρωματικό ως προς το 3' άκρο του RNA για να συνθέσουν την αλυσίδα του cDNA. Στη συνέχεια, το cDNA μπορεί να χρησιμοποιηθεί κατευθείαν για ποσοτική Real-Time PCR.

Σε αυτή την εργασία χρησιμοποιήθηκε η M-MLV αντίστροφη μεταγραφάση (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase, M-MLV RT) για τη σύνθεση cDNA με μήτρα ολικό RNA. Η M-MLV αντίστροφη μεταγραφάση είναι RNA-εξαρτώμενη DNA πολυμεράση που δεν έχει 3' → 5' δράση εξωνουκλεάσης. Το ένζυμο έχει δυνατότητα σύνθεσης συμπληρωματικού κλώνου DNA από μονόκλωνο RNA, DNA, ή από υβρίδιο RNA:DNA. Επίσης, παρουσιάζει μειωμένη δράση RNάσης Η και μπορεί να συνθέσει cDNA μήκους μέχρι 7 kb.

#### Υλικά

- M-MLV RT [200 units/μl]
- Τυχαίοι εκκινητές (random primers)
- 10 mM dNTP Mix (dATP, dGTP, dCTP, dTTP σε συγκέντρωση 10 mM το καθένα σε ουδέτερο pH)
- ddH<sub>2</sub>O (Δις απεσταγμένο νερό)
- First-Strand Buffer [5X]
- DTT (dithiothreitol) [0,1 M]
- RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor [40 units/μl]

#### Μέθοδος

Οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν για μια αντίδραση M-MLV RT παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα:

Υλικά	Ποσότητες	
<b>Total RNA</b>	8,5 μl	Mix 1
<b>Random Primers</b>	1 μl	
<b>dNTP mix</b>	1 μl [2 mM]	
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	1,5 μl	



<b>Buffer [5X]</b>	4 $\mu$ l [1X]	Mix 2
<b>DTT</b>	2 $\mu$ l	
<b>Rnase inhibitor</b>	1 $\mu$ l (40 u)	
<b>M-MLV RT</b>	1 $\mu$ l (200 u)	
Τελικός όγκος	<b>20 <math>\mu</math>l</b>	

Η πειραματική διαδικασία περιελάμβανε τα εξής βήματα:

- 1) Προσθήκη του Mix 1 στο δείγμα RNA.
  - 2) Θέρμανση του μίγματος στους 65°C για 5 min και γρήγορη ψύξη σε πάγο. Ακολουθεί σύντομη φυγοκέντρηση στα 11.000 g για 1 min ώστε να συλλεχθεί τυχόν μέρος του δείγματος που έχει μετατραπεί σε υδρατμούς.
  - 3) Προσθήκη του Mix 2 και ήπια ανάδευση του μίγματος με πιπετάρισμα.
- Τα βήματα 4 έως 7 πραγματοποιούνται σε θερμοκυκλοποιητή.
- 4) Επώαση μίγματος στους 37°C για 2 min.
  - 5) Επώαση μίγματος στους 25°C για 10 min.
  - 6) Επώαση μίγματος στους 37°C για 50 min.
  - 7) Απενεργοποίηση της M-MLV RT και λήξη της αντίδρασης με θέρμανση του μίγματος στους 70°C για 15 min.

### 3.6 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) είναι μια εξαιρετικά διαδεδομένη τεχνική στη μοριακή βιολογία. Πρόκειται για *in vitro* ενζυμική μέθοδο ενίσχυσης συγκεκριμένων αλληλουχιών DNA σε πολλαπλά αντίγραφα, μέσω επαναλαμβανόμενων κύκλων με εναλλαγές στη θερμοκρασία. Σε κάθε κύκλο ο νεοσυντιθέμενος κλώνος λειτουργεί ως εκμαγείο για τη σύνθεση νέων, πολλαπλασιάζοντας εκθετικά την αλληλουχία στόχο. Παρουσιάστηκε για πρώτη φορά το 1986 (Mullis et al, 1986).

Η αντίδραση της PCR πραγματοποιείται σε τρία στάδια, τα οποία επαναλαμβάνονται διαδοχικά:

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

3. **Το στάδιο της επιμήκυνσης.** Στο στάδιο αυτό το ένζυμο Taq πολυμεράση, επιμηκώνει τους εκκινητές εισάγοντας τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (Deoxynucleotide triphosphates, dNTPs) χρησιμοποιώντας τη συμπληρωματική αλληλουχία DNA ως εκμαγείο. Η ταχύτητα σύνθεσης της νέας αλυσίδας είναι της τάξης των 1000 bp ανά λεπτό. Η θερμοκρασία για την αντίδραση επιμήκυνσης είναι 72°C (βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της Taq πολυμεράσης).

Ανάλογα με το μέγεθος του επιθυμητού προϊόντος, τα παραπάνω στάδια επαναλαμβάνονται από 25 έως 35 φορές. Συνήθως μετά τους 30 κύκλους η μέθοδος εμφανίζει συχνά λάθη. Η PCR εκτελείται σε θερμικό κυκλοποιητή (thermal cycler), συσκευή που φέρει θερμαινόμενη πλάκα που μπορεί να εναλλάσσει θερμοκρασίες με ταχύτητα και ακρίβεια. Ο υπολογισμός των τελικών αντιγράφων της αλληλουχίας προκύπτει ως  $2^n$  αντίγραφα του κάθε αρχικού μορίου DNA, όπου  $n$  οι κύκλοι της PCR.

Παρακάτω φαίνονται τα στάδια μιας τυπικής αντίδρασης PCR:

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

Στα πλαίσια αυτής της πτυχιακής, πραγματοποιήθηκαν τυπικές αντιδράσεις PCR για να επαληθευτεί η σωστή λειτουργία των ζευγών εκκινητών που σχεδιάστηκαν.

### Υλικά

- DNA
- Εκκινητές (Forward και Reverse)
- dNTPs
- DNA Taq πολυμεράση
- Ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμου (Buffer)
- $MgCl_2$

### Μέθοδος

Σε μια τυπική αντίδραση PCR τελικού όγκου 20μl, προστίθενται τα εξής αντιδραστήρια σε ειδικό σωληνάκι :

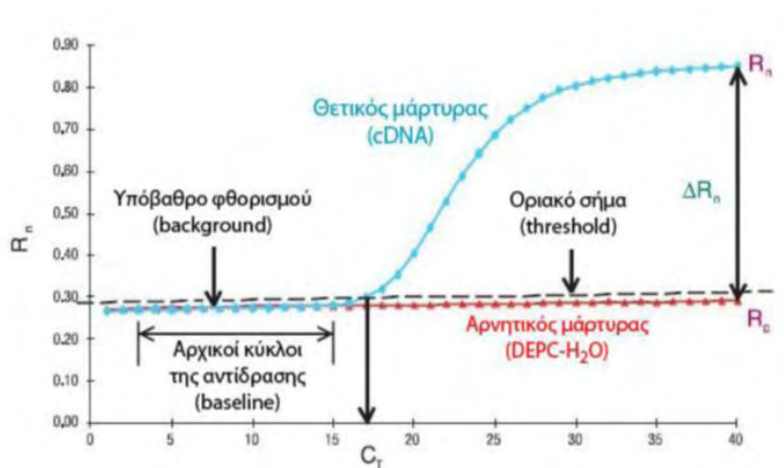
Υλικά	Ποσότητες
DNA ή cDNA	2 $\mu$ l
Buffer [10X]	2 $\mu$ l [1X]
DNTPs [40 mM]	0,4 $\mu$ l [0,8 mM]
Εκκινητής F [10 pmol/ $\mu$ l]	0,6 $\mu$ l [0,3 $\mu$ M]
Εκκινητής R [10 pmol/ $\mu$ l]	0,6 $\mu$ l [0,3 $\mu$ M]
Ταq πολυμεράση [5 units/ $\mu$ l]	0,2 $\mu$ l (1 unit)
ddH <sub>2</sub> O	14,2 $\mu$ l
Τελικός όγκος	<b>20 <math>\mu</math>l</b>

Εν συνεχεία το σωληνάκι τοποθετείται σε θερμοκυκλοποιητή και πραγματοποιούνται οι κύκλοι της PCR, όπως περιγράφηκαν παραπάνω.

### 3.6.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Quantitative Real Time PCR, QRT-PCR)

Η ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (Quantitative Real Time PCR, QRT-PCR ή qPCR) αποτελεί μια προηγμένη εφαρμογή της κλασσικής PCR και χρησιμοποιείται στη μελέτη γονιδιακής έκφρασης. Μέσω της qPCR, μπορεί να προσδιοριστεί η ποσότητα DNA ή RNA που βρίσκεται αρχικά σε ένα δείγμα και να συγκριθούν οι ποσοτικές τιμές της ίδιας αλληλουχίας μεταξύ διαφορετικών δειγμάτων. Η μέθοδος επιτρέπει τον καθορισμό της ποσότητας του προϊόντος ενίσχυσης, σε πραγματικό χρόνο, καθώς εξελίσσεται η αντίδραση της PCR. Η ανίχνευση του ενισχυόμενου τμήματος DNA επιτυγχάνεται μέσω μιας φθορίζουσας χρωστικής, όπως τη SYBR Green 1. Η SYBR είναι χρωστική που προσδένεται μη εξειδικευμένα σε δίκλωνο DNA και αυξάνει τον φθορισμό της 20-100 φορές από όταν είναι σε ελεύθερη μορφή (Yibing Jia, 2012). Καθώς προχωράει η PCR, αυξάνεται η ποσότητα του δίκλωνου DNA και αντίστοιχα η ένταση του φθορισμού από το SYBR. Ωστόσο, λόγω έλλειψης εξειδίκευσης του SYBR, η χρωστική ενσωματώνεται σε όλα τα δίκλιωνα τμήματα DNA παρόντα στο δείγμα π.χ. διμερή εκκινητών ή ενισχυμένα μη-ειδικά προϊόντα της αντίδρασης. Σαν αποτέλεσμα, αυξάνεται ο συνολικός φθορισμός του δείγματος δίνοντας ψευδή αποτελέσματα για την ποσότητα του DNA στόχου. Για αυτό, είναι άκρως σημαντική η βελτιστοποίηση των συνθηκών της qPCR ώστε να ενισχύεται μόνο η αλληλουχία στόχος.

Ο υπολογισμός της αρχικής ποσότητας DNA σε ένα δείγμα και η σύγκριση των ποσοτήτων αλληλουχίας στόχου μεταξύ διαφορετικών δειγμάτων, επιτυγχάνεται μέσω της τιμής C<sub>q</sub> (ή C<sub>t</sub>) της qPCR. Ως C<sub>q</sub> ορίζεται ο αριθμός κύκλων PCR που απαιτείται για να ξεπεράσει ο φθορισμός του προϊόντος το όριο ανίχνευσης (threshold). Η τιμή C<sub>q</sub> είναι αντιστρόφως ανάλογη της αρχικής ποσότητας του DNA στόχου στο δείγμα, δηλαδή όσο υψηλότερο το C<sub>q</sub> τόσο λιγότερα αντίγραφα του στόχου υπήρχαν στο αρχικό δείγμα.



Σχηματική απεικόνιση της καμπύλης της ποσοτικής Real-Time PCR.

Προκειμένου να εξασφαλιστεί η αξιοπιστία σύγκρισης των επιπέδων mRNA σε διαφορετικά δείγματα, είναι απαραίτητη η κανονικοποίηση των τιμών έκφρασής τους. Η κανονικοποίηση είναι μια διαδικασία που αντισταθμίζει τα πειραματικά σφάλματα, που προέρχονται από το χειρισμό των δειγμάτων (π.χ εισαγωγή διαφορετικών τελικών ποσοτήτων γενετικού υλικού από το κάθε δείγμα στην αντίδραση) και τη διαφορετική απόδοση των αντιδράσεων μεταγραφής ή/και της PCR. Για την κανονικοποίηση των τιμών η πιο συνηθής μέθοδος είναι η παράλληλη ενίσχυση ενός γονιδίου σταθερής έκφρασης (housekeeping gene, hkg) στους εξεταζόμενους ιστούς, που παίζει το ρόλο εσωτερικού μάρτυρα και λειτουργεί ως γονίδιο αναφοράς. Η κανονικοποιημένη ποσότητα της αλληλουχίας στόχου προσδιορίζεται ως προς την έκφραση του γονιδίου αναφοράς (σχετική έκφραση, normalized relative expression). Η σχετική ποσοτικοποίηση πραγματοποιείται με τη μέθοδο σύγκρισης των Ct ( $\Delta\Delta Ct$ ) (Livak et al, 2001). Όλη η επεξεργασία των αποτελεσμάτων της Real-Time PCR και η ανάλυση γονιδιακής έκφρασης, πραγματοποιήθηκαν με χρήση του προγράμματος CFX Manager Software 3.1 (Bio-Rad CFX96).

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

### Υλικά

- cDNA
- Εκκινητές (Forward και Reverse)
- iTaq Universal SYBR Green Supermix (Mix διάλυμα, στο οποίο περιέχονται τα: hot-start iTaq DNA polymerase, dNTPs,  $MgCl_2$ , SYBR® Green I dye)

## Μέθοδος

Για την πραγματοποίηση μιας Real-time PCR προστίθενται στα ειδικά PCR σωληνάκια τα παρακάτω συστατικά με τελικό όγκο 15μL. Τα συστατικά της αντίδρασης dNTPs, Ταq πολυμεράση, ρυθμιστικό διάλυμα πολυμεράσης, MgCl<sub>2</sub> και SYBR Green βρίσκονται ήδη στο Buffer mix.

Για το κάθε δείγμα cDNA πραγματοποιείται ξεχωριστή αντίδραση ενίσχυσης με το εκάστοτε ζεύγος εκκινητών ανά γονίδιο, καθώς και με τους εκκινητές των γονιδίων αναφοράς. Στην εργασία αυτή χρησιμοποιήθηκαν τρία γονίδια αναφοράς, δύο ανά κάθε ιστό: α-TUB και RpL19 για τα κεφάλια/κεραίες, α-TUB και GAPDH για τους θώρακες.

Υλικά	Ποσότητες
cDNA (αραίωση 1:20)	2 μl
Buffer mix [2X]	7,5 μl [1X]
Εκκινητής F [10 pmol/μl]	0,45 μl [300 nM]
Εκκινητής R [10 pmol/μl]	0,45 μl [300 nM]
ddH <sub>2</sub> O	4,6 μl
<b>Τελικός όγκος</b>	<b>15 μl</b>

- Στην περίπτωση του γονιδίου XM\_014239073 Or94a-like χρειάστηκε επιπλέον προσθήκη 2 mM MgCl<sub>2</sub> στο διάλυμα της qPCR για να λειτουργήσουν οι εκκινητές. Οπότε τα μl MgCl<sub>2</sub> που προστέθηκαν αντισταθμίστηκαν με αντίστοιχη μείωση των μl του ddH<sub>2</sub>O, ώστε ο τελικός όγκος αντίδρασης να παραμείνει 15 μl.

Τα σωληνάκια με τα υλικά της qPCR τοποθετούνται σε ειδικό θερμοκυκλοποιητή που όμως έχει δυνατότητα ανίχνευσης του φθορισμού του SYBR green. Όπως και στην κλασική PCR, πραγματοποιούνται κύκλοι με εναλλαγές θερμοκρασίας.

### 3.7 Απόδοση ενίσχυσης (Amplification efficiency)

Η απόδοση ενίσχυσης (amplification efficiency, E) αποτελεί δείκτη της αποτελεσματικότητας της αντίδρασης PCR. Ο καθορισμός της απόδοσης είναι απαραίτητος για σωστή ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων της Real-time PCR. Θεωρούμε ότι η απόδοση είναι 100% όταν κατά την εκθετική φάση μιας αντίδρασης PCR γίνεται τέλειος διπλασιασμός του προϊόντος ανά κύκλο και παρατηρείται δεκαπλάσια αύξηση του προϊόντος ανά 3,32 κύκλους αντίδρασης (Stephenson, 2016). Το efficiency υπολογίζεται βάσει του τύπου:  $E\% = 10^{(-1/\text{slope})} \times 100$ ,

όπου slope είναι η κλίση της πρότυπης καμπύλης που κατασκευάζεται από αραιώσεις ενός δείγματος DNA γνωστής συγκέντρωσης. Η σωστή ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων της Real-time PCR προϋποθέτει efficiency 90-110% και κλίση που

να μην ξεπερνά το -3,3. Για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης σε αυτή την εργασία, έγινε χρήση δείγματος DNA γνωστής συγκέντρωσης σε αραιώσεις 1:5, 1:10, 1:50 και 1:100. Ο υπολογισμός της κλίσης (slope) και εν συνεχεία του efficiency για κάθε ζεύγος εκκινητών, έγινε αυτόματα με χρήση του προγράμματος CFX Manager Software 3.1.

### **3.8 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης**

Η ηλεκτροφόρηση είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος διαχωρισμού και ανάλυσης μακρομορίων (DNA, RNA, πρωτεΐνες). Όσον αφορά το DNA, η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα (gel) αγαρόζης αποτελεί την πιο αποτελεσματική μέθοδο διαχωρισμού τμημάτων μήκους 100 bp έως 25 kb (Lee et al., 2012). Τα μόρια του DNA εισάγονται σε ειδικές θέσεις (πηγάδια) εντός του πηκτώματος αγαρόζης (πορώδες μέσο που προκύπτει από πολυμερισμό του πολυσακχαρίτη αγαρόζη), το οποίο τοποθετείται μέσα σε συσκευή ηλεκτροφόρησης (συσκευή που δημιουργεί ηλεκτρικό πεδίο μεταξύ δύο πόλων). Ως γνωστό, το μόριο του DNA φέρει αρνητικό φορτίο, σε ουδέτερο pH, εξαιτίας των φωσφορικών ομάδων που περιέχει. Έτσι με την εφαρμογή του ηλεκτρικού πεδίου, το DNA αρχίζει να μετακινείται προς τον θετικό πόλο της συσκευής. Επειδή το DNA έχει ομοιόμορφη κατανομή φορτίου/μάζα, ο διαχωρισμός των μορίων εντός του gel γίνεται βάση του μεγέθους των τμημάτων DNA. Η απόσταση που διανύει ένα τμήμα DNA στο gel είναι αντιστρόφως ανάλογη του λογαρίθμου του μοριακού του βάρους. Σαν αποτέλεσμα, τα μικρότερα σε μέγεθος (ζεύγη βάσεων) δείγματα απέχουν μικρότερη απόσταση από τον θετικό πόλο. Πρέπει να σημειωθεί ότι η ταχύτητα μετακίνησης των τμημάτων προς τον θετικό πόλο εξαρτάται από: 1) το μέγεθος του μορίου DNA, 2) τη συγκέντρωση αγαρόζης του gel (καθορίζει το μέγεθος των πόρων του πλέγματος αγαρόζης), 3) τη διαμόρφωση του DNA 4) την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου, 5) την παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου και 6) τον τύπο του buffer ηλεκτροφόρησης. Μετά το διαχωρισμό, τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης γίνονται ορατά χάρη στο βρωμιούχο αιθίδιο, μια φθορίζουσα χρωστική που ανιχνεύεται υπό υπεριώδες φως. Το βρωμιούχο αιθίδιο παρεμβάλλεται εντός της διπλής έλικας του DNA και καθιστά τα τμήματα του δείγματος ορατά. Τέλος, υπάρχει δυνατότητα εκτίμησης του μεγέθους των εξεταζόμενων τμημάτων βάση σύγκρισης με έναν μάρτυρα γνωστού μοριακού βάρους (ladder), ο οποίος αποτελεί ένα μίγμα τμημάτων με διακριτά μοριακά μεγέθη και μετακινείται παράλληλα με το DNA στο ηλεκτρικό πεδίο.

Σε αυτή την εργασία, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της qPCR ώστε να ελεγχθεί το μέγεθος των αναμενόμενων προϊόντων ενίσχυσης καθώς και τυχόν παρουσία παραπροϊόντων της αντίδρασης (π.χ διμερή εκκινητών).

#### **Υλικά**

- Ρυθμιστικό διάλυμα TBE 5X (1L: 54g Tris-base, 20mL EDTA 0,5M (pH:8), 27,5g Boric acid)
- Αγαρόζη

- Ladder (χρησιμοποιήθηκε ο pBR322 DNA/BsuRI (HaeIII) Marker 5, ladder ιδανικός για μικρά τμήματα DNA από 80 bp έως 587 bp)
- Διάλυμα φόρτωσης (Loading buffer) 10X (0,25% μπλε της βρωμοφαινόλης, 0,25% κυανού της ξυλόλης, 15% φικκόλη σε νερό)
- Βρωμιούχο αιθίδιο

### **Μέθοδος**

Για την παρασκευή 100mL πηκτώματος αγαρόζης 2%, 0,5X TBE ακολουθούνται τα εξής βήματα:

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

Για την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων:

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

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

## **3.9 In silico ανάλυση**

### **3.9.1 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)**

Το BLAST (Johnson et al., 2008) είναι ένα πρόγραμμα τοπικής στοίχισης αλληλουχιών που μας ενδιαφέρουν (query sequence) με αλληλουχίες μιας επιλεγμένης βάσης δεδομένων (target database). Ο αλγόριθμος παρέχεται από το NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) και δίνει πληθώρα δεδομένων για την στοίχιση μεταξύ της αλληλουχίας αναζήτησης (query) και των αλληλουχιών της βάσης όπως:

1) το βαθμό κάλυψης της αλληλουχίας αναζήτησης, 2) τον βαθμό ομοιότητας μεταξύ των αλληλουχιών που συγκρίνονται και πρωτίστως 3) το E-value (Expected value) της στοίχισης. Το E-value είναι μια παράμετρος που περιγράφει τον αριθμό των τυχαίων αντιστοιχίσεων που μπορούν να παρατηρηθούν μεταξύ της αλληλουχίας αναζήτησης και μιας βάσης δεδομένων συγκεκριμένου μεγέθους. Όσο μεγαλύτερο είναι το σκορ της στοίχισης (S) τόσο μειώνεται η τιμή του E-value. Ο αλγόριθμος παίρνει υπόψιν το μήκος της αλληλουχίας query κατά τον υπολογισμό του E-value. Πρακτικά, όσο χαμηλότερο το E-value ή πιο κοντά στο μηδέν, τόσο πιο στατιστικά σημαντική είναι η στοίχιση. Επομένως, η παράμετρος αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την επιλογή αλληλουχιών που μοιάζουν σημαντικά στην αλληλουχία που μας ενδιαφέρει.

