ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΚΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας

ΠΜΣ «Βιοτεχνολογία & Εφαρμογές στη Γεωπονία»

«ΚΑΣ/ΝΣΗ: Μοριακή Οικολογία και Ανίχνευση Γενετικά Τροποποιημένων Οργανισμών»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Επίδραση του ξενοοιστρογόνου BPA στην ανάπτυξη των εντόμων

Μιχαήλ Ξένια

ΑΘΗΝΑ
2013

Επιβλέπουσα καθηγήτρια: Κούρτη Άννα

Η ανάθεση της παρούσας πτυχιακής μελέτης έγινε με απόφαση της Γενικής Συνέλευσης του Τομέα Βιοχημείας, Ενζυμικής Τεχνολογίας, Μικροβιολογίας και Μοριακής Βιολογίας (ΓΣΕΣ Συνεδρία 15η 27-06-2012) κατά την οποία εγκρίθηκαν το θέμα " Επίδραση του ξενοοιστρογόνου BPA στην ανάπτυξη των εντόμων" και η τριμελής Συμβουλευτική και Εξεταστική Επιτροπή της μελέτης.

Συμβουλευτική και Εξεταστική Επιτροπή

1. Επ. Καθηγήτρια Κούρτη Ιωάννα Επιβλέπουσα
2. Καθηγητής Χατζόπουλος Πολυδεύκης Μέλος
3. Επ. Καθηγήτρια Μηλιώνη Δήμητρα Μέλος

Η παρούσα πτυχιακή μελέτη πραγματοποιήθηκε στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας υπό την άμεση επίβλεψη της Επίκουρης καθηγήτριας κ. Κούρτη Άννας στα πλαίσια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών «Βιοτεχνολογία & εφαρμογές στη γεωργία», με κατεύθυνση «Μοριακή Οικολογία και Ανίχνευση Γενετικά Τροποποιημένων Οργανισμών» .

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την Επίκουρη καθηγήτρια κ. Κούρτη Άννα για το συνεχές ενδιαφέρον της, την καθοδήγηση και τις πολύτιμες συμβουλές της καθ' όλη την πορεία του πειραματικού μέρους της εργασίας. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαιτέρως τον υποψήφιο διδάκτορα Κοντογιαννάτο Δημήτρη για τη συνεργασία, την υπομονή, την καθοδήγηση, τις συμβουλές και τις παρατηρήσεις του.

Τέλος, ευχαριστώ θερμά τα μέλη του εργαστηρίου της Μοριακής Βιολογίας και τα μέλη της εξεταστικής μου επιτροπής, κ Π. Χατζόπουλο και την κ. Δ. Μηλιώνη για τις εξαιρετικές συνθήκες εργασίας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ABSTRACT

Endocrine disruptors (EDs) are a structurally diverse group of compounds that may adversely affect the health of humans and wildlife by interaction with the endocrine system. The monomer bisphenol A (BPA) is one of the most common chemicals that behave as endocrine disruptors. In vertebrates and invertebrates, BPA causes estrogen-like developmental effects. However, there is still little detailed information about the molecular action of BPA in invertebrates.

In this work we examine the endocrine disrupting effects of BPA on insects and *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae) was selected to evaluate this. *S. nonagrioides* larvae were continuously exposed until last (6^{th}) instar, to selected concentrations of BPA applied in their food layer. Additionally, 6^{th} instar non-diapausing larvae were injected to several concentrations of BPA. Semi-quantitative RT-PCR and Real Time PCR was used to identify the effects of BPA at the transcriptional level of five heat shock protein and two hormone- nuclear receptor genes that we have isolated and characterized previously from *S. nonagrioides*. These genes were the *SnoHsp70*, *SnoHsc70, SnoHsp83*, *SnoHsp19.5*, *SnoHsp20.8*, *SnoEcR* and *SnoUSP genes*. Application of BPA via the oral route or via intra-haemocoel injection induced the synthesis of the *SnoHsp19.5* and *SnoHsp20.8* mRNAs. In contrast, *SnoHsc70* as well as *SnoHsp83,* which play a pivotal role in vertebrate sex steroid signal transduction, were significantly elevated by BPA. A significant induction was also noticed in the expression levels of *SnoEcR, and SnoUSP* as well.

Application of BPA via the oral route, also affected the developmental progression of the insect *S. nonagrioides*. Different concentrations of BPA seemed to affect the endocrine system of the insects through the molting process. In the present study, we evaluated the survival rate, head capsule length and weight gain in order to monitor BPA’s effect in development. Abnormal phenotypes were observed in all developmental stages determining the crucial effect of BPA in insects’ endocrine and reproductive system. Sex ratio, testis size and ovaries size were also affected by different concentrations of BPA. In order to access the effect of BPA in long term, two generations of insects were treated in different concentrations of BPA. Our results demonstrate that BPA behaves as an ecdysone-mimic in the moth *S. nonagrioides*.

Περίληψη

Οι ενδοκρινικοί διαταράκτες επηρεάζουν βασικές λειτουργίες του ενδοκρινολογικού συστήματος των διάφορων οργανισμών. Σε βιοχημικό επίπεδο μιμούνται τις φυσικά παραγόμενες ορμόνες του οργανισμού, επηρεάζοντας όλες τις λειτουργίες και τα βιολογικά μονοπάτια που εμπλέκονται οι φυσιολογικά παραγόμενες ορμόνες. Το μονομερές δισφαινόλη Α (BPA) είναι μία από τις πιο κοινές χημικές ουσίες που συμπεριφέρονται ως ενδοκρινικοί διαταράκτες, αλληλεπιδρώντας με ορμονικούς υποδοχείς. Στα σπονδυλωτά και ασπόνδυλα, BPA μιμείται την δράση των οιστρογόνων επιφέροντας σημαντικές επιπτώσεις στην ανάπτυξη των οργανισμών. Παρ’ όλες τις μέχρι τώρα έρευνες, δεν έχει εξακριβωθεί ακόμα ο ακριβής μοριακός μηχανισμός δράσης της δισφαινόλης στα ασπόνδυλα.

Για την μελέτη της επίδραση της δισφαινόλης στο ενδοκρινικό σύστημα των εντόμων επιλέχθηκε το έντομο *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae). Προνύμφες του εντόμου *S. nonagrioides* εκτέθηκαν μέχρι το τελευταίο προνυμφικό στάδιο (6ο instar), σε επιλεγμένες συγκεντρώσεις BPA μέσω της τεχνητής τους τροφής. Επιπλέον, προνύμφες του $6^{ου}$ προνυμφικού σταδίου ενέθηκαν σε διάφορες συγκεντρώσεις BPA. Τα αποτελέσματα των μεταγραφικών επιπέδων των γονιδίων των θερμοεπαγώμενων πρωτεϊνών (HSP) και των δύο γονιδίων του υποδοχέα της έκδυσης αναλύθηκαν με την μέθοδο της ημι-ποσοτικής RT-PCR και της Real Time PCR. Τα γονίδια *SnoHsp70, SnoHsc70, SnoHsp83, SnoHsp19.5, SnoHsp20.8, SnoEcR* και *SnoUSP* έχουν απομονωθεί και μελετηθεί στο έντομο *S. nonagrioides* σε προηγούμενες μελέτες. Οι συγκεντρώσεις δισφαινόλης μέσω της τεχνητή τροφή των εντόμων, αλλά και οι ενέσιμες συγκεντρώσεις, είχαν ως αποτέλεσμα την μείωση των μεταγραφικών επιπέδων των *SnoHsp19.5* και *SnoHsp20.8* mRNAs. Αντίθετα, τα μεταγραφικά επίπεδα των *SnoHsc70* και *SnoHsp83* αυξήθηκαν στατιστικά σημαντικά από την δράση της BPA. Σημαντική αύξηση παρουσίασαν επίσης τα επίπεδα έκφρασης των *SnoEcR* και *SnoUSP* γονιδίων.

Η δισφαινόλη φάνηκε να επηρεάζει και το ενδοκρινικό σύστημα των εντόμων επηρεάζοντας την διαδικασία της έκδυσης. Στην παρούσα μελέτη, αξιολογήσαμε το ποσοστό επιβίωσης, το μήκος της κεφαλής και την αύξηση του σωματικού βάρους, προκειμένου να παρακολουθήσουμε την επίδρασης της BPA στην ανάπτυξη των εντόμων. Σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια παρατηρήθηκαν μη φυσιολογικοί φαινότυποι, υποδεικνύοντας την άμεση επίδραση της δισφαινόλης στο ενδοκρινικό και αναπαραγωγικό σύστημα των εντόμων. Η αναλογία φύλου, το μέγεθος των όρχεων και των ωοθηκών επηρεάστηκαν επίσης από τις

διαφορετικές συγκεντρώσεις της δισφαινόλης. Για να μελετηθεί η μακροπρόθεσμη επίδραση της δισφαινόλης, δύο γενιές των εντόμων εκτέθηκαν σε διαφορετικές συγκεντρώσεις δισφαινόλης και καταγράφηκαν οι μορφολογικές επιπτώσεις της σε όλα τα αναπτυξιακά επίπεδα των εντόμων. Τα αποτελέσματά μας υποδεικνύουν ότι η BPA έχει εκδυστεροειδική δράση στο έντομο *S. nonagrioides*.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Η Ανάπτυξη των εντόμων

1.1.1 Δομή του ωοκυττάρου

Το στάδιο του αυγού αρχίζει αμέσως μετά την ωοαπόθεση. Για πρακτικούς λόγους, η ηλικία ενός αυγού υπολογίζεται από την στιγμή της απόθεσής του, ακόμα και αν προϋπήρχε στο σώμα του θηλυκού.

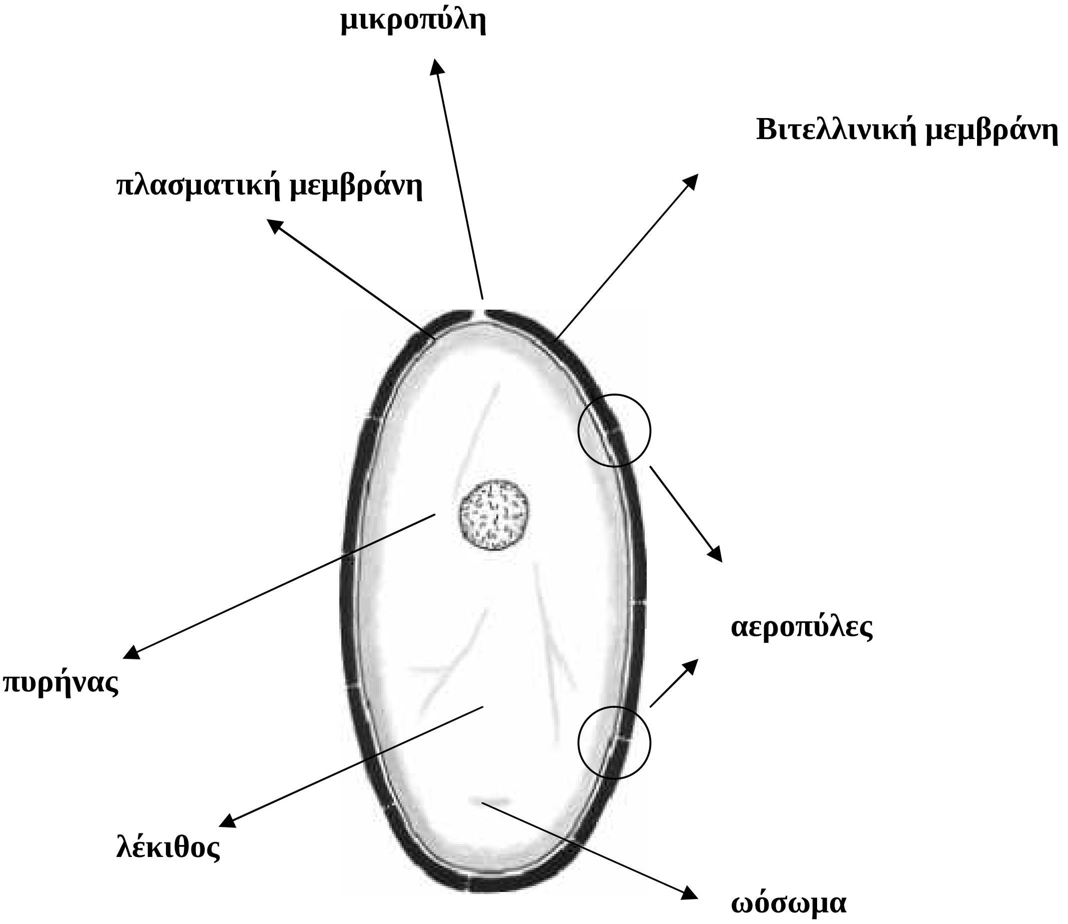
Στα έντομα, η ωογένεση ρυθμίζεται από την ορμόνη νεότητας (JH), που την προωθεί είτε διεγείροντας τη διαφοροποίηση του ωοκυττάρου, είτε προωθώντας τη σύνθεση της λεκιθογενίνης από το λιπαρό σωμάτιο. Το ωοκύτταρο διαθέτει όλα τα τυπικά κυτταρικά οργανίδια και ταυτόχρονα είναι το μοναδικά κύτταρο, που έχει τη δυνατότητα να δώσει γένεση σε κάθε διαφορετικό κυτταρικό τύπο που αποτελεί τον οργανισμό. Το ωάριο περιβάλλεται από διάφορα προστατευτικά στρώματα και περιέχει ένα στρώμα από φλοϊκά κοκκία κάτω από την πλασματική μεμβράνη. Τα ωάρια μερικών ζώων, όπως των εντόμων και των ψαριών, έχουν μικρές οπές στα κελύφη τους, τις μικροπύλες, για την είσοδο του σπερματοζωαρίου. Σημαντική είναι η βιτελλινική μεμβράνη, ένα στρώμα από γλυκοπρωτεΐνες που περικλείουν το ωάριο. Κάτω από τη βιτελλινική μεμβράνη βρίσκεται η πλασματική μεμβράνη

Το μεγαλύτερο μέρος του εσωτερικού του αβγού καταλαμβάνει η λέκιθός του. Η λέκιθος (ή κρόκος) αποτελεί μορφή αποθήκευσης τροφής στο ωοκύτταρο και το ποσό της κυμαίνεται. Σε αυγά που αναπτύσσονται έξω από το μητρικό σώμα, η εξάρτηση του εμβρύου από τη λέκιθο είναι ζωτικής σημασίας και μπορεί να αποτελεί και το 95% το όγκου του αυγού.

Συνήθως τα συστατικά του ωοκυττάρου είναι άνισα κατανεμημένα και προσδίδουν πολικότητα, δηλαδή χαρακτηριστική διευθέτηση στο χώρο των διαφόρων εγκλείστων του αυγού. Η πολικότητα είναι από τα πιο εντυπωσιακά γνωρίσματα της μορφολογίας των ωοκυττάρων και αποτελεί σημαντικό παράγοντα στην ανάπτυξη του αυγού. Ορίζει έναν άξονα στο αυγό, ο οποίος είναι μια νοητή γραμμή που συνδέει τους δύο πόλους, το ζωικό με το φυτικό. Ως ζωικός ορίζεται ο πόλος προς τον οποίο είναι μετατοπισμένος ο πυρήνας του ωοκυττάρου. Ο φυτικός πόλος βρίσκεται στο αντίθετο άκρο και σ' αυτόν συσσωρεύεται η λέκιθος. Έτσι το φυτικό ημισφαίριο μπορεί να είναι πλούσιο σε λέκιθο και σχετικά φτωχό σε κυτταρόπλασμα, ενώ το ζωικό ημισφαίριο μπορεί να υστερεί σε λέκιθο και να είναι πλουσιότερο σε κυτταρόπλασμα.

Ο πυρήνας στα αρχικά στάδια της ωογένεσης κατέχει κεντρική θέση στο ωοκύτταρο. Καθώς η διάμετρος του κυττάρου αυξάνει, ο πυρήνας μετακινείται στο ζωικό πόλο. Ο ευμεγέθης πυρήνας καλείται βλαστικό κυστίδιο και συχνά περιέχει πολλούς μικρούς πυρηνίσκους.

Τα ωοκύτταρα διαθέτουν μηχανισμούς που συμβάλλουν στην αύξηση του μεγέθους τους. Αυτό το σύστημα υποστήριξης είναι τα βοηθητικά κύτταρα που αναπτύσσονται ταυτόχρονα με το ωοκύτταρο, διατηρούν στενή σχέση μ' αυτό και έχουν προέλευση σωματική ή βλαστική. Ο ρόλος τους είναι η μεταφορά κυτταροπλάσματος στο ωοκύτταρο και η παραγωγή στεροειδών ορμονών. Διακρίνονται σε θυλακιακά και διατροφικά. Τα πρώτα κατάγονται από σωματικά κύτταρα και τα δεύτερα από τη βλαστική κυτταρική γραμμή.



Εικόνα 1. Σχηματική αναπαράσταση ωοκυττάρου.

1.1.2 Εμβρυογένεση

Το εμβρυϊκό στάδιο ξεκινά όταν ενεργοποιείται βιοχημικά η εμβρυική ανάπτυξη. Η ενεργοποίηση αυτή επακολουθεί της γονιμοποίησης στα σεξουαλικώς αναπαραγώμενα έντομα, ενώ στα παρθενογενετικώς αναπαραγώμενα είδη φαίνεται πως ελέγχεται από διάφορα ερεθίσματα, όπως είναι η ωοαπόθεση, η εισαγωγή οξυγόνου στο αυγό ή η μηχανική παραμόρφωση.