Ο αλγόριθμος του BLAST έχει υποκατηγορίες ανάλογα με τη φύση της αλληλουχίας query (νουκλεοτιδική ή αμινοξική) και τον τύπο της βάσης δεδομένων με την οποία πραγματοποιείται η στοίχιση:

- **blastn**: Μια νουκλεοτιδική αλληλουχία query στοιχίζεται με τις αλληλουχίες μιας νουκλεοτιδικής βάσης δεδομένων.
- **blastp**: Μια αμινοξική αλληλουχία query στοιχίζεται με τις αλληλουχίες μιας πρωτεϊνικής βάσης δεδομένων.
- **blastx**: Μια νουκλεοτιδική αλληλουχία query μεταφράζεται σε αμινοξική και εν συνεχεία αυτή η αμινοξική αλληλουχία στοιχίζεται με τις αλληλουχίες μιας πρωτεϊνικής βάσης δεδομένων.

### 3.9.2 MEGA6

Το MEGA6 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0) είναι ένα πρόγραμμα βιοπληροφορικής, που χρησιμοποιείται για τη στοίχιση αλληλουχιών, για επαλήθευση φυλογενετικών σχέσεων και για τη διεξαγωγή ανάλυσης μοριακής εξέλιξης (Tamura et al., 2013). Ο αλγόριθμός του κατασκευάστηκε ειδικά για συγκριτικές μελέτες αλληλουχιών DNA/πρωτεϊνών για την εύρεση εξελικτικών μοριακών μοτίβων μεταξύ γονιδίων, γονιδιωμάτων και ειδών. Τα αποτελέσματα της φυλογενετικής ανάλυσης οπτικοποιούνται υπό τη μορφή φυλογενετικού δέντρου. Η μέθοδος στοίχισης των αλληλουχιών, η μέθοδος κατασκευής του φυλογενετικού δέντρου καθώς και οι σχετικοί παράμετροι (π.χ bootstrap) καθορίζονται από τον χρήστη. Επιπλέον, αυτή η έκδοση περιλαμβάνει ενισχυμένους αλγόριθμους, ώστε να επιλέγεται το βέλτιστο δέντρο ανάλογα με τα εξελικτικά κριτήρια που έχουν τεθεί.

Σε αυτή την πτυχιακή, η στοίχιση των αμινοξικών αλληλουχιών υποδοχέων ORs έγινε με τον αλγόριθμο MUSCLE (MUltiple Sequence Comparison by Log-Expectation). Το MUSCLE θεωρητικά επιτυγχάνει μεγαλύτερη μέση ακρίβεια και ταχύτητα στοίχισης σε σχέση με τους αλγόριθμους ClustalW2 και T-Coffee, ανάλογα με τις επιλεγμένες παραμέτρους (European Bioinformatics Institute, EMBL-EBI). Τα φυλογενετικά δέντρα κατασκευάστηκαν με την μέθοδο Neighbor joining και η τιμή bootstrap του δέντρου ήταν 1000. Το bootstrap παρέχει μια εκτίμηση της αξιοπιστίας



κάθε κλάδου σε ένα παρατηρούμενο φυλογενετικό δέντρο, βάση του ποσοστού των δέντρων bootstrap που παρουσιάζουν τον ίδιο κλάδο.

### 3.9.3 Fig Tree

Το λογισμικό Fig Tree Version 1.4.3 χρησιμοποιήθηκε στον σχεδιασμό των φυλογενετικών δέντρων αυτής της εργασίας. Συγκεκριμένα, επιλέχθηκε η λειτουργία παρουσίασης “Align tip labels” και ορίστηκε διαφορετικό χρώμα για τους υποδοχείς ORs κάθε είδος εντόμου.

### 3.9.4 MAFFT

Το MAFFT (Multiple Alignment using Fast Fourier Transform) είναι πρόγραμμα πολλαπλής στοίχισης ακολουθιών DNA ή πρωτεϊνών (Katoh et al. 2002, Katoh and Toh 2008). Βασίζεται σε δύο αλγοριθμικές μεθόδους:

- 1) Χρήση ενός γρήγορου μετασχηματισμού Fourier (Fast Fourier Transform, FFT) για τον ταχύτατο εντοπισμό ομόλογων περιοχών. Στην περίπτωση στοίχισης πρωτεϊνών, η αμινοξική αλληλουχία μετατρέπεται σε αλληλουχία αποτελούμενη από τιμές πολικότητας (polarity values) και τιμές που εκφράζουν πόσο όγκο καταλαμβάνει το κάθε αμινοξύ στον χώρο (volume values).
- 2) Χρήση ενός απλοποιημένου συστήματος τιμών (score system) για μείωση του χρόνου επεξεργασίας και αύξηση της ακρίβειας των στοιχίσεων. Το MAFFT εφαρμόζει την μέθοδο FFT-NS-2 και μια μέθοδο βελτιστοποίησης των αποτελεσμάτων βάση επαναλήψεων (FFT-NS-i).

Το πρόγραμμα MEGA6 περιέχει τον αλγόριθμο του MAFFT στις διαθέσιμες μεθόδους στοίχισης. Μέσω του MEGA6, τα αποτελέσματα της στοίχισης MAFFT παρουσιάζονται σε περιβάλλον φιλικό για τον χρήστη. Υπάρχει η δυνατότητα εμφάνισης αμινοξέων με παρόμοιες ιδιότητες με τον ίδιο χρωματικό κώδικα (π.χ υδρόφοβα αμινοξέα με κόκκινο και υδρόφιλα με μπλε). Έτσι, διευκολύνεται η παρατήρηση ομόλογων περιοχών μεταξύ εξελικτικά συγγενικών πρωτεϊνών. Στα πλαίσια αυτής της εργασίας, χρησιμοποιήθηκε το MAFFT για τον εντοπισμό συντηρημένων περιοχών μεταξύ των πρωτεϊνών ORs του δάκου.

### 3.9.5 TMHMM

Το TMHMM (Transmembrane Helices Hidden Markov Model) είναι μέθοδος πρόβλεψης της τοπολογίας μεμβρανικών πρωτεϊνών (Krogh et al., 2001). Βασίζεται σε ένα κρυπτομαρκοβιανό μοντέλο (Hidden Markov Model, HMM) και προβλέπει αποτελεσματικά την ύπαρξη του 97-98% των διαμεμβρανικών ελίκων (transmembrane helices). Ο αλγόριθμος δίνει πληροφορίες σχετικά με: 1) τον αριθμό πιθανών διαμεμβρανικών ελίκων/περιοχών, 2) την τοπολογία του αμινοτελικού άκρου (πιθανότητα του N-άκρου να είναι ενδοκυτταρικά) και 3) την ύπαρξη πεπτιδικών σινιάλων στα άκρα της πρωτεΐνης. Επιπλέον, το TMHMM παρέχει

αναλυτικά τον αριθμό αμινοξέων που συμμετέχουν στην κάθε περιοχή (εξωκυτταρική, διαμεμβρανική ή ενδοκυτταρική) και παρουσιάζει τα αποτελέσματα υπό μορφή γραφήματος πιθανοτήτων-τοπολογίας. Σε αυτή την πτυχιακή, έγινε χρήση της έκδοσης TMHMM2.0 για: α) έλεγχο της ακεραιότητας της αμινοξικής αλληλουχίας των ORs του δάκου (οι μη partial πρωτεΐνες έπρεπε να δίνουν 7 προβλεπόμενες διαμεμβρανικές περιοχές στο TMHMM και τοπολογία αντίστροφου GPCR υποδοχέα) και β) για ταυτοποίηση των εξωκυτταρικών περιοχών των υποδοχέων.

### 3.9.6 Omiga

Το Omiga είναι ένα πολυχρηστικό πρόγραμμα. Έχει τη δυνατότητα ταυτόχρονης παρουσίασης νουκλεοτιδικών αλληλουχιών και των τριπλετών κωδικονίων που τους αντιστοιχούν. Επίσης, το αναγνωστικό πλαίσιο των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών μπορεί να καθοριστεί από το χρήστη και αντίστοιχα το πρόγραμμα δίνει την παραγόμενη αμινοξική αλληλουχία. Στη εν λόγω εργασία, χρησιμοποιήθηκε το Omiga για την αντιστοίχιση νουκλεοτιδικών τμημάτων με εξωκυτταρικές περιοχές της πρωτεΐνης OR. Μέσω του TMHMM (βλ. ενότητα 3.9.5), είχε ξεκαθαριστεί για τον κάθε OR ποια αμινοξέα απαρτίζουν τις εξωκυτταρικές περιοχές. Ζητούμενο ήταν να βρεθούν τα τμήματα του κάθε γονιδίου OR που κωδικοποιούν εξωκυτταρικές περιοχές της παραγόμενης πρωτεΐνης. Για αυτό το σκοπό, εισήχθησαν στο Omiga οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες mRNA των επιλεγμένων γονιδίων OR. Εν συνεχεία, έγινε μετάφραση του mRNA σύμφωνα με το αναγνωστικό πλαίσιο που ανέφερε η βάση δεδομένων του NCBI (για επαλήθευση των αποτελεσμάτων δοκιμάστηκαν όλα τα αναγνωστικά πλαίσια και το σωστό ήταν πράγματι αυτό του NCBI). Ακολούθησε διασταύρωση της αμινοξικής αλληλουχίας που έδινε το Omiga με την επίσημη αμινοξική αλληλουχία του υποδοχέα OR στο NCBI. Αφού επαληθεύτηκαν τα παραπάνω, καταγράφησαν ξεχωριστά για το κάθε γονίδιο OR τα τμήματα που κωδικοποιούσαν εξωκυτταρικές περιοχές στον αντίστοιχο υποδοχέα (όπως είχε υποδείξει το πρόγραμμα TMHMM).

### 3.9.7 PrimerQuest Tool

Το PrimerQuest Tool ([www.idtdna.com/SciTools](http://www.idtdna.com/SciTools)) είναι πρόγραμμα σχεδιασμού ζευγών εκκινήτων για PCR ή qPCR και παρέχεται από το IDT (Integrated DNA Technologies). Στα πλεονεκτήματά του συμπεριλαμβάνονται η δυνατότητα εξατομίκευσης των συνθηκών αντίδρασης (ελευθερία ρύθμισης συγκεντρώσεων εκκινήτων, αλάτων,  $Mg^{+2}$  κτλπ.) και η επιλογή συγκεκριμένων περιοχών σχεδίασης. Ακόμη, το πρόγραμμα διαθέτει έτοιμες προεπιλεγμένες παραμέτρους ανάλογα με τον τύπο της αντίδρασης (PCR, qPCR με probes, qPCR intercalating dyes).

Για κάθε επιλεγμένο γονίδιο OR, σχεδιάστηκε με το PrimerQuest Tool εξειδικευμένο ζεύγος εκκινήτων για qPCR με SYBR Green 1. Συγκεκριμένα, διατηρήθηκαν οι προεπιλεγμένοι παράμετροι αντίδρασης για intercalating dyes qPCR (μέθοδος ποσοτικοποίησης που βασίζεται σε μόρια βαφής που παρεμβάλλονται στο δίκλωνο

DNA, στην οποία ανήκει και το SYBR Green 1). Οι παράμετροι σχεδιασμού των εκκινητών ορίστηκαν ως εξής:

<b>Primer size</b>	18-24 νουκλεοτίδια
<b>T<sub>m</sub></b>	minimum: 59°C, optimal: 62°C, maximum: 65°C
<b>GC%</b>	minimum: 35, optimal: 50, maximum: 65
<b>Amplicon size (μέγεθος προϊόντος ενίσχυσης)</b>	90-130 νουκλεοτίδια

Επιπροσθέτως, ορίστηκαν ως περιοχές σχεδίασης αυτές που αντιστοιχούσαν σε εξωκυτταρικά τμήματα, ξεχωριστά για την κάθε πρωτεΐνη OR. Τα νουκλεοτίδια που κωδικοποιούσαν εξωκυτταρικές περιοχές είχαν προηγουμένως καθοριστεί μέσω του προγράμματος Omega (βλ. ενότητα 3.9.6). Σε περιπτώσεις που η νουκλεοτιδική αλληλουχία της εξωκυτταρικής περιοχής ήταν πολύ μικρή για το σχεδιασμό δύο εκκινητών, συμπεριλήφθησαν και 10-20 νουκλεοτίδια της διαμεμβρανικής περιοχής. Το PrimerQuest Tool έδωσε 5-7 διαφορετικά ζεύγη εκκινητών για το κάθε γονίδιο OR.

### 3.9.8 OligoAnalyzer 3.1

Το OligoAnalyzer 3.1 ([www.idtdna.com/SciTools](http://www.idtdna.com/SciTools)) είναι πρόγραμμα ανάλυσης των ιδιοτήτων μικρών νουκλεοτιδικών αλληλουχιών. Στα πλαίσια αυτής της πτυχιακής, χρησιμοποιήθηκε για έλεγχο και επιλογή των καλύτερων ζευγών εκκινητών για qPCR. Το πρόγραμμα προσφέρει τα εξής δεδομένα για μια δοθείσα ολιγονουκλεοτιδική αλληλουχία:

**ANALYZE:** Ανάλυση των φυσικοχημικών ιδιοτήτων της αλληλουχίας. Στα αποτελέσματα συμπεριλαμβάνονται η συμπληρωματική αλληλουχία, το μήκος της αλληλουχίας, το ποσοστό γουανινών-κυτοσινών (GC% content), η θερμοκρασία τήξεως (T<sub>m</sub>), το μοριακό βάρος κτλπ.

**HAIRPIN:** Πρόβλεψη δευτεροταγών δομών που σχηματίζει η αναλυόμενη ολιγονουκλεοτιδική αλληλουχία, βάση του αλγόριθμου mFold. Εκκινητές που εμφάνιζαν πολλές δομές θηλιάς (hairpin) καθώς και δομές όπου το 3' άκρο δεν ήταν ελεύθερο, απερρίφθησαν.

**SELF-DIMER:** Ανάλυση παρουσίας εσωτερικής συμπληρωματικότητας και πιθανού σχηματισμού ομοδιμερών εκκινητών. Επίσης, ελέγχεται η σταθερότητα της υβριδοποίησης της αλληλουχίας με τον εαυτό της. Εκκινητές που εμφάνιζαν μεγάλη εσωτερική συμπληρωματικότητα και σχημάτιζαν ομοδιμερή με  $dG < -7$  kcal/mol απερρίφθησαν.

**HETERO-DIMER:** Έλεγχος πιθανού σχηματισμού ετεροδιμερών εκκινητών. Ο χρήστης δίνει στο πρόγραμμα τις αλληλουχίες των δύο εκκινητών και ο αλγόριθμος παρέχει πληροφορίες για την συμπληρωματικότητα και την σταθερότητα της υβριδοποίησης. Ζεύγη εκκινητών που σχημάτιζαν ετεροδιμερή με μεγάλη σταθερότητα ( $dG < -7$  kcal/mol), απερρίφθησαν.

## 4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στόχος αυτής της εργασίας ήταν η ανάλυση της απόκρισης συγκεκριμένων γονιδίων οσφρητικών υποδοχέων του δάκου, μετά από έκθεση των εντόμων σε υδροξυτυροσόλη. Τα εξεταζόμενα γονίδια OR επιλέχθηκαν μετά από φυλογενετική ανάλυση με ομόλογους υποδοχείς άλλων συγγενικών ειδών εντόμων, βάσει δύο κριτηρίων: 1) ειδοειδικότητα όσον αφορά τον δάκο ή 2) ύπαρξη ομολογίας με γονίδια OR που κωδικοποιούν υποδοχείς που ανιχνεύουν φαινολικές ενώσεις στη *Drosophila melanogaster*. Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε βιοπληροφορική ανάλυση των υποψηφίων γονιδίων ώστε να σχεδιαστούν κατάλληλοι εκκινητές για ποσοτική Real-Time PCR. Τελικά, έγινε ανάλυση γονιδιακής έκφρασης για τους OR στόχους με qPCR, σε επίπεδο μεταγράφων, προ και μετά έκθεσης των δάκων σε υδροξυτυροσόλη. Η διαδικασία της φυλογενετικής ανάλυσης καθώς και η βιοπληροφορική μελέτη που οδήγησαν στην επιλογή των γονιδίων OR, παρουσιάζονται συνοπτικά στο Σχήμα 1 και θα αναλυθούν παρακάτω.



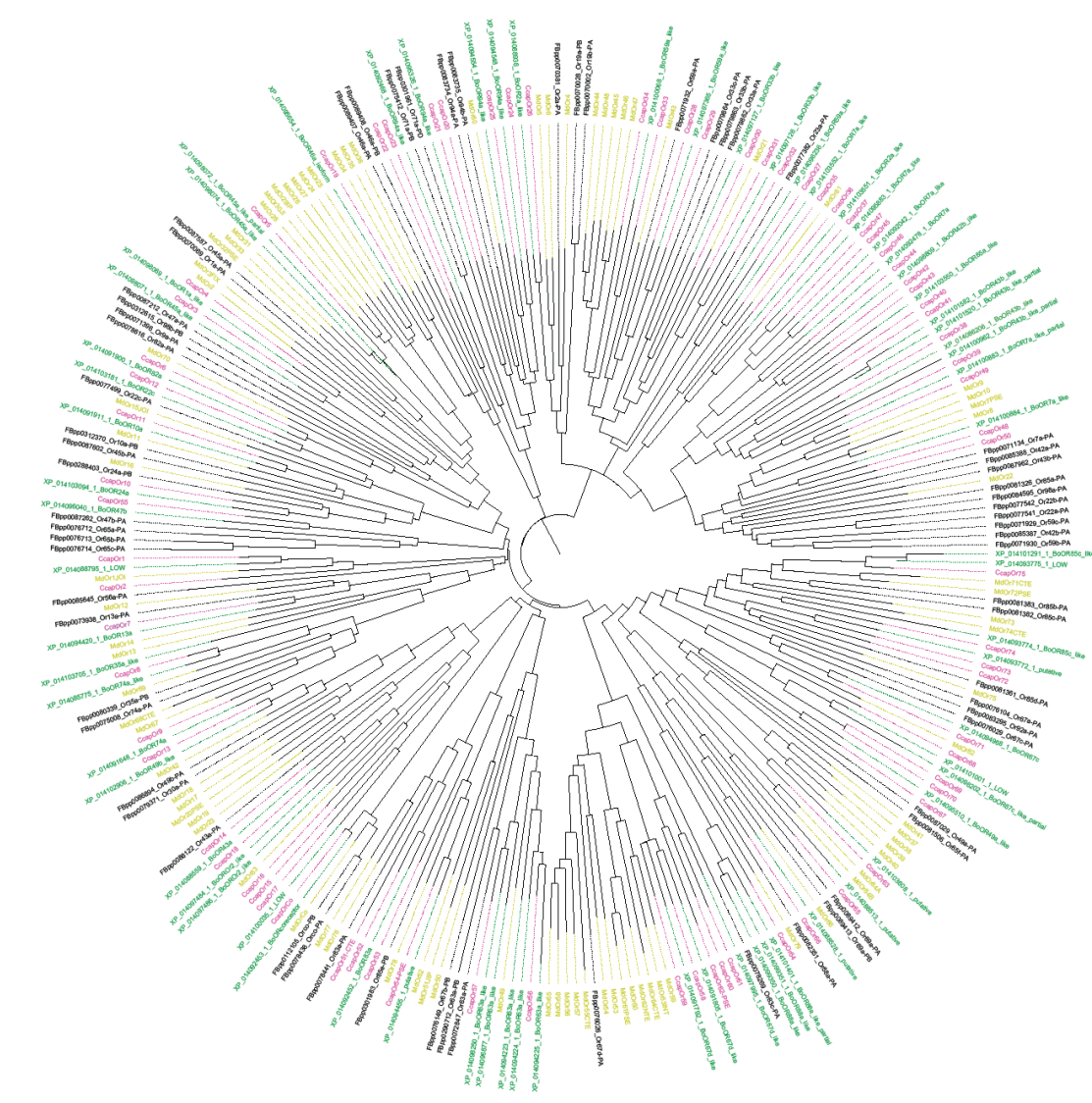
### 4.1 Φυλογενετική ανάλυση ORs δάκου

Προκειμένου να εντοπίσουμε πιθανούς ειδοειδικούς ORs του δάκου, έπρεπε να μελετήσουμε την εξελικτική τους σχέση με αυτούς άλλων συγγενικών ειδών εντόμων. Σε μια πρώτη προσέγγιση, συλλέχθηκαν οι αμινοξικές αλληλουχίες όλων των ORs, από τη βάση δεδομένων NCBI, για τα εξής είδη εντόμων:

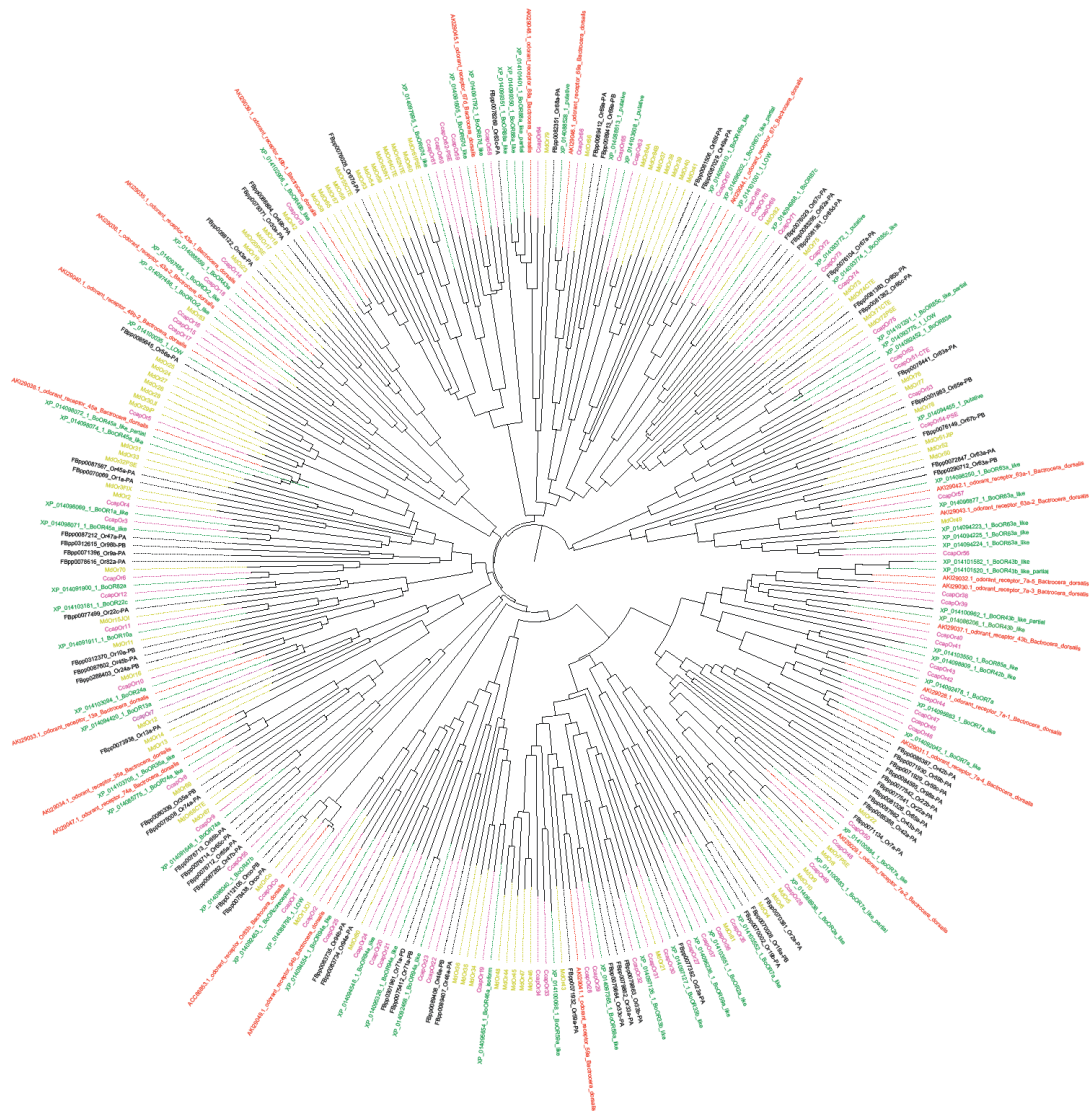
1. *Bactrocera oleae* (75 γονίδια αυτόματης πρόβλεψης (predicted genes) OR): πρέπει να επισημανθεί ότι για το γονιδίωμα του δάκου δεν έχει ολοκληρωθεί ο υπομνηματισμός (annotation). Άρα τα γονίδια που δίνουν οι βάσεις δεδομένων ως υποψήφια ORs δεν αντιστοιχούν απαραίτητα σε υποδοχείς ORs και χρίζουν περαιτέρω μελέτης.

2. *Drosophila melanogaster* (60 γονίδια OR) (Clyne et al. 1999, Robertson et al. 2003)
3. *Ceratitis capitata* (76 γονίδια OR) (Papanicolaou et al. 2016)
4. *Musca domestica* (85 γονίδια OR) (Scott et al. 2014)

Εν συνεχεία, κατασκευάσαμε φυλογενετικό δέντρο βάσει των παραπάνω αμινοξικών αλληλουχιών ORs με τη μέθοδο Neighbor joining, με χρήση του προγράμματος MEGA6 βασιζόμενοι σε στοίχιση MUSCLE και με bootstrap 1000. Το φυλογενετικό δέντρο που προέκυψε παρουσίαζε 7 από τους 75 προβλεπόμενους υποδοχείς ORs του δάκου ως τελείως εξελικτικά απομακρυσμένους από αυτούς άλλων συγγενικών εντόμων. Λόγω της έλλειψης annotation του γονιδιώματος του δάκου, έπρεπε να ελεγχθεί η πιστότητα κατηγοριοποίησης αυτών των γονιδίων ως ORs. Πράγματι, ανάλυση με BLASTP απέδειξε ότι οι πρωτεΐνες αυτών των 7 γονιδίων δεν είναι ORs αλλά GRs καθώς βρέθηκε ομολογία με αξιόπιστο e-value μόνο με GRs της *D. melanogaster* και της *C. capitata*. Έτσι, τα γονίδια στα οποία αντιστοιχούσαν αυτοί οι υποδοχείς GR αφαιρέθηκαν από την περαιτέρω μελέτη και επαναλήφθηκε η διαδικασία κατασκευής του φυλογενετικού δέντρου, με χρήση των αμινοξικών αλληλουχιών 68 γονιδίων OR του δάκου (βλ. Εικ. 14). Επιπροσθέτως, σχεδιάστηκε και δεύτερο φυλογενετικό δέντρο το οποίο ενσωμάτωνε και τους 23 ORs του είδους *Bactrocera dorsalis* (Wu Zhongzhen et al., 2015) ώστε να γίνει περαιτέρω έλεγχος ειδοειδικότητας των ORs του δάκου και διατήρησης των εξελικτικών σχέσεων που υποδεικνυε το πρώτο δέντρο (βλ. Εικ. 15).



**Εικόνα 14. Φυλογενετικό δέντρο Neighbor joining των υποδοχέων ORs του δάκου της ελιάς και συγγενικών δίπτερων εντόμων:** Το παραπάνω δέντρο κατασκευάστηκε βάσει 289 γονιδίων OR προερχόμενα από 4 διαφορετικά είδη εντόμων (με πράσινο *B. oleae*, με μαύρο *D. melanogaster*, με φούξια *C. capitata*, με κίτρινο *M. domestica*) με χρήση των προγραμμάτων MEGA6 και FigTree ,βασίζόμενοι σε στοίχιση MUSCLE.

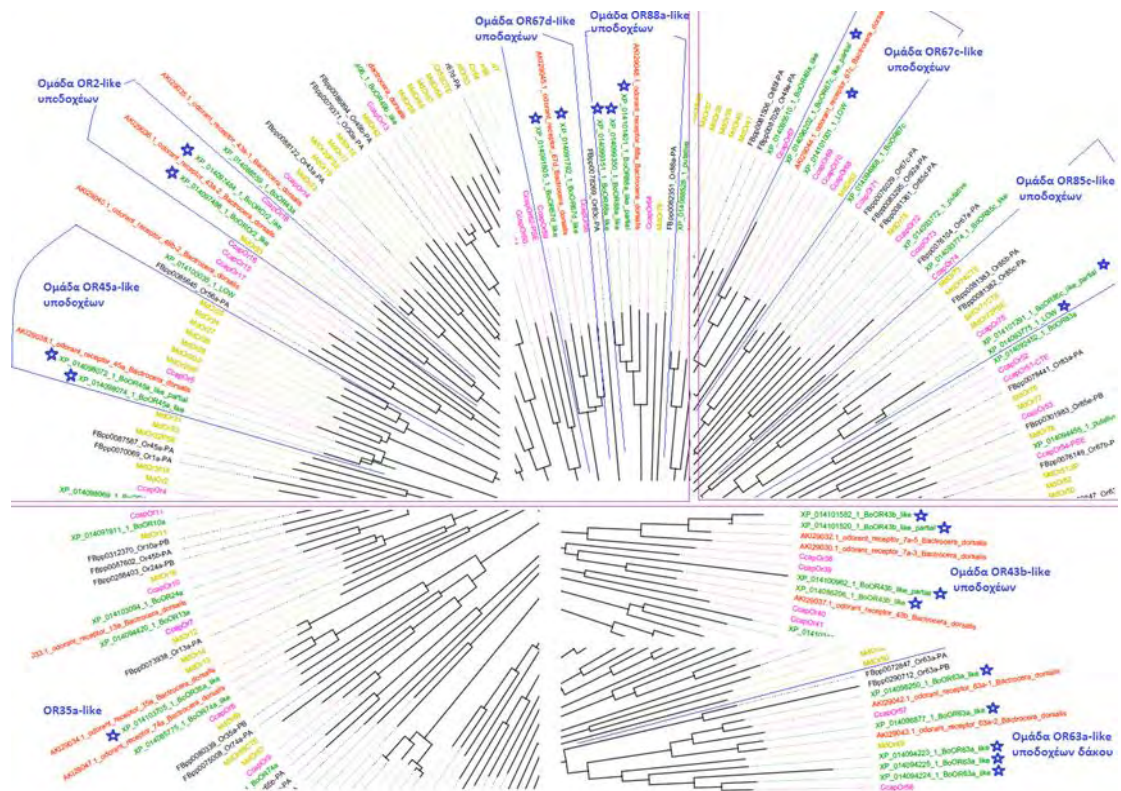


**Εικόνα 15. Φυλογενετικό δέντρο Neighbor joining των υποδοξέων ORs του δάκου της ελιάς και συγγενικών δίπτερων εντόμων:** Το παραπάνω δέντρο κατασκευάστηκε βάσει 312 γονιδίων OR προερχόμενα από 5 διαφορετικά είδη εντόμων (με πράσινο *B. oleae*, με πορτοκαλί *B. dorsalis*, με μαύρο *D. melanogaster*, με φούξια *C. capitata*, με κίτρινο *M. domestica* ) με χρήση των προγραμμάτων MEGA6 και FigTree, βασιζόμενοι σε στοίχιση MUSCLE.

## 4.2 Επιλογή γονιδίων OR δάκου

Η φυλογενετική ανάλυση των ORs του δάκου συγκριτικά με τους συγγενικούς οργανισμούς που εξετάστηκαν, μας έδωσε τη δυνατότητα να εξετάσουμε την ύπαρξη ή μη εξελικτικά απομακρυσμένων ORs του δάκου (Εικ.15). Οι ORs αυτοί πιθανότατα διαδραματίζουν ειδοειδικό ρόλο, συμμετέχοντας σε αποκρίσεις του εντόμου στον ξενιστή του την ελιά. Ανάμεσα στα 68 γονίδια OR του δάκου, επιλέχθηκαν 22 ως υποψήφια ειδοειδικά γονίδια με τις μεγαλύτερες πιθανότητες απόκρισης στην υδροξυτυροσόλη. Από αυτά, οι 21 διακρίνονται σε 8 ομάδες πάνω στο δέντρο (βλ. Εικ. 16). Επιπλέον, γνωρίζοντας ότι η υδροξυτυροσόλη είναι φαινολική ένωση και τα ορθόλογα γονίδια μεταξύ συγγενικών ειδών έχουν συνήθως την ίδια λειτουργία, επιλέξαμε ORs ομόλογους των ORs της *D. melanogaster* που αποκρίνονται σε

φαινολικές ενώσεις. Η επιλογή των ορθόλογων ORs του δάκου που αποκρίνονται σε φαινολικές ενώσεις βασίστηκε στα δεδομένα του φυλογενετικού δένδρου και όχι στην ονοματολογία των υποδοχέων (αν και οι αυτόματες προβλέψεις των ORs του δάκου έχουν πάρει τα ονόματά τους βάση ομολογίας με τους ORs της *D. melanogaster*). Οι ORs της *D. melanogaster* που αποκρίνονται σε φαινολικές ενώσεις σύμφωνα με τη βιβλιογραφία καθώς και οι ομόλογοι υποδοχείς τους στο δάκο βάσει του φυλογενετικού δένδρου των ORs, παρουσιάζονται στον Πίνακα 1 του παραρτήματος. Με βάση αυτό το κριτήριο εντοπίστηκαν 10 ORs του δάκου που πιθανώς αποκρίνονται σε φαινολικές ενώσεις. Επομένως, μεταξύ των δύο κριτηρίων η επιλογή περιορίστηκε τελικά σε 32 ORs (από τους συνολικά 68 που εντοπίστηκαν αρχικά) που μπορεί να αποκρίνονται στην υδροξυτυροσόλη.



**Εικόνα 16. Ομάδες ειδοειδικών υποδοχέων ORs στο δάκο της ελιάς:** απεικονίζονται τμήματα του φυλογενετικού δένδρου της Εικόνας 15, όπου με μπλε αστερίσκο σημαίνονται οι υποψήφιοι ειδοειδικοί ORs του δάκου.

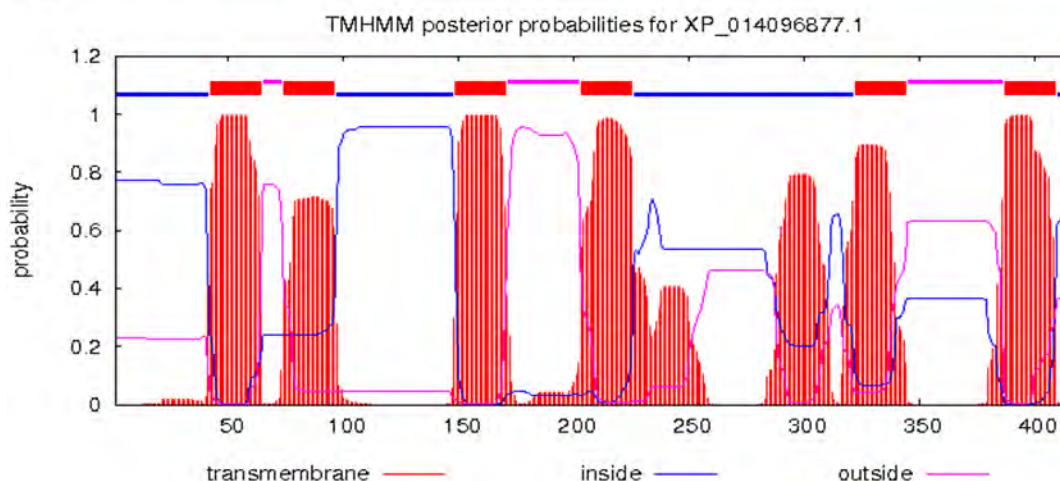
### Έλεγχος δομής γονιδίων ORs

Δεδομένου ότι για τα επιλεγμένα γονίδια θα κατασκευάζονταν εκκινητές για qRT-PCR, έπρεπε να εξεταστεί αν οι υποψήφιοι ORs είναι προϊόντα εναλλακτικού ματίσματος. Για αυτό το σκοπό έγινε χρήση της πλατφόρμας Web Apollo που ενσωματώνει δεδομένα RNAseq πάνω στα γονιδιωματικά ικρίωματα (scaffold). Τα δεδομένα έδειξαν ότι όλοι οι υποψήφιοι υποδοχείς εκφράζονται από διαφορετικά γονίδια (βλ. Παράρτημα Πίνακα 2). Στη συνέχεια έγινε εκτίμηση της ακεραιότητας της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των υποψηφίων γονιδίων μέσω ελέγχου της αμινοξικής αλληλουχίας των ORs. Χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα TMHMM για να



εκτιμηθεί αν η αλληλουχία του γονιδίου είναι ολόκληρη ή μερική (partial) βάσει των προβλέψεων του αριθμού των διαμεμβρανικών περιοχών, καθώς είναι γνωστό ότι οι υποδοχείς ORs διαθέτουν 7 διαμεμβρανικές περιοχές στο πρωτεϊνικό τους μόριο. Ενδεικτικά παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του TMHMM για τον OR XP\_014096877 του δάκου της ελιάς (Εικ. 17). Η μελέτη των αμινοξικών αλληλουχιών των ORs με το TMHMM έδειξε ότι ορισμένα γονίδια OR δεν ήταν ολόκληρα και τους έλειπε μέρος της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας.

```
# XP_014096877.1 Length: 417
# XP_014096877.1 Number of predicted TMHs: 6
# XP_014096877.1 Exp number of AAs in TMHs: 149.11492
# XP_014096877.1 Exp number, first 60 AAs: 18.78732
# XP_014096877.1 Total prob of N-in: 0.77200
# XP_014096877.1 POSSIBLE N-term signal sequence
XP_014096877.1 TMHMM2.0 inside 1 41
XP_014096877.1 TMHMM2.0 TMhelix 42 64
XP_014096877.1 TMHMM2.0 outside 65 73
XP_014096877.1 TMHMM2.0 TMhelix 74 96
XP_014096877.1 TMHMM2.0 inside 97 147
XP_014096877.1 TMHMM2.0 TMhelix 148 170
XP_014096877.1 TMHMM2.0 outside 171 202
XP_014096877.1 TMHMM2.0 TMhelix 203 225
XP_014096877.1 TMHMM2.0 inside 226 321
XP_014096877.1 TMHMM2.0 TMhelix 322 344
XP_014096877.1 TMHMM2.0 outside 345 386
XP_014096877.1 TMHMM2.0 TMhelix 387 409
XP_014096877.1 TMHMM2.0 inside 410 417
```



**Εικόνα 17.** Αποτελέσματα ελέγχου του υποδοχέα XP\_014096877 του δάκου με το πρόγραμμα TMHMM.

Εν τέλει επιλέχθηκαν **4 γονίδια** OR για τα οποία θα ελεγχόταν η απόκριση στην υδροξυτυροσόλη. Τα τρία είναι μέλη της ειδοειδικής επέκτασης της DmelOr63a γενεαλογίας στον δάκο και επιλέχθηκαν διότι οι ειδοειδικοί υποδοχείς έχουν αυξημένη πιθανότητα να αποκρίνονται σε πτητικά του ξενιστή-ελιά. Το τέταρτο γονίδιο επιλέχθηκε ως ορθόλογο του DmelOr94a, που αποκρίνεται σε φαινολικές ενώσεις, και συνεπώς είναι πιθανό να ανιχνεύει την επίσης φαινολική ένωση υδροξυτυροσόλη.

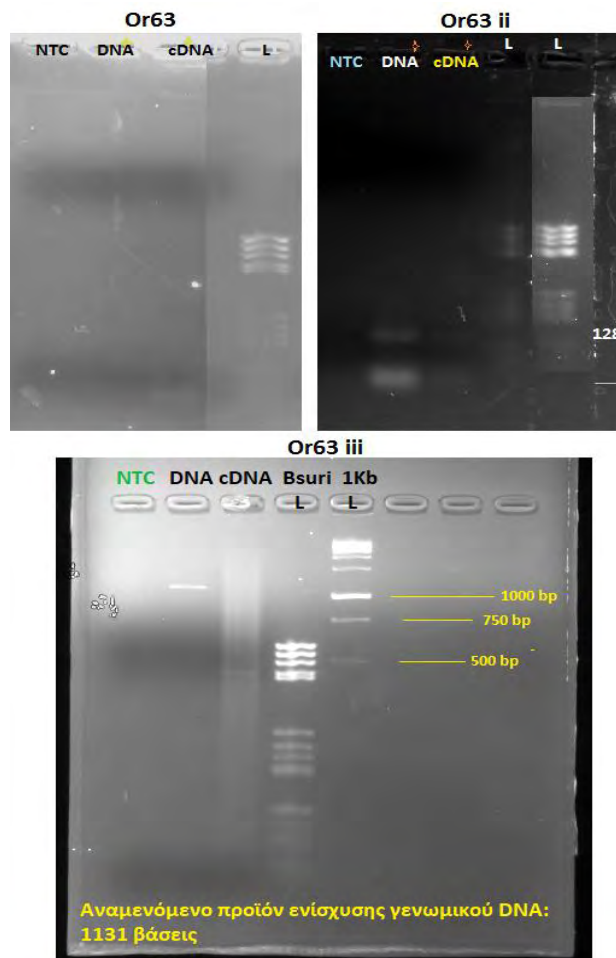
- 1) XM\_014241402 Or63a-like
- 2) XM\_014238750 Or63a-like ii
- 3) XM\_014238749 Or63a-like iii
- 4) XM\_014239073 Or94a-like

### 4.3 Επιλογή περιοχών σχεδίασης εκκινητών για qRT-PCR

Κατά το σχεδιασμό των ζευγών εκκινητών έπρεπε να εξασφαλιστεί η εξειδίκευσή τους ως προς το γονίδιο OR που ενισχύουν. Κάθε ζεύγος πρέπει να ενισχύει μόνο το cDNA που έχει προέλθει από το mRNA του γονιδίου στόχου του. Άρα, συντηρημένες περιοχές, κοινές στην πλειοψηφία των γονιδίων OR, έπρεπε να αποφευχθούν. Για αυτό το σκοπό έγινε χρήση του προγράμματος MAFFT στο σύνολο των ORs του δάκου. Όπως ήταν αναμενόμενο, εντοπίστηκαν συντηρημένα μοτίβα σε διαμεμβρανικές περιοχές. Έτσι, οι περιοχές των γονιδίων που αντιστοιχούν στις διαμεμβρανικές περιοχές της παραγόμενης πρωτεΐνης δεν χρησιμοποιήθηκαν στο σχεδιασμό. Επιπλέον, είναι γνωστή από τη βιβλιογραφία η ύπαρξη συντηρημένων αμινοξικών μοτίβων στο αμινοτελικό και καρβοξυτελικό άκρο των υποδοχέων ORs. Για να αποφευχθεί τυχόν ταυτόχρονη ενίσχυση περισσότερων του ενός γονιδίου κατά την qRT-PCR, οι νουκλεοτιδικές περιοχές που αντιστοιχούν στα N- και COOH-άκρα αφαιρέθηκαν από το σχεδιασμό. Τελικά, ο σχεδιασμός των εκκινητών (primers) έγινε πάνω σε εξωκυτταρικές περιοχές που δεν παρουσιάζουν συντήρηση μεταξύ των ORs. Σχεδιάστηκαν ζεύγη εκκινητών για τα 4 γονίδια OR που προαναφέρθηκαν με χρήση του PrimerQuest Tool. Από τα πιθανά ζεύγη επιλέχθηκε το καλύτερο για κάθε γονίδιο OR βάση 2 χαρακτηριστικών: α) χαμηλή εσωτερική συμπληρωματικότητα του ζεύγους προς αποφυγή σχηματισμού ομοδιμερών ή ετεροδιμερών εκκινητών και β) απουσία δίκλωνων δομών στο 3' άκρο. Ο έλεγχος των εκκινητών ως προς τα παραπάνω χαρακτηριστικά έγινε με το πρόγραμμα OligoAnalyzer 3.1. Οι αλληλουχίες από τα τελικά ζεύγη εκκινητών καθώς και τα υπόλοιπα χαρακτηριστικά τους παρουσιάζονται στον Πίνακα 3 του παραρτήματος.