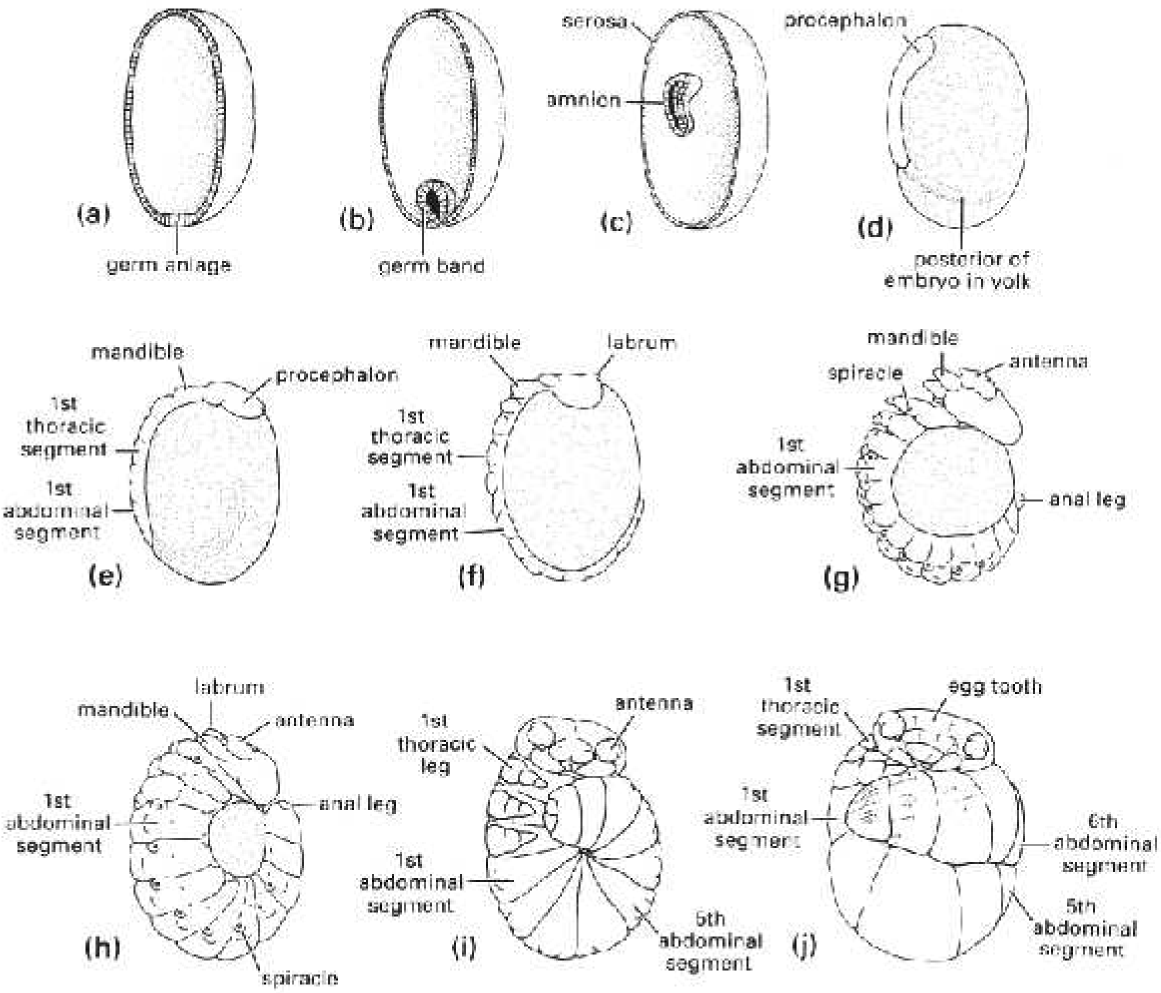
Μετά από την ενεργοποίηση του αυγού, ο πυρήνας του ζυγωτού υποδιαιρείται μέσω μιτωτικών διαιρέσεων, παράγοντας τους θυγατρικούς πυρήνες, δημιουργώντας έτσι το συγκύτιο. Αυτοί οι πυρήνες και το περιβάλλον κυτταρόπλασμά τους, που αποκαλούνται ενεργίδες (cleavage energids), μεταναστεύουν στην περιφέρεια του αυγού, όπου η μεμβράνη του κυτοπλάσματος του συγκυτίου αναδιπλώνεται, οδηγώντας στην κυτταροποίηση του επιφανειακού στρώματος, διαμορφώνοντας έτσι το μονοκυτταρικό βλαστόδερμα. Η διακριτή επιφανειακή εγκόλπωση κατά την διάρκεια της προ-εμβρυογένεσης, είναι αποτέλεσμα συσσώρευσης μεγάλης ποσότητας λεκίθου στο αυγό (Gullan & Cranston, 2005).

Το βλαστόδερμα, αποτελεί την βάση για τη δημιουργία όλων των κυττάρων του λαρβικού σώματος, ενώ το κεντρικό μέρος της λεκίθου του αυγού παρέχει τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά για το αναπτυσσόμενο έμβρυο, τα οποία στην συνέχεια θα καταναλώνονται συνεχώς, μέχρι τη στιγμή της εκκόλαψης (eclosion).

Η περιφερειακή διαφοροποίηση του βλαστοδέρματος οδηγεί στην δημιουργία του γεννητικού δίσκου (germ anlage ή germ disc). Ο γεννητικός δίσκος αποτελεί το πρώτο σημάδι ανάπτυξης του αναπτυσσόμενου εμβρύου, ενώ το υπόλοιπο τμήμα του βλαστοδέρματος, μετατρέπεται σε μια λεπτή μεμβράνη, γνωστή ως serosa ή αλλιώς ως εμβρυικό κάλυμα. Στη συνέχεια, ο γεννητικός δίσκος αναπτύσσεται με μία διαδικασία που ονομάζεται γαστριδίωση και μεταναστεύει στην λέκιθο του αυγού, σχηματίζοντας έτσι ένα έμβρυο δύο στρώσεων, στο οποίο εντοπίζεται η αμνιακή κοιλότητα (Gullan & Cranston, 2005).

Μετά από τη γαστριδίωση, ο γεννητικός δίσκος μετατρέπεται στην γεννητική ζώνη, η οποία εξωτερικά χαρακτηρίζεται από την μεταμερική οργάνωση, που ξεκινά από τον σχηματισμό του πρωτοκεφάλου. Η γεννητική ζώνη, διαμορφώνει τα ραχιαία τμήματα του μελλοντικού σώματος και επομένως διαφοροποιείται σταδιακά στο κεφάλι, στα μεταμερή και στα προσαρτήματα. Αργότερα, κοντά στο τέλος της εμβρυογέννεσης, τα ακραία τμήματα της γεννητικής ζώνης αυξάνονται καθ’ όλη την λεκιθική μοίρα και συννενώνονται μέσωανωπλευρικά, για να σχηματίσουν τα πλευρικά και ραχιαία μέρη του εντόμου, μια διαδικασία που αποκαλείται ραχιαία περάτωση (dorsal closure) (Gullan & Cranston, 2005).

Η λειτουργική εξειδίκευση των κυττάρων και των ιστών εμφανίζεται κατά τη διάρκεια της τελευταίας περιόδου της εμβρυικής ανάπτυξης, έτσι ώστε μέχρι την στιγμή της εκκόλαψης το έμβρυο να έχει διαμορφωθεί σε ένα μικροσκοπικό πρώτο-έντομο, το οποίο καταλαμβάνει όλο τον χώρο του αυγού. Στα αμετάβολα και ημιμετάβολα έντομα, αυτό το στάδιο χαρακτηρίζεται και προνυμφικό (Gullan & Cranston, 2005).



Εικόνα 2. Η εμβρυϊκή ανάπτυξη του *Panorpodes paradoxa.*(a-c) Σχηματική αναπαράσταση του αυγού, όταν έχει αφαιρεθεί η λέκιθος, προκειμένου να προσδιοριστεί η θέση του εμβρύου. (d-j) Ηλικία από την ωοαπόθεση: (a): 32h; (b): 2 ημέρες; (c): 7 ημέρες; (d): 12 ημέρες; (e): 16 ημέρες; (f): 19 ημέρες; (g): 23 ημέρες; (h): 25 ημέρες; (i): 25-26 ημέρες; (j): πλήρης ανάπτυξη την 32η ημέρα.

1.1.3 Μορφογένεση

Όταν το έντομο εκκολαφθεί και πραγματοποιηθεί η έξοδος από το αυγό, περνά ένα πλήθος μεταβολικών διεργασιών που περιλαμβάνουν την ανάπτυξη, την έκδυση και την ωρίμανση, τα στάδια αυτά περιλαμβάνονται στη φάση της μορφογένεσης. Η μορφογένεση χωρίζεται σε δύο στάδια: τις διαδοχικές εκδύσεις και τη μεταμόρφωση.

Εικόνα 3. Στάδια εκδύσεων κατά την διάρκεια της προνυμφικής ζωής των εντόμων.

Η ανάπτυξη του ανώριμου εντόμου χαρακτηρίζεται από επαναλαμβανόμενες εκδύσεις, οι οποίες διακόπτονται από περιόδους σίτισης (Εικόνα 3). Τα ημιμετάβολα έντομα υποβάλλονται γενικά σε περισσότερες εκδύσεις μέχρι την ενηλικίωση, σε σχέση με τα ολομετάβολα έντομα. Η διαδικασία της έκδυσης καθορίζεται από την δράση ορμονών που ενεργοποιούν τα επιδερμικά κύτταρα και σχηματίζουν νέο εξωσκελετό, ενώ ο παλιός αποβάλλεται με τη διαδικασία της απόλυσης (apolysis).

Η απόλυση είναι δύσκολο να προσδιορισθεί στα περισσότερα έντομα, αλλά η γνώση του χρονικού διαστήματος όπου λαμβάνει χώρα, αποτελεί σημαντικό γεγονός και αυτό διότι πολλά έντομα περνούν μια σημαντική περίοδο στην επιδερμίδα του προηγούμενου προνυμφικού σταδίου, αναμένοντας τις ευνοϊκές συνθήκες για την μετάβαση στο επόμενο προνυμφικό στάδιο. Τα έντομα συχνά επιζούν των δυσμενών συνθηκών, ώς διαπαύουσες νύμφες ή διαπαύοντα ενήλικα, αφού το διπλό στρώμα της επιδερμίδας του πουπαρίου, στην πρώτη περίπτωση, περιορίζει την απώλεια νερού κατά τη διάρκεια της αναπτυξιακής περιόδου.

Οι αλλαγές στη μορφή του σώματος, επέρχονται από τη διαφορική αύξηση των μελών του. Τα όργανα που θα λειτουργήσουν στο ενήλικο άτομο, αλλά δεν είχαν αναπτυχθεί στην προνύμφη, αυξάνονται με γρηγορότερους ρυθμούς. Η επιταχυνόμενη αύξηση των φτερών είναι το προφανέστερο παράδειγμα, αλλά τα πόδια, τα γεννητικά όργανα, οι γονάδες και άλλα εσωτερικά όργανα, μπορούν να αυξηθούν στο μέγεθος και την πολυπλοκότητα στο στάδιο αυτό (Gullan & Cranston, 2005). Η έναρξη της μεταμόρφωσης συνδέεται με την επίτευξη ενός συγκεκριμένου μεγέθους του σώματος του εντόμου, που θεωρείται ικανό για τον προγραμματισμό του εγκέφαλου, για τη μεταμόρφωση, οδηγώντας έτσι στην αλλαγή των επιπέδων των διαφόρων ορμονών. Μόνο στα ολομετάβολα έντομα η μεταμόρφωση περιλαμβάνει το στάδιο του πουπαρίου (pupal stadium), κατά την διάρκεια του οποίου οι δομές του σώματος των ακμαίων διαμορφώνονται από τις προνυμφικές δομές (Gullan & Cranston, 2005).

Οι αλλαγές στην μορφή (μορφολογία) κατά τη διάρκεια της οντογένεσης, έχουν επιπτώσεις τόσο στις εξωτερικές δομές όσο και στα εσωτερικά όργανα, αλλά μόνο οι εξωτερικές αλλαγές είναι εμφανείς σε κάθε έκδυση. Τρείς είναι οι μορφές των αναπτυξιακών και μορφολογικών αλλαγών κατά τη διάρκεια της οντογένεσης, που σχετίζονται με τον βαθμό της εξωτερικής αλλαγής, που λαμβάνει χώρα κατά τις μετα-εμβρυϊκές φάσεις ανάπτυξης.

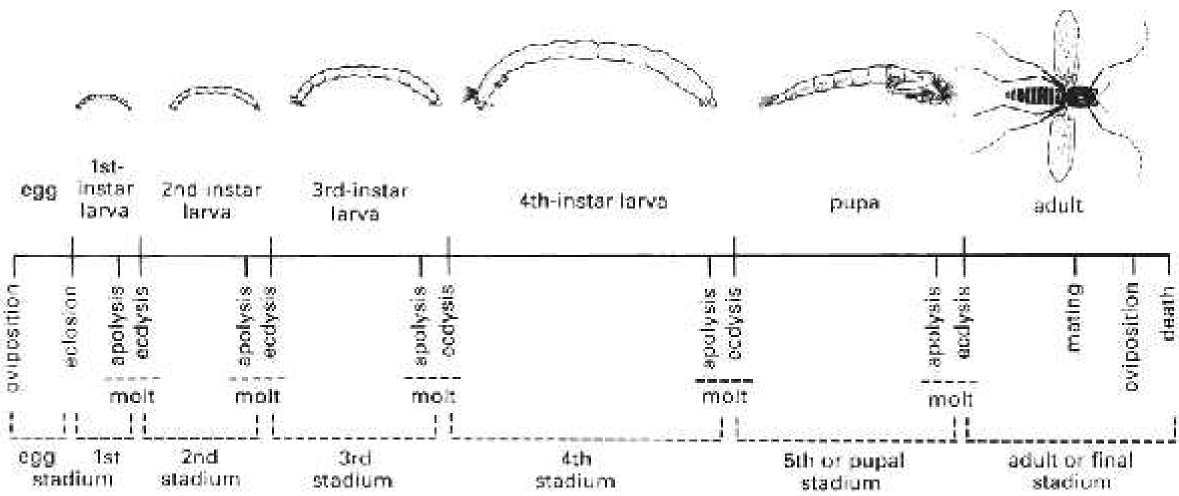
Το πρωτόγονο αναπτυξιακό σχέδιο, των αμετάβολων εντόμων (Εικόνα 4), περιλαμβάνει μια διαδικασία όπου το νεοσσό εκκολάπτεται και διαθέτει μία μορφή παρόμοια με ένα μικροσκοπικό ενήλικο, που στερείται μόνο τα γεννητικά όργανα (Zygentoma, Archaeognatha).

Αντιθέτως, όλα τα πτερυγωτά έντομα υποβάλλονται σε μια μεταμορφωτική διαδικασία, μεταξύ της ανώριμης φάσης της ανάπτυξης και της πτερωτής ή δευτερευόντως άπτερης φάσης των ενηλίκων. Αυτά τα έντομα μπορούν να υποδιαιρεθούν, σύμφωνα με δύο αναπτυξιακά προγράμματα, στα ημιμετάβολα (μερική ή ελλιπής μεταμόρφωση) (Εικόνα 5) και στα ολομετάβολα (πλήρης μεταμόρφωση) έντομα (Εικόνα 6). Τα αναπτυσσόμενα φτερά, είναι ορατά στις εξωτερικές θήκες της ραχιαίας επιφάνειας των νυμφών των ημιμετάβολων εντόμων, πλήν των νεώτερων προνυμφικών τους σταδίων. Ο όρος εξωπτερυγωτό αναφέρεται σε αυτή την μορφή της ανάπτυξης των φτερών (Gullan & Cranston, 2005).

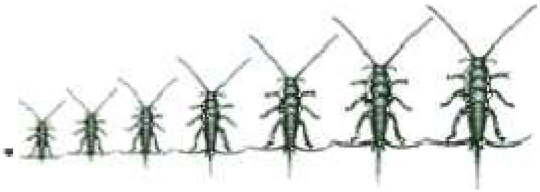
Στο παρελθόν, τάξεις εντόμων με ημιμετάβολη και εξωπτερυγωτή ανάπτυξη ομαδοποιήθηκαν στην τάξη «Hemimetabola» (Exopterygota), αλλά αυτή η ομάδα αναγνωρίζεται σαν ένας βαθμός οργάνωσης, παρά σαν μία μονοφυλετική φυλογενετική μονάδα. Αντιθέτως, οι τάξεις των πτερυγωτών που εμφανίζουν ολομετάβολη ανάπτυξη, μοιράζονται τη μοναδική εξελικτική καινοτομία ενός εφησυχάζοντος σταδίου ή αλλιώς ενός σταδίου νύμφης (pupal), στο οποίο συσσωρεύονται όλες εκείνες οι δομικές αλλαγές μεταξύ του προνυμφικού και του ενήλικου σταδίου. Οι τάξεις των εντόμων που μοιράζονται αυτό το μοναδικό, αναπτυξιακό πρόγραμμα ανάπτυξης, αντιπροσωπεύουν ένα κλάδο εντόμων, τα ενδοπτερυγωτά (Endopterygota) ή ολομετάβολα, (Holometabola) έντομα (Gullan & Cranston, 2005).

Στα νεώτερα εξελικτικά Holometabola, η έκφραση όλων των ενήλικων χαρακτηριστικών γνωρισμάτων καθυστερείται μέχρι το στάδιο της νύμφης. Εντούτοις στις περισσότερες τάξεις εντόμων, μεμονωμένες δομές συμπεριλαμβανομένων και των φτερών, μπορούν να είναι παρούσες εσωτερικά στις προνύμφες, ως ομάδες αδιαφοροποίητων κυττάρων, γνωστές ως imaginal δίσκοι (imaginal discs ή buds). Παρά ταύτα, οι imaginal δίσκοι δεν είναι αρκετά εμφανείς μέχρι το στάδιο της νύμφης (Gullan & Cranston, 2005). Αυτό το είδος της ανάπτυξης των φτερών ονομάζεται ενδοπτερυγωτία και αυτό γιατί τα φτερά αναπτύσσονται από τα πρωτογενή (primordia), μέσα στις πτυχές του περιβλήματος, (Gullan & Cranston, 2005).

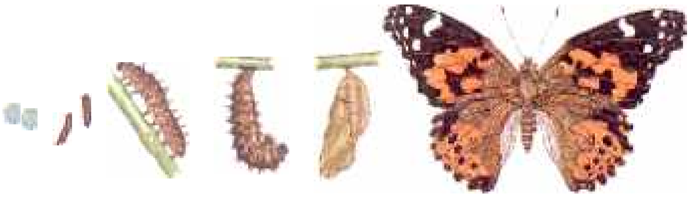
Η εξέλιξη των ολομετάβολων εντόμων επιτρέπει στα προνυμφικά και ενήλικα στάδια του εντόμου, να εξειδικεύονται με βάση τους διαθέσιμους πόρους, συμβάλλοντας έτσι στην επιτυχή διασπορά της ομάδας αυτής.



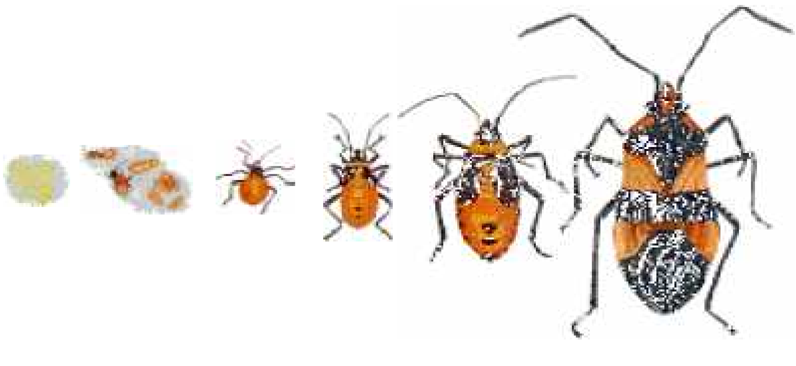
Εικόνα 4. Σχηματική αναπαράσταση του κύκλου ζωής της σκνίπας (Diptera: Chironomidae, *Chironomus*).



Εικόνα 5. Αμετάβολη ανάπτυξη εντόμων.



Εικόνα 6. Ολομετάβολη ανάπτυξη. Είναι εμφανή τα στάδια της προνύμφης, της νύμφης και του ενήλικου ατόμου.



Εικόνα 7. Ημιμετάβολη ανάπτυξη.

1.2.5 Μεταμόρφωση

Όλα τα πτερυγωτά έντομα υποβάλλονται σε διάφορους βαθμούς μεταμορφώσεως, από την προνυμφική στην ενήλικη φάση της ιστορίας της ζωής τους. Μερικά εξωπτερυγωτά, όπως οι κατσαρίδες, παρουσιάζουν μόνο μικρές μορφολογικές αλλαγές κατά τη διάρκεια της μετά-εμβρυϊκής ανάπτυξής τους, ενώ σε πολλά ενδοπτερυγωτά, το σώμα αναδημιουργείται κατά ένα μεγάλο μέρος του κατά την διάρκεια της μεταμορφώσεως (Gullan & Cranston, 2005).
Μόνο στα ολομετάβολα έντομα η μεταμόρφωση περιλαμβάνει το στάδιο του πουπαρίου (pupal stadium), κατά την διάρκεια του οποίου οι δομές του σώματος των ακμαίων διαμορφώνονται από τις προνυμφικές δομές, (Gullan & Cranston, 2005).

Οι αλλαγές στη μορφή του σώματος, επέρχονται από τη διαφορική αύξηση των μελών του. Σα όργανα που θα λειτουργήσουν στο ενήλικο, αλλά δεν είχαν αναπτυχθεί στην προνύμφη, αυξάνονται με γρηγορότερους ρυθμούς. Η επιταχυνόμενη αύξηση των φτερών είναι το προφανέστερο παράδειγμα, αλλά τα πόδια, τα γεννητικά όργανα, οι γονάδες και άλλα εσωτερικά όργανα, μπορούν να αυξηθούν στο μέγεθος και την πολυπλοκότητα στο στάδιο αυτό (Gullan & Cranston, 2005).