### 4.4 Έλεγχος εκκινητών

Πριν την έναρξη των πειραμάτων ελέγχου έκφρασης γονιδίων, έπρεπε να επαληθευτεί η σωστή λειτουργία των ζευγών εκκινητών. Για αυτό πραγματοποιήθηκε μια σειρά δοκιμαστικών PCR ώστε να ελεγχθεί η ενίσχυση και να βελτιστοποιηθούν οι συνθήκες υβριδοποίησης όπου κρίνεται απαραίτητο. Ενισχύθηκαν επιτυχώς τα προϊόντα των γονιδίων Or63 και Or63ii από γονιδιωματικό DNA ολόκληρων δάκων και το cDNA κεφαλιών (βλ. Εικ. 18). Συγκεκριμένα για τον Or63ii παρουσιάστηκαν και διμερή εκκινητών. Στη περίπτωση του Or63 iii, επιβεβαιώθηκε η ενίσχυση σε γονιδιωματικό DNA (μαζί με το ιντρόνιο που υπήρχε μεταξύ της περιοχής σχεδίασης) αλλά όχι και σε cDNA, πιθανότατα λόγω μικρού αριθμού μεταγράφων στο συγκεκριμένο δείγμα.



**Εικόνα 18.** Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης προϊόντων PCR όπου είχαν χρησιμοποιηθεί ζεύγη εκκινητών για τα γονίδια Or63, Or63ii και Or63iii

Όσον αφορά τους εκκινητές του γονιδίου Or94, δοκιμαστικές PCR με θερμοκρασίες υβριδοποίησης (annealing temperature,  $T_a$ ) 47°C, 50°C, 53°C και 55°C δεν έδωσαν κανένα προϊόν ενίσχυσης. Ήταν φανερό λοιπόν, ότι άλλος παράγοντας δεν επέτρεπε την ενίσχυση. Μετά από πληθώρα δοκιμών, διαπιστώθηκε ότι το συγκεκριμένο ζεύγος εκκινητών απαιτεί συγκέντρωση  $MgCl_2$  μεγαλύτερη κατά 2 mM από αυτή που περιέχεται στο buffer του κατασκευαστή για Real Time PCR (βλ. Εικ. 19).



**Εικόνα 19. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης προϊόντων PCR του γονιδίου Or94:**

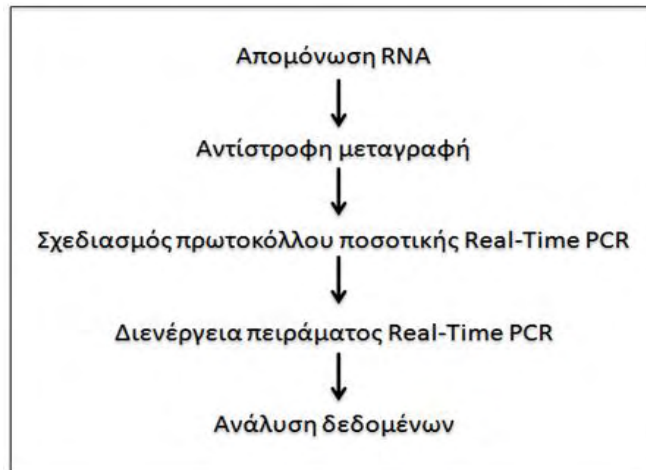
Είναι φανερή η απουσία του προϊόντος του Or94 όταν η PCR πραγματοποιείται χωρίς επιπλέον  $MgCl_2$ . Αντίθετα, προσθήκη επιπλέον 2 mM  $MgCl_2$  στην ίδια θερμοκρασία υβριδοποίησης ( $55^\circ C$ ) δίνει το αναμενόμενο προϊόν των 93 bp.

Γονίδιο	Προϊόν	$T_a$
Or63	86 bp	$55^\circ C$
Or63 ii	128 bp	$55^\circ C$
Or63 iii	157 bp	$55^\circ C$
Or94	93 bp	$55^\circ C$

**Πίνακας 4.** Τα προϊόντα ενίσχυσης των εξεταζόμενων γονιδίων του δάκου και οι ιδανικές θερμοκρασίες υβριδοποίησης της PCR.

#### 4.5 Ανάλυση των επιπέδων έκφρασης των τεσσάρων γονιδίων με qRT-PCR

Για τα τέσσερα αυτά γονίδια OR πραγματοποιήθηκε λειτουργική ανάλυση με ποσοτική Real-Time PCR. Συγκεκριμένα, ελέγχθηκε η έκφρασή τους σε επίπεδο τρανσκριπτόματος σε συζευγμένα θηλυκά άτομα δάκου που είχαν εκτεθεί σε υδροξυτυροσόλη.



**Σχήμα 2:** Βήματα ανάλυσης γονιδιακής έκφρασης

Απομονώθηκε RNA από: 1) τα κεφάλια (χωρίς στοματικά μόρια και γναθικές προσακτρίδες), 2) τα στοματικά μόρια και τις γναθικές προσακτρίδες και 3) τους θώρακες συζευγμένων θηλυκών ατόμων που είχαν εκτεθεί σε υδροξυτυροσόλη. Επιπλέον, απομονώθηκε και RNA από τους ίδιους ιστούς από συζευγμένα θηλυκά εκτεθειμένα σε ακετόνη (δείγματα control). Τα έντομα control εκτίθενται στον διαλύτη ακετόνη (με τον οποίο πραγματοποιήθηκε η αραίωση της υδροξυτυροσόλης) ώστε να εξασφαλιστεί ότι οποιαδήποτε διαφορά επιπέδων έκφρασης μετά από έκθεση σε υδροξυτυροσόλη οφείλεται αποκλειστικά σε αυτή και όχι στην έκθεση σε ακετόνη. Το RNA από την περιοχή του θώρακα, στην οποία φυσιολογικά δεν εκφράζονται οσφρητικά γονίδια, επρόκειτο να χρησιμοποιηθεί ως control ιστός για τον έλεγχο της ιστοειδικότητας των εξεταζόμενων γονιδίων.

Το RNA στη συνέχεια υπέστη επεξεργασία με DNase για την αποικοδόμηση τυχόν τμημάτων DNA που ανακτήθηκαν ταυτόχρονα κατά τη διάρκεια απομόνωσης. Ακολούθως, συντέθηκε ο συμπληρωματικός του cDNA κλώνος με αντίστροφη μεταγραφή, ο οποίος έχει την απαιτούμενη σταθερότητα για περαιτέρω ανάλυση. Τελικά, το cDNA χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα στην qRT-PCR.

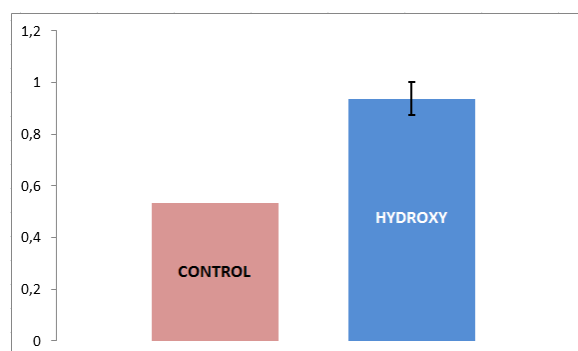
Κατά την ανάλυση γονιδιακής έκφρασης με qRT-PCR, χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές που σχεδιάστηκαν για τα 4 γονίδια OR που επιλέχθηκαν. Επίσης, έγινε χρήση εκκινητών που ενίσχυαν τα γονίδια αναφοράς alpha-tubulin ( $\alpha$ -TUB, γονίδιο πρωτεΐνης κυτταροσκελετού), RpL19 (60S ribosomal protein L19, ριβοσωμικό γονίδιο) και GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, γονίδιο ενζύμου που συμμετέχει στην γλυκόλυση), μέσω των οποίων πραγματοποιήθηκε η κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων. Σε αυτό το σημείο πρέπει να αναφερθεί ότι, σε αντίθεση με παλαιότερες αντιλήψεις, τα γονίδια αναφοράς δεν διατηρούν σταθερή έκφραση μεταξύ όλων των ιστών και για κάθε ιστό υπάρχουν βέλτιστα γονίδια αναφοράς για κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων. Στο δάκο της ελιάς έχει γίνει πρόσφατα ο καθορισμός των βέλτιστων γονιδίων αναφοράς ανάλογα με τον εξεταζόμενο ιστό. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των Sagri et al. 2017, το βέλτιστο γονίδιο αναφοράς για όλους τους ιστούς που μας ενδιέφεραν ήταν το 14-3-3z. Όμως,

λόγω προβλημάτων με τους εκκινητές του 14-3-3z η κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με το δεύτερο καλύτερο γονίδιο αναφοράς κάθε ιστού αντίστοιχα: το RpL19 για τα κεφάλια και το GAPDH για τους θώρακες. Στα στοματικά μόρια/γναθικές προσακτρίδες η κανονικοποίηση έγινε βάσει του γονιδίου αναφοράς  $\alpha$ -TUB.

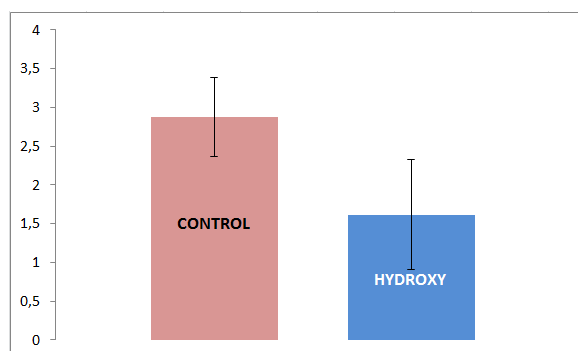
Η ειδικότητα της αντίδρασης ενίσχυσης ελέγχθηκε από την καμπύλη αποδιάταξης των προϊόντων της Real-Time κατά την οποία δεν παρατηρήθηκε ύπαρξη διμερών των εκκινητών ή παραπροϊόντων. Για μεγαλύτερη ακρίβεια των αποτελεσμάτων η διαδικασία πραγματοποιήθηκε εις διπλούν για κάθε βιολογικό δείγμα και τα αποτελέσματα για κάθε γονίδιο παρουσιάζονται στη συνέχεια.

### **Or63 (XM\_014241402)**

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ανάλυσης γονιδιακής έκφρασης, ο οσφρητικός υποδοχέας OR63 δεν εκφράζεται στα στοματικά μόρια και στις γναθικές προσακτρίδες θηλυκών ατόμων δάκου, καθώς δεν παρατηρήθηκε καμία ενίσχυση στην qRT-PCR. Χαμηλά επίπεδα έκφρασης παρατηρούνται στα κεφάλια/κεραίες. Η εμφάνιση προϊόντος ενίσχυσης έγινε άνω του κύκλου 40 της qRT-PCR ( $C_q > 40$ ), γεγονός που υποδηλώνει πολύ μικρό αριθμό αντιγράφων mRNA του γονιδίου στόχου στο αρχικό δείγμα. Σε αυτό το γεγονός οφείλεται πιθανότατα η μη ενίσχυση στο βιολογικό δείγμα control headh\_C1. Η έκθεση των εντόμων στην υδροξυτυροσόλη δεν φαίνεται να επηρεάζει την έκφραση του γονιδίου Or63 στο κεφάλι, όπως επιβεβαιώνουν τα αποτελέσματα μετά από κανονικοποίηση με το γονίδιο RpL19 (βλ. Εικ. 20). Επιπλέον, έκφραση παρουσιάστηκε και στους θώρακες. Κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων με το γονίδιο αναφοράς GAPDH δείχνει ότι ο OR63 δεν αποκρίνεται στην υδροξυτυροσόλη στους θώρακες (βλ. Εικ. 21). Ο υποδοχέας OR63 (XP\_014096877) που κωδικοποιείται από το γονίδιο Or63 (XM\_014241402) παρουσιάζει ομολογία με τον DmelOR63a της δροσόφιλας βάσει blastp (Evalue για DmelOR63a A-ισομορφή:  $4e-100$ , βλ. Παράρτημα Πίνακα 4) και αποτελεί μέρος της ειδοειδικής επέκτασης της DmelOr63a γενεαλογίας στο δάκο.



**Εικόνα 20. Σχετική γονιδιακή έκφραση του Or63 σε κεφάλια θηλυκών δάκων, μετά από κανονικοποίηση με RpL19:** Παρουσιάζονται τα επίπεδα έκφρασης του Or63 σαν βιολογικό σεί (μέσος όρος έκφρασης των δύο βιολογικών δειγμάτων). Με ροζ απεικονίζονται τα δείγματα control ενώ με μπλε τα δείγματα που είχαν εκτεθεί σε υδροξυτυροσόλη. Τα αποτελέσματα έχουν κανονικοποιηθεί ως προς την έκφραση του γονιδίου αναφοράς RpL19.



**Εικόνα 21. Σχετική γονιδιακή έκφραση του Or63 σε θώρακες θηλυκών δάκων, μετά από κανονικοποίηση με GAPDH:** Παρουσιάζονται τα επίπεδα έκφρασης του Or63 σαν βιολογικό σέτ (μέσος όρος έκφρασης των δύο βιολογικών δειγμάτων). Με ροζ απεικονίζονται τα δείγματα control ενώ με μπλε τα δείγματα που είχαν εκτεθεί σε υδροξυτυροσόλη. Τα αποτελέσματα έχουν κανονικοποιηθεί ως προς την έκφραση του γονιδίου αναφοράς GAPDH.

### **Or63 ii (XM\_014238750)**

Το γονίδιο Or63 ii δεν εκφράζεται ούτε στα στοματικά μόρια και στις γναθικές προσακτρίδες, ούτε στο κεφάλι/κεραίες και ούτε στον θώρακα. Επίσης, δεν διαπιστώθηκε διαφορά επιπέδων έκφρασης προ και μετά της έκθεσης σε υδροξυτυροσόλη. Δεν παρατηρήθηκε καμία ενίσχυση του γονιδίου Or63 ii στις qRT-PCR που πραγματοποιήθηκαν για τους συγκεκριμένους ιστούς. Ο υποδοχέας OR63 ii (XP\_014094225) που κωδικοποιείται από το παραπάνω γονίδιο είναι και αυτός μέρος της ειδοειδικής επέκτασης της DmelOr63a γενεαλογίας στο δάκο. Έτσι, δεν εκπλήσσει η ομολογία του με τον DmelOR63a σύμφωνα με blastp (Evaluate για DmelOR63a A-ισομορφή: 1e-79) (βλ. Παράρτημα Πίνακα 5).

### **Or63 iii (XM\_014238749)**

Όπως και στην περίπτωση του Or63 ii, το γονίδιο Or63 iii δεν εμφανίζει έκφραση σε κανέναν από τους εξεταζόμενους ιστούς (στοματικά μόρια/γναθικές προσακτρίδες, κεφάλι/κεραίες, θώρακας) ούτε φαίνεται να αποκρίνεται στην υδροξυτυροσόλη. Δεν παρατηρήθηκε καμία ενίσχυση του γονιδίου Or63 iii στις qRT-PCR που πραγματοποιήθηκαν για τους συγκεκριμένους ιστούς. Ο υποδοχέας OR63 iii (XP\_014094224) ανήκει στην ειδοειδική επέκταση της DmelOr63a γενεαλογίας στο δάκο (ομολογία με DmelOR63a A-ισομορφή, Evaluate: 7e-143, βλ. Παράρτημα Πίνακα 6). Πρέπει να σημειωθεί ότι τα γονίδια Or63 ii (XM\_014238750) και Or63 iii (XM\_014238749) είναι πιθανότατα προϊόν γονιδιακού διπλασιασμού καθώς εντοπίζονται στο ίδιο scaffold, σε κοντινή απόσταση και με σημαντική ομολογία παραγόμενης πρωτεΐνης (βλ. Παράρτημα Πίνακα 2 και 7).

### **Or94 (XM\_014239073)**

Το γονίδιο Or94 δεν εκφράζεται στα στοματικά μόρια και τις γναθικές προσακτρίδες θηλυκών δάκων, αφού δεν παρατηρήθηκε καμία ενίσχυση στην qRT-PCR. Επίσης, δεν επηρεάζεται η έκφρασή του στους παραπάνω ιστούς ακόμα και μετά από έκθεση

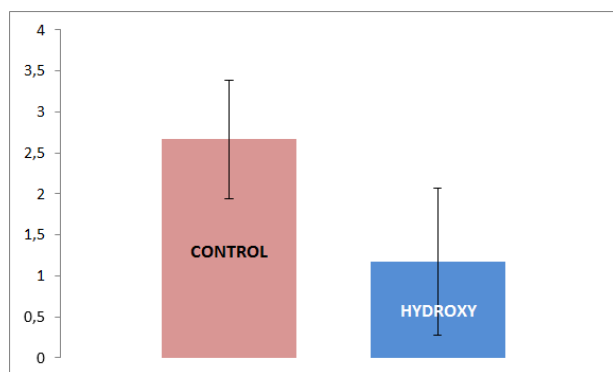
στην υδροξυτυροσώλη. Όσον αφορά τα κεφάλια, παρατηρείται έκφραση του Or94 μόνο μετά από έκθεση σε υδροξυτυροσώλη (βλ. Εικ. 22). Πρέπει να σημειωθεί, ότι ο φθορισμός καταγράφηκε να περνάει το κατώφλι στα κεφάλια κατά την qRT-PCR στον κύκλο 49 ( $C_q=49$ ), δηλαδή ένα κύκλο πριν την λήξη της αντίδρασης ενίσχυσης. Αυτό συνεπάγεται, ότι ο αριθμός των μεταγράφων της αλληλουχίας στόχου ήταν τόσο μικρός στο αρχικό δείγμα, που άγγιζε τα όρια ανίχνευσης της μεθόδου. Δηλαδή, το αν θα παρατηρείτο ενίσχυση ή όχι ήταν εν μέρει θέμα τύχης και δεν συνδέεται απαραίτητα με την έκθεση στην υδροξυτυροσώλη. Επομένως, τα αποτελέσματα κρίνονται αναξιόπιστα και δεν μπορούμε να πούμε με σιγουριά αν η υδροξυτυροσώλη προκαλεί υπερέκφραση (upregulation) του Or94 στα κεφάλια ή όχι. Επιπροσθέτως, υπήρχε αισθητή διαφορά των επιπέδων έκφρασης μεταξύ των δύο βιολογικών δειγμάτων (που είχαν εκτεθεί σε υδροξυτυροσώλη) με το headh\_H2 να παρουσιάζει περίπου την πενταπλάσια έκφραση Or94 σε σχέση με το headh\_H1. Τέλος, έκφραση του Or94 υπάρχει και στους θώρακες (βλ. Εικ 23). Κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων με το γονίδιο αναφοράς GAPDH, δείχνει ότι η διαφορά επιπέδων έκφρασης στους θώρακες προ και μετά της έκθεσης σε υδροξυτυροσώλη δεν είναι στατιστικά σημαντική ( $P$  value =0,527), σύμφωνα με T-test κατά ζεύγη δίπλευρης κατανομής (two tailed distribution, paired sample T-test).

Το γονίδιο Or94 (XM\_014239073) κωδικοποιεί τον OR94 (XP\_014094548) που είναι πρωτίστως ομόλογος με τον DmelOR94a και δευτερευόντως με τον DmelOR94b της δροσόφιας (βλ. Παράρτημα Πίνακα 8).



**Εικόνα 22. Σχετική γονιδιακή έκφραση του Or94 σε κεφάλια θηλυκών δάκων, μετά από κανονικοποίηση με RpL19:** Παρουσιάζονται τα επίπεδα έκφρασης του Or94 σαν βιολογικό σετ (άνω τμήμα) και ξεχωριστά σε κάθε βιολογικό δείγμα που είχε εκτεθεί σε υδροξυτυροσώλη (κάτω τμήμα). Τα αποτελέσματα έχουν κανονικοποιηθεί ως προς την έκφραση του γονιδίου αναφοράς RpL19.





**Εικόνα 23. Σχετική γονιδιακή έκφραση του Or94 σε θώρακες θηλυκών δάκων, μετά από κανονικοποίηση με GAPDH:** Παρουσιάζονται τα επίπεδα έκφρασης του Or94 σαν βιολογικό σετ. Με ροζ απεικονίζονται τα δείγματα control ενώ με μπλε τα δείγματα που είχαν εκτεθεί σε υδροξυτυροσόλη. Τα αποτελέσματα έχουν κανονικοποιηθεί ως προς την έκφραση του γονιδίου αναφοράς GAPDH.

## 5 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Απώτερος στόχος της μελέτης του οσφρητικού συστήματος είναι η κατανόηση της σύνδεσης οσμής-απόκρισης του δάκου, με σκοπό τον έλεγχο του εντόμου. Ως γνωστό, οι έως πρότινος τεχνικές αντιμετώπισης του δάκου υστερούν σε αποτελεσματικότητα και ειδοειδικότητα. Για να περιοριστεί ο πληθυσμός σε επίπεδα που η προκαλούμενη ζημιά στην παραγωγή είναι οικονομικά βιώσιμη, απαιτείται ταυτόχρονη εφαρμογή διαφόρων μεθόδων με συχνά αδρό κόστος. Μάλιστα, η αποτελεσματικότητα πολλών τεχνικών εξαρτάται από τις περιβαλλοντικές συνθήκες/μέγεθος της παραγωγής και «πέφτει στο κενό» σε περιόδους υψηλής υγρασίας/χαμηλής παραγωγής ελιάς (Tsolakis et al., 2011). Τα παραπάνω, σε συνδυασμό με παράπλευρες απώλειες ωφέλιμων εντόμων κατά την εφαρμογή των γνωστών μεθόδων, καθιστούν επιτακτική την ανάγκη για ειδοειδικές μεθόδους ελέγχου του δάκου. Η ανακάλυψη οσμών που προσελκύουν ειδοειδικά και αποτελεσματικά τον δάκο, καθώς και η αντιστοίχισή τους σε συγκεκριμένους οσφρητικούς υποδοχείς, μπορεί να οδηγήσει σε νέες πιο αποτελεσματικές, φιλικές προς το περιβάλλον μεθόδους αντιμετώπισης του παρασίτου.

Τα παραπάνω πειράματα είναι μέρος μιας ευρύτερης προσπάθειας αντιστοίχισης υποδοχέων ORs του δάκου με συγκεκριμένες οσμές της ελιάς. Η έρευνα που πραγματοποιήθηκε περιελάμβανε δύο σκέλη: 1) φυλογενετική μελέτη του ρεπερτορίου των ORs στο δάκο και 2) λειτουργική ανάλυση της απόκρισης επιλεγμένων, ειδοειδικών ORs στην υδροξυτυροσόλη. Η υδροξυτυροσόλη επιλέχθηκε ανάμεσα στις πολλές πτητικές ενώσεις της ελιάς διότι: i) είναι πτητική ένωση παρούσα μόνο σε φυτά του γένους *Olea*, ii) έχει υψηλή συγκέντρωση στα φύλλα/καρπούς της ελιάς και iii) είναι άμεσο παράγωγο της ολεωρωπαΐνης (ένωση με τεράστια βιολογική σημασία για το δάκο και τη σχέση του με την ελιά). Μέσω της φυλογενετικής μελέτης των γονιδίων ORs, αναδείχθηκαν πάνω από 20 πιθανοί ειδοειδικοί υποδοχείς του δάκου. Από αυτούς, μόνο τέσσερις ελέγχθηκαν ως προς την απόκρισή τους στην υδροξυτυροσόλη σε επίπεδο τρανσκριπτόματος. Η ανάλυση

έγινε σε ενήλικα έντομα, ξεχωριστά για τον κάθε οσφρητικό ιστό (κεραίες, γναθικές προσακτρίδες).

## 5.1 Φυλογενετική μελέτη οικογένειας ORs στο δάκο

Το ρεπερτόριο οσφρητικών υποδοχέων (ORs) είναι αντιπροσωπευτικό της ειδοειδικής οικολογίας κάθε εντόμου. Γνωστές προσαρμογές του ρεπερτορίου περιλαμβάνουν: α) επέκταση γονιδιακών γενεαλογιών ORs που ανιχνεύουν καίριες οσμές για την επιβίωση και β) συρρίκνωση/απώλεια υποοικογενειών/υποδοχέων που δεν εξυπηρετούν πια λειτουργικό ρόλο. Συγκεκριμένα ευνοούνται ORs που είναι εξειδικευμένοι στην ανίχνευση σημαντικών οσμών του ξενιστή/πηγής τροφής /συντρόφου.

Στον δάκο της ελιάς το ρεπερτόριο ORs περιλαμβάνει 68 γονίδια, συμπεριλαμβανομένου του συνυποδοχέα Orco. Η αντίστοιχη οικογένεια αριθμεί 60 γονίδια στην *D. melanogaster*, 76 στην *C. capitata*, 85 στην *M. domestica* και 23 στην *B. dorsalis*. Όπως ήταν αναμενόμενο, ο συνυποδοχέας Orco στον δάκο (BoOr coreceptor, XP\_014092453) διατηρεί υψηλά επίπεδα ομολογίας με τους αντίστοιχους συνυποδοχείς συγγενικών ειδών εντόμων. Η ομολογία αμινοξικής αλληλουχίας του *B. oleae* Orco φτάνει το 98% με την *B. dorsalis*, το 96% με την *C. capitata*, το 90% με την *M. domestica* και το 88% με την *D. melanogaster* (βλ. Παράρτημα Πίνακα 9). Δηλαδή, ο Orco του δάκου είναι εξελικτικά πιο συγγενικός με αυτόν της *B. dorsalis* και μετά κατά μειούμενη ομολογία με την *C. capitata*, την *M. domestica* και την *D. melanogaster*. Τα παραπάνω αποτελέσματα συμπίπτουν με τις εξελικτικές σχέσεις που παρουσίαζε το φυλογενετικό δέντρο των ORs που κατασκευάσαμε μεταξύ αυτών των 5 εντόμων.

Στο φυλογενετικό δέντρο, παρατηρούνται 4 περιπτώσεις ύπαρξης ορθολόγων γονιδίων OR 1:1:1:1 μεταξύ και των 5 εξεταζόμενων εντόμων. Επίσης, εντοπίζονται 5 περιπτώσεις ύπαρξης ορθολόγων 1:1:1:1 μεταξύ όλων των εντόμων εκτός της *B. dorsalis* (βλ. Πίνακα 6).

Dmel	Ccap	Mdom	Bdors	Bolae
DmelOr83a/ Orco	CcapOrco	MdomOrco	BdorOrco	XP_014092453 BoOrco
DmelOr13a	CcapOr7	MdomOr12	BdorOr13a	XP_014094420
DmelOr43a	CcapOr14	MdomOr23	BdorOr43a-1	XP_014088559
DmelOr49b	CcapOr13	MdomOr42	BdorOr49b-1	XP_014102906
DmelOr82a	CcapOr6	MdomOr70	-lost-	XP_014091900
DmelOr24a	CcapOr10	MdomOr16	-lost-	XP_014103094
DmelOr10a	CcapOr11	MdomOr11	-lost-	XP_014091911
DmelOr22c	CcapOr12	MdomOr15	-lost-	XP_014103181
DmelOr85e	CcapOr54	MdomOr78	-lost-	XP_014094455

**Πίνακας 6.** Υποδοχείς OR δάκου και ορθόλογα γονίδια συγγενικών δίπτερων εντόμων, σύμφωνα με το φυλογενετικό δέντρο της Εικόνας 15.

Επιπλέον εντοπίζονται 5 περιπτώσεις επέκτασης γονιδιακών γενεαλογιών ORs στον δάκο βάσει του φυλογενετικού δέντρου που κατασκευάστηκε:

1) Ο *B. oleae* παρουσιάζει μια ειδοειδική επέκταση που περιλαμβάνει 9 γονίδια OR (υποδοχείς XP\_014101582, XP\_014101520, XP\_014100962, XP\_014086206, XP\_014103550, XP\_014098809, XP\_014092478, XP\_014095883, XP\_014092042) ανάλογη της ειδοειδικής επέκτασης που παρατηρείται στην *C. capitata* (10 γονίδια OR, CcapOr38-47). Αντίστοιχη αλλά μικρότερη επέκταση υπάρχει και στην *B. dorsalis* (5 γονίδια OR). Δεν υπάρχουν ορθόλογα των παραπάνω υποδοχέων στη *D. melanogaster* και στη *M. domestica*. Όσον αφορά την προέλευση της επέκτασης, τα αποτελέσματα του δέντρου και η ανάλυση μέσω blastp δείχνουν ότι αυτοί οι υποδοχείς συγγενεύουν μακρινά με την DmelOr7a/DmelOr43b/DmelOr42b/DmelOr85a γενεαλογία της δροσόφιλας. Οι DmelOR7a, DmelOR43b, DmelOR42b, DmelOR85a έχουν ταυτοποιηθεί ως υποδοχείς που αποκρίνονται σε πληθώρα οσμών χαρακτηριστικών των φρούτων και των φύλλων, όπως ακεταλδεϋδη (πτητικό ώριμων φρούτων), 1-pentanol (άρωμα μπανάνας), ethyl propionate (άρωμα φράουλας και ακτινιδίου), β-πινένιο/hexanal/E-2-hexenal/Z-2 hexenol (οσμή φύλλων/χορταριού, “green smells”) κλπ. (Fishilevich and Vosshall 2005, Hallem and Carlson 2006). Άρα, είναι πιθανό η επέκταση αυτής της γενεαλογίας στο δάκο να περιλαμβάνει ORs που ανιχνεύουν οσμές φρούτων.

2) Εξελικτικά σημαντική για το δάκο φαίνεται να είναι η ειδοειδική επέκταση της DmelOr88a γενεαλογίας, σε σύγκριση με τα υπόλοιπα είδη που αναλύθηκαν. Συγκεκριμένα, εντοπίστηκε ένα μόνο ορθόλογο του DmelOr88a για κάθε οργανισμό (MdOr79, CcapOr64 και Or88a *B. dorsalis* αντίστοιχα). Αντίθετα στον δάκο βρέθηκε ειδοειδική επέκταση που περιλαμβάνει 3 γονίδια Or88a-like (υποδοχείς XP\_014101401, XP\_014099351, XP\_014099350), τα οποία είναι εξελικτικά απομακρυσμένα από τα ορθόλογα των συγγενικών ειδών εντόμων. Δύο γονίδια (υποδοχείς XP\_014099351, XP\_014099350) - εκ των τριών Or88a-like του δάκου - βρίσκονται στο ίδιο scaffold, σε κοντινή απόσταση και είναι πιθανότατα προϊόντα γονιδιακού διπλασιασμού. Το παραπάνω συμπέρασμα προκύπτει από το γεγονός ότι εμφανίζουν 86% ομολογία στην αμινοξική αλληλουχία των υποδοχέων που κωδικοποιούν μετά από ανάλυση blastp. Όσον αφορά τη λειτουργία του Or88a, έχει ταυτοποιηθεί στη δροσόφιλα ως ανασταλτικός υποδοχέας (inhibitory receptor) (Hallem and Carlson 2006) που εκφράζεται στο στάδιο της προνύμφης και στο ενήλικο έντομο (Kreher et al., 2005). Ο DmelOr88a ανιχνεύει μεταξύ άλλων πτητικών τη  $\gamma$ -octalactone (πτητικό των φρούτων μάνγκο) (Hallem and Carlson 2006), η οποία είναι ισχυρός επαγωγέας ωοαπόθεσης στην *B. dorsalis* (Pagadala Damodaram et al., 2014). Δεδομένων ότι 1) ο DmelOr88a εκφράζεται στα στάδια προνύμφης/ενηλικίου, 2) η εξέλιξη των γονιδίων ORs είναι ταχύτερη σε είδη που εξειδικεύονται σε λίγες πηγές τροφής και 3) η προνύμφη του δάκου είναι μονοφάγος, αναμένεται η ειδοειδική επέκταση να παίζει σημαντικό ρόλο στην επιβίωση του δάκου. Επομένως, οι Or88a-like υποδοχείς του δάκου αποτελούν ιδανικούς μελλοντικούς στόχους για μελέτη της απόκρισής τους στην υδροξυτυροσόλη.

3) Στον δάκο εντοπίζεται ειδοειδική επέκταση και της DmelOr63a γενεαλογίας. Υπάρχουν 2 ομόλογοι υποδοχείς στην δροσόφιλα, 2 στην *C. capitata*, 2 στην *B. dorsalis* και 1 στην *M. domestica* (απώλεια ενός ορθολόγου). Ο δάκος διαθέτει 5 γονίδια αυτής της γενεαλογίας, εκ των οποίων τα 3 είναι πιθανότατα αποτέλεσμα διπλασιασμών. Αναζήτηση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών τους στην πλατφόρμα Apollo έδειξε ότι εντοπίζονται στο ίδιο scaffold, δίπλα το ένα στο άλλο χωρίς καμία επικάλυψη και με μεγάλη ομολογία αμινοξικής αλληλουχίας στις παραγόμενες πρωτεΐνες. Στη *D. melanogaster* ο OR63a εκφράζεται αποκλειστικά στο στάδιο της προνύμφης (Kreher et al. 2005, Fishilevich et al. 2005b). Ο DmelOR63a δεν ανταποκρίνεται σε καμία οσμή από αυτές που έχουν εξετασθεί έως σήμερα. Σε πληθώρα ερευνών έχει ανιχνευτεί η παρουσία του DmelOr63a σε επίπεδο τρανσκριπτόματος και η πρωτεΐνη OR63a πάνω σε OSN της προνύμφης της δροσόφιλας. Ωστόσο, *in vivo* πειράματα έκφρασης με το σύστημα κενού νευρώνα (empty neuron system) κατηγοριοποιούν τον DmelOR63a ως μη λειτουργικό υποδοχέα. Φυσικά, δεν είναι απαραίτητο οι Or63a-like του δάκου να εμφανίζουν την ίδια συμπεριφορά και είναι πιθανό να παρουσιάζουν τελείως διαφορετική απόκριση. Στα πλαίσια αυτής της πτυχιακής εξετάστηκε η έκφραση τριών Or63a-like γονιδίων του δάκου σε επίπεδο τρανσκριπτόματος με Real-Time PCR καθώς και η απόκρισή τους μετά από έκθεση σε υδροξυτυροσόλη.

4) Όσον αφορά την DmelOr45a γενεαλογία, παρατηρήθηκε η ειδοειδική επέκταση στη *M. domestica* (10 γονίδια) που είχαν καταγράψει οι Papanicolaou et al. (2016). Εντοπίστηκε 1 μόνο ορθόλογο του DmelOr45a σε *C. capitata* και *B. dorsalis* ενώ στον δάκο διπλασιασμός. Συγκεκριμένα, εντοπίστηκαν 2 γονίδια στο ίδιο scaffold, σε κοντινή απόσταση χωρίς ωστόσο να υπάρχει επικάλυψη των δυο αλληλουχιών. Στη δροσόφιλα, ο DmelOr45a εκφράζεται αποκλειστικά στο στάδιο της προνύμφης (Kreher et al. 2005, Fishilevich et al. 2005b) και διαμεσολαβεί στην απόθεση των προνυμφών από βλαβερές ενώσεις (Bellmann et al., 2010). Η οικιακή μύγα έχει μεγάλη επέκταση αυτής της γενεαλογίας ως προσαρμογή που προστατεύει τις προνύμφες της από πιθανές τοξικές πηγές τροφής από τις οποίες συχνά διατρέφονται. Η προνύμφη του δάκου είναι μονοφάγος και διατρέφεται αποκλειστικά με τον καρπό της ελιάς. Ως γνωστό, η ολευρωπαΐνη είναι τοξική σε υψηλές συγκεντρώσεις οπότε η πιθανή ανίχνευση πτητικών παραγώγων μπορεί να βοηθά την προνύμφη να κρίνει ποιες περιοχές του ελαιόκαρπου είναι βρώσιμες.

5) Τέλος, παρατηρείται μια μικρή επέκταση της DmelOr67d γενεαλογίας στο δάκο (3 γονίδια, υποδοχείς XP\_014091792, XP\_014091805, XP\_014097995), μεγάλη επέκταση στη *M. domestica* (13 γονίδια), 5 γονίδια στη *C. capitata* και 1 μόνο ορθόλογο στη *B. dorsalis*. Ο DmelOR67d συμμετέχει στην αναγνώριση της αρσενικής φερομόνης [Z]-11-octadecenyl acetate (Kurtovic et al., 2007). Στην περίπτωση των φερομονών, η αναγνώριση τους από τους ORs διαμεσολαβείται από τις OBPs. Η επέκταση της DmelOr67d γενεαλογίας στην *M. domestica*, *C. capitata* και στον *B. oleae* πιθανώς αντιπροσωπεύει τα πιο περίπλοκα ρεπερτόρια OBPs/φερομονών αυτών των εντόμων.

- ❖ Οι επεκτάσεις γονιδιακών γενεαλογιών OR που αφορούν το δάκο καθώς και υποδοχείς που παρουσιάζουν ειδοειδικό ενδιαφέρον, λόγω εξελικτικής απόστασης από ομόλογους υποδοχείς συγγενικών εντόμων, παρουσιάζονται αναλυτικά στον παρακάτω πίνακα:

Dmel	Ccap	Mdom	Bdors	Bolae	ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ στη Dmel
60 OR genes	76 OR genes	85 OR genes	23 OR genes	68 OR genes	
DmelOr7a	Επέκταση 10 γονίδια	-	5 γονίδια	Επέκταση 9 γονίδια	Ανίχνευση οσμών φρούτων
-	CcapOr38 CcapOr39	-	BdorOr7a-5 BdorOr7a-3 BdorOr43b	XP_014101582* XP_014101520* XP_014100962* XP_014086206*	
-	CcapOr40 CcapOr41	-	-	XP_014103550*	
-	CcapOr42 CcapOr43	-	-	XP_014098809*	
-	CcapOr44,45,46,47	-	BdorOr7a-1 BdorOr7a-4	XP_014092478* XP_014092042* XP_014095883*	
Dmel88a	CcapOr64	MdomOr79	BdorOr88a	Ειδοειδική επέκταση (3 γονίδια) XP_014101401* XP_014099351* XP_014099350*	Ανασταλτικός υποδοχέας
DmelOr63a-PA DmelOr63a-PB	CcapOr56 CcapOr57	MdOr49	BdorOr63a-1 BdorOr63a-2	Ειδοειδική επέκταση (4 γονίδια) XP_014094225* XP_014094224* XP_014094223* XP_014096877* XP_014098250*	Άγνωστη λειτουργία
DmelOr45a	CcapOr5	Ειδοειδική επέκταση (10 γονίδια) MdomOr24-33	BdorOr45a	Διπλασιασμός XP_014098074* XP_014098072*	Απώθηση των προνυμφών (larvae) από βλαβερές ενώσεις
DmelOr67d	Επέκταση (5 γονίδια) CcapOr58-62	Επέκταση (13 γονίδια) MdomOr53-65	BdorOr67d	Επέκταση (3 γονίδια) XP_014091792* XP_014091805*	Ανίχνευση φερομόνης

				XP_014097995*	
-	-	-	Ειδοειδικός OR BdorOr35a	Ειδοειδικός OR XP_014103705* (Μακρινή συγγένεια με DmelOr35a-PB)	OR προνύμφης και ενήλικου Dmel με μέγιστη απόκριση στην 1-pentanol (πητητικό μπανάνας) (Mathew et al., 2013)
Dmel85b,85c	CcapOr75	MdOr71CTE MdOr72PSE	-lost-	XP_014101291* XP_014093775*	OR προνύμφης Dmel με μέγιστη απόκριση στην 3-octanol (αλκοόλη παρούσα σε κρασιά και στο φυτό σόγια) (Kreher et al, 2005)
-	CcapOr18	MdOr83	BdorOr43a-2	XP_014097484* XP_014097486*	-
DmelOr67c-PA	Επέκταση (4 γονίδια) CcapOr68-71	MdOr82	BdorOr67c	Επέκταση (3 γονίδια) XP_014101001* XP_014096202* XP_014094968	Άγνωστη λειτουργία

**Πίνακας 7.** Παρουσιάζονται οι ομόλογοι ORs μεταξύ 5 ειδών εντόμων. Με (\*) σημαίνονται πιθανοί ειδοειδικοί ORs του δάκου.

## 5.2 Έλεγχος απόκρισης ORs στην υδροξυτυροσόλη

Στα πλαίσια αυτής της πτυχιακής εξετάστηκε η έκφραση τριών Or63a-like γονιδίων του δάκου και ενός Or94a-like, με ποσοτική Real-Time PCR. Η μελέτη της γονιδιακής έκφρασης έγινε στα οσφρητικά όργανα θηλυκών ενήλικων δάκων (γναθικές προσακτρίδες, κεραίες) καθώς και σε ιστό control (θώρακας). Επίσης, ελέγχθηκε η ύπαρξη θετικής ρύθμισης (upregulation), αρνητικής ρύθμισης (downregulation) ή μη απόκρισης των γονιδίων OR μετά από έκθεση των ιστών (γναθικές προσακτρίδες, κεραίες, θώρακας) σε υδροξυτυροσόλη. Σε αυτή την ενότητα θα αναλυθούν τα αποτελέσματα των παραπάνω πειραμάτων, ξεχωριστά για κάθε γονίδιο.

### **Or63 (XM\_014241402)**

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της qRT-PCR, το γονίδιο Or63 (XM\_014241402) δεν εκφράζεται στις γναθικές προσακτρίδες θηλυκών δάκων. Ωστόσο, παρατηρούνται χαμηλά επίπεδα έκφρασης στις κεραίες. Ο OR63 αποτελεί μέρος της ειδοειδικής επέκτασης της DmelOr63a γενεαλογίας στο δάκο. Όπως προαναφέρθηκε, ο DmelOR63a ανήκει στους OR που εκφράζονται μόνο στο στάδιο της προνύμφης (larva specific). Κάτι τέτοιο δεν ισχύει για τον OR63 (XP\_014096877) του δάκου, ο οποίος εμφανίζει έκφραση (αν και μικρή) στις κεραίες του ενήλικου εντόμου. Όμως,

δεδομένης της γενεαλογίας αυτού του γονιδίου είναι πιθανό ο OR63 να εκφράζεται και στην προνύμφη του δάκου, πράγμα που πρέπει να εξεταστεί σε μελλοντικά πειράματα. Όσον αφορά τον θώρακα, παρουσιάζεται έκφραση του γονιδίου Or63. Ο θώρακας είχε επιλεγεί ως ιστός control διότι δεν ανήκει στα οσφρητικά όργανα και κανονικά δεν εκφράζει υποδοχείς OR. Εκτοπική έκφραση οσφρητικών υποδοχέων σε μη οσφρητικούς ιστούς έχει παρατηρηθεί σε θηλαστικά όπως το ποντίκι καθώς και στον άνθρωπο (Feldmesser et al. 2006, NaNa Kang and JaeHyung Koo 2012). Στην περίπτωση των εντόμων, έχει καταγραφεί στο *Bemisia tabaci* εκτοπική έκφραση OBPs στον θώρακα σε χαμηλά επίπεδα (Wang et al., 2017). Όταν οι OBPs βρίσκονται στο οσφρητικό σύστημα, συνεργάζονται στενά με τους ORs. Άρα, άμα υπάρχει εκτοπική έκφραση και άλλων μοριακών συστατικών του οσφρητικού, η παρουσία ORs σε μη οσφρητικούς ιστούς δεν είναι τόσο παράξενη. Σχετικά με τη βιολογική λειτουργία των εκτοπικά εκφρασμένων ORs, μπορεί να μην υπάρχει καμία χρησιμότητα και να είναι απλώς αποτέλεσμα γενετικών μεταλλάξεων στην περιοχή του υποκινητή, που οδηγούν σε χαλαρότερη ρύθμιση της μεταγραφής (leaky transcription) (Rodríguez-Trelles et al., 2005). Από την άλλη, υπάρχει το ενδεχόμενο να συμμετέχουν σε κάποια βιολογική διεργασία που ακόμα δεν έχει καταγραφεί, όπως στην περίπτωση συμμετοχής ORs στην χημειοτακτική συμπεριφορά του σπέρματος στον άνθρωπο (Spehr et al., 2003). Δεδομένου του μικρού αριθμού βιολογικών δειγμάτων που εξετάστηκαν σε αυτή την εργασία, η εκτοπική έκφραση του OR63 στον θώρακα πρέπει να επαληθευτεί με επανάληψη των πειραμάτων με περισσότερα βιολογικά δείγματα.