Η έναρξη της μεταμόρφωσης συνδέεται με την επίτευξη ενός συγκεκριμένου μεγέθους του σώματος του εντόμου, που θεωρείται ικανό για τον προγραμματισμό του εγκέφαλου, για τη μεταμόρφωση, οδηγώντας έτσι στην αλλαγή των επιπέδων των διαφόρων ορμονών. Η μεταμόρφωση στα περισσότερα σκαθάρια, παρουσιάζει ιδιαίτερη ανεξαρτησία από την επιρροή του εγκεφάλου.

Στα περισσότερα έντομα, μία μείωση του ποσοστού της κυκλοφορίας της ορμόνης νεότητας (JH), ως αποτέλεσμα της μείωσης της δραστηριότητας των corpora allata, είναι ουσιαστική για την έναρξη της μεταμόρφωσης.

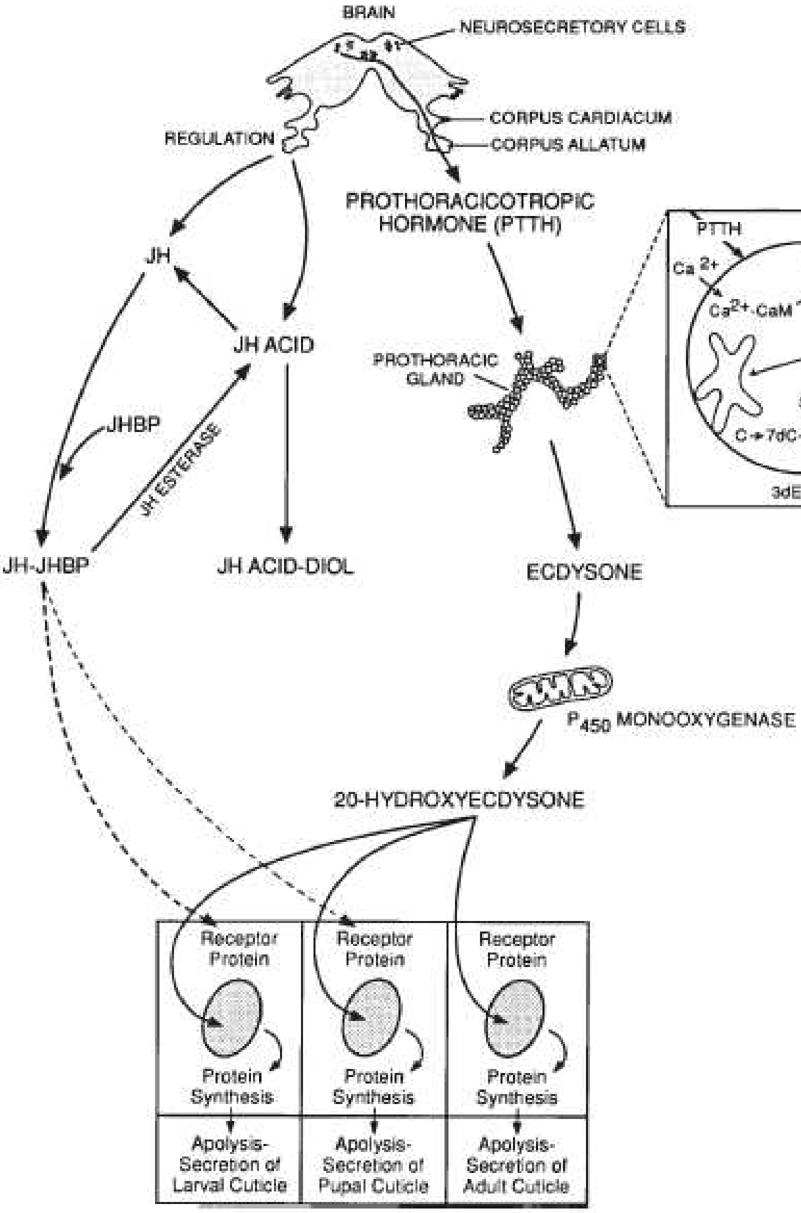
Κατά την μεταμόρφωση αυτό που εμφανίζεται να είναι νύμφη, είναι ένα πλήρως ανεπτυγμένο ενήλικο, μέσα στην επιδερμίδα του πουπαρίου, το οποίο καλείται και ως εγκλεισμένο ενήλικο (Gullan & Cranston, 2005).

Εξωτερικά, ένα προστατευτικό περίβλημα ή ένα κουκούλι περιβάλλει τις νύμφες των περισσοτέρων ενηλίκων, με εξαίρεση τα ενήλικα ορισμένων κολεοπτέρων, διπτέρων, λεπιδοπτέρων και υμενοπτέρων.

Έχουν αναγνωριστεί διάφοροι τύποι νυμφών και αυτοί φαίνεται να έχουν προκύψει κατά ανεξάρτητο πρότυπο στις διάφορες τάξεις των εντόμων. Οι περισσότερες νύμφες είναι exarate, τα προσαρτήματά τους δηλαδή (πόδια, φτερά, μέρη του στόματος και κεραίες) είναι συνδεδεμένα με τα σώματα των εγκλεισμένων ενηλίκων. Οι υπόλοιπες, που δεν ανήκουν σε αυτόν τον τύπο ονομάζονται obtect νύμφες και τα εξαρτήματά τους είναι ακινητοποιημένα και στενά συνδεδεμένα με το σώμα του εγκλεισμένου ενηλίκου, ενώ η επιδερμίδα τους είναι ισχυρά σκληροποιημένη (σχεδόν σε όλα τα Lepidoptera) (Gullan & Cranston, 2005).

Οι exarate νύμφες μπορεί να έχουν ενισχυμένες τις κάτω γνάθους (decticous), ώστε τα εγκλεισμένα ενήλικα να μπορέσουν να τμήσουν το κουκούλι κατά την έξοδό τους, ή μη ενισχυμένες (adecticous) και σ’αυτή την περίπτωση το ενήλικο, πρώτα διαρηγνύει την επιδερμίδα και χρησιμοποιεί μετέπειτα τις κάτω γνάθους και τα πόδια του για να δραπετεύσει από το κουκούλι (Gullan & Cranston, 2005).

Η διαφυγή από το πουπάριο, διευκολύνεται από ένα μεμβρανώδη σάκο του κεφαλιού του αναδυόμενου ενηλίκου, το ptilinum. Τα έντομα της κατηγορίας των obtect νυμφών, μπορούν να στερηθούν ενός πλήρως διαμορφωμένου κουκουλιού, όπως συμβαίνει στα σκαθάρια της οικογενείας των coccinellidae και στα νηματόκερα και ορθόρραφα δίπτερα. Στα κουκούλια των λεπιδοπτέρων, η διαφυγή επιτυγχάνεται μηχανικά από το σώμα του ενηλίκου, είτε με την βοήθεια προβολών του κεφαλιού, είτε από την έκκριση εξειδικευμένων αποδομητικών ουσιών (Gullan & Cranston, 2005).



Εικόνα 8. Ενδοκρινικός έλεγχος της μεταμόρφωσης.

1.2.6 Ενήλικη φάση

Εκτός από τα είδη της τάξης των *Ephemenoptera*, τα έντομα σε γενικές γραμμές δεν εμφανίζουν περαιτέρω εκδύσεις, από την στιγμή όπου έχουν φτάσει στο στάδιο του ενηλίκου. Το τελευταίο αυτό στάδιο, έχει αναπαραγωγικό ρόλο και συχνά αποτελεί ένα στάδιο διασποράς, ειδικότερα στα έντομα με σχετικά στατικές προνύμφες (Gullan & Cranston, 2005).

Το ακμαίο, μπορεί να είναι αναπαραγωγικά ικανό σχεδόν αμέσως την έξοδό του από το πουπάριο ή μπορεί να μεσολαβήσει μια περίοδος ωρίμανσης, στο χρονικό διάστημα αναμονής για τη μεταφορά του σπέρματος ή για την ωοαπόθεση.

Ανάλογα με τη διαθεσιμότητα τροφής, εμφανίζονται διάφοροι αναπαραγωγικοί κύκλοι κατά την διάρκεια του σταδίου του ακμαίου. Τα ενήλικα ορισμένων ειδών, όπως εκείνα της τάξης των Ephemenoptera, ζούν για ένα πολύ μικρό χρονικό διάστημα (Gullan & Cranston, 2005).

Αυτά τα έντομα έχουν ατελώς ή καθόλου σχηματισμένα στοματικά μέλη και πετούν για μόνο μερικές ώρες ή κατ' ανώτατο όριο μια ημέρα ή δύο, ζευγαρώνουν και στην συνέχεια πεθαίνουν. Τα περισσότερα ενήλικα, ζουν τουλάχιστον μερικές εβδομάδες, συχνά μερικούς μήνες και μερικές φορές για αρκετά έτη: οι αναπαραγωγικοί τερμίτες και τα μυρμήγκια και οι βασίλισσες των μελισσών, αποτελούν μερικά από τα μακροβιότερα ενήλικα.

Η ενήλικη ζωή ξεκινά από την στιγμή όπου το ακμαίο διαφεύγει του πουπαρίου. Η μεταμόρφωση, εντούτοις, μπορεί να ολοκληρωθεί σε μερικές ώρες, ημέρες ή εβδομάδες πριν και το εγκλεισμένο ενήλικο μπορεί να παραμείνει στο πουπάριο μέχρις ότου εμφανιστούν οι κατάλληλες περιβαλλοντικές συνθήκες για την έξοδό του από αυτό (Gullan & Cranston, 2005). Οι αλλαγές στη θερμοκρασία ή στο φώς, χημικά σήματα και άλλους παράγοντες, μπορούν να συγχρονίσουν την έξοδο των ενηλίκων στα περισσότερα είδη.

Ο ορμονικός έλεγχος της εξόδου έχει μελετηθεί εκτενώς στο έντομο Manduca sexta (λεπιδόπτερα: Sphingidae (Gullan & Cranston, 2005). Η περιγραφή των γεγονότων που ακολουθούν την έξοδο, έχει βασιστεί κατά ένα μεγάλο βαθμό στο M. sexta, αλλά θεωρούνται παρόμοια και στα υπόλοιπα έντομα.

Μερικές ημέρες πριν από την έξοδο, τα επίπεδα των εκδυστεροειδών μειώνονται και ακολουθεί μια σειρά φυσιολογικών και συμπεριφοριστικών γεγονότων, τα οποία προετοιμάζουν το έντομο για την έκδυση, συμπεριλαμβανομένων και της απελευθέρωσης δύο νευροπεπτιδίων.

Η ορμόνη επαγωγής της έκδυσης, Ecdysis triggering hormone (ETH), που εκκρίνεται από τους επιτραχειακούς αδένες ή αλλιώς από τα κύτταρα Inka και η ορμόνη εξόδου (eclosion hormone, EH) που εκκρίνεται από τα νευροεκκριτικά κύτταρα (neurosecretory cells) του εγκεφάλου, δρουν σε συνδυασμό για την πρόκληση προ-εξώδιας συμπεριφοράς (Gullan & Cranston, 2005).

Η ETH απελευθερώνεται πρώτα και οι ETH και EH υποκινούν την έκκριση της μίας από την άλλη, διαμορφώνοντας έτσι ένα θετικό ανατροφοδοτικό βρόγχο. Η EH επάγει επίσης την απελευθέρωση του καρδιοενεργού νευροπεπτιδίου των καρκινοειδών (crustacean cardioactive peptide, CCAP). Σο CCAP αναστέλλει την προ-εξώδια συμπεριφορά, παρεμποδίζοντας δηλαδή τις κοιλιακές συσπάσεις και τις κινήσεις των φτερών καθώς και την επιτάχυνση των καρδιακών παλμών (Gullan & Cranston, 2005).

Η ορμόνη εξόδου (eclosion hormone, EH) διεγείρει την απελευθέρωση περαιτέρω νευροορμονών, όπως είναι η ορμόνη bursicon και τα καρδιοπεπτίδια. Σα καρδιοπεπτίδια, ενεργοποιούν τις καρδιακές συσπάσεις, διευκολύνοντας έτσι την μετακίνηση της αιμολέμφου στο θώρακα και κατά συνέπεια στα φτερά. Η Bursicon, προκαλεί μια σύντομη αύξηση στην πλαστικότητα της επιδερμίδας, ώστε να επιτραπεί η επέκταση των φτερών, ακολουθούμενη από σκλήρυνση της επιδερμίδας (Gullan & Cranston, 2005).

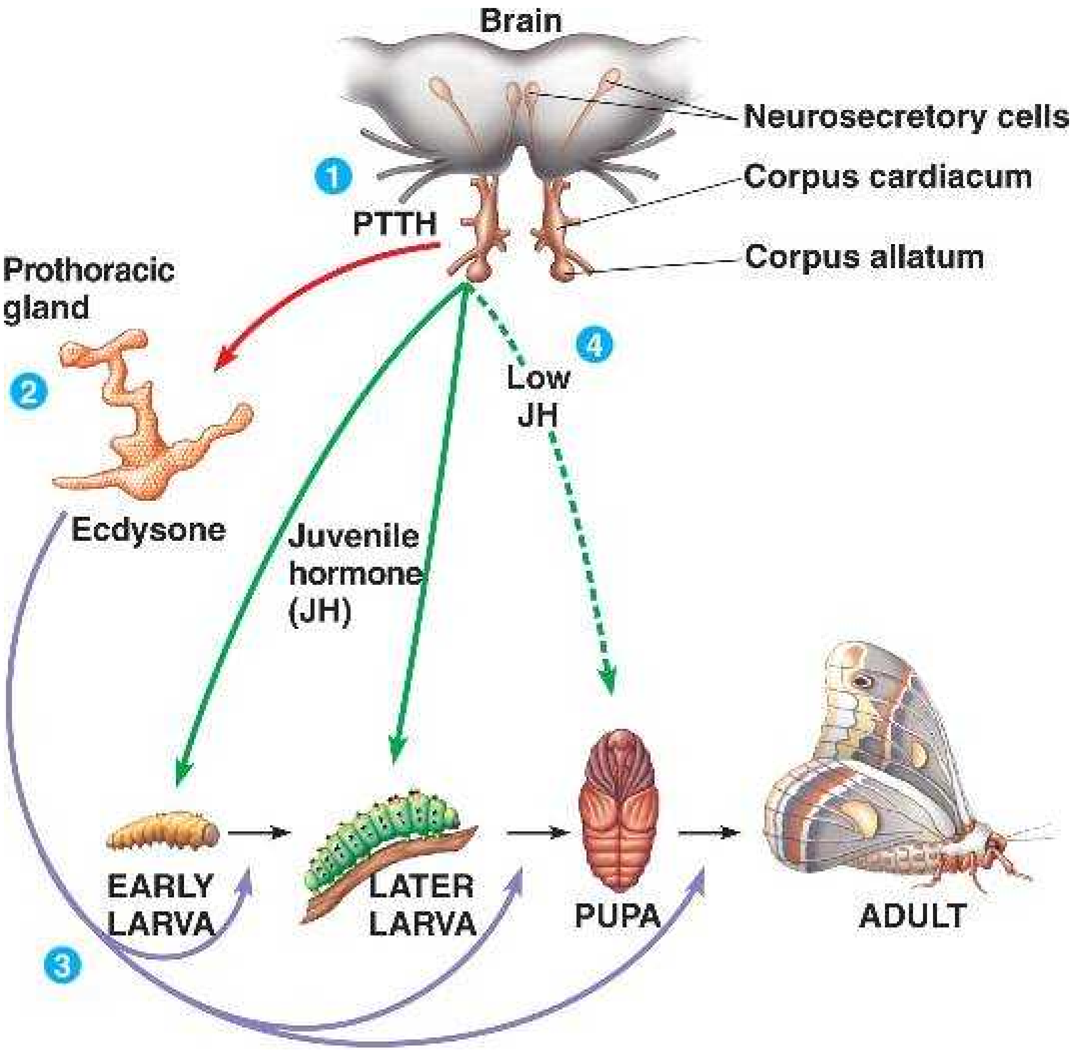
Το ενήλικο που εξήλθε από το πουπάριο εμφανίζει μαλακή επιδερμίδα, η οποία επιτρέπει την επέκταση της επιφάνειας του σώματος με άμεση κατάποση του αέρα ή με λήψη του από τους τραχειακούς σάκους και με τοπική αύξηση της πίεσης της αιμολέμφου, ύστερα από έντονη μυϊκή δραστηριότητα. Τα φτερά κρεμιούνται με φορά προς τα κάτω, αυξάνοντας έτσι την εκτασιμότητά τους.

Ο χρωματισμός της επιδερμίδας και των επιδερμικών κυττάρων εμφανίζεται αμέσως πρίν ή αμέσως μετά της εξόδου από το πουπάριο και η διαδικασία αυτή συμπίπτει ή προηγείται της σκληροποίησης της επιδερμίδας το σώματος, κάτω από την επιρροή της ορμόνης Bursicon.

Μετά από τον σχηματισμό της επιδερμίδας του πουπαρίου, πολλά ολομετάβολα έντομα απεκκρίνουν ένα περιττωματικό ρευστό, αποκαλούμενο μηκόνιο (meconium). Το τελευταίο, αντιπροσωπεύει τα μεταβολικά απόβλητα που είχαν συσσωρευτεί κατά τη διάρκεια του σταδίου της νύμφης. Μερικές φορές, το ενήλικο διατηρεί το meconium στο ορθό έντερο, έως ότου ολοκληρωθεί η σκλήρυνση, βοηθώντας κατά συνέπεια την αύξηση του μεγέθους του σώματος.

Η αναπαραγωγή αποτελεί την κύρια δραστηριότητα της ενήλικης ζωής και η διάρκεια του σταδίου αυτού, συμπίπτει με τον χρόνο παραγωγής των αυγών. Η γήρανση, σχετίζεται με την λήξη της αναπαραγωγής και ο θάνατος μπορεί να προκαθορίσει την οντογένεση ενός εντόμου.

Τα θηλυκά μπορεί να πεθάνουν μετά την ωοαπόθεση, ενώ τα αρσενικά μπορεί να πεθάνουν αμέσως μετά από το ζευγάρωμα. Η παρουσία μιας μετα-αναπαραγωγικής ζωής είναι απαραίτητη στα μιμητικά έντομα, επιτρέποντας στους θηρευτές να εκπαιδευτούν με την δυσάρεστη γεύση του θηράματός τους (Gullan & Cranston, 2005).



Εικόνα 9. Η ανάπτυξη των εντόμων από το προνυμφικό στάδιο στο ενήλικο άτομο και ο ρόλος των ορμονών στα αναπτυξιακά στάδια των εντόμων.

1. 2 Το ενδοκρινικό σύστημα των εντόμων

Ορμόνη καλείται η χημική ουσία που παράγεται στον οργανισμό, κυκλοφορεί στο αίμα και έχει ρυθμιστική δράση στη δραστηριότητα συγκεκριμένων κυττάρων ή οργάνων του σώματος.
Οι ορμόνες συμμετέχουν στη διαδικασία μεταβίβασης σήματος από το ένα κύτταρο στο άλλο. Αλληλεπιδρούν με τα κύτταρα-στόχους τους μέσω ειδικών αλληλεπιδράσεων υποδοχέων-ορμονών. Ο υποδοχέας μπορεί να βρίσκεται στη μεμβράνη του πλάσματος ή μέσα στο κύτταρο (κυτταροπλασματικό ή πυρηνικό). Η αλληλεπίδραση ορμόνης - υποδοχέα μπορεί να δημιουργήσει δεύτερους αγγελιοφόρους ή να ρυθμίσει τη γονιδιακή έκφραση. Η επίδραση της ορμόνης στο κύτταρο μπορεί να είναι το αποτέλεσμα τροποποιημένων μεταβολικών οδών ή μεταβολών στην κυτταρική δομή και ανάπτυξη.