Όσον αφορά την απόκριση στην υδροξυτυροσόλη, δεν επηρεάζεται η έκφραση του γονιδίου Or63 σε κανέναν από τους εξεταζόμενους ιστούς μετά την έκθεση. Αυτό δεν σημαίνει απαραίτητα ότι ο OR63 δεν ανιχνεύει την υδροξυτυροσόλη. Η απόκριση των οσφρητικών υποδοχέων είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με την συγκέντρωση του οσμηρού ερεθίσματος και το χρόνο έκθεσης του εντόμου σε αυτό. Άρα, η μη απόκριση του OR63 στην υδροξυτυροσόλη αφορά συγκέντρωση έκθεσης 7,7 ng ανά έντομο και τις συνθήκες έκθεσης που περιγράφησαν. Επομένως, δεν αποκλείεται ο υποδοχέας OR63 του δάκου να αποκρίνεται σε διαφορετικές συγκεντρώσεις υδροξυτυροσόλης, ενδεχόμενο που πρέπει να εξετασθεί μελλοντικά.

### **Or63 ii (XM\_014238750)**

Το γονίδιο Or63 ii (XM\_014238750) δεν εκφράζεται στις γναθικές προσακτρίδες και στις κεραίες θηλυκών δάκων. Δεν παρατηρείται έκφραση του Or63 ii στον θώρακα. Ο υποδοχέας OR63 ii (XP\_014094225) είναι και αυτός μέρος της ειδοειδικής επέκτασης της DmelOr63a γενεαλογίας στο δάκο. Δεδομένης της larva specific έκφρασης του γονιδίου DmelOr63a, πρέπει να γίνει μελλοντικά έλεγχος της έκφρασης του Or63 ii στο στάδιο της προνύμφης. Σχετικά με την απόκριση του Or63 ii στην υδροξυτυροσόλη, δεν διαπιστώθηκε διαφορά επιπέδων έκφρασης μετά της έκθεσης. Όμως, δεν αποκλείεται το γονίδιο Or63 ii να αποκρίνεται στην υδροξυτυροσόλη στο στάδιο της προνύμφης ή σε διαφορετική συγκέντρωση έκθεσης.

### **Or63 iii (XM 014238749)**

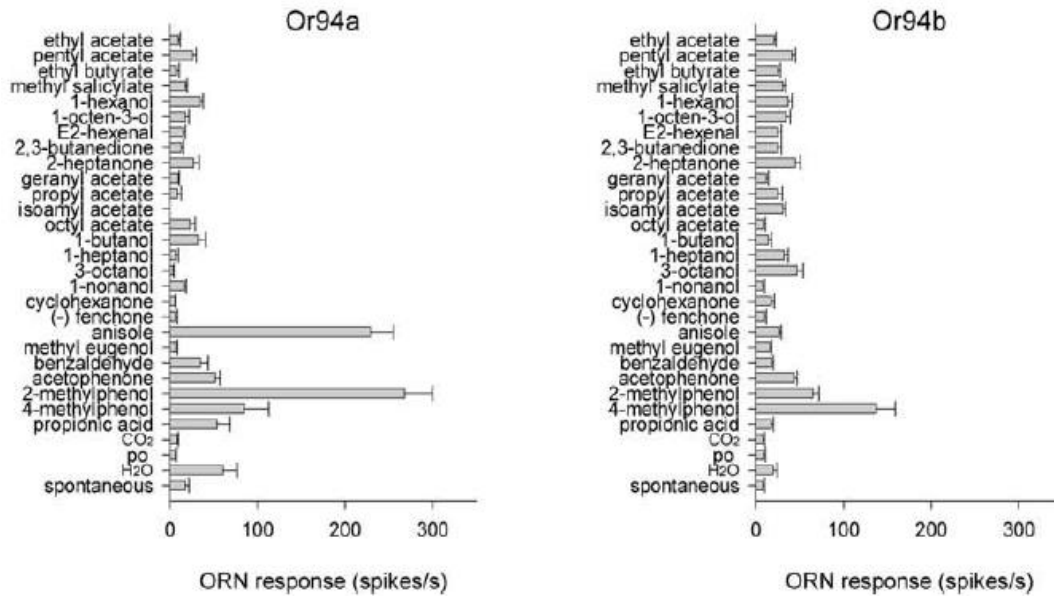
Ομοίως με το Or63 ii, το γονίδιο Or63 iii δεν εμφανίζει έκφραση σε κανέναν από τους εξεταζόμενους ιστούς (γναθικές προσακτρίδες, κεραίες, θώρακας), ούτε φαίνεται να αποκρίνεται στην υδροξυτυροσόλη. Δεδομένου ότι τα γονίδια Or63 ii (XM\_014238750) και Or63 iii (XM\_014238749) είναι πιθανότατα προϊόντα γονιδιακού διπλασιασμού, είναι αναμενόμενο να εμφανίζουν παρόμοια συμπεριφορά. Έτσι, ότι υποθέσεις διατυπώθηκαν παραπάνω για τον Or63 ii ισχύουν εξίσου και για τον Or63 iii.

### **Or94 (XM 014239073)**

Το γονίδιο Or94 δεν εκφράζεται και δεν αποκρίνεται στην υδροξυτυροσόλη στις γναθικές προσακτρίδες θηλυκών δάκων. Στην περίπτωση των κεραιών/κεφαλιού, παρατηρείται υπερέκφραση (upregulation) του Or94 μετά από έκθεση σε υδροξυτυροσόλη. Η παρατηρούμενη διαφορά στην απόκριση μεταξύ των δύο βιολογικών δειγμάτων που είχαν εκτεθεί στην υδροξυτυροσόλη μπορεί να οφείλεται σε διαφορές στην έκθεση των εντόμων του ενός βιολογικού δείγματος, σε σχέση με τα άτομα του άλλου βιολογικού δείγματος (αν και είναι σχετικά απίθανο). Όσον αφορά το θώρακα, παρατηρήθηκε εκτοπική έκφραση του Or94. Πρόκειται για ανάλογη περίπτωση με αυτή του Or63 (XM\_014241402) που περιγράφηκε παραπάνω. Ο Or94 δεν αποκρίνεται στην υδροξυτυροσόλη στους θώρακες, στην συγκέντρωση έκθεσης που εφαρμόστηκε. Ωστόσο, είναι πιθανό ο Or94 να παρουσιάζει απόκριση όταν η συγκέντρωση της υδροξυτυροσόλης είναι μεγαλύτερη, ενδεχόμενο που πρέπει να εξετασθεί μελλοντικά.

Όπως προαναφέρθηκε, το γονίδιο Or94 (XM\_014239073) κωδικοποιεί τον OR94 (XP\_014094548) που είναι ομόλογος με τους DmelOR94a/DmelOR94b της δροσόφιλας. Οι DmelOR94a/DmelOR94b εκφράζονται στη *D. melanogaster* μόνο στο στάδιο της προνύμφης (Kreher et al. 2005, Fishilevich et al. 2005b). Πρόκειται για ORs που συνεκφράζονται στον ίδιο OSN και αποκρίνονται σε αρωματικές ενώσεις με βενζολικό δακτύλιο (βλ. Εικ. 29). Και οι δύο υποδοχείς παρουσιάζουν μέγιστη απόκριση στην ένωση 2-methoxyphenyl acetate (Mathew et al., 2013). Ο DmelOR94a ενεργοποιείται από κάποιες οσμές και αναστέλλεται από άλλες, λειτουργώντας ως χημικός ανιχνευτής δύο κατευθύνσεων (Kreher et al. 2005). Στον δάκο, το γονίδιο Or94 που εξετάστηκε δεν είναι larva specific, παρά την ομολογία του OR94 με τους DmelOR94a/DmelOR94b. Όμως παίρνοντας υπόψη την παραπάνω ομολογία, είναι πιθανό το γονίδιο Or94 να εκφράζεται και στην προνύμφη του δάκου.





**Εικόνα 29.** Ενώσεις στις οποίες αποκρίνονται οι υποδοχείς **DmelOR94a** και **DmelOR94b** (Kreher et al., 2005): Παρουσιάζεται ο αριθμός των κορυφών του ηλεκτρογραφήματος του οσφρητικού νευρώνα (odorant receptor neuron, ORN).

### 5.3 Επίλογος-Μελλοντικές προσεγγίσεις

Το οσφρητικό σύστημα αντικατοπτρίζει τις ανάγκες που θέτει η ειδοειδική οικολογία του κάθε εντόμου. Στο δάκο της ελιάς, η εξειδίκευση σε ένα μόνο είδος ξενιστή οδηγεί σε αντίστοιχες αλλαγές στο ρεπερτόριο των ORs. Οι εξελικτικές προσαρμογές του οσφρητικού που παρατηρήθηκαν περιλαμβάνουν επέκταση συγκεκριμένων υποοικογενειών ORs. Όπως ήταν αναμενόμενο, ευνοούνται ORs που πιθανώς σχετίζονται με την ανίχνευση καιρίων οσμών του ξενιστή/συντρόφου/πηγής τροφής. Η εν λόγω φυλογενετική μελέτη υπέδειξε 32 ειδοειδικά γονίδια OR του δάκου, που έχουν αυξημένες πιθανότητες απόκρισης στην υδροξυτυροσόλη. Περαιτέρω λειτουργική μελέτη αυτών των γονιδίων, μπορεί να μας αποκαλύψει τον ή τους ORs υπεύθυνους για τον εντοπισμό του ξενιστή-ελιά καθώς και τους φυσικούς προσδέτες τους. Σε επόμενο στάδιο, μπορούν να σχεδιαστούν συνθετικά μόρια που παρομοιάζουν τη δομή και τη δράση των φυσικών προσδετών ενώ παράλληλα διατηρούν ειδοειδική στόχευση. Με αυτό τον τρόπο, μπορεί να οδηγηθούμε σε νέες, ειδοειδικές και πιο αποτελεσματικές μεθόδους ελέγχου του παρασίτου.

Όσον αφορά τους τέσσερις υποδοχείς OR για τους οποίους ελέγχθηκε η απόκριση στην υδροξυτυροσόλη, τα αποτελέσματα χρειάζονται επαλήθευση με μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων και επιπλέον γονίδια αναφοράς. Το γεγονός, ότι οι εξεταζόμενοι υποδοχείς δεν εκφράζονται σε κάποιους από τους οσφρητικούς ιστούς στο ενήλικο, δεν αποκλείει την πιθανότητα τα αποτελέσματα να διαφέρουν σημαντικά στο στάδιο της προνύμφης. Επίσης, η παρατηρούμενη έλλειψη απόκρισης στην υδροξυτυροσόλη δεν συνεπάγεται ότι οι συγκεκριμένοι υποδοχείς δεν την ανιχνεύουν. Όπως αναλύθηκε, η απόκριση των ORs εξαρτάται άμεσα από την συγκέντρωση του

οσηρού ερεθίσματος και από το χρόνο έκθεσης σε αυτό. Συνεπώς, η απόκριση των εξεταζόμενων ORs του δάκου ισχύει ειδικά για την συγκέντρωση υδροξυτυροσόλης που χρησιμοποιήθηκε (7,7 ng ανά έντομο) και τις συνθήκες έκθεσης που περιγράφησαν. Για καλύτερη κατανόηση της απόκρισης του δάκου στην υδροξυτυροσόλη, τα πειράματα πρέπει να επαναληφτούν με μεγαλύτερες συγκεντρώσεις έκθεσης. Επιπλέον, πρέπει να περιλαμβάνουν και το στάδιο προνύμφης του δάκου, στο οποίο το έντομο διαβιεί μέσα στον ελαιόκαρπο. Οι μελλοντικές μελέτες δεν πρέπει να περιοριστούν σε επίπεδο τρανσκριπτόματος, αλλά να επεκταθούν και σε ηλεκτροφυσιολογική μελέτη απόκρισης.

## 6 ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

<i>D.mel</i>	<i>B.oleae</i>
DmelOr94a	XP_014094548 XP_014094554 XP_014095326
DmelOr94b	
DmelOr24a	XP_014103094
DmelOr10a	XP_014091911
DmelOr46aA	
DmelOr46aB	XP_014095654
DmelOr85b	XP_014093775
DmelOr43a	XP_014088559
DmelOr49b	XP_014102906
DmelOr22c	XP_014103181

**Πίνακας 1.** ORs της *D. melanogaster* που αποκρίνονται σε φαινολικές ενώσεις (Ray et al., 2014) καθώς και οι ομόλογοι υποδοχείς τους στο δάκο βάση του φυλογενετικού δέντρου των ORs.

ID	NAME	locus	scaffold	NOTES
XP_014101291	BoOR85c_like_partial	<b>LOC106626008</b>	NW_013589685.1 (1585..4006, complement)	Διαφορετικά scaffolds
XP_014093775	LOW QUALITY PROTEIN BoOr85c like	<b>LOC106619952</b>	NW_013581464.1 (193106..197725)	>>
XP_014101001	LOW QUALITY PROTEIN BoOr67c like partial	<b>LOC106625697</b>	NW_013586014.1 (8773..10831, complement)	>>
XP_014096202	BoOr67c like partial	<b>LOC106621753</b>	NW_013581740.1 (123144..123848)	>>
XP_014101401	BoOr88a like partial	<b>LOC106626119</b>	NW_013592004.1 (4..1399, complement)	Διαφορετικά scaffolds
XP_014099350	BoOr88a like	<b>LOC106624188</b>	NW_013582790.1 (15283..16701, complement)	ίδιο scaffold, καμία επικάλυψη, κοντά
XP_014099351	BoOr88a like	<b>LOC106624189</b>	NW_013582790.1 (534..7533, complement)	>>
XP_014091805	BoOr67d like	<b>LOC106618541</b>	NW_013581344.1 (363535..364928)	ίδιο scaffold, καμία επικάλυψη, αντιπαράλληλα οι υποκινητές
XP_014091792	BoOr67d like	<b>LOC106618531</b>	NW_013581344.1 (365870..367248, complement)	>>
XP_014094225	BoOr63a like	<b>LOC106620291</b>	NW_013581504.1 (109077..110667)	ίδιο scaffold, καμία επικάλυψη, κοντά

XP_014094224	BoOr63a like	LOC106620290	NW_013581504.1 (102802..108204)	>>
XP_014094223	BoOr63a like	LOC106620289	NW_013581504.1 (97439..100945)	>>
XP_014096877	BoOr63a like	LOC106622271	NW_013581862.1 (65815..79788, complement)	Διαφορετικά scaffolds
XP_014098250	BoOr63a like	LOC106623316	NW_013582247.1 (43697..51194, complement)	>>
XP_014097484	BoOr2 like	LOC106622741	NW_013582023.1 (44554..46740)	ίδιο scaffold,καμία επικάλυψη,κοντά
XP_014097486	BoOr2 like	LOC106622743	NW_013582023.1 (37201..38940)	>>
XP_014098074	BoOr45a like	LOC106623179	NW_013582182.1 (47130..48497)	ίδιο scaffold,καμία επικάλυψη, κοντά
XP_014098072	BoOr45a like partial	LOC106623177	NW_013582182.1 (48776..49506)	>>
XP_014101582	BoOr43b like	LOC106626293	NW_013595040.1 (454..1221, complement)	Διαφορετικά scaffolds
XP_014101520	BoOr43b like partial	LOC106626234	NW_013593763.1 (5..2034)	>>
XP_014100962	BoOr43b like partial	LOC106625659	NW_013585606.1 (9..638, complement)	>>
XP_014086206	BoOr43b like	LOC106614819	NW_013581239.1 (967348..968480, complement)	>>

**Πίνακας 2.**

Γονίδιο στόχος	Αλληλουχία εκκινητή	T <sub>a</sub>	Μέγεθος αναμενόμενου προϊόντος
Or63 XM_014241402	F: CATATGTGGCATTTCGTTGTATCC	55°C	86 bp
	R: TGGTGATGGTCTCTGCAATTAG		
Or63 ii XM_014238750	F: GCCAGTTGAAGCAGGAGAT	55°C	128 bp
	R: GACGAAGATGGAGCCAAA		
Or63 iii XM_014238749	F: TTTCTGTTGTTGTGTGGCTATT	55°C	157 bp
	R: TCCCAAAAAGGATATAGTGCAGGA		
Or94 XM_014239073	F: GCAACACTGCTCGTGAATG	55°C	93 bp
	R: GCCGTAGGCGTACCAATAAT		

**Πίνακας 3:** Αλληλουχίες των ομόλογων εκκινητών, οι θερμοκρασίες T<sub>a</sub> και το αναμενόμενο μέγεθος του προϊόντος κατά την ενίσχυση του cDNA του *Bactrocera oleae*. (Ενότητα 4.3)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> <a href="#">odorant receptor [Drosophila melanogaster]</a>	307	307	99%	5e-101	40%	<a href="#">CBW30593.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">odorant receptor [Drosophila melanogaster]</a>	306	306	99%	2e-100	40%	<a href="#">CBW30597.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">odorant receptor 63a, isoform A [Drosophila melanogaster]</a>	305	305	99%	4e-100	40%	<a href="#">NP_523895.2</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">odorant receptor [Drosophila melanogaster]</a>	305	305	99%	6e-100	39%	<a href="#">CBW30594.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">odorant receptor [Drosophila melanogaster]</a>	299	299	99%	6e-98	39%	<a href="#">CBW30603.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">odorant receptor [Drosophila melanogaster]</a>	295	295	99%	4e-96	39%	<a href="#">CBW30604.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">IP19850p [Drosophila melanogaster]</a>	172	172	49%	1e-51	42%	<a href="#">ABV82297.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">odorant receptor 63a, isoform B [Drosophila melanogaster]</a>	124	124	44%	3e-33	38%	<a href="#">NP_001163331.1</a>

**Πίνακας 4.** Αποτελέσματα blastp μεταξύ του OR63 (XP\_014096877) και της πρωτεϊνικής βάσης της *D. melanogaster*.

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	<a href="#">odorant receptor 63a_isoform A [Drosophila melanogaster]</a>	247	247	98%	1e-79	43%	<a href="#">NP_523895.2</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">odorant receptor [Drosophila melanogaster]</a>	246	246	98%	2e-79	43%	<a href="#">CBW30594.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">odorant receptor [Drosophila melanogaster]</a>	245	245	98%	5e-79	43%	<a href="#">CBW30593.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">odorant receptor [Drosophila melanogaster]</a>	244	244	98%	2e-78	43%	<a href="#">CBW30597.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">odorant receptor [Drosophila melanogaster]</a>	236	236	98%	3e-75	43%	<a href="#">CBW30604.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">odorant receptor [Drosophila melanogaster]</a>	235	235	98%	7e-75	43%	<a href="#">CBW30603.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">odorant receptor 63a_isoform B [Drosophila melanogaster]</a>	146	146	66%	3e-43	38%	<a href="#">NP_001163331.1</a>

**Πίνακας 5.** Αποτελέσματα blastp μεταξύ του OR63 ii (XP\_014094225) και της πρωτεϊνικής βάσης της *D. melanogaster*.

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	<a href="#">odorant receptor 63a_isoform A [Drosophila melanogaster]</a>	414	414	99%	7e-143	48%	<a href="#">NP_523895.2</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">odorant receptor [Drosophila melanogaster]</a>	413	413	99%	1e-142	48%	<a href="#">CBW30594.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">odorant receptor [Drosophila melanogaster]</a>	413	413	99%	2e-142	48%	<a href="#">CBW30593.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">odorant receptor [Drosophila melanogaster]</a>	411	411	99%	6e-142	48%	<a href="#">CBW30597.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">odorant receptor [Drosophila melanogaster]</a>	404	404	99%	5e-139	48%	<a href="#">CBW30604.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">odorant receptor [Drosophila melanogaster]</a>	402	402	99%	3e-138	47%	<a href="#">CBW30603.1</a>

**Πίνακας 6.** Αποτελέσματα blastp μεταξύ του OR63 iii (XP\_014094224) και της πρωτεϊνικής βάσης της *D. melanogaster*.

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	<a href="#">PREDICTED: odorant receptor 63a-like [Bactrocera oleae]</a>	851	851	99%	0.0	100%	<a href="#">XP_014094224.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">PREDICTED: odorant receptor 63a-like [Bactrocera oleae]</a>	502	502	66%	2e-180	87%	<a href="#">XP_014094225.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">PREDICTED: odorant receptor 63a-like [Bactrocera oleae]</a>	498	498	99%	2e-177	62%	<a href="#">XP_014094223.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">PREDICTED: odorant receptor 63a-like [Bactrocera oleae]</a>	363	363	99%	2e-123	44%	<a href="#">XP_014098250.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">PREDICTED: odorant receptor 63a-like [Bactrocera oleae]</a>	348	348	99%	1e-117	43%	<a href="#">XP_014096877.1</a>

**Πίνακας 7.** Αποτελέσματα blastx μεταξύ του Or63 iii (XM\_014238749) και της πρωτεϊνικής βάσης του *B. oleae*: παρουσιάζονται οι 5 υποδοχείς OR που είναι μέλη της ειδοειδικής επέκτασης της DmelOr63a γενεαλογίας στο δάκο.

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	<a href="#">odorant receptor 94a [Drosophila melanogaster]</a>	338	338	93%	8e-114	46%	<a href="#">NP_524455.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">odorant receptor 94b [Drosophila melanogaster]</a>	330	330	86%	1e-110	46%	<a href="#">NP_524456.1</a>

**Πίνακας 8.** Αποτελέσματα blastx μεταξύ του Or94 (XM\_014239073) και της πρωτεϊνικής βάσης της *D. melanogaster*.

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	<a href="#">PREDICTED: odorant receptor coreceptor [Bactrocera oleae]</a>	982	982	100%	0.0	100%	<a href="#">XP_014092453.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">odorant receptor Or83b [Bactrocera dorsalis]</a>	967	967	100%	0.0	98%	<a href="#">ACC86853.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">PREDICTED: odorant receptor coreceptor [Bactrocera dorsalis]</a>	967	967	100%	0.0	98%	<a href="#">XP_011203778.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">odorant receptor coreceptor isoform X1 [Ceratitis capitata]</a>	926	926	100%	0.0	96%	<a href="#">XP_012156143.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">odorant receptor coreceptor [Ceratitis capitata]</a>	925	925	100%	0.0	96%	<a href="#">NP_001266301.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">odorant receptor co-receptor [Musca domestica]</a>	873	873	100%	0.0	90%	<a href="#">AFH96944.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">odorant receptor co-receptor isoform A [Drosophila melanogaster]</a>	872	872	100%	0.0	88%	<a href="#">NP_524235.2</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">PREDICTED: odorant receptor coreceptor isoform X1 [Musca domestica]</a>	872	872	100%	0.0	90%	<a href="#">XP_005175278.1</a>

**Πίνακας 9.** Παρουσιάζονται τα αποτελέσματα blastp, όπου χρησιμοποιείται ως αλληλουχία query η αμινοξική αλληλουχία του Orco του *B. oleae* και γίνεται αναζήτηση ομόλογων πρωτεϊνών σε βάσεις πρωτεϊνικών δεδομένων των εντόμων *D. melanogaster*, *C. capitata*, *M. domestica* και *B. dorsalis*.

### Νουκλεοτιδικές αλληλουχίες mRNA

#### ➤ Γονίδιο Or63 (XM\_014241402) 1254 bp

>XM\_014241402.1 PREDICTED: Bactrocera oleae odorant receptor 63a-like (LOC106622271), mRNA  
 ATGTACAACACAGAAGAGTTTGTAGAATTGAAAAGTACAATCGCTTCAAATAAGAGAGCTTAAAGCGGTATCATATATTTAGGCATAAACTATGG  
 CTCGGAAACGTCATTAATAAATTTCTCGAGTGCATAAATCTACTGCTTATCATATATGTGGCATTTCGTTGTATCCACGATGGTTGATGCTAGAAA  
 GGGCTGATGGTGTATGTGCCGCTAATTGCAGAGACCATCACCAAAATTTGCAAACTACAAGCATGGTTAAAATGACCTTCTGTCTGTTTATGCAA  
 GGCCAGTGTGTGATTAACCTAAGAAGGCTGAAAACATGAGCTGCTCAAGGAATGAAGATCTTCTCGACTGATATGTGCATTAATAACTGAGTTGAA  
 AAATAGATAAACTCGATTATGAAAATATATGGATGGAATCAAGGCGACAACCTTTAAGCTGTCTCATAACTTGTTCGTCATCTTAGTAACATATT  
 TTCTCTACGCCCTTCTCACAACACTGTACCACCAATAAAGAAGACGCGGAACATATGTACATATATTACCTTTTACCAGTTCCCAATGTTTCTGGAT  
 AAGGGATGACCTCGCCTTATTATGCGGTGAAATGTTTCAATCGCGGATCTCACTACTCAGTGTGGCATGTGTTCAGTCAGCTTTCATTGCAATTT  
 TATGATCCTTTGCAAACATGCTTGTGGACTAGTTAAGGTAAGTCTGCGCCATCTGTTGCAATCCACCTCACCCCATGTTCCAGCTCATCGGCGTGATG  
 AATATTTGCGTTACTGCGTATCCAAACATCAAGAGACTCTGCGGTTTATAAATGACATCAATGAGCTTTTAAACACATCACTCTTTCACATTTCCCT  
 CATAGCTTGGCTATATATGGACTTGTGCTTTTCGAAATGAACCTTTGGATTAGAAACAAATAAACAACATTTGTTCTGATGATTATGATATATCGGAGC  
 TGCCCTCACCGTGGATTCATGTTATACGTAATGGCCAATTTTGTAGTACAGAGTTGGAAAAAATCCCTTAGTTTGTACAGTTGCGATTTGGTTTA  
 TGAACTCTGAAGTTTCAAGAAAACACTGAACATGATCATTATGCGAATAAAGATTCTGTTTTCAAATATCCCTGTTCCGCGTAATGTCTCCTTA  
 ACCACATTAATGGGTATATTAAGCCAGTTTTTCATATTTCTTGATTCTTCGAGATATAACGGATGAAATAAACTAA

#### ➤ Γονίδιο Or63ii (XM\_014238750) 828 bp

>XM\_014238750.1 PREDICTED: Bactrocera oleae odorant receptor 63a-like (LOC106620291), mRNA  
 ATGTTAGAAAGTGTGAAGAAATCTATAACGTAATTAACAATCTATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAAT  
 TAGTAAATTAAGATGTCCTTGAACCTTTTAAATGATTTTGGTAGTGACAGCCTTCTATCCTTATACGCCCACTGGTGTATTTCCCTCCGATATA  
 TTGACAGCATACCACCTTTAGCTGAGACCGTTTGCACCGCTTTGCAAACTCTCATTCCCGCTGTAATAAGATGATTTACCTCTCACCCAACTACT  
 TTCTATCGCCTTCTGGATCAGACTTTAAAACATGAAATAATACGCAAAATAGAAATATTCAACATGATTTTCCAATAAATCGCCAGTTGAAGCAGGA  
 GATCGATGATATAAATGAATGGAGTTTGGCTTAAGCGCAAAACGCCAAATATATTTTATTTCTGTTGTTGTTGGTATTTTGTAAATTACACTTTTG  
 GCTCCTCTTCGTTCAATTTGTATCATCAGCTGAAGCAAAACGCCGATTTAGAGTATAAATAGCACCTCCCGCACTGTATCCATTTTGGGATAGATAAA  
 GGCATGACATTTCCCTATTTATCCATTTGCAATGATATACCAGCAGTGTAAATATGCTCTGGCATGTCTGCGGTGAGTTTCAAGGCTCTTTCAT  
 CGTGTATGTCAGCATGCGGTTGGCTTGGTGAAGGTTCAAAATTTGCTGGTGTACAATCCACCTCACCACTCATACCGCTGCGAGGAAGGTTGAGT  
 ATCTGCGTTATACCATCATTACTTATCGCGCAATAAATTTGTA

#### ➤ Γονίδιο Or63iii (XM\_014238749) 1245 bp

>XM\_014238749.1 PREDICTED: Bactrocera oleae odorant receptor 63a-like (LOC106620290), mRNA  
 ATGTTAGAAAGTGTGAAGAAATTTATAACGTAATTAACAATCTATTAAGTGTCTATTGGAGTATCCTTTGGTTTGGGTGTGAACCTTGACAGCGCC  
 TAGTAAATTAAGATGTCCTTGAACCTTTTAAATGATTTTGGTAGTGACAGCCTTCTATCCTTATACGCCCACTGGTGTATTTCCCTCCGATATA  
 TTGACAGCATACCACCTTTAGCTGAGACCGTTTGCACCGCTTTGCAAACTCTCATTCCCGCTGTAATAAGATGATTTACCTCTCACCCAACTACT  
 TTCTATCGCCTTCTGGATCAGACTTTAAAACATGAAATAATACGCAAAATAGAAATATTCAACATGATTTTCCAATAAATCGCCAGTTGAAGCAGGA  
 GATCGATGATATAAATGAATGGAGTTTGGCTTAAGCGCAAAACGCCAAATATATTTTATTTCTGTTGTTGTTGGTATTTTGTAAATTACTTTTTG  
 GCTCCTCTTCGTTAATCTATCATCAGCTGAAGCAAAACGCCGATTTAAGCATATATACCATATCCTGCATATATCCTTTTGGGAAAGAAAA  
 GGCATGACATTTCCCTATTTATCCATTTGCAATGATATGACTGGCAGTGTCTATATCTCTGGCATATGTGCGGTGAGTTTCAAGGTTGCTTTCAT  
 CGTGTCTGTGAGCATGCGGTTGGCTTGGTGAAGGTTCCAAATTTGCTGGTGTACGATCCACCTCACCACTGATACCGGCGAGAGGCGGTTGGAAT  
 ATCTACGTTATACCATTAACCTTATCAGCGAATAAATTTTATGTCAGCAGATCCAAAATAGCTTCAAACACGTCAGCTTGTCAAAATTCGTAAGT  
 AGCTGATGATTTTGGTTTGTACTGTTTTCGAAATGAGTTTTCGGTTTGAAGTCCAGCATAGTTATCGTTATTCGATGATAATGATTTCCGCGGCGG  
 AGGAACCTCAAATTTCTATCTGTTTATAATGTCAGCACTAACCACTGTAGCGAAGAGATTTCCGTCAGGTTATACAGTTTCAAAATGATTTGTAAG  
 AAAGCGAAATTTCAAACATTTCTACGATGATGATTTAGAGAACTAATCGATATTTTACATGGAGGTATCATCGTTTACACTGATGAAATTTGGCC  
 ACCTTAATTTGCGTTATTCAGGATGAGTGGTTCTACTTTTTGTTATTACGCAACCTTCAAGAAAAATA

#### ➤ Γονίδιο Or94 (XM\_014239073) 1179 bp

>XM\_014239073.1 PREDICTED: Bactrocera oleae odorant receptor 94a-like (LOC106620548), mRNA  
 ATGACACCAACGGCCACAGCGCAGGAGACGCATAGGTGTAGCGGTGTGCTAATGCGCCTGCTGCAGATCCTTGGACTTTGGCCAATATGGAAAGA  
 AAGCCACCAAAAAATGGCAGTTTCAACACAATGTCGCAATTTGCTGACGCACTACTACCGCTACCTGCTGCACGTCGCGCTCACCTTACCTACAATA  
 CGCTCATGTTGATTCGAGGCGCTGACGCGCTGGGAACGCGCGGATCACAATCTTACATCTCCATCACCGAAGTGGGTATGATGGCGTTGACGCTAAAC  
 TTCTGGCGCTTAGAGCAGCGCGCTTACCCTTTATGCACAGGCTCAGCTACAGCGCAACCTTTGGCTTTGCGCAACAGGCGGAACGTCAGTGGTGGCG  
 CGGAGGCGAGCGCTTTTTTGGCGCGCATTTGCCGTGTGCTATATAGCGGCGGCGTGTGTGCTCTCACAGCATTCGCGCAACACTGCTCGTGAATG  
 GCTACTCCTTGCCTACGACTATTGGCTACCATTGCAATGGCATAACGCGCAAAATATTGGTACGCTACGGCTATGAGTTGATAGCGATGTCACTC

ACGTGCATCTCAAACGTCACCATGGATATGCTGCTGTATTACCTCTTCCAGTGGCGCTTTATACAAAGTTAATTGGCATGCGTCTAATGGCGTT  
GCAGCATCTAAGCGAAAGGTTGGCCGTGCAACAGCTGATAAACATAATCGAGTTACATAAAAGAGTCAAAGGTTGACAACGCAATGTGAGGTGCTCG  
TGTCCGTGCCCATTTCTGGTGCAAATCGTGTGAGCGCCTTCATTTTATGCTTTGTGCTTACAAACTATGCAAAATAGCGAGAATCCAGGC  
CAATTTTATAGCCATGTGCAATTTGCCAGCGTGTGACGTTGCAAAATATTCTGCCATGTACTTTGGCAATGAGATTACCATAAATTCGGATGCGCT  
GACAACGTTGTGTACAACAGTAATTTGGGAGGAATTTCCACCGCTACCGCTAAGCTAATGAATCTGTATATGGAGCTGCTGAAGCGACCGCGCAAA  
TAAAAGCTGGCAACTTCTTCTGGTGGCCGTGCCCTTTTACAAAAGACCATGAATAATGCTTACAGCCTTCTAGCGTACTTTTGAATATGAGTAAA  
TAA

## Αμινοξικές αλληλουχίες

### ➤ Υποδοχέας OR63 (XP\_014096877) 417 aa

>XP\_014096877.1 PREDICTED: odorant receptor 63a-like [Bactrocera oleae]  
MYNTEEFVELKKYNRFKIRELKAIVSYILGINYGETSLKKFLRVLNLLIIICGISLYPRWMLERADGDVPLIAETITITLQTTSMVKMTFCLFMQ  
GQCCALLKKAENYELLQGMKIFSTDMCIKTELKNEINSIMETIWMESRRQLLSCLITCSCILSNYFLYAFFTNLYHQIKKTPNYVHILPFTGPFMFLD  
KGMTSPYYAVEMFIGGSSLLTCGMCSVSVFHCIFMILCKHACGLVVKVLCALLQSTSPHVPARRRDEYLRYCVIQHQTETLRFINDINELFKHITLSHFL  
HSLAIYGLVLFEMNFGLSTNKTTFVRMIMYIGAALTVDMSMYVNGQFLVTELEKIPLVCSYCDWFNESEGFKKTLNMIIMRSNKDFCFQISWFGVMSL  
TTLMLGILKASFSYFLLLRDITDEIN

### ➤ Υποδοχέας OR63ii (XP\_014094225) 275 aa

>XP\_014094225.1 PREDICTED: odorant receptor 63a-like [Bactrocera oleae]  
MLESVEEIIYKRNYNSIKLLIGVTFGLGVNLTAPSKIKDALKLFNVILVVTSLLSLYAHWCYFLRYIDNIPLLAETVCTALHILMSVVKIVYYLFTQRN  
FYRLLDQTLKHEIIRKIEIFQHDFFPINRQLKQEIIDDIMNGVWLSAKRQILFYFCCCVAVIVCNVYFFGSFFVNLVYHQLKQTPDYKHILPYPALYPFWEEK  
GMTFFYYPLQMYMTGSNAVYISGICAVSFEQVFIIVLCQHAVGLVRVHNLVLRSTSPILPAERREVEYLRYTIIITYRRINL

### ➤ Υποδοχέας OR63iii (XP\_014094224) 414 aa

>XP\_014094224.1 PREDICTED: odorant receptor 63a-like [Bactrocera oleae]  
MLESVEEIIYKRNYNSIKVLIGVTFGLGVNLTAPSKIKDALKLFNVILVVTSLLSLYAHWCYFLRYIDNIPLLAETVCTALQTLISAVKMYVYLFQRT  
FYRLLDQTLKHEIIRKIEIFQHDFFPINRQLKQEIIDDIMNGVWLSAKRQILFYFCCCVAVIVCNVYFFGSFFVNLVYHQLKQTPDYKHILPYPALYPFWEEK  
GMTFFYYPLQMYMTGSNAVYISGICAVSFEQVFIIVLCQHAVGLVRVHNLVLRSTSPILPAERREVEYLRYTIIITYRRINL

### ➤ Υποδοχέας OR94 (XP\_014094548) 392 aa

>XP\_014094548.1 PREDICTED: odorant receptor 94a-like [Bactrocera oleae]  
MTPPTAQRERIGVARVLMRLQLILGLWPIWKESHQKNGSSTQCRNWLTHYRYLLHVPLTFTYNTLMWIEALTRWERADHILYISITEVGMMLTLN  
FWRLEQRAYHFHMEHSYSDNLALRNQAEQWRGEQRFARIACVYIGGGVCLVFTAFGATLLVNGYSLPYDYWLPEFWHNAQNYWYAYGYELIAMS  
TCISNVTMDMLLCYYLFHVALLYKLI GMRLMALQHLSERLAVQQLINIIEHLKRVKRLTTQCEVLVSVPIVQIVLSAFILCLCAYRLQTMQISENPG  
QFLAMLQFASVLTQLIFLPCYFNGEITINSDALTTCCVYNSNWEFEPSPTKRLMNLMEMLKRPQIKAGNFFLVGLPVFTKTMNAYSLALLLNMSK

## 7 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

### A

Adler J. (1966). Chemotaxis in bacteria. *Science* 153:708-716

Alagna F, Mariotti R, Panara F, Caporali S, Urbani S, Veneziani G, Esposto S, Taticchi A, Rosati A, Rao R, Perrotta G, Servili M and Baldoni L (2012). Olive phenolic compounds: metabolic and transcriptional profiling during fruit development. *BMC Plant Biology*, 12:162

Alagna F, Kallenbach M, Pompa A, De Marchis F, Rao R, Baldwin I.T, Bonaventure G, Baldoni L, (2015). Olive fruits infested with olive fly larvae respond with an ethylene burst and the emission of specific volatiles. *J. Integr.Plant Biol.* <http://dx.doi.org/10.1111/jipb.12343>

Axel R (2005). Scents and sensibility: A molecular logic of olfactory perception (Nobel lecture). *Angew Chem Int Ed Engl*, 44:6110–6127

### B

Bellmann D, Richardt A, Freyberger R, Nuwal N, Schwärzel M, Fiala A, Störtkuhl KF (2010). Optogenetically Induced Olfactory Stimulation in *Drosophila* Larvae Reveals the Neuronal Basis of Odor-Aversion behavior. *Front Behav Neurosci*, 4:27

**Benov L** and Fridovich I (1996). *Escherichia coli* exhibits negative chemotaxis in gradients of hydrogen peroxide, hypochlorite, and N-chlorotaurine: products of the respiratory burst of phagocytic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:4999-5002

**Benton R** (2006). On the ORigin of smell: odorant receptors in insects. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 63(14):1581

**Benton R**, Sachse S, Michnick SW and Vosshall LB (2006). Atypical membrane topology and heteromeric function of *Drosophila* odorant receptors in vivo. *PLoS Biol* 4, e20

**Benton R**, Vannice KS, Vosshall LB (2007). An essential role for a CD36-related receptor in pheromone detection in *Drosophila*. *Nature*. 450(7167):289-93

**Benton R**, Vannice, KS, Gomez-Diaz C, and Vosshall LB (2009). Variant ionotropic glutamate receptors as chemosensory receptors in *Drosophila*. *Cell* 136:149-162

**Biasazin TD**, Karlsson MF, Hillbur Y, Seyoum E, and Dekker T (2014). Identification of host blends that attract the African invasive fruit fly, *Bactrocera invadens*. *Journal of chemical ecology* 40:966-976

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

**Burrack HJ**, Fornell AM, Connell JH, O'Connell NV, Phillips PA, Vossen PM, Zalom FG (2009). Intraspecific larval competition in the olive fruit fly (Diptera: tephritidae). *Environ Entomol*, 38:1400-1410. 10.1603/022.038.0508

**Byron MA** and Gillett-Kaufman JL (1999, revised 2009 and 2016). Olive Fruit Fly *Bactrocera oleae* (Rossi) (Insecta: Diptera: Tephritidae) U.S. Department of Agriculture, UF/IFAS Extension Service, University of Florida, IFAS, Florida A & M University Cooperative Extension Program Entomology and Nematology Department EENY645

## C

**Carraher C**, Dalziel J, Jordan MD, Christie DL, Newcomb RD, Kralicek AV (2015). Towards an understanding of the structural basis for insect olfaction by odorant receptors. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 66:31-41

**Chang H**, Liu Y, Yang T, Pelosi P, Dong S, Wang G (2015). Pheromone binding proteins enhance the sensitivity of olfactory receptors to sex pheromones in *Chilo suppressalis*. *Sci Rep.*, 5:13093. doi: 10.1038/srep13093.

**Chatterjee A**, Roman G and Hardin PE (2009). G<sub>o</sub> contributes to olfactory reception in *Drosophila melanogaster*. *BMC Physiol* 9:22

**Clyne PJ**, Warr CG, Freeman MR, Lessing D, Kim J and Carlson JR (1999). A novel family of divergent seven-transmembrane proteins: candidate odorant receptors in *Drosophila*. *Neuron* 22:327-338

**Couto A**, Alenius M and Dickson BJ (2005). Molecular, anatomical and functional organization of the *Drosophila* olfactory system. *Curr Biol* 15:1535-1547

**Crnjar R**, Scalera G, Liscia A, Angioy AM, Bigiani A, Pietra P and Tomassini Barbarossa I (1989). Morphology and EAG mapping of the antennal olfactory receptors in *Dacus oleae*. *Entomol. exp. appl.* 51:77-85

**Croset V**, Rytz R, Cummins SF, Budd A, Brawand D, Kaessmann H, Gibson TJ and Benton R (2010). Ancient protostome origin of chemosensory ionotropic glutamate receptors and the evolution of insect taste and olfaction. *PLoS Genet.*, 6(8):e1001064

## D

**de Bruyne M**, Clyne PJ and Carlson JR (1999). Odor coding in a model olfactory organ: the *Drosophila* maxillary palp. *J Neurosci* 19:4520–4532

**de Bruyne M**, Foster K and Carlson JR (2001). Odor coding in the *Drosophila* antenna. *Neuron* 30: 537-552

**de Bruyne M**, Smart R, Zammit E and Warr CG (2010). Functional and molecular evolution of olfactory neurons and receptors for aliphatic esters across the *Drosophila* genus. *J. Comp. Physiol. A Neuroethol. Sens. Neural Behav. Physiol.* 196:97–109

**Dekker T**, Ibba I, Siju KP, Stensmyr MC and Hansson BS (2006). Olfactory shifts parallel superspecialism for toxic fruit in *Drosophila melanogaster* sibling, *D. sechellia*. *Curr. Biol*, 16:101–109

**Dobritsa AA**, Van der Goes van Naters WM, Warr CG, Steinbrecht RA and Carlson JR (2003). Integrating the molecular and cellular basis of odor coding in the *Drosophila* antenna. *Neuron* 37:827–841

## F

**Faucher C**, Forstreuter M, Hilker M and de Bruyne M (2006). Behavioral responses of *Drosophila* to biogenic levels of carbon dioxide depend on life-stage, sex and olfactory context. *J. Exp. Biol*, 209:2739–48

**Feldmesser E**, Olender T, Khen M, Yanai I, Ophir R and Lancet D (2006). Widespread ectopic expression of olfactory receptor genes. *BMC Genomics*. 7:121. doi:10.1186/1471-2164-7-121

**Fletcher B** (1987). The biology of dachne fruit flies. *Annual review of entomology* 32:115-144

**Fishilevich E** and Vosshall LB (2005). Genetic and functional subdivision of the *Drosophila* antennal lobe. *Curr Biol* 15:1548-1553

**Fishilevich E**, Domingos IA, Asahina K, Naef F, Vosshall LB and Louis M (2005b) Chemotaxis Behavior Mediated by Single Larval Olfactory Neurons in *Drosophila*. *Current Biology*, 15:2086–2096

**Franco MI**, Turin L, Mershin A and Skoulakis EM (2011). Molecular vibration-sensing component in *Drosophila melanogaster* olfaction. *Proc Natl Acad Sci USA*. 108(9):3797-802

## G

**Galizia CG** and Sachse S (2010). *Odor Coding in Insects. The Neurobiology of Olfaction*. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis 2 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK55975/>

**Galindo K**, Smith DP (2001). A large family of divergent *Drosophila* odorant-binding proteins expressed in gustatory and olfactory sensilla. *Genetics*. 159(3):1059-72