Στο σώμα των εντόμων υπάρχουν 4 κατηγορίες κυττάρων που παράγουν ορμόνες:

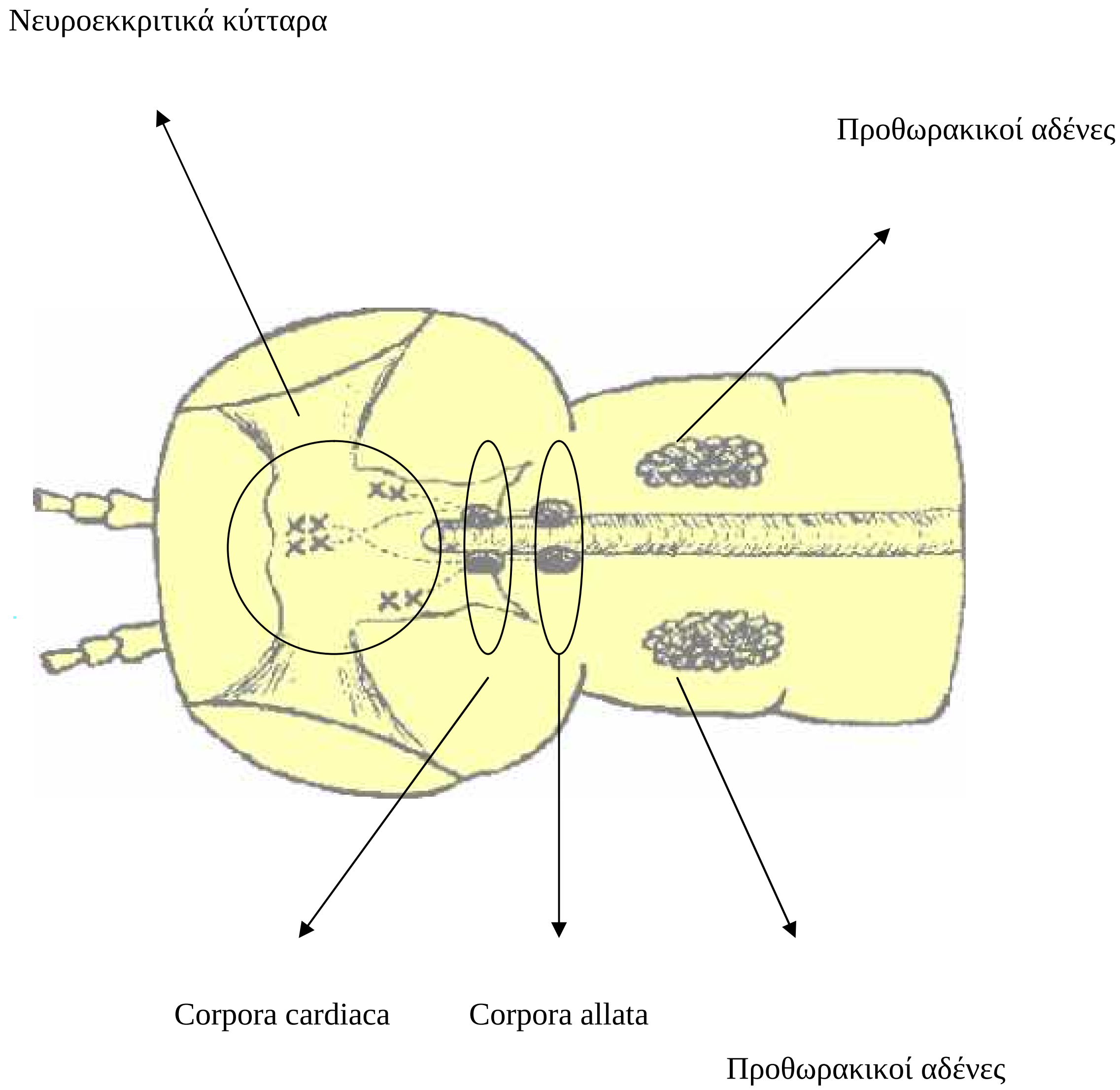
1) Ενδοκρινικοί αδένες: ο σημαντικότερος ενδοκρινικός αδένας βρίσκεται στον θώρακα, ακριβώς πίσω από το κεφάλι, γι' αυτό το λόγο ονομάζεται και προθωρακικός αδένας. Οι προθωρακικοί αδένες αποτελούν απεκκριτικούς παράγοντες ενός εκδυστεροειδούς, της εκδυσόνης (ecdysone ή molting hormone), η οποία αφού υδροξυλιωθεί, συμμετέχει στην διαδικασία της έκδυσης.

2) Νευροαδενικά σύμπλοκα: στα σύμπλοκα αυτά περιέχονται τα corpora cardiaca και τα corpora allata. Τα **corpora cardiaca** είναι ένα ζευγάρι νευροαδενικών συμπλόκων, τα οποία εντοπίζονται στην αορτή, πίσω από τον εγκέφαλο. Εκτός από την παραγωγή εξειδικευμένων ορμονών, το νευροαδενικό αυτό σύμπλοκο αποθηκεύει και απελευθερώνει νευροορμόνες, συμπεριλαμβανομένης και της προθωρακικοτρόπου ορμόνης [prothoracicotropic hormone (PTTH) ή brain hormone ή ecdysiotropin], η οποία παράγεται από τα NSC του εγκεφάλου. Η PTTH υποκινεί την εκκριτική δραστηριότητα των προθωρακικών αδένων. Τα **corpora allata** είναι ένα μικρό ζεύγος αδενικών σωμάτων, τα οποία προκύπτουν από το επιθήλιο και εντοπίζονται στις δύο πλευρές του πρόσθιου εντέρου (foregut). Σε κάποια έντομα οι αδένες αυτοί συνενώνονται για να σχηματίσουν έναν ενιαίο αδένα. Ο φυσιολογικός τους ρόλος είναι η έκκριση της ορμόνης νεότητας, juvenile hormone (JH), η οποία εμφανίζει ρυθμιστική επίδραση στην μεταμόρφωση και αναπαραγωγή (Gullan& Cranston, 2005).

3) Νευροεκκριτικά κύτταρα [Neurosecretory cells (NSC) ή αλλιώς neuroendocrine cells]: είναι τροποποιημένοι νευρώνες, που εντοπίζονται στο νευρικό σύστημα, αλλά και στον εγκέφαλο. Αυτά τα κύτταρα παράγουν τις περισσότερες από τις γνωστές ορμόνες των εντόμων, με αξιοσημείωτη εξαίρεση την παραγωγή των εκδυστεροειδών και των ορμονών νεότητας. Η σύνθεση και η απελευθέρωση των τελευταίων ελέγχεται από νευροορμόνες των NSC.

4) Εσωτερικά όργανα: ορμόνες παράγονται από αρκετά κύτταρα εσωτερικών οργάνων των εντόμων όπως τα αναπαραγωγικά όργανα (όρχεις και ωοθήκες), το λίπος κτλ.

Οι 4 κατηγορίες αυτές κυττάρων που παράγουν ορμόνες συνθέτουν το ενδοκρινικό σύστημα των εντόμων που βοηθούν στην διατήρηση της ομοιόστασης, στη ρύθμιση της ανάπτυξης και σε άλλες σημαντικές κυτταρικές δραστηριότητες.



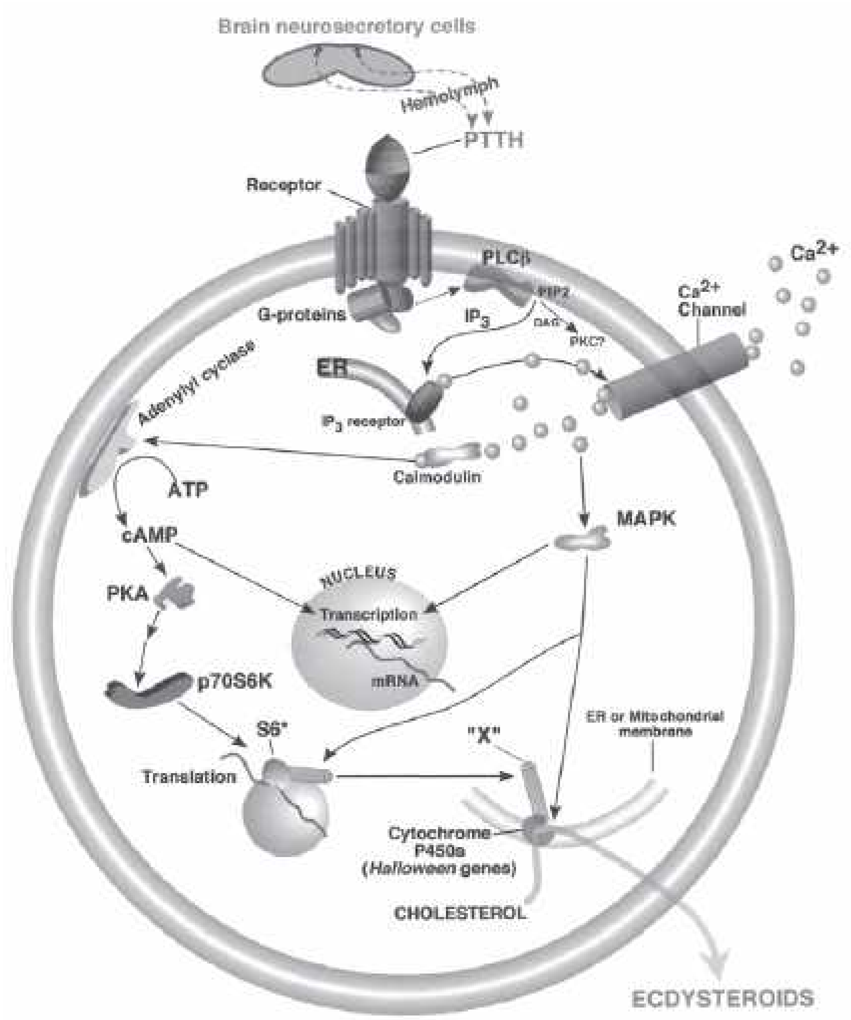
Εικόνα 10. Τα κυριότερα κέντρα παραγωγής ορμονών στα έντομα.

1.2.1 Οι ορμόνες των εντόμων

Στους προθωρακικούς αδένες που βρίσκονται στον θώρακα, ακριβώς πίσω από το κεφάλι, συνθέτονται τα εκδυστεροειδή. Όλα τα εκδυστεροειδή σχηματίζονται από τις στερόλες, όπως είναι η χοληστερόλη, τις οποίες τα έντομα δεν μπορούν να συνθέσουν *de novo,* αλλά λαμβάνουν από την τροφή τους. Όταν το έντομο γίνει ενήλικο οι προθωρακικοί του αδένες ατροφούν και το έντομο δεν μπορεί να υποστεί άλλη έκδυση. Οι προθωρακικοί αδένες παράγουν και ελευθερώνουν εκδυστεροειδή μόνο μετά την δράση ενός άλλου χημικού αγγελιοφόρου, της προθωρακιοτρόπου ορμόνης (PTTH). Αυτή η πεπτιδική ορμόνη που σχηματίζεται στα corpora cardiaca, υποκινεί την εκκριτική δραστηριότητα των προθωρακικών αδένων.

Στα corpora allata συνθέτεται η ορμόνη της νεότητας, **juvenile hormone** (JH). Ο συμβολισμός JH αφορά ένα μίγμα ορμονών συμπεριλαμβανομένων των JH-I, JH-II, JHIII και JH-0. Γενικά, οι ορμόνες νεότητας συμμετέχουν στον έλεγχο της μεταμόρφωσης και στην ρύθμιση της αναπαραγωγής. Τα χαρακτηριστικά των προνυμφών διατηρούνται και η μεταμόρφωση παρεμποδίζεται παρουσία JHs, ενώ η ανάπτυξη του ακμαίου απαιτεί μία έκδυση απουσία JH. Στο θηλυκό ώριμο άτομο η JH ελέγχει την απόθεση της λεκίθου στα αυγά και επηρεάζει την δραστηριότητα των αδένων και την παραγωγή φερομονών (Gullan & ranston, 2005). Στα νευροεκκριτικά κύτταρα συνθέτονται οι νευροορμόνες που αποτελούν την μεγαλύτερη κλάση ορμονών στα έντομα και καλούνται νευροπεπτίδια. Μία από τις πιο γνωστές ορμόνες της κατηγορίας αυτής είναι η brain hormone. Πρόκειται για ένα μικρού μοριακού βάρους πεπτίδιο που φαίνεται να έχει παρόμοια δράση με την προθωρακιοτρόπο ορμόνη που συνθέτεται στα corpora cardiaca.

Τα νευροπεπτίδια φθάνουν στους ιστούς στόχους μέσω της αιμολέμφου και των νευρικών αξόνων. Η δραστικότητα των ρυθμιστικών νευροπεπτιδίων εξαρτάται από στερεοειδικές, υψηλής συγγένειας περιοχές πρόσδεσης, οι οποίες εντοπίζονται στην πλασματική μεμβράνη των διαφόρων κυττάρων. Αυτές οι πρωτεΐνες πιθανώς να ρυθμίζουν τα ορμονικά επίπεδα, κατευθύνοντας τις ορμόνες στα σημεία-στόχους, ελαττώνοντας την μη εξειδικευμένη πρόσδεση ή προστατεύοντας από την απέκκριση ή την καταστροφή τους (Gullan & Cranston, 2005).



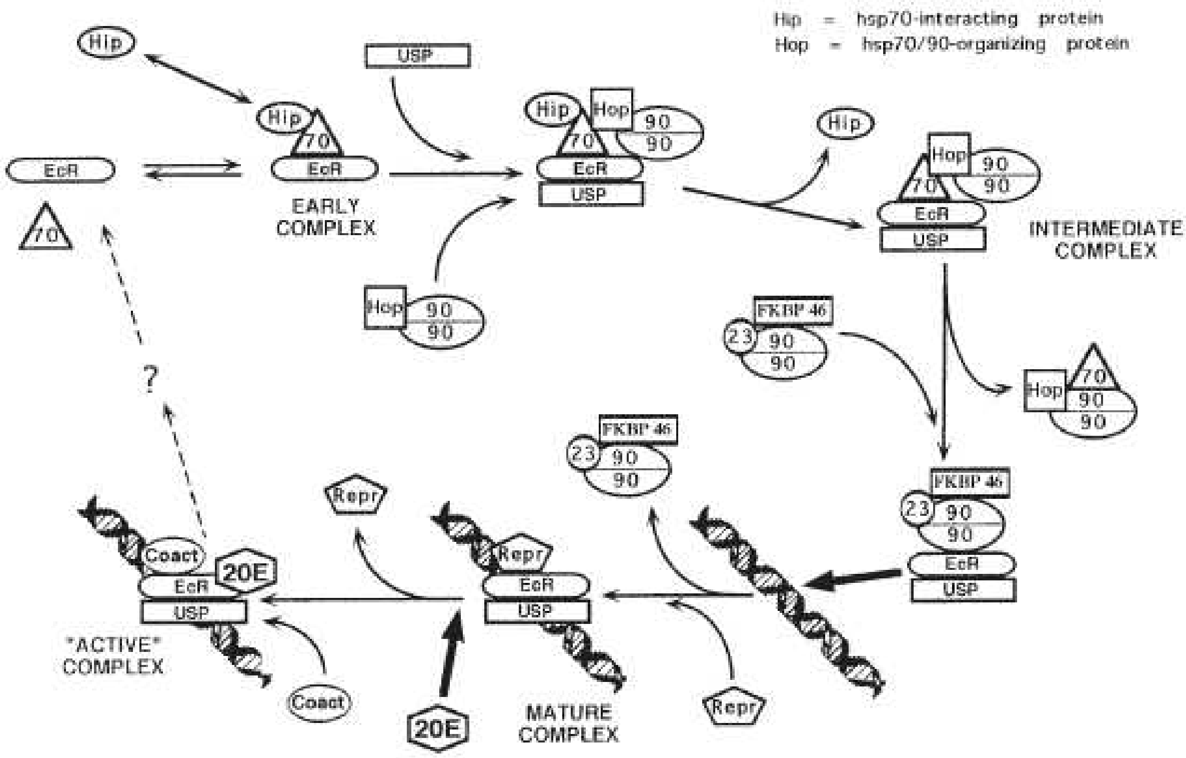
Εικόνα 11. Έκκριση της προθωρακιοτρόπου ορμόνης (PTTH) οδηγεί στη σύνθεση και απελευθέρωση των εκδυστεροειδών.

1.2.1.1 Τα εκδυστεροειδή

Τα εκδυστεροειδή αποτελούν μία ομάδα ορμονών με υψηλή συγγένεια με τις στεροειδή ορμόνες (που περιλαμβάνουν την εκδυσόνη) και ρυθμίζουν την σύνθεση της χιτίνης, διάφορων πρωτεϊνών των επιδερμικών κυττάρων και καθορίζουν φυσιολογικές διεργασίες που εμπλέκονται στην διαδικασία της έκδυσης. Για αυτό, συχνά τα εκδυστεροειδή αναφέρονται και ως ορμόνες έκδυσης.

Τα εκδυστεροειδή αντιπροσωπεύουν μια κατηγορία των στεροειδών ορμονών που ρυθμίζουν πολλές πτυχές της ανάπτυξης και της αναπαραγωγής. Τον ρόλο των εκδυστεροειδών στα σπονδυλωτά παίζουν τα ανδρογόνα, τα οιστρογόνα και οι ορμόνες του θυροειδούς. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η εμβρυϊκή ανάπτυξη των οστρακοειδών, η οποία ρυθμίζεται εν μέρει από την δράση των εκδυστεροειδών. Η ανάπτυξη των αρθροπόδων απαιτεί την περιοδική απώλεια του εξωσκελετού και την αντικατάστασή του με την επιδερμίδα. Αυτή η διαδικασία της έκδυσης ρυθμίζεται από τα εκδυστεροειδή [Horn, 1966]. Τα εκδυστεροειδή έχουν επίσης αποδειχθεί ότι ρυθμίζουν τις πτυχές της λεκιθογένεσης και της σπερματογένεσης [Adams et al., 1999]. Λειτουργούν μέσω της ενεργοποίησης του υποδοχέα της εκδυσόνης (EcR) με τρόπο ορθόλογο του υποδοχέα της θυρεοειδούς ορμόνης των σπονδυλωτών.

Η στεροειδής ορμόνη 20-hydroxyecdysone (ecdysone), ενεργοποιεί και συντονίζει τα διαδοχικά στάδια του κύκλου ζωής του εντόμου. Στην *D. melanogaster*, ο υποδοχέας της εκδυσόνης αποτελείται από ένα ετεροδιμερές της πρωτεΐνης που κωδικοποιείται από τον EcR και το ultraspiracle (USP) γονίδιο (Koelle et al., 1991). Το ετεροδιμερές EcR/USP ενεργοποιείται από ένα σύμπλεγμα μοριακών συνοδών που απαιτείται για την ενεργοποίηση των στεροειδών υποδοχέων στα σπονδυλωτά. Το σύμπλεγμα που απαιτείται για την ενεργοποίηση του υποδοχέα της εκδυσόνης αποτελείται από τις hsp90 και hsc70 (Εικόνα 12).



Εικόνα 12. Ενεργοποίηση του υποδοχέα της εκδυσόνης (EcR) και ο ρόλος των *hsp90* και *hsp70* γονιδίων.

Διάφορα ξενοβιοτικά που έχουν την ιδιότητα να δεσμεύουν τον υποδοχέα ως αγωνιστές ή ανταγωνιστές μπορεί να προκαλέσουν υψηλά επίπεδα τοξικότητας στον οργανισμό των αρθροπόδων. Βασικός στόχος ορισμένων εντομοκτόνων, όπως η τεβουφενοζίδη, είναι η δέσμευση του υποδοχέα της έκδυσης των εντόμων- στόχων, δρώντας ως χημικά ανάλογα της ορμόνης της έκδυσης [Dhadialla et al., 1998].

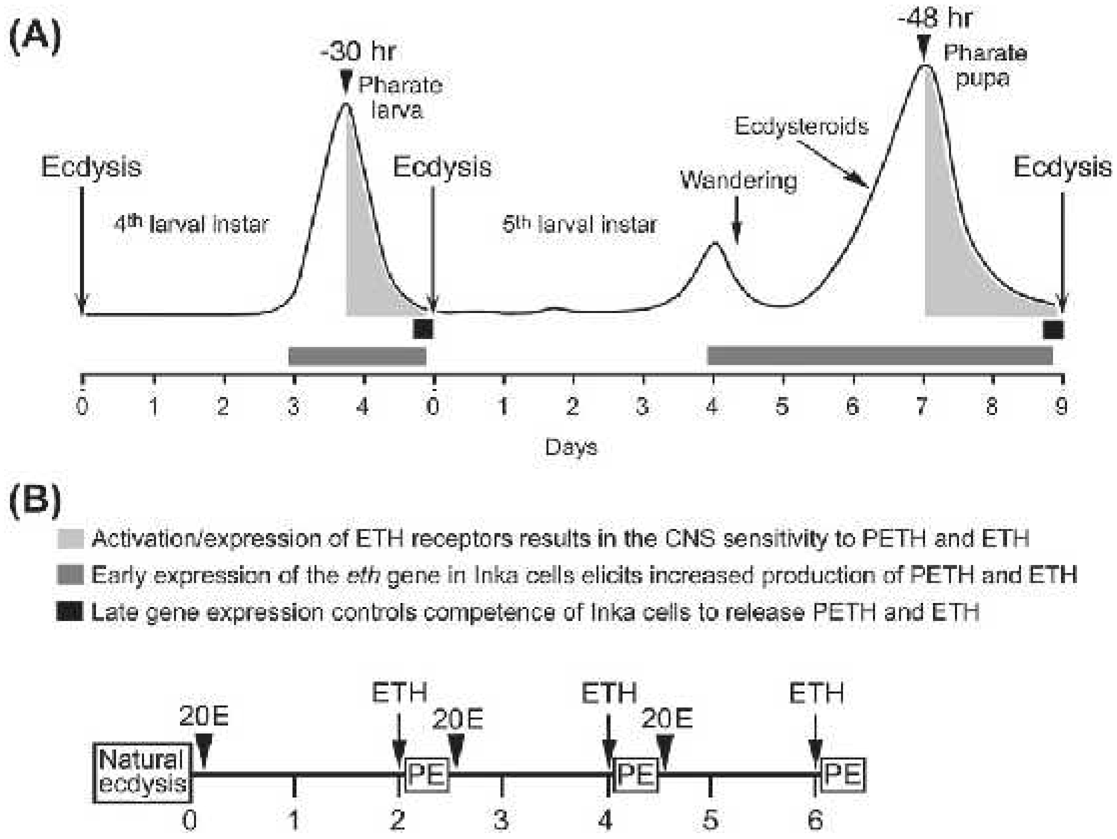
Τα ξενοβιοτικά δρουν ως εκδυστεροειδικοί ανταγωνιστές παρεμβαίνοντας στις διαδικασίες έκδυσης καθώς και στην εμβρυική ανάπτυξη του οστρακοειδούς, *Daphnia magna* [LeBlanc et al., 2000].

1.2.1.2 Η ορμόνη επαγωγής της έκδυσης (ΕΤΗ) στα *Lepidoptera*

Η έναρξη της έκδυσης στα έντομα απαιτεί την ενεργοποίηση του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ) από την δράση της ορμόνης της επαγωγής της έκδυσης (ecdysis-triggering hormone, ETH) και της ορμόνης της επαγωγής της προ-έκδυσης (PETH), η έκκριση των οποίων ρυθμίζεται από τα Inka κύτταρα των επιτραχιακών αδένων. Η λειτουργία των επιτραχιακών αδένων και η ταυτοποίηση μίας λειτουργικής πεπτιδικής ορμόνης έχει μελετηθεί επαρκώς στην *Manduca* (Zitnan et al., 1996). Ένεση των ορμονών που παράγονται στου επιτραχιακούς αδένες του σε προνύμφες του εντόμου είχαν ως αποτέλεσμα την επαγωγή της διαδικασίας της έκδυσης στο έντομο μέσα σε 5-10 λεπτά. Στο συγκεκριμένο έντομο απομονώθηκε και χαρακτηρίστηκε ένα πεπτίδιο 26 αμινοξέων με C- τελικό άκρο, με βιολογική δράση όμοια με εκείνη των ορμονών των επιτραχιακών αδένων. Αυτό το πεπτίδιο ονομάσθηκε Manduca ecdysis triggering hormone ή Mas-ETH (Zitnan et al., 1996). Έγχυση με συνθετική ΕΤΗ μιμήθηκε τα αποτελέσματα του φυσικού πεπτιδίου. Παρόμοιο πεπτίδιο (με μοριακό βάρος 2656) απομονώθηκε από τα inka κύτταρα νυμφών του εντόμου *B. mori* και ονομάστηκε Bom-ETH (Zitnan et al., 1999).

Η απελευθέρωση των ορμονών PETH και ETH στην αιμολέμφο σε κάθε έκδυση έχει μελετηθεί με ανοσοϊστοχημικές μελέτες (Zitnan et al., 2002; Zitnan et al., 1999; Zitnanova et al., 2001). Σύμφωνα με τις παραπάνω μελέτες, στα πρώτα 20 λεπτά της διαδικασίας της προ-έκδυσης, στην αιμολέμφο εντοπίζονται χαμηλές συγκεντρώσεις αυτών των πεπτιδίων (μέχρι 5 nM). Οι συγκεντρώσεις των πεπτιδίων αυξάνονται απότομα, φθάνοντας ~ 30 nM περίπου 20 λεπτά αργότερα. Αύξηση των επιπέδων των συγκεκριμένων πεπτιδίων σχετίζεται με αυξημένα επίπεδα κυκλικής GMP στα inka κύτταρα. Τα επίπεδα των PETH και ETH στην αιμολέμφο μειώνονται στα ~ 15 ηM κατά την έναρξη της διαδικασίας της έκδυσης (Zitnan et al., 1999).

Τα χαμηλά επίπεδα ενός μερικά επεξεργασμένου πρόδρομου πεπτιδίου (ETH-ETH-AP) επίσης συν-απελευθερώνεται στην κυκλοφορία της αιμολέμφου μαζί με πλήρως επεξεργασμένα πεπτίδια. Η φυσιολογική σημασία αυτής της πρόδρομης συν-απελευθέρωσης, εάν υπάρχει, είναι ασαφής. Τα ρυθμιστικά στοιχεία που συμβάλλουν στην έκφραση της ETH ορμόνης παρατηρήθηκαν μέσω του προσδιορισμού των περιοχών του υποκινητή του ETH γονιδίου. Μεταξύ των στοιχείων που παρατηρήθηκαν είναι επαναλαμβανόμενα μοτίβα που φαίνεται να λειτουργούν σαν στοιχεία απόκρισης της έκδυσης (ecdysone response elements EcRE).



Εικόνα 13. Η δράση των εκδυστεροειδών στο ΚΝΣ και στα inka κύτταρα στο έντομο *Manduca*. (Α) Οι προνύμφες που έχουν μόλις περάσει το πρώτο στάδιο της έκδυσης έχουν χαμηλά επίπεδα εκδυστεροειδών στην αιμολέμφο και είναι ευαίσθητα στην ορμόνη επαγωγής της έκδυσης (ETH). Οι γκρι περιοχές απεικονίζουν τα χαμηλά επίπεδα εκδυστεροειδών στην αιμολέμφο των εντόμων, ενώ με ταυτόχρονη ένεση της ETH ορμόνης προκαλείται η έκδυση του εντόμου. Υψηλά επίπεδα εκδυστεροειδών επάγουν την έκφραση του γονιδίου ETH, ενώ μείωση των επιπέδων τους στην αιμολέμφο επάγουν την εκκριτική ικανότητα των inka κυττάρων. (Β) Ένεση της ορμόνης της έκδυσης (20-hydroxyecdysone) επάγει την ευαισθησία του ΚΝΣ στην ETH ορμόνη μέσα σε 1-2 ημέρες. Χειρισμός των εντόμων με εκδυστεροειδή που ακολουθούνται από ενέσεις με ETH ορμόνη (βέλη) επάγουν την επαναλαμβανόμενη έκδυση, 2 ημέρες αργότερα (Zitnanova et al., 2001).

1.2.2 Ορμονική ρύθμιση της έκδυσης και της μεταμόρφωσης

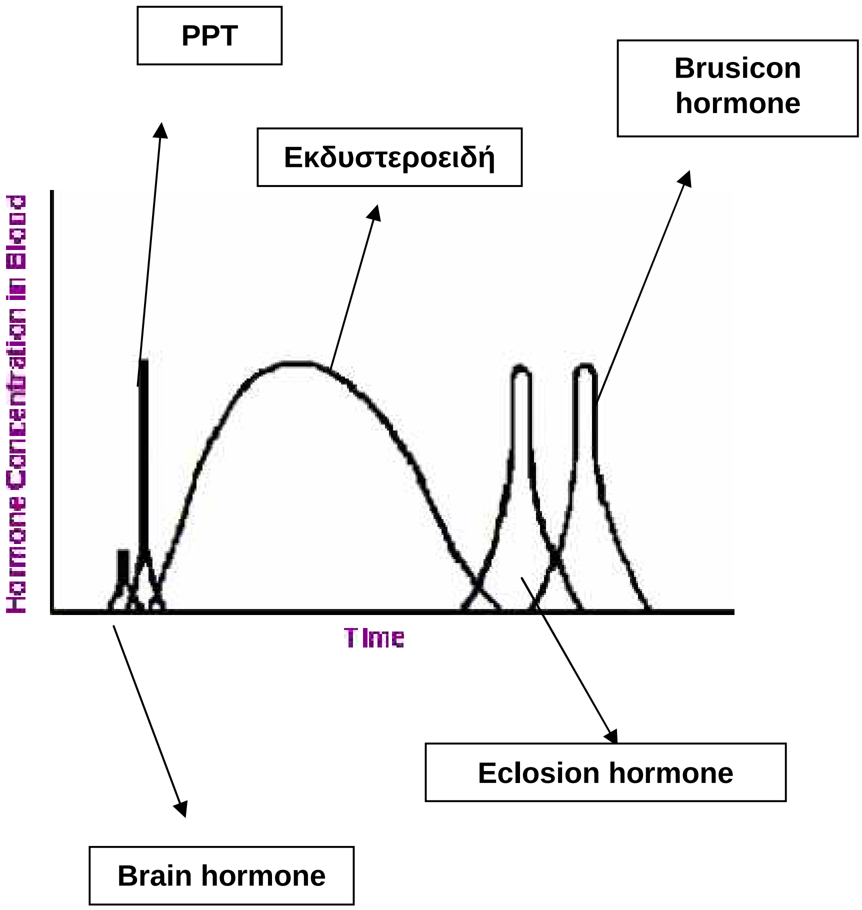
Όταν το ενήλικο έντομο έχει μεγαλώσει αρκετά ώστε να απαιτήσει την δημιουργία ενός μεγαλύτερου εξωσκελετού, ενεργοποιούνται κάποια νευροεκκριτικά κύτταρα στον εγκέφαλο. Οι νευρώνες αυτοί απαντούν στο ερέθισμα των εγκεφαλικών ορμονών (brain hormone) με την ενεργοποίηση των corpora cardiaca που απελευθερώνουν στο κυκλοφοριακό σύστημα την προθωρακιοτρόπο ορμόνη (PTTH). Αυτή η ξαφνική έκκριση της PTTH διεγείρει τους προθωρακικούς αδένες και εκκρίνουν τις ορμόνες της έκδυσης (molting hormones), τα εκδυστεροειδή.

Οι ορμόνες της έκδυσης επηρεάζουν πολλά κύτταρα σε όλο το σώμα, αλλά η κύρια λειτουργία τους είναι να πυροδοτήσουν μια σειρά από φυσιολογικές διεργασίες (apolysis) που οδηγούν σε σύνθεση του νέου εξωσκελετού . Κατά τη διάρκεια αυτών των διαδικασιών, ο νέος εξωσκελετός συνθέτεται ως ένα μαλακό, ζαρωμένο στρώμα κάτω από τα σκληρά μέρη του παλιού εξωσκελετού. Η διάρκεια της aposysis κυμαίνεται από μερικές ημέρες έως και εβδομάδες, ανάλογα με το είδος του εντόμου και τον ρυθμό ανάπτυξης του. Όταν ολοκληρωθεί ο νέος εξωσκελετός το έντομο είναι έτοιμο να αποβάλλει ότι έχει μείνει από τον παλιό με την διαδικασία της έκδυσης.

Όσο τα επίπεδα των εκδυστεροειδών παραμένουν πάνω από ένα κρίσιμο όριο στην αιμολέμφο, διάφορες άλλες ενδοκρινικές δομές παραμένουν ανενεργές. Πριν από το τέλος της apolysis, τα επίπεδα των εκδυστεροειδών πέφτουν και τα νευροεκκριτικά κύτταρα στα κοιλιακά γάγγλια αρχίζουν την έκκριση των ορμονών της εξόδου (eclosion hormone). Όσο αυξάνεται η συγκέντρωση της ορμόνης αυτής διεγείρονται και άλλα νευροεκκριτικά κύτταρα και εκκρίνουν μια ορμόνη που προκαλεί την σκλήρυνση και το σκούρο χρώμα του περιβλήματος (bursicon hormone) (Πίνακας 1).

Στα έντομα, η ορμόνη της νεότητας (juvenile hormone) εκκρίνεται από τα corpora allata πριν από κάθε έκδυση. Αυτή η ορμόνη εμποδίζει την έκφραση των γονιδίων που προάγουν την ανάπτυξη των χαρακτηριστικών των ενηλίκων εντόμων (π.χ. φτερά, αναπαραγωγικά όργανα), έχοντας σαν συμπέρασμα το έντομο να παραμένει στο στάδιο της προνύμφης. Τα corpora allata ατροφούν κατά την διάρκεια του τελευταίου προνυμφικού σταδίου και σταματούν να παράγουν την ορμόνη της νεότητας, έτσι το έντομο αναπτύσσει τα ενήλικα χαρακτηριστικά του και φτάνει στο στάδιο του ενήλικα (hemimetabolous) ή της χρυσαλλίδας (holometabolous).

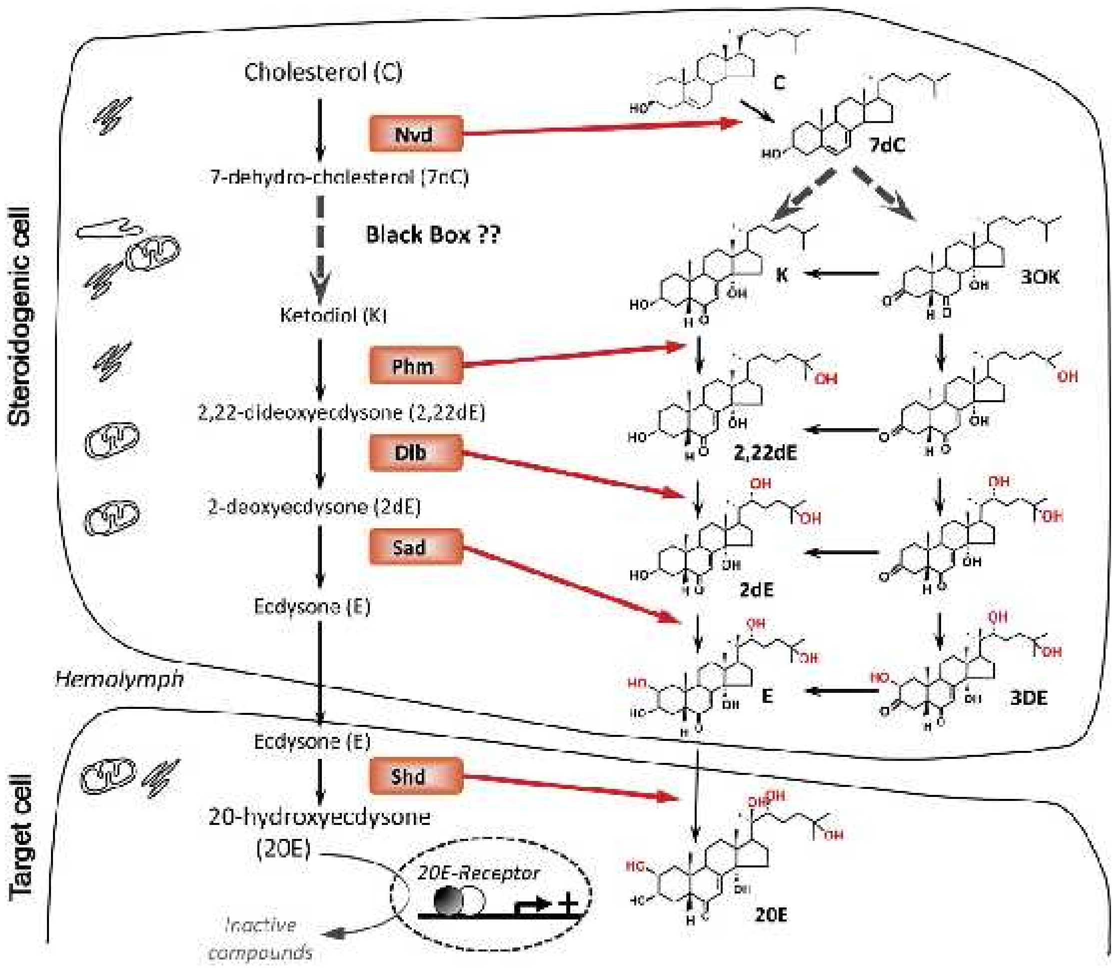
Όσον αφορά την σεξουαλική ωριμότητα του ενήλικου εντόμου, νευροεκκριτικά κύτταρα του εγκεφάλου απελευθερώνουν μια ορμόνη που «ενεργοποιεί» τα corpora allata, παράγοντας εκ νέου την ορμόνη της νεότητας. Σε ενήλικα θηλυκά, η ορμόνη αυτή διεγείρει την παραγωγή των αυγών. Σε ενήλικα αρσενικά άτομα, διεγείρει τους αδένες που χρειάζονται για την παραγωγή πρωτεϊνών που απαιτούνται στο σπερματικό υγρό. Σε περίπτωση απουσίας της ορμόνης της νεότητας τα ενήλικα έντομα μένουν σεξουαλικώς στείρα



Πίνακας 1. Γραφική απεικόνιση της συγκέντρωσης των ορμονών στην αιμολέμφο των εντόμων κατά την διαδικασία ανάπτυξής τους από το στάδιο της νύμφης έως και την μεταμόρφωσή τους.

Οι διαδοχικές μορφολογικές αλλαγές που παρατηρούνται κατά τη διάρκεια των εκδύσεων πυροδοτούνται από την απελευθέρωση εκδυστεροειδών στην αιμολέμφο των εντόμων κατά την διάρκεια κάθε αναπτυξιακού σταδίου. Στο τελευταίο προνυμφικό στάδιο το peak στην συγκέντρωση των εκδυστεροειδών στην αιμολέμφο, απουσία της ορμόνης νεότητας (JH), πυροδοτούν την μεταμόρφωση της προνύμφης στο στάδιο της νύμφης. Δάφορες μελέτες έχουν αποδείξει ότι μεταβάλλοντας τη συγκέντρωση των ορμονών στην αιμολέμφο, είτε με χορήγηση εκδυστεροειδούς είτε με JH, παρατηρούνται φαινοτυπικές δυσμορφίες στα αναπτυξιακά στάδια των διαφόρων οργανσμών (Riddiford and Ajami, 1973, Kurushima and Ohtaki, 1975, Lafont et al., 1977, Trouman et al., 1980).

Η στεροειδής ορμόνη 20-Hydroxyedysone (20HE) είναι μία από τις σημαντικότερες ορμόνες, δρα σαν εκδυστεροειδές, ρυθμίζοντας όλα τα στάδια της ανάπτυξης του εντόμου, τις εκδύσεις και την δαδικασία της μεταμόρφωσης. Αυτή η ορμόνη παίζει έναν κρίσιμο ρόλο στην ανάπτυξη του εντόμου, και υπάρχουν αρκετές βιβλιογραφικές αναφορές που μελετούν την δράση ανταγωνιστών της στην διατάραξη των φυσιολογικών διαδικασιών του οργανισμού στόχου (Oberländer and Smagghe 2001, Yanagi et al., 2006).



Εικόνα 14. Σχηματική προσέγγιση της βιοσυνθετικής οδού των εκδυστεροειδών.

1.3 Το αναπαραγωγικό σύστημα των εντόμων

Τα αναπαραγωγικά όργανα των εντόμων παρουσιάζουν μια μεγάλη ποικιλία μορφών, αλλά υπάρχει ένα μορφολογικό πρότυπο και λειτουργία για κάθε όργανο, έτσι ώστε ακόμη και οι πιο παρεκκλίνουσες μορφές να μπορούν να γίνουν κατανοητές από την άποψη ενός γενικευμένου προτύπου. Ανάλογα με την οικογένεια των εντόμων τα αναπαραγωγικά όργανα μπορεί να ποικίλουν σε σχήμα (π.χ. των γονάδων και των accessory glands), θέση και αριθμό (π.χ. των ωοθηκών μεταξύ διαφορετικών οικογενειών εντόμων και μερικές φορές ακόμη και μεταξύ διαφορετικών ειδών στο ίδιο γένος).

Υπάρχουν ποικίλες βιβλιογραφικές αναφορές για το αναπαραγωγικό σύστημα των Λεπιδοπτέρων. Το αναπαραγωγικό σύστημα της οικογένειας Noctuidae έχει μελετηθεί επαρκώς. (Siverly, 1947; Williams, 1948; Callahan,1958; Callahan and Chapin, 1960; Etman and Hooper, 1979).

1.3.1 Το θηλυκό αναπαραγωγικό σύστημα

Το αναπαραγωγικό σύστημα των θηλυκών εντόμων βρίσκεται στην κοιλία των εντόμων και τα περισσότερα από τα μέρη του έχουν αμφίπλευρη συμμετρία. Στο θήλυ οι ζυγές ωοθήκες βρίσκονται στο άνω και πρόσθιο μέρος της κοιλίας. Κάθε μία ωοθήκη αποτελείται από ένα αριθμό σωλήνων που είναι γνωστοί σαν ωοφόροι σωλήνες.

Ο αριθμός των ωοφόρων σωλήνων ποικίλει από έναν στις αφίδες μέχρι μερικές εκατοντάδες σε άλλα είδη. Καθένας απ' αυτούς που καλύπτεται από επιθηλιακά κύτταρα, καταλήγει σε ένα τελικό νημάτιο (γνωστό και σαν κρεμαστήρα σύνδεσμο). Μέσα στο σωλήνα βρίσκονται ωάρια όλων των σταδίων ανάπτυξης, από τα πολύ μικρά ωογόνια, τους μεγαλύτερους ωοκύτες, μέχρι τα ώριμα ωάρια. Η ανάπτυξη των ωαρίων κατά τη διάρκεια της ωογένεσης συντελείται περισσότερο με τη βοήθεια ειδικών θρεπτικών κυττάρων, των λεκιθογόνων ή, όταν αυτά δεν υπάρχουν, με θρεπτικά στοιχεία των κυττάρων από το επιθήλιο του τοιχώματος του ωοφόρου σωλήνα. Προς το τέλος της ωογένεσης το επιθήλιο σχηματίζει εγκολπώσεις έτσι ώστε να σχηματίζεται γύρω από κάθε ωοκύτη ένα καλυπτήριο θυλάκιο, το λεγόμενο ωοθυλάκιο. Αυτό, εκτός από το θρεπτικό του ρόλο, εκκρίνει και το εξωτερικό περίβλημα του ωαρίου το χόριο (κέλυφος του ωού). Η ανάγλυφη επιφάνεια του χορίου είναι ουσιαστικά το αποτύπωμα των επιθηλιακών κυττάρων. Στο ένα άκρο κάθε ωαρίου υπάρχει ένα άνοιγμα γνωστό σαν μικροπύλη μέσα από το οποίο εισέρχεται, το σπέρμα για να γίνει η γονιμοποίηση. Τα κάτω άκρα των ωοφόρων σωλήνων σχηματίζουν τον κάλυκα. Από το κάλυκα το ωάριο περνάει στο ζυγό ωαγωγό. Οι δύο ζυγοί ωαγωγοί ενώνονται σχηματίζοντας τον άζυγο ωαγωγό. Από αυτόν το ωάριο περνάει στον κόλπο, ο οποίος έχει άνοιγμα στον ωοθέτη.

Κατά την κάθοδο του από τον άζυγο ωαγωγό το ωάριο μπορεί να γονιμοποιηθεί από σπέρμα που βρίσκεται στη σπερματοθήκη. Κάποια έντομα, όπως οι βασίλισσες των μελισσών, ελέγχουν τη γονιμοποίηση των ωαρίων. Το σπέρμα είναι δυνατό να διατηρήσει τη ζωτικότητα του μέσα στη σπερματοθήκη για μεγάλο χρονικό διάστημα. Προσαρτημένος στη σπερματοθήκη είναι ο αδένας της σπερματοθήκης.

Σε χαμηλότερο σημείο του άζυγου ωαγωγού εκβάλλουν οι κολλητήριοι ή βοηθητικοί αδένες. Αυτοί εκκρίνουν ουσίες για κάλυψη των ωών ή για την προσκόλλησή τους σε υποστήριγμα. Η αποθήκευση των σπερματοζωαρίων σε ορισμένα έντομα, όπως στα ανώτερα Lepidoptera γίνεται σε ειδικό θύλακο οχείας (bursa copulatrix). Γενικά, υπάρχει ευρύτατη ποικιλία στα αναπαραγωγικά όργανα των θηλέων εντόμων, όπως στους αδένες, στους αγωγούς και στον αριθμό και το σχήμα των ωοφόρων σωλήνων.

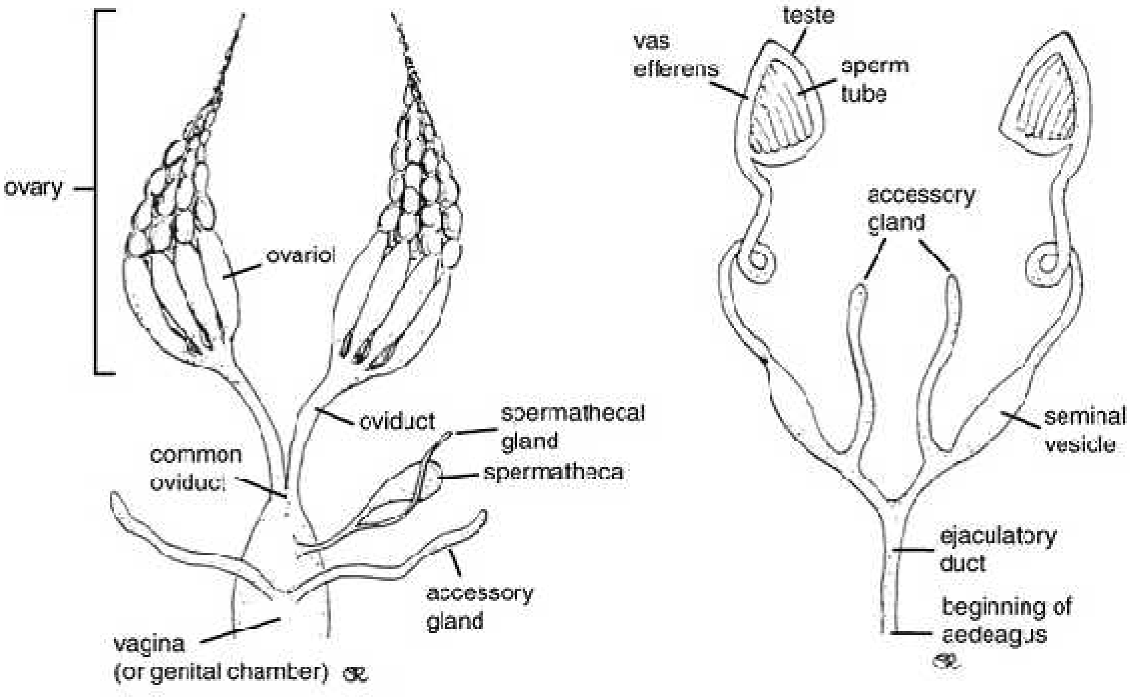
1.3.2 Το αρσενικό αναπαραγωγικό σύστημα

Η βασική δομή των αναπαραγωγικών οργάνων των αρρένων εντόμων είναι πολύ παρόμοια με αυτή των θηλέων. Οι όρχεις είναι τοποθετημένοι στο σώμα σε παρόμοιες θέσεις με τις ωοθήκες. Καθένας απ' αυτούς αποτελείται από τους τυφλούς σπερματοφόρους σωλήνες. Κάθε σωλήνας περιέχει γεννητικά κύτταρα σε όλα τα στάδια της ανάπτυξής τους, από σπερματογόνια, σε σπερματοκύτες, σε. σπερματίδια έως και τέλεια σπερματοζωάρια.

Κάθε όρχις έχει έξοδο σε έναν από τους ζυγούς εκσπερματοφόρους σωλήνες ή εκφορητικούς αγωγούς, (vasa deferentia). Αυτοί έχουν κατεύθυνση προς τα κάτω και πίσω και συνενούνται κάτω από τον πεπτικό σωλήνα για να σχηματίσουν τον άζυγο εκσπερματικό αγωγό. Σπερματοδόχες κύστες, για την αποθήκευση σπέρματος, είναι διογκώσεις των εκσπερματοφόρων σωλήνων.

Οι βοηθητικοί αδένες είναι προσαρτημένοι στο κάτω μέρος των εκσπερματοφόρων σωλήνων ή στον εκσπερματικό αγωγό. Εκκρίνουν ειδικό υγρό το οποίο συντελεί στη διατήρηση του σπέρματος σε ζωηρή και υγρή κατάσταση. Στο Κολεόπτερο *Lytta vesicatoria* το έκκριμα από τους αδένες αυτούς είναι πλούσιο σε ειδική διεγερτική ουσία, την κανθαριδίνη.

Ο άζυγος εκσπερματικός αγωγός καταλήγει στο όργανο οχείας, γνωστό σαν φαλλό ή αιδοιαγό.



Εικόνα 15. Το θηλυκό και αρσενικό αναπαραγωγικό σύστημα των εντόμων.

1.3.3 Η σύζευξη των εντόμων

Κατά τη σύζευξη τα δύο φύλα μπορεί να πάρουν διάφορες θέσεις (στάσεις). Σε ορισμένες περιπτώσεις μένουν ενωμένα μόνο με τα άκρα της κοιλίας έχοντας το σώμα και τα άκρα σε διαμετρικά αντίθετες κατευθύνσεις. Άλλοτε το άρρεν και το θήλυ βρίσκονται το ένα δίπλα στο άλλο με τις κεφαλές προς την ίδια κατεύθυνση, όπως π.χ. σε πολλά νυκτόβια, Lepidoptera.

Σε Coleoptera, Diptera κ.α. το άρρεν βρίσκεται στο νώτο του θήλεος ή αντίθετα (Diptera). Σε ορισμένα Coleoptera τα άρρενα είναι εφωδιασμένα με ισχυρότατες άνω γνάθους για να συγκρατούν σταθερά το θήλυ κατά τη διάρκεία της οχείας (π. χ. *Lucanus cervus*).

Πολύ ιδιόρρυθμος είναι ο τρόπος οχείας στα Odonata (υδροσταθμυλλίδες). Σε αυτά το όργανο οχείας του άρρενος βρίσκεται όχι στο άκρο αλλά στη βάση της κοιλίας, στο δεύτερο και τρίτο κοιλιακό τμήμα. Όταν πρόκειται να λάβει χώρα η οχεία το άρρεν συλλαμβάνει το θήλυ στον αέρα από το λαιμό με τη βοήθεια λαβίδας που βρίσκεται στο άκρο της κοιλίας του, και το παρασύρει στην πτήση του. Το θήλυ, μετά από λίγο, ανυψώνει το άκρο της κοιλίας του, όπου βρίσκεται και το γεννητικό του άνοιγμα, και το φέρει σε επαφή με τον αιδοιαγό του άρρενος, και έτσι γίνεται η γονιμοποίηση. Μετά το τέλος της ο θήλυ καταβροχθίζει το άρρεν.

Σε είδη Scolytidae στα Coleoptera, τα οποία ζουν μέσα στο ξύλο ή τον φλοιό δένδρων η οχεία γίνεται με τον εξής τρόπο: Το άρρεν βγαίνει από τη στοά, ενώ μένει μέσα σ’ αυτή το θήλυ. Το τελευταίο έρχεται προς το άνοιγμα της στοάς και προβάλλει προς τα έξω το άκρο της κοιλίας του όπου βρίσκεται και το γεννητικό του άνοιγμα. Στη στάση αυτή το άρρεν γονιμοποιεί το θήλυ.

Στα έντομα άλλα είδη είναι πολύγαμα και άλλα μονόγαμα. Η πολυγαμία ή η μονογαμία είναι δυνατό να αφορά ένα ή και δύο φύλα. Στο δάκο της ελιάς για παράδειγμα και τα δύο φύλα είναι πολύγαμα.

Ο αριθμός των συζεύξεων στη διάρκεια του βιολογικού κύκλου ποικίλει για τα διάφορα έντομα. Μπορεί να είναι μόνο μία ή περισσότερες. Σε κάθε σύζευξη ένας μεγάλος αριθμός σπερματοζωαρίων διοχετεύεται από το άρρεν στο θήλυ. Αυτά αποθηκεύονται αρχικά στη σπερματοθήκη ή στο θύλακο οχείας αν υπάρχει.

Η παραπέρα χρήση τους ρυθμίζεται κατά βούληση από το θήλυ έτσι ώστε είτε να μη γονιμοποιούνται ορισμένα ωάρια είτε όταν ένα ωάριο περνάει μπροστά από την έξοδο της σπερματοθήκης να απελευθερώνεται μόνο μικρός αριθμός σπερματοζωαρίων. Με τον τρόπο αυτό δεν είναι απαραίτητη η σύζευξη για κάθε γονιμοποίηση ωαρίου (π.χ. στη βασίλισσα των μελισσών).

Η σύζευξη των δύο φύλλων παρακινείται από ποικίλα ερεθίσματα, όπως ιδιόρρυθμες κινήσεις του άρρενος, διακριτικοί ήχοι (π.χ. στις ακρίδες και στους γρύλους), ειδικοί χρωματισμοί και διάφορες σεξουαλικές οσμές που προέρχονται από εκκρίματα βοηθητικών αδένων (φερομόνες).

Η ωριμότητα των γεννητικών οργάνων (γονάδων) και στα δυο φύλλα δεν φαίνεται να έχει ιδιαίτερη επίδραση στη σεξουαλική παρόρμηση για σύζευξη. Έχουν παρατηρηθεί συζεύξεις σε έντομα στα οποία το θηλυκό είχε τελείως άωρες ωοθήκες, ενώ σε άλλες περιπτώσεις τα άρρενα είχαν προηγουμένως ευνουχισθεί.

1.3.4 Έλεγχος της αναπαραγωγής

Η έναρξη και η λήξη της αναπαραγωγικής περιόδου στα έντομα εξαρτάται συχνά από περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως η θερμοκρασία, η υγρασία, η φωτοπερίοδος, καθώς και από την ύπαρξη η μη ενός κατάλληλου ωοτόκιου χώρου. Επιπροσθέτως, οι εξωτερικές επιδράσεις μπορούν να τροποποιηθούν με διάφορους εσωτερικούς παράγοντες όπως η διατροφική κατάσταση και η ωρίμανση των ωοκυττάρων. Το ζευγάρωμα των εντόμων μπορεί επίσης να πυροδοτήσει την ωρίμανση των ωαρίων, την ωοτοκία ή ακόμα και την αναστολή της σεξουαλικής δεκτικότητας του θηλυκού ατόμου μέσω ενζύμων ή πεπτιδίων που μεταφέρονται στο αναπαραγωγική οδό των θηλυκών από τους αδένες των αρσενικών ατόμων.

Η ρύθμιση της αναπαραγωγής είναι μία πολύπλοκη διαδικασία η οποία περιλαμβάνει αισθητήριους υποδοχείς, διαβιβαστές νευρώνων, καθώς και χημικούς αγγελιοφόρους (ορμόνες) που μεταφέρονται στην αιμολέμφο ή μέσω των νευραξόνων στους νευρικούς ιστούς και σε διάφορους ενδοκρινείς αδένες. Συγκεκριμένα κύτταρα του νευρικού συστήματος, τα νευροεκκριτικά κύτταρα του εγκεφάλου, παράγουν νευροορμόνες ή νευροπεπτίδια που ελέγχουν τη σύνθεση των δύο βασικότερων ομάδων ορμονών των εντόμων, τα εκδυστεροειδή και τις ορμόνες νεότητας (JH). Τα νευροπεπτίδια, οι στεροειδείς ορμόνες, καθώς και οι ορμόνες νεότητας (JH) παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της αναπαραγωγής.

Οι ορμόνες νεότητας και τα εκδυστεροειδή παίζουν σημαντικό ρόλο στην αναπαραγωγή, με τις ορμόνες νεότητας να πυροδοτούν τη λειτουργία σημαντικών οργάνων των εντόμων, όπως οι ωοθήκες και οι βοηθητικοί αδένες και τα εκδυστεροειδή να επηρεάζουν την μορφογένεση και την λειτουργικότητα των γονάδων.

Τα νευροπεπτίδια παίζουν διαφορετικούς ρόλους στα διάφορα στάδια της αναπαραγωγής, ρυθμίζοντας την λειτουργία των ενδοκρινών αδένων (μέσω των corpora allata και των προθωρακικών αδένων) και επίσης, επηρεάζοντας άμεσα την αναπαραγωγή, μέσω της ωορρηξία και της ωοτοκίας. Ο ρόλος των νευροπεπτιδίων δεν έχει μελετηθεί ακόμα επαρκώς.

1.4 Ξενοοιστρογόνα και ενδοκρινικοί διαταρακτές

Τα **ξενοοιστρογόνα** είναι «ξένα» οιστρογόνα που χρησιμοποιούνται ευρέως σε βιομηχανικές ενώσεις, όπως τα PCB, η BPA και οι φθαλικές ενώσεις, έχουν οιστρογονικές συνέπειες στους ζωντανούς οργανισμούς, ακόμη κι αν διαφέρουν χημικά από τα φυσικά οιστρογόνα που παράγονται από το ενδοκρινικό σύστημα του οργανισμού. Οι πιθανές επιπτώσεις της δράσης τους τόσο στο περιβάλλον όσο και στην ανθρώπινη υγεία, βρίσκεται υπό εκτεταμένη μελέτη από πολλά επιστημονικά ιδρύματα και ανεξάρτητους ερευνητές. Ετυμολογικά η λέξη προέρχεται από τις ελληνικές λέξεις ξένο, οἶστρος και γόνο (γονίδιο, που σημαίνει "για τη δημιουργία") και κυριολεκτικά σημαίνει «ξένα οιστρογόνα». Τα ξενοοιστρογόνα συχνά ονομάζονται και **ενδοκρινικοί διαταρακτές** καθώς επηρεάζουν βασικές λειτουργίες του ενδοκρινολογικού συστήματος των διάφορων οργανισμών (Hahn et al., 2002).

Σε βιοχημικό επίπεδο τα ξενοοιστρογόνα μιμούνται τα φυσικά οιστρογόνα του οργανισμού επηρεάζοντας όλες τις λειτουργίες και τα βιολογικά μονοπάτια που εμπλέκονται οι φυσιολογικά παραγόμενες ορμόνες. Η δράση τους έχει ενοχοποιηθεί ότι εμπλέκεται σε πολλά προβλήματα υγείας και τα τελευταία 10 χρόνια οι έρευνες για τις σοβαρές επιπτώσεις των ξενοοιστρογόνων έχουν πολλαπλασιαστεί. Έχουν παρουσιαστεί αρκετές έρευνες που αποδεικνύουν τις επιπτώσεις των ενδοκρινικών διαταρακτών στην ορθή ανάπτυξη των οργανισμών, επηρεάζοντας την ανάπτυξη του εγκεφάλου ή την μεταβίβαση από την μία αναπτυξιακή φάση στην άλλη (στα έντομα αυτό αναφέρεται στην μεταμόρφωση από το στάδιο της προνύμφης στο ακμαίο) , καθώς και την διαχώριση των φύλλων και το στάδιο της αναπαραγωγής (Crain et al., 2007).

Όλες οι βιολογικές διεργασίες του οργανισμού και οι διαφορετικές φάσεις ανάπτυξης ελέγχονται και καθορίζονται από ορμόνες, ένα ξενοοιστρογόνο μπορεί να εκτροχιάσει το ενδοκρινικό σύστημα του οργανισμού αυξάνοντας την συγκέντρωση ορμονών που φυσιολογικά δεν θα παράγονταν ή θα υπήρχαν σε χαμηλά επίπεδα. Η κρίσιμη περίοδος ανάπτυξης για τους περισσότερους οργανισμούς είναι μεταξύ της μετάβασης από το γονιμοποιημένο ωάριο, σε ένα πλήρως διαμορφωμένο έμβρυο (Crain et al., 2007). Καθώς τα κύτταρα αρχίζουν να αυξάνονται και να διαφοροποιούνται, υπάρχουν κρίσιμες ισορροπίες στις συγκεντρώσεις των ορμονών και των υπόλοιπων πρωτεϊνών. Ως εκ τούτου, μια διαταραχή στην συγκέντρωσή τους λόγω της ύπαρξης ξενοοιστρογόνου στον οργανισμό μπορεί να επιφέρει σημαντική ζημιά σε ένα αναπτυσσόμενο έμβρυο.

Ανάλογα με το στάδιο της ανάπτυξης, παρεμβολή με ορμόνες σε μη φυσιολογικές συγκεντρώσεις μπορεί να οδηγήσει σε σοβαρές και μη αναστρέψιμες επιπτώσεις που ανάλογης βαρύτητας δεν συναντάται σε ενήλικες που εκτίθενται στην ίδια δόση για το ίδιο χρονικό διάστημα. Πειράματα με ζώα έχουν αποδείξει ότι κρίσιμα αναπτυξιακά στάδια είναι η διάρκεια που το έμβρυο βρίσκεται στη μήτρα καθώς και μερικές ημέρες μετά τη γέννηση όταν η έκθεση σε χημικές ουσίες που παρεμβαίνουν ή μιμούνται τις φυσικές ορμόνες έχουν δυσμενείς επιπτώσεις που εξακολουθούν να υπάρχουν και στην ενήλικη ζωή. Για παράδειγμα η διακοπή της λειτουργίας του θυρεοειδούς στα πρώτα στάδια της ανάπτυξης του ατόμου μπορεί να είναι αιτία ανώμαλης σεξουαλικής ανάπτυξης και στους άνδρες και στις γυναίκες, προβλημάτων στην κίνηση καθώς και μαθησιακές δυσκολίες (Iwamuro et al., 2006).

Καθώς τα στοιχεία ενδοκρινικής διαταραχής περιλαμβάνονται σε ποικιλία χημικών ουσιών μπορεί να βρίσκονται σε φάρμακα, παρασιτοκτόνα, ενώσεις που χρησιμοποιούνται στην βιομηχανία πλαστικών και σε ευρέως διαδεδομένα καταναλωτικά προϊόντα. Μερικές από τις ουσίες αυτές μπορεί να διαφύγουν μέσω των ρύπων ή της μόλυνσης στο περιβάλλον όπου και μπορεί να βιοσυσσωρεύονται. Άλλες αποδομούνται ταχέως στο περιβάλλον ή στο ανθρώπινο σώμα πολλαπλασιάζοντας προβλήματα υγείας όπως προβλήματα αναπαραγωγής (μειωμένη γονιμότητα ανδρών και γυναικών, αναπαραγωγικές ανωμαλίες του ουροποιητικού, απώλεια του εμβρύου, προβλήματα εμμήνου ρύσεως), αλλαγές στα φυσιολογικά επίπεδα των ορμονών, πρόωρη εφηβεία, προβλήματα στην ανάπτυξη του εγκεφάλου, διαταραχή του ανοσοποιητικού συστήματος καθώς και αύξηση της εμφάνισης διαφόρων μορφών καρκίνου (Crain et al., 2007). Οι ορμόνες δρουν σε πολύ μικρές δόσεις. Μία ενδοκρινική διαταραχή μπορεί να εμφανιστεί ως εκ τούτου από έκθεση σε χαμηλή δόση εξωγενούς ορμόνης ή ορμονική δράση χημικών ουσιών που μπορούν να αλληλεπιδράσουν με υποδοχείς άλλων ορμονικά σχετιζόμενων διαδικασιών. Επιπλέον, εφόσον οι ενδογενείς ορμόνες είναι ήδη παρούσες στο σώμα σε σταθερές συγκεντρώσεις, επιπλέον έκθεση σε σχετικά μικρές ποσότητες εξωγενών ορμονών μπορούν να θίξουν την εύρυθμη λειτουργία του ενδοκρινικού συστήματος του οργανισμού. Έτσι, ένας ενδοκρινικός διαταρακτής μπορεί να επιφέρει ανεπιθύμητα αποτελέσματα σε πολύ χαμηλότερες δόσεις απ’ ότι δρα ένας τοξικός παράγοντας, ενεργώντας μέσω διαφορετικού μηχανισμού (Welshons et al., 2006).

Υπάρχουν μελέτες από καλλιέργειες κυττάρων, δοκιμές σε πειραματόζωα και κλινικές μελέτες ανθρώπων που εκτέθηκαν κατά λάθος σε χημικές ουσίες που αποδεικνύουν ότι επηρεάζεται ένα ευρύ φάσμα της αναπαραγωγής και της ανάπτυξης (Taenzler et al., 2007).

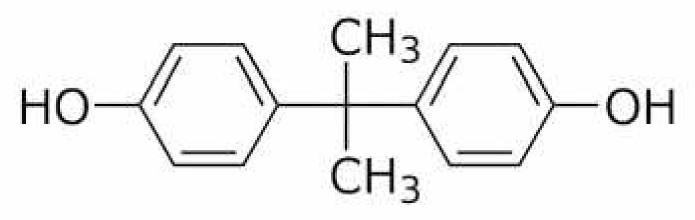
1.4.1 Δισφαινόλη Α (Bisphenol -A)

Η δισφαινόλη Α είναι μία χημική ένωση που χρησιμοποιείται στην παραγωγή των πολυκαρβονικών πλαστικών (PC polycarbonates) και των εποξυ-ρητινών (epoxyresins). Από τις πολυκαρβονικές ενώσεις παράγεται το ελαφρύ, σκληρό και χρωματιστό πλαστικό που χρησιμοποιείται σε πιάτα, ποτήρια, μπουκάλια, μαχαιροπήρουνα, cd, dvd, ηλεκτρονικό εξοπλισμό (π.χ. ξυπνητήρια, ηλεκτρονικούς υπολογιστές, ραδιόφωνα), αθλητικό εξοπλισμό (π.χ. παπούτσια, ακόντια, προστατευτικά κράνη), εξοπλισμό αυτοκινήτων (π.χ. φώτα, προφυλακτήρες), ιατρικές συσκευές και οδοντιατρικά σφραγίσματα (Cousins et al., 2002).

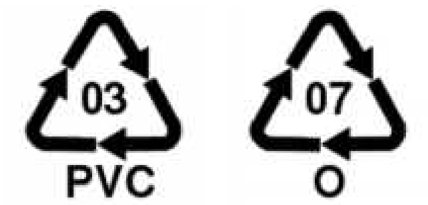
Ως ξενοοιστρογόνο η δισφαινόλη μιμείται την δράση των φυσικών οιστρογόνων αλληλεπιδρώντας με ορμονικούς υποδοχείς (Kang et al., 2007) Τα ξενοοιστρογόνα δρούν συνδεόμενα με τους υποδοχείς των οιστρογόνων (ERs) ή τους SXRs (steroid xenobiotics receptors), συγκεντρώνονται σε όλα τα βιολογικά υγρά (ωοθυλακικό, γάλα, σπερματικό πλάσμα, τραχηλική βλέννη), οι μεταβολίτες τους παραμένουν επί μακρόν στον οργανισμό λόγω αποθήκευσης στον λιπώδη ιστό, έχουν ανταγωνιστική δράση στον υποδοχέα των ανδρογόνων (DDT), οιστρογονική (όπως το κάδμιο) ή αντι-οιστρογονική δράση στον υποδοχέα των οιστρογόνων (PCBs) και αλλάζουν την δραστηριότητα των θυρεοειδικών ορμονών (T3, T4), οι οποίες είναι απαραίτητες για την ανάπτυξη του νευρικού συστήματος του εμβρύου. Επιπροσθέτως, δεν συνδέονται με την αFP που προστατεύει το έμβρυο από τα οιστρογόνα της μητέρας, προκαλούν γονοτοξικότητα, προκαλούν μεθυλίωση – απομεθυλίωση του DNA, με αποτέλεσμα αλλαγή της έκφρασης των γονιδίων, δρούν σε ένζυμα και τέλος είναι γνωστό ότι η υδροξυλίωση ενός οιστρογόνου αλλάζει με απρόβλεπτο τρόπο την σύνδεση με τον υποδοχέα του (O'Connor and Chapin, 2003).

Πολύ μικρές ποσότητες δισφαινόλης Α μπορούν να περάσουν από ένα πλαστικό δοχείο που έχει ζεσταθεί σε υψηλή θερμοκρασία στα τρόφιμα που περιλαμβάνει, παραδείγματος χάριν στο γάλα που περιέχουν τα μπιμπερό. Κατά τη διάρκεια των πρώτων έξι μηνών της ζωής του το βρέφος είναι αυτό που εκτίθεται περισσότερο στη δισφαινόλη Α, κυρίως αν το γάλα από μπιμπερό είναι η μόνη πηγή διατροφής του (Cousins et al., 2002).

Ενώ η πηγή για την ανθρώπινη έκθεση στην δισφαινόλη είναι τα δοχεία αποθήκευσης τροφίμων και υγρών, η BPA απελευθερώνεται στο περιβάλλον είτε μέσω της επεξεργασίας λυμάτων και υγρών αποβλήτων είτε μετά από φυσική αποδόμηση των πολυανθρακικών πλαστικών. Τα όρια της περιβαλλοντικής μόλυνσης από την δισφαινόλη δεν είναι ακόμη γνωστά καθώς δημοσιεύονται συνεχώς καινούρια πειραματικά αποτελέσματα τόσο για την συγκέντρωσή της σε λίμνες και έδαφος όσο και για τον βαθμό επικινδυνότητάς της για τους ζωικούς οργανισμούς και την διατήρηση της βιοποικιλότητάς τους (Kang et al., 2007).



Εικόνα 16. Χημική δομή της Δισφαινόλης Α (BPA).



Εικόνα 17. Πλαστικά τα οποία περιέχουν τα παραπάνω σήματα πιθανόν να περιέχουν δισφαινόλη, η οποία μπορεί να διαρρεύσει στα υγρά ή στερεά τρόφιμα που περιέχονται μέσα σε αυτά.

1.4.2 Επίδραση της Δισφαινόλης Α στους οργανισμούς των οικοσυστημάτων

Από έρευνες έχει βρεθεί ότι οι συγκεντρώσεις της δισφαινόλης σε ποτάμια και λίμνες κυμαίνονται από 0,1μg/L έως και 21μg/L. Εργαστηριακά στους οργανισμούς μοντέλα που έχει ερευνηθεί η δισφαινόλη, τα επίπεδα των συγκεντρώσεών της κυμαίνονται από 0,1μg/L έως και 100μg/L ανάλογα με τον υπό μελέτη οργανισμό (Kang et al., 2007).

Η δισφαινόλη μιμείται τη βιολογική λειτουργία της φυσικά παραγόμενης ορμόνης της έκδυσης, αλληλεπιδρώντας με τους υποδοχείς των εκδυστεροειδών (Dhadialla et al 1998, Smagghe et al 2004). Οι ανταγωνιστές της εκδυσόνης είναι εξαιρετικά επιλεκτικοί με τα έντομα της οικογένειας των λεπιδοπτέρων, με αποτέλεσμα άτομα άλλων οικογενειών να επηρεάζονται λιγότερα από αυτούς (Silhacek et al.,1990, Schneider et al., 2003, 2008).

Λαμβάνοντας υπ’ όψιν ότι οι υψηλές συγκεντρώσεις BPA επηρεάζουν τον προσδιορισμό του φύλου σε ορισμένα ψάρια (zebrafish, D. Rerio), αμφίβια (Xenopus laevis, Rana nigromaculata), ερπετά και πτηνά οι χαμηλότερες συγκεντρώσεις προκαλούν είτε αλλοιώσεις στην έκφραση των γονιδίων και στα αναπτυξιακά και αναπαραγωγικά τους στάδια, είτε φαινοτυπικές δυσμορφίες Στα ασπόνδυλα οι δημοσιευμένες έρευνες είναι λιγότερες και το εύρος της επιρροής μετά από την επίδραση της δισφαινόλης δεν είναι ακόμη διαπιστωμένο (Segner et al., 2003).

Από μελέτη στο έντομο Porcellio scaber μετά από έκθεση σε μικρές και μεγάλες συγκεντρώσεις δισφαινόλης επηρεάζεται η αναπαραγωγή και το ποσοστό αποβολών (Lemos et al., 2010).

Η έρευνα της επίδρασης της δισφαινόλης στους οργανισμούς είναι πολύ σημαντική για την κατανόηση των μηχανισμών δράσης της όπως και τον βαθμό επικινδυνότητάς της για την διατήρηση της ισορροπίας της βιοποικιλότητας σε ευπαθείς οργανισμούς, όπως τα έντομα (Cousins et al., 2002).

Στην D. magna, έκθεση των προνυμφών σε συγκεντρώσεις δισφαινόλης για μεγάλο χρονικό διάστημα, επηρεάζει την ανάπτυξη των προνυμφικών σταδίων (Brennan et al. 2006), την έκδυση και την αναπαραγωγή (Mu et al. 2005).

Έρευνες στα A. tonsa και Tigriopus japonicus απέδειξαν την επίδραση της δισφαινόλης στα αναπτυξιακά στάδια (Andersen et al. 2001; Marcial et al. 2003), ανεξαρτήτου συγκεντρώσεως. Επίδραση της δισφαινόλης παρατηρήθηκε και στην ωοπαραγωγή του A. Tonsa (Andersen et al., 1999), που πιθανώς να υποδηλώνει υψηλότερο ρυθμό ανάπτυξης από τα πρώτα στάδια της ζωής των οργανισμών. Επιπροσθέτως, τα θηλυκά έντομα που προήλθαν από εκτεθειμένα σε δισφαινόλη ενήλικα άτομα, παρουσίασαν σημαντικά μειωμένο ρυθμό εκκόλαψης. Η θνησιμότητα στα έντομα της δεύτερης γενιάς εντόμων ήταν ιδιαίτερα αυξημένη συγκριτικά με τα control έντομα. Αυτά τα αποτελέσματα υποδεικνύουν μία μητρική μεταβίβαση της BPA εντός των αναπτυσσόμενων αυγών και / ή μία διακοπή ισχύος κατά την ωογένεση.

Σε μελέτες του C. Riparius, έκθεση σε συγκεντρώσεις δισφαινόλης είχε ως αποτέλεσμα την καθυστερημένη εκκόλαψη της δεύτερης γενιάς εντόμων (Watts et al. 2001). Στο Gammarus fossarum, έκθεση σε συγκεντρώσεις δισφαινόλης επηρέασε τα επίπεδα των HSP γονιδίων. Σε αυτή την μελέτη, έκθεση των ατόμων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις δισφαινόλης οδήγησε σε επιταχυνόμενη ωρίμανση των ωοκυττάρων, μείωσε τον αριθμό των απογόνων που εκκολάπτονται και οδήγησε σε μειωμένα επίπεδα των HSP γονιδίων.

Σε κυτταρικές σειρές του εντόμου D. melanogaster, βρέθηκε ότι η δισφαινόλη σε υψηλές συγκεντρώσεις, δρα ως εκδυστεροειδικός ανταγωνιστής (Dinan et al. 2001).

Σε μελέτες που συνδυάζεται η έκθεση των οργανισμών σε συγκεντρώσεις δισφαινόλης και άλλων χημικών ενδοκρινικών διαταρακτών, αποδείχθηκε ότι επηρεάζεται η εμβρυική ανάπτυξη και ο αριθμός των απογόνων στις επόμενες γενιές (Mu et al., 2005, Wang et al., 2005). Μελέτες σε υδρόβια αρθρόποδα, καταδεικνύουν ότι η έκθεση των οργανσμών σε BPA φαίνεται να παρεμβαίνει στην ομοιόσταση του οργανισμού, μεταβάλλοντας την συγκέντρωση των φυσικών ορμονών στην αιμολέμφο. Η μεταβολή αυτή μπορεί να επηρεάζει την έκφραση των HSP γονιδίων και / ή μέσω παρεμβολής με τον υποδοχέα της εκδυσόνης, προκαλώντας δυσμενείς επιδράσεις στους οργανισμούς.

Υπάρχουν αρκετές μελέτες σχετικά με τις επιδράσεις των εκδυστεροειδικών ανταγωνιστών σε προνύμφες και ενήλικα άτομα εντόμων. Τα αποτελέσματα των μελετών περιλαμβάνουν καθυστερήσεις ή επιτάχυνση της ανάπτυξης (Adel & Sehnal 2000, Biddinger et al 2006), απώλεια βάρους τόσο σε προνύμφες όσο και σε νύμφες εντόμων (Pineda et al 2007, Ζαμόρα et al 2008), θνησιμότητα και φαινοτυπικές δυσμορφίες σε νύμφες (Gobbi et al 2000, Pineda et al 2004), δυσμορφίες στα φτερά ενήλικων ατόμων (Trisyono & Chippendale 1998, Sundaram et al 2002), διαταραχή της διάπαυσης (Eizaguirre et al 2007), μειωμένη αναπαραγωγική ικανότητα (Seth et al 2004, Smagghe et al 2004) καθώς και αλλαγές στην αναλογία του φύλου (Biddinger et al 2006).

1.5 Πρωτεΐνες καταπόνησης

Κατά την διάρκεια της εξέλιξης οι πρόγονοι των σημερινών οργανισμών απέκτησαν διάφορους μηχανισμούς προσαρμοστικότητας ώστε να ανταπεξέλθουν στις ξαφνικές περιβαλλοντικές μεταβολές. Η ικανότητά τους να αντιδρούν άμεσα σε ένα εύρος περιβαλλοντικών αλλαγών ήταν από τους σημαντικότερους μηχανισμούς που καθόρισαν την επιτυχή εξάπλωση των ειδών. Η εγκατάσταση δηλαδή ενός δικτύου αλληλένδετων κυτταρικών συστημάτων ανταπόκρισης σε καταπονήσεις ήταν προαπαιτούμενο για την επιβίωση.

Η μελέτη της μοριακής βάσης της ανταπόκρισης σε παράγοντες καταπόνησης ξεκίνησε τυχαία, όταν ανακαλύφθηκε από τον αναπτυξιακό βιολόγο F. Ritossa το 1962, ότι ακόμα και ολιγόλεπτη αύξηση της θερμοκρασίας προκαλεί μεταβολές στο πρωτεϊνικό πρότυπο της νύμφης, στα πολυταινικά χρωμοσώματα της *Drosophila*. Ακολούθως αποδείχθηκε ότι η θερμική καταπόνηση προκαλεί μεταβολές στο πρωτεϊνικό πρότυπο στα κύτταρα της *Drosophila* και ανάλογες μεταβολές παρατηρήθηκαν και σε φυτικούς οργανισμούς, ενώ λεπτομερειακές πληροφορίες για τη μοριακή και βιοχημική πλευρά των θερμοεπαγώμενων πρωτεϊνών (HSP, Heat Shock Protein) αποτέλεσαν το θέμα πολλών δημοσιεύσεων.

Οι πρωτεΐνες καταπόνησης (heat shock proteins), αποτελούν μία ομάδα συντηρητικών πρωτεϊνών, οι οποίες ενεργοποιούνται σε σχέση με κάποια περιβαλλοντική καταπόνηση. Οι ακραίες περιβαλλοντικές αλλαγές δημιουργούν κάποια μορφή πίεσης ή στρες στα κύτταρα δοκιμάζοντας τις κανονικές και φυσιολογικές διαδικασίες ανάπτυξης και αύξησης του οργανισμού. Οι οργανισμοί αντιπαρέρχονται τις συνθήκες αυτές, αξιοποιώντας τη δυναμική έκφραση εξειδικευμένων γονιδίων. Οι πρωτεΐνες καταπόνησης βρίσκονται σε ικανοποιητικές συγκεντρώσεις μέσα στα κύτταρα υπό κανονικές συνθήκες και επάγονται σε συγκεκριμένα αναπτυξιακά στάδια. (Kreget et al., 2002).

Οι πιο εκτενώς χαρακτηρισμένες πρωτεΐνες καταπόνησης είναι οι θερμοεπαγώμενες πρωτεΐνες και ειδικότερα στη *Drosophila,* στο *Saccharomyces cerevisiae* και στο *E. coli*. Οι Hsp πρωτεΐνες κωδικοποιούνται κυρίως στα πυρηνικά γονίδια αλλά εντοπίζονται σε διάφορα κυτταρικά διαμερίσματα όπως το κυτταρόπλασμα, τα μιτοχόνδρια, τους χλωροπλάστες, τα υπεροξυσώματα και το ενδοπλασματικό δίκτυο. Γενικά οι hsp's κατηγοριοποιούνται σε δύο κατηγορίες, αυτές που εκφράζονται συστατικά (heat shock cognates) και αυτές που η έκφρασή τους επάγεται κάτω από συνθήκες καταπόνησης. Εκτός από τη θερμική καταπόνηση, ένας μεγάλος αριθμός χημικών παραγόντων όπως και διάφορες παθολογικές καταστάσεις, προκαλούν την ενεργοποίηση των θερμοεπαγώμενων γονιδίων. Είναι επίσης πολύ πιθανό το σύστημα αντίληψης της καταπόνησης σε κυτταρικό επίπεδο να είναι η απόκλιση από την πρωτεϊνική ομοιόσταση, δηλαδή το ισοζύγιο μεταξύ της νέας σύνθεσης, της πρωτεϊνικής αναδίπλωσης, του ενδοκυτταρικού προορισμού της βιολογικής λειτουργίας και της πρωτεϊνικής αποδόμησης (Parsell, 1993).

Ένας άλλος ρόλος των θερμοεπαγώμενων πρωτεϊνών είναι η ιδιότητα των μοριακών συνοδών (molecular chaperones) που είναι απαραίτητοι για την διατήρηση ή την αντικατάσταση της πρωτεϊνικής ομοιόστασης. Οι μοριακοί συνοδοί (τσαπερόνια), συνιστούν εξεζητημένους κυτταρικούς μηχανισμούς, παρόντες σε όλη τη διάρκεια της εξέλιξης προκαρυωτών και ευκαρυωτών. Τα τσαπερόνια υποστηρίζουν διάφορα στάδια της πρωτεϊνικής ομοιόστασης, όπως η πρωτεϊνική αναδίπλωση που αποτελεί την σημαντικότερη βιολογική διαδικασία, καθώς έχει σαν αποτέλεσμα την τριτοταγή δομή, η οποία είναι υπεύθυνη για συγκεκριμένες ιδιότητες και βιολογικές δράσεις των πρωτεϊνικών μορίων. Όταν η αναδίπλωση δεν γίνει σωστά και εφόσον υπάρχουν εναλλακτικοί συνδυασμοί αλληλεπιδράσεων, μια πρωτεΐνη μπορεί να παγιδευτεί σε μια σταθερή στερεοδιαμόρφωση, η οποία όμως δεν αντιστοιχεί στη σωστή τελική μορφή. Οι πρωτεΐνες που ανήκουν σε αυτή την κατηγορία δεν μπορούν να αυτο-συναρμολογηθούν. Για να αποκτήσουν σωστή τριτοταγή δομή, χρειάζονται τη βοήθεια ενός μοριακού συνοδού. Αυτό επιτυγχάνεται με το να προσδένονται στις ενεργές επιφάνειες της πρωτεΐνης-στόχου, οι οποίες είναι εκτεθειμένες κατά τη διαδικασία αναδίπλωσης, και να εμποδίζουν τις αλληλεπιδράσεις με άλλες περιοχές της πρωτεΐνης που οδηγούν σε λανθασμένες στερεοδιαμορφώσεις.

Οι μοριακοί συνοδοί λειτουργούν περισσότερο αποτρέποντας το σχηματισμό λανθασμένης τριτοταγής δομής, παρά προωθώντας το σχηματισμό της σωστής δομής (Hartl et al., 2002).

Μια λανθασμένη δομή μπορεί να σχηματιστεί είτε από κακή αναδίπλωση μιας μόνο πρωτεΐνης είτε μέσω αλληλεπιδράσεων με μια άλλη πρωτεΐνη. Η υψηλή συγκέντρωση των πρωτεϊνών στο κύτταρο προκαλεί συνθήκες «μακρομοριακού συνωστισμού» (macromolecular crowding), που μπορεί να αυξήσουν την απόδοση πολλών αντιδράσεων σε σύγκριση με τις ταχύτητες που παρατηρούνται in vitro. Συνεπώς, ένας ακόμα ρόλος των μοριακών συνοδών είναι να προστατεύουν μία πρωτεΐνη, έτσι ώστε να αναδιπλώνεται χωρίς να επηρεάζεται αρνητικά από τις συνθήκες συνωστισμού στο κύτταρο (Lindquist, 1986)

Η ανάγκη για μοριακά τσαπερόνια προκύπτει από το γεγονός ότι στο κύτταρο, το δίπλωμα των πρωτεϊνών πρέπει να γίνει υπό την παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων πολυπεπτιδιακών αλυσίδων εν τω γεννάστε και σε πολύ υψηλή συγκέντρωση ολικής πρωτεΐνης. Παράλληλα κατά τη διάρκεια της μετάφρασης ή της μεταφοράς σε κάποια μεμβράνη, τα νεοσυντιθέμενα πολυπεπτίδια έχουν περιορισμένη δυνατότητα να διπλώσουν και εκτίθενται ως μη διπλωμένες αλυσίδες στο κυτταρικό περιβάλλον για μεγάλες περιόδους (Hartl et al., 2002).

Τα τσαπερόνια αλληλεπιδρούν με ένα μεγάλο αριθμό διαφορετικών πολυπεπτιδίων και δρουν παρεμποδίζοντας μη παραγωγικές ενδομοριακές αλλά και μεταξύ διαφορετικών μορίων αλληλεπιδράσεις, καθιστώντας έτσι ικανό το μη διπλωμένο πολυπεπτίδιο να φτάσει στην προκαθορισμένη δομή του, που προσδιορίζεται από την αμινοξική του αλληλουχία.

Πιθανώς, όλες οι κυτταρικές πρωτεΐνες πρέπει να αλληλεπιδρούν με μοριακά τσαπερόνια, τουλάχιστον μια φορά κατά τη διάρκεια της ύπαρξης τους, είτε κατά την σύνθεσή τους, τη μεταφορά τους σε κάποιο υποκυτταρικό διαμέρισμα είτε κατά την αποδόμησή τους (Denlingeret et al., 2001)

1.5.1 Οικογένειες θερμοεπαγώμενων πρωτεϊνών και ο ρόλος τους στον οργανισμό των εντόμων

Οι θερμοεπαγώμενες πρωτεΐνες ομαδοποιούνται σε 3 κατηγορίες ανάλογα με το μοριακό τους βάρος: 90kDa ή HSP90, 70kDa ή HSP70, και τις μικρές θερμοεπαγώμενες πρωτεΐνες που κυμαίνονται από 15 έως 40kDa (sHSPs).

Μεγάλη προσοχή έχει δοθεί στη μελέτη των **Hsp90** που θεωρείται ότι είναι ένα χρήσιμο σύστημα για την κατανόηση της κυτταρικής απόκρισης στα περιβαλλοντικά σινιάλα διαμεταγώγησης του σήματος, καθώς και στο φυσιολογικό status quo του κυττάρου. Οι πρωτεΐνες αυτές είναι από τις πιο άφθονες κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες και σε ποσοστιαία αναλογία είναι το 1% των διαλυτών πρωτεϊνών ακόμη και απουσία του στρες (Chen et al., 2006).

Έχει αποδειχθεί ότι οι πρωτεΐνες αυτές προκαθορίζουν το μορφογενετικό μονοπάτι και αποτελούν μία συσκευή αποτύπωσης και αποτροπής κρυφών μεταλλάξεων σε υψηλές θερμοκρασίες. Μέλη της οικογένειας hsp90 εντοπίζονται κυρίως στο κυτταρόπλασμα, μα έχουν επίσης ανιχνευθεί και σε άλλα οργανίδια (Young et al., 2001).

Εκτός από το θερμικό στρες υπάρχουν και άλλοι παράγοντες που φαίνεται ότι επηρεάζουν την έκφραση των γονιδίων hsp90 όπως τα βαρέα μέταλλα, χημικά ανάλογα αμινοξέων, ανοξία κτλ. Σε κανονικές συνθήκες η hsp90 αλληλεπιδρά με ένα πλήθος ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών (όπως διάφορες κινάσες, ακτίνη, σωληνίνη κτλ) καθώς και με υποδοχείς στεροειδών ορμονών. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι η πρωτεΐνη αυτή έχει ένα γενικό ρόλο στη φυσιολογία του κυττάρου. Της έχει αποδοθεί επίσης ο ρόλος του τσαπερονίου, σε ένα δυναμικό και πολυλειτουργικό μηχανισμό που επεκτείνει τα όρια του πέρα από την πρωτεϊνική αναδίπλωση μέσα στο κύτταρο (Young et al., 2001).

Πολλά πειραματικά δεδομένα υποδεικνύουν τη συμμετοχή των **Hsp70** σε μια πληθώρα κυτταρικών λειτουργιών. Οι Hsp70 αλληλεπιδρούν με πολυπεπτίδια εν τω γεννάστε και με πρωτεϊνικές υπομονάδες που βρίσκονται στη διαδικασία συναρμολόγησης ή αποσυναρμολόγησης του συμπλόκου στο οποίο συμμετέχουν. Παρ’ όλο που έχουν παρόμοια γενική δράση, υπάρχουν μέλη που εντοπίζονται σε διάφορα κυτταρικά οργανίδια όπου εξειδικευμένα και τοπικά εκδηλώνουν τη δράση τους. Όσον αφορά τη συμμετοχή και το ρόλο των hsp70 πρωτεϊνών κάτω από διάφορες μορφές καταπόνησης έχει βρεθεί ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στη θερμοανεκτικότητα, προάγοντας την ανάπτυξη σε σχετικά υψηλές θερμοκρασίες και προστατεύοντας τους οργανισμούς από το θάνατο σε ακραίες συνθήκες θερμικής καταπόνησης (Mahroof et al., 2005).

Παρ’ όλο που αρκετές πληροφορίες είναι γνωστές σχετικά με τις λειτουργίες των hsp70 και με το ρόλο τους στην προστασία των οργανισμών σε υψηλές θερμοκρασίες, δεν έχουν καθοριστεί ακόμα με ακρίβεια οι βιολογικές διεργασίες τις οποίες προστατεύει (Kiang et al, 1998).

Οι μικρές Hsp’s (**smHSPs**) είναι οι πιο διαφοροποιημένες πρωτεΐνες από όλες τις προηγούμενες οικογένειες. Ανήκουν σε μια οικογένεια πρωτεϊνών οι οποίες περικλείουν μια κρυσταλωειδή πρωτεΐνη την α- crystalline. Οι smHSPs έχουν μέγεθος από 12 έως 40kDa ανάλογα από το είδος. Σε νουκλεοτιδικό επίπεδο δεν είναι υψηλά συντηρημένες, ενώ η δομή και το επίπεδο φωσφοριλίωσης τους είναι κρίσιμο για την λειτουργία τους. Η φωσφορυλίωση δημιουργεί αποδιάταξη σε ένα μεγάλο πολυμερές σύμπλεγμα των smHSPs, σε μονομερή και διμερή. Σημαντικός είναι ο ρόλος του ως μοριακοί συνοδοί, όπως και οι άλλες HSPs καθώς συμμετέχουν σε πολύπλοκες δομές (Feder et al, 1999).

1.6 Η εστεράση της ορμόνης νεότητας (juvenile hormone esterase, JHE)

Ο έλεγχος του τίτλου των ορμονών νεότητας, στους ιστούς και την αιμολέμφο, απαιτείται για την σωστή μετάβαση του εντόμου στα διάφορα μεταμορφωτικά του στάδια. Ο έλεγχος αυτός, επιτυγχάνεται είτε σε βιοσυνθετικό επίπεδο, είτε μέσω αποδόμησής τους από πλείστα ένζυμα, σημαντικότερα των οποίων είναι οι εστεράσες της ορμόνης νεότητας (JHEs).

Οι εστεράσες της ορμόνης νεότητας, juvenile hormone esterases (JHE; EC 3.1.1.1) αποτελούν τα κυριότερα ένζυμα της αιμολέμφου, που αποδομούν τις ορμόνες νεότητας και κατά συνέπεια ρυθμίζουν τον τίτλο τους. Ανήκουν στην ευρύτερη οικογένεια των a/b υδρολασών και είναι υψηλής εκλεκτικότητας ένζυμα, τα οποία διασπούν τις JHs ακόμα και αν αυτές βρίσκονται σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις.

Οι JHEs, διαθέτουν ένα συντηρημένο ενεργό κέντρο με γενικό συμβολισμό GxSxG, που ονομάζεται GxSxG μοτίβο, ενώ διαμοιράζονται τον ίδιο καταλυτικό της καταλυτικής τριάδας σερίνης, ιστιδίνης, ασπαρτικό ή γλουταμινικό οξύ.

Η συγκέντρωση των ορμονών νεότητας στην αιμολέμφο είναι υψηλή όταν η συγκέντρωση της JHE βρίσκεται σε χαμηλά επίπεδα και το αντίθετο. Η JHE συντίθεται στον λιπώδη ιστό και απελευθερώνεται στην αιμολέμφο, ενώ τα επίπεδά της ελέγχονται σε μεταγραφικό επίπεδο, αλλά και με αποτοξινωτικούς μηχανισμούς, όπως είναι η αποδόμησή της από τα λυσοσώματα των περικαρδιακών κυττάρων (Shanmugavelu et al., 2000).

Εφαρμογή χημικών αναλόγων των JHs καθώς και αναστολέων των JHEs (TFK,OTFP κλπ), οδηγεί στην δημιουργία γιγαντιαίων προνυμφών, ενώ στα λεπιδόπτερα, στην καθυστέρηση εισόδου στο στάδιο της νύμφης (Abdel et al., 1986).

Σε διαγονιδιακούς μεταξοσκώληκες *Bombyx mori*, που υπερεκφράζουν το γονίδιο της JHE, καθολικά και από τα πρώτα εμβρϋικά στάδια, εμφανίστηκε πρόωρη είσοδος στο στάδιο της νύμφης, 2 προνυμφικά στάδια νωρίτερα σε σχέση με τους αγρίου τύπου μεταξοσκώληκες (Anjang et al., 2005).

Στα περισσότερα είδη που έχουν μελετηθεί έως τώρα, έχουν αναφερθεί περισσότερες από μία JHE δραστηριότητες, οι οποίες προσδίδουν ποικιλομορφία στην καταλυτική αποδοτικότητα και στα βιοχημικά χαρακτηριστικά του ενζύμου. Πέραν του προαναφερθέντος γεγονότος δεν έχει διελευκανθεί ακόμα, εάν τα ένζυμα που προσδίδουν αυτού του είδους την ποικιλομορφία στην ενζυμική δραστηριότητα, αποτελούν προϊόντα διαφορετικών γονιδίων ή προϊόντα διαφορετικής επεξεργασίας από αλληλόμορφους του ίδιου γονιδίου.

Στο λεπιδόπτερο *Trichoplusia ni*, ενώ έχουν χαρακτηριστεί τρία ένζυμα που εμφανίζουν ενζυμική δραστηριότητα τύπου JHE, δεν έχει γίνει κατανοητό εάν τα ένζυμα αυτά αποτελούν διαφορετικούς ισόμορφους του ίδου γονιδίου ή διαφορετικά προϊόντα οικογένειας γονιδίων (Hanzlik et al., 1987). Στο *Aedes aegypti*, έχουν κλωνοποιηθεί τρία cDNAs που διαθέτουν το μοτίβο GQSAG (χαρακτηριστικό όλων των εστερασών των ορμονών νεότητας) και παρ' όλες τις ομοιότητες που παρουσιάζονται στα επίπεδα έκφρασής των γονιδίων αυτών, κατά τα διάφορα αναπτυξιακά τους στάδια, μόνο ένα από τα τρία κωδικοποιεί για μια λειτουργική JHE (Bai et al., 2007).

Επιπροσθέτως, στα έντομα *Heliothis virescens* (Hanzlik et al., 1989) και *Drosophila melanogaster* (Campell et al., 1998), έχουν αναφερθεί στοιχεία που υποστηρίζουν την ύπαρξη περισσοτέρων του ενός γονιδίων με JHE δραστηριότητα.

Στον *Gryllus assimillis* έχουν αναφερθεί 4 ισομορφές του μοναδικού κλωνοποιημένου JHE cDNA μεγέθους 1512 bp (Crone et al., 2007). Τα ένζυμα αυτά, χαρακτηρίστηκαν ως ισομορφές και όχι ως προϊόντα οικογένειας γονιδίων, λόγω του ότι οι μοναδικές διαφορές που παρατηρήθηκαν σε αμινοξικό επίπεδο, εντοπίστηκαν σε μερικά από τα αμινοξικά κατάλοιπα του N' άκρου της ώριμης πρωτεϊνης. Στον ίδιο οργανισμό, ύστερα από εφαρμογή πειραμάτων κλασσικής γενετικής, δημιουργήθηκαν δύο σειρές εντόμων (Zera et al., 1995). Η πρώτη σειρά που δημιουργήθηκε, επιλέχθηκε για υψηλή, ενώ η δεύτερη για χαμηλή JHE δραστηριότητα. Από τις σειρές αυτές απομονώθηκαν κλώνοι του γονιδίου, ώστε να διευκρινιστεί εάν οι διαφορές που εντοπίστηκαν στην ενζυμική δραστηριότητα στους ιστούς των εντόμων, ήταν αποτέλεσμα νουκλεοτιδικών