**Gao Q** and Chess A (1999). Identification of candidate *Drosophila* olfactory receptors from genomic DNA sequence. *Genomics* 60:31-39

**Gardiner A**, Barker D, Butlin RK., Jordan WC and Ritchie MG (2008). *Drosophila* chemoreceptor gene evolution: selection, specialization and genome size. *Mol. Ecol.* 17:1648–1657

**Gomez-Diaz C**, Martin F, and Alcorta E (2006). The Inositol 1,4,5-triphosphate kinase1 gene affects olfactory reception in *Drosophila melanogaster*. *Behav Genet*, 36:309-321



**Gomez-Diaz** C, Reina JH, Cambillau C and Benton R (2013). Ligands for pheromone-sensing neurons are not conformationally activated odorant binding proteins. *PLoS Biol.* 11(4):e1001546

**Gong** Y, Tang H, Bohne C and Plettner E (2010). Binding conformation and kinetics of two pheromone-binding proteins from the Gypsy moth *Lymantria dispar* with biological and nonbiological ligands. *Biochemistry*, 49(4):793-801

**Grimaldi** D and Engel M (2005). *The Insects. Evolution of the Insects* (New York: Cambridge University Press), 119–147

**Gronenberg** W, Raikhelkar A, Abshire E, Stevens J, Epstein E, Loyola K, Rauscher M and Buchmann S (2014). Honeybees (*Apis mellifera*) learn to discriminate the smell of organic compounds from their respective deuterated isotopomers. *Proc Biol Sci.* 281(1778):20133089

## H

**Ha** TS and Smith DP (2006). A pheromone receptor mediates 11-*cis*-vaccenyl acetate-induced responses in *Drosophila*. *J. Neurosci.*, 26(34):8727-8733

**Hallem** EA, Ho MG and Carlson JR (2004a). The molecular basis of odor coding in the *Drosophila* antenna. *Cell* 117:965-979

**Halle** EA and Carlson JR (2006). Coding of odors by a receptor repertoire. *Cell* 125:143-160

**Hansson** BS and Stensmyr MC (2011). Evolution of Insect Olfaction. *Neuron* 72

**Hekmat-Scafe** DS, Scafe CR, McKinney AJ and Tanouye MA (2002). Genome-wide analysis of the odorant-binding protein gene family in *Drosophila melanogaster*. *Genome Res.* 12(9):1357-69

**Hill** CA, Fox AN, Pitts RJ, Kent LB, Tan PL, Chrystal MA, Cravchik A, Collins FH, Robertson HM, and Zwiebel LJ (2002). G protein-coupled receptors in *Anopheles gambiae*. *Science* 298:176-178

## I

**Innocenti** M, La Marca G, Malvagia S, Giaccherini C, Vincieri FF and Mulinacci N (2006). Electrospray ionisation tandem mass spectrometric investigation of phenylpropanoids and secoiridoids from solid olive residue. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 20:2013-2022

## J

**Jayanthi** PDK., Woodcock CM, Caulfield J, Birkett MA and T. J. Bruce (2012). Isolation and identification of host cues from mango, *Mangifera indica*, that attract gravid female oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis*. *Journal of chemical ecology*, 38:361-369

**Jefferis** GS, Potter CJ, Chan AM, Marin EC, Rohlffing T, Maurer Jr CR and Luo L (2007). Comprehensive Maps of *Drosophila* Higher Olfactory Centers: Spatially Segregated Fruit and Pheromone Representation. *Cell*, 128(6):1187-1203

**Jerman** Klen T and Mozetič Vodopivec B (2014). Olive fruit phenols in olive oil processing: the fate and antioxidant potential : dissertation. Nova Gorica: [T. Jerman Klen]

**Johnson** M, Zaretskaya I, Raytselis Y, Merezhuk Y, McGinnis S and Madden TL (2008). NCBI BLAST: a better web interface. *Nucleic Acids Res.* 36 (Web Server issue):W5-9. doi: 10.1093/nar/gkn201

## K

**Keil T** (1999). Morphology and development of the peripheral olfactory organs. In *Insect olfaction* (Springer). 6-47

**Kain P**, Chakraborty TS, Sundaram S, Siddiqi O, Rodrigues V, Hasan G (2008). Reduced odor responses from antennal neurons of Gq $\alpha$ , phospholipase C $\beta$ , and rdgA mutants in *Drosophila* support a role for a phospholipid intermediate in insect olfactory transduction. *J Neurosci.* 28:4745–4755

**Kalidas S** and Smith DP (2002). Novel genomic cDNA hybrids produce effective RNA interference in adult *Drosophila*. *Neuron* 33:177-184

**Katoh K**, Misawa K, Kuma K, Miyata T (2002). MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Res.* 30(14):3059-66

**Katoh K** and Toh H (2008). Recent developments in the MAFFT multiple sequence alignment program. *Brief Bioinform.* 9(4):286-98

**Kaupp UB** (2010). Olfactory signalling in vertebrates and insects: differences and commonalities. *Nat Rev Neurosci.* 11:188-200

**Kreher SA**, Kwon JY and Carlson JR (2005). The Molecular Basis of Odor Coding in the *Drosophila* Larva *Neuron.* 46:445–456

**Krieger J**, Klink O, Mohl C, Raming K and Breer H (2003). A candidate olfactory receptor subtype highly conserved across different insect orders. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol.* 189:519–26

**Krogh A**, Larsson B, von Heijne G, Sonnhammer EL (2001). Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol.* 305(3):567-80

**Kurtovic A**, Widmer A, Dickson BJ (2007). A single class of olfactory neurons mediates behavioural responses to a *Drosophila* sex pheromone. *Nature* 446:542-546

## L

**Larsson MC**, Domingos AI, Jones WD, Chiappe ME, Amrein H, Vosshall LB (2004). *Or83b* encodes a broadly expressed odorant receptor essential for *Drosophila* olfaction. *Neuron* 43:703–14

**Larter NK**, Sun JS, Carlson JR (2016). Organization and function of *Drosophila* odorant binding proteins *eLife.* 5:e20242. doi: 10.7554/eLife.20242

**Laughlin JD**, Ha TS, Jones DNM, Smith DP (2008). Activation of pheromone-sensitive neurons is mediated by conformational activation of pheromone-binding protein. *Cell* 133(7):1255-1265

**Lavista Llanos S**, Svatoš A, Kai M, Riemensperger T, Birman S, Stensmyr MC and Hansson BS (2014). Dopamine drives *Drosophila sechellia* adaptation to its toxic host. *eLife.* 3:e03785. doi: 10.7554/eLife.03785

**Leal WS**, Chen AM, Ishida Y, Chiang VP, Erickson ML, Morgan TI and Tsuruda JM (2005). Kinetics and molecular properties of pheromone binding and release. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102(15):5386-91

**Lee PY**, Costumbrado J, Hsu CY and Kim YH (2012). Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *J Vis Exp.* 62:3923. doi:10.3791/3923

**Li Z**, Ni JD, Huang J and Montell C (2014). Requirement for *Drosophila* SNMP1 for rapid activation and termination of pheromone-induced activity. *PLoS Genet.* 10(9):e1004600

**Liscia A**, Angioni P, Sacchetti P, Poddighe S, Granchietti A, Setzu MD and Belcari A (2013). Characterization of olfactory sensilla of the olive fly: behavioral and electrophysiological responses to volatile organic compounds from the host plant and bacterial filtrate. *J. Insect. Physiol.* 50:705–71

**Liu JL**, Chen XY and Zeng XN (2015). Classical Olfactory Conditioning in the Oriental Fruit Fly, *Bactrocera dorsalis*. *Plos One.* 10:e0122155

**Livak K.J** and **Schmittgen TD** (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods.* 25(4):402-408

**Lo Scalzo R**, Scarpati ML, Verzegnassi B and Vita G (1994). *Olea europaea* chemicals repellent to *dacus oleae* females. *Journal of Chemical Ecology.* 20(8)

## M

**Malheiro R**, Casal S, Baptista P and Pereira JA (2015). Physico-chemical characteristics of olive leaves and fruits and their relation with *Bactrocera oleae* (Rossi) cultivar oviposition preference. *Scientia Horticulturae.* 194:208–214

**Malheiro R**, Casal S, Cunha SC, Baptista P and Pereira JA (2016). Identification of leaf volatiles from olive (*Olea europaea*) and their possible role in the ovipositional preferences of olive fly, *Bactrocera oleae* (Rossi) (Diptera: Tephritidae). *Phytochemistry* 121:11–19

**Mathew D**, Martelli C, Kelley-Swift E, Brusalis C, Gershow M, Samuel AD, Emonet T and Carlson JR (2013). Functional diversity among sensory receptors in a *Drosophila* olfactory circuit. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110(23):2134-43

**Mayer ML** (2006). Glutamate receptors at atomic resolution. *Nature* 440:456-462

**Mazzini M** and **Vita G** (1981). Identificazione submicroscopica del meccanismo di trasmissione del batterio simbionte in *Dacus oleae* (Gmel.) (Diptera, Trypetidae). *Redia* 64:277-301

**Miller R** and **Tu Z** (2008). Odorant receptor c-terminal motifs in divergent insect species. *Journal of insect science* 8:53

**Mullis KB**, Faloona FA, Scharf SJ, Saiki RK, Horn GT and Erlich H (1992). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Biotechnology Series*, 17-17

## N

**Nakagawa T** and **Vosshall LB** (2009). Controversy and consensus: noncanonical signaling mechanisms in the insect olfactory system. *Curr. Opin. Neurobiol.* 19:284-292

**Kang N** and **Koo JH** (2012). Olfactory receptors in non-chemosensory tissues. *BMB Rep.* 45(11):612–622. doi: [10.5483/BMBRep.2012.45.11.232]

**Nei M**, Niimura Y and Nozawa M (2008). The evolution of animal chemosensory receptor gene repertoires: roles of chance and necessity. *Nat Rev Genet.* 9:951-963

**Noce ME**, Perri E, Scalercio S and Iannotta N (2014). Phenolic compounds and susceptibility of olive cultivars to *Bactrocera oleae* (Diptera:Tephritidae) infestations and complementary aspects. *ActaHortic.*1057

## O

**Obied HK**, Bedgood Jr DR, Prenzier PD and Robards K (2007a). Chemical screening of olive biophenol extracts by hyphenated liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta* 603:176-189

## P

**Pagadala** Damodaram KJ, Kempraj V, Aurade RM, Venkataramanappa RK, Nandagopal B, Verghese A et al. (2014). Oviposition site-selection by *Bactrocera dorsalis* is mediated through an innate recognition template tuned to  $\gamma$ -octalactone. *PLoS One*. 9:e85764. pmid:24465690

**Papanicolaou** A et al. (2016). The whole genome sequence of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Wiedemann), reveals insights into the biology and adaptive evolution of a highly invasive pest species. *Genome Biology* 17:192 DOI 10.1186/s13059-016-1049-2

**Pikielny** CW, Hasan G, Rouyer F and Rosbash M (1994). Members of a family of *Drosophila* putative odorant-binding proteins are expressed in different subsets of olfactory hairs. *Neuron*. 12(1):35-49

**Piñero** J, Aluja M, Vázquez A, Equihua M and Varón J (2003). Human urine and chicken feces as fruit fly (Diptera: Tephritidae) attractants for resource poor fruit growers. *Journal of economic entomology* 96: 334-340

**Prokopy** RJ, Green TA and Wong TT (1989). Learning to find fruit in *Ceratitis capitata* flies. *Entomologia experimentalis et applicata* 53:65-72

## R

**Raming** K, Krieger J and Breer H (1990). Primary structure of a pheromone-binding protein from *Antheraea pernyi*: Homologies with other ligand-carrying proteins. *J. Comp. Physiol.* 160:503-509

**Ray** A, van Naters WG and Carlson JR (2014). Molecular determinants of odorant receptor function in insects. *J. Biosci.* 39:555–563

**Riachy** ME, Priego-Capote F, León L, Rallo L and Luque de Castro MD (2011a). Hydrophilic antioxidants of virgin olive oil. Part 1: Hydrophilic phenols: A key factor for virgin olive oil quality. *European Journal of Lipid Science and Technology* 113:678-691

**Rice** R (2000). Bionomics of the olive fruit fly, *Bactrocera (Dacus) oleae*. University of California Plant Protection Quarterly 10:1-5

**Robacker** D, Lauzon C, Patt J, Margara F and Sacchetti P (2009). Attraction of Mexican fruit flies (Diptera: Tephritidae) to bacteria: effects of culturing medium on odour volatiles. *Journal of Applied Entomology* 133:155-163

**Robertson** HM, Warr CG and Carlson JR (2003). Molecular evolution of the insect chemoreceptor gene superfamily in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100 Suppl 2:14537-14542

**Rodríguez-Trelles** F, Tarrío R and Ayala FJ (2005). Is ectopic expression caused by deregulatory mutations or due to gene-regulation leaks with evolutionary potential?. *Bioessays*. 27(6):592-601

**Ryan** D and **Robards** K (1998). Critical Review: Phenolic compounds in olives. *The Analyst* 123:31-44

## S

**Sacchetti** P, Landini S, Granchietti A, Camera A, Rosi MC and Belcari A (2007). Attractiveness to the olive fly of *Pseudomonas putida* isolated from the foregut of *Bactrocera oleae*. *IOBC/WPRS Bulletin* 30:37–42

**Sacchetti** P, Granchietti A, Landini S, Vitti C, Giovannetti L and Belcari A (2008). Relationships between the olive fly and bacteria. *J. Appl. Entomol.* 132:682–689

- Sagri E**, Koskinioti P, Gregoriou ME, Tsoumani K, Bassiakos YC and Mathiopoulos KD (2017). Housekeeping in Tephritid insects: the best gene choice for expression analyses in the medfly and the olive fly. *Scientific Reports*. 7:45634. DOI: 10.1038/srep45634
- Sargsyan V**, Getahun MN, Llanos SL, Olsson SB, Hansson BS and Wicher D (2011). Phosphorylation via PKC regulates the function of the *Drosophila* odorant coreceptor. *Front. Cell. Neurosci.* 5:1-8
- Sato K.**, Pellegrino M, Nakagawa T, Nakagawa T, Vosshall LB and Touhara K. (2008). Insect olfactory receptors are heteromeric ligand-gated ion channels. *Nature* 452:1002-1006
- Scarpati ML**, Lo Scalzo R and Vita G (1993). Olea europaea volatiles attractive and repellent to the olive fruit fly (*Dacus oleae*, Gmelin) *Journal of Chemical Ecology*. 19(4)
- Schultze A**, Pregitzer P, Walter MF, Woods DF, Marinotti O, Breer H and Krieger J (2013). The co-expression pattern of odorant binding proteins and olfactory receptors identify distinct trichoid sensilla on the antenna of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *PLoS One*. 8(7):e69412
- Scott JG**, Warren WC, Beukeboom LW, Bopp D, Clark AG, Giers SD, Hediger M, Jones AK, Kasai S, Leichter CA, et al. (2014). Genome of the house fly, *Musca domestica L.*, a global vector of diseases with adaptations to a septic environment. *Genome Biol.* 15:466
- Servili M**, Selvaggini R, Esposito S, Taticchi A, Montedoro G and Morozzi G (2004). Health and sensory properties of virgin olive oil hydrophilic phenols: agronomic and technological aspects of production that affect their occurrence in oil. *Journal of Chromatography A* 1054:113-127
- Shanbhag SR**, Hekmat-Safe D, Kim MS, Park SK, Carlson JR, Pikielny C, Smith DP and Steinbrecht RA (2001). Expression mosaic of odorant-binding proteins in *Drosophila* olfactory organs. *Microsc Res Tech.* 55(5):297-306
- Siderhurst MS** and **Jang EB** (2006). Female-biased attraction of Oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel), to a blend of host fruit volatiles from *Terminalia catappa L.* *Journal of chemical ecology* 32:2513-2524
- Smart R**, Kiely A, Beale M, Vargas E, Carraher C, Kralicek AV, Christie DL, Chen C, Newcomb RD and Warr CG (2008). *Drosophila* odorant receptors are novel seven transmembrane domain proteins that can signal independently of heterotrimeric G proteins. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 38:770-780
- Soler-Rivas C**, Espin JC and Wichers HJ (2000). Oleuropein and related compounds. *Sci Food Agric* 80:1013-1023
- Spehr M**, Gisselmann G, Poplawski A, Riffell JA, Wetzel CH, Zimmer RK and Hatt H (2003). Identification of a testicular odorant receptor mediating human sperm chemotaxis. *Science*. 299(5615):2054-8
- Stensmyr MC**, Dekker T and Hansson BS (2003b). Evolution of the olfactory code in the *Drosophila melanogaster* subgroup. *Proc. Biol. Sci.* 270:2333–2340
- Stephenson FH** (2016). *Calculations for Molecular Biology and Biotechnology (Third Edition)*
- Stocker RF** (2001). *Drosophila* as a focus in olfactory research: mapping of olfactory sensilla by fine structure, odor specificity, odorant receptor expression, and central connectivity. *Microsc Res Tech* 55:284-296
- Stokl J**, Strutz A, Dafni A, Svatos A, Doubsky J, Knaden M, Sachse S, Hansson BS and Stensmyr, MC (2010). A deceptive pollination system targeting drosophilids through olfactory mimicry of yeast. *Curr. Biol.* 20:1846–1852
- Strausfeld NJ** and **Hildebrand JG** (1999). Olfactory systems: Common design, uncommon origins? *Curr Opin Neurobiol.* 9:634–39
- Suh GS**, Wong AM, Hergarden AC, Wang JW, Simon AF, et al. (2004). A single population of olfactory sensory neurons mediates an innate avoidance behavior in *Drosophila*. *Nature* 431:854–59

**Sun M**, Liu Y, Walker WB, Liu C, Lin K, Gu S, Zhang Y, Zhou J and Wang G (2013). Identification and characterization of pheromone receptors and interplay between receptors and pheromone binding proteins in the diamondback moth, *Plutella xylostella*. PLoS One. 8(4):e62098. doi: 10.1371/journal.pone.0062098

**Syed Z** and **Leal WS** (2009). Acute olfactory response of *Culex* mosquitoes to a human- and bird-derived attractant. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 106:18803–18808

**Syed HO** (2010). Oleuropein in Olive and its Pharmacological Effects. Sci Pharm. 78(2):133–154

## T

**Tamura K**, Stecher G, Peterson D, Filipski A and Kumar S (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. Molecular biology and evolution. 30(12):2725-9

**Thein SL** and **Wallace RB** (1986). The use of synthetic oligonucleotides as specific hybridization probes in the diagnosis of genetic disorders. Human genetic diseases: A practical approach, 33-50

**Tsolakis H**, Ragusa E and Tarantino P (2011). Control of *Bactrocera oleae* by low environmental impact methods: NPC methodology to evaluate the efficacy of lure-and-kill method and copper hydroxide treatments. Bulletin of Insectology 64(1):1-8

**Turin L** (1996). A spectroscopic mechanism for primary olfactory reception. Chem Senses 21:773–791

**Turin L** (2002). A method for the calculation of odor character from molecular structure. J Theor Biol 216:367–385

## V

**Van der Goes van Naters W** and Carlson JR (2007). Receptors and neurons for fly odors in *Drosophila*. Curr Biol 17:606-612

**Võ UU T** and Morris MP (2014). Nonvolatile, semivolatile, or volatile: Redefining volatile for volatile organic compounds. Journal of the Air & Waste Management Association. 64(6):661-669

**Vita G** and Barbera F (1976). Aspetti biochimici del rapporto pianta-insetto nel *Dacus oleae* (Gmel.). Atti Congr. Ital. Entomol. 11:151-161

**Vosshall LB**, Amrein H, Morozov PS, Rzhetsky A, and Axel R (1999). A spatial map of olfactory receptor expression in the *Drosophila* antenna. Cell 96:725-736

**Vosshall LB**, Wong AM and Axel R (2000). An olfactory sensory map in the fly brain. Cell 102:147–59

**Vosshall LB** (2003). Diversity and expression of odorant receptors in *Drosophila*. Insect Pheromone Biochemistry and Molecular Biology, G. Blomquist, and R. Vogt, eds. (Elsevier Academic Press)

**Vosshall LB** and **Stockert RF** (2007). Molecular architecture of smell and taste in *Drosophila*. Annu Rev Neurosci. 30:505-533

## W

**Wang R**, Li F, Zhang W, Zhang X, Qu C, Tetreau G et al. (2017). Identification and expression profile analysis of odorant binding protein and chemosensory protein genes in *Bemisia tabaci* MED by head transcriptome. PLoS ONE 12(2): e0171739. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171739>

**Wetzel CH**, Behrendt HJ, Gisselmann G, Störtkuhl KF, Hovemann B, Hatt H (2001). Functional expression and characterization of a *Drosophila* odorant receptor in a heterologous cell system. Proc Natl Acad Sci U S A. 98(16):9377-80

**Wicher D**, Schafer R, Bauernfeind R, Stensmyr MC, Heller R, Heinemann SH and Hansson BS (2008). *Drosophila* odorant receptors are both ligand-gated and cyclic-nucleotide-activated cation channels. *Nature* 452:1007e1011

**Wu Z**, Zhang H, Wang Z, Bin S, He H, Lin J (2015). Discovery of Chemosensory Genes in the Oriental Fruit Fly, *Bactrocera dorsalis*. *PLoS One*. 10(6):e0129794. doi:10.1371/journal.pone.0129794

## **X**

**Xu P**, Atkinson R, Jones DN, Smith DP (2005). *Drosophila* OBP LUSH is required for activity of pheromone-sensitive neurons. *Neuron*. 45(2):193-200

## **Y**

**Yao CA**, Ignell R and Carlson JR (2005). Chemosensory coding by neurons in the coeloconic sensilla of the *Drosophila* antenna. *J Neurosci* 25:8359-8367

**Yao CA** and **Carlson JR** (2010). Role of G-proteins in odor-sensing and CO<sub>2</sub>-sensing neurons in *Drosophila*. *J. Neurosci.* 30:4562-4572

**Yibing J** (2012). Real-Time PCR. *Methods in cell biology* 112:55-68 DOI: 10.1016/B978-0-12-405914-6.00003-2

## **Z**

**Zhou JJ** (2010). Odorant-Binding Proteins in Insects. *Vitamins & Hormones* 83:241-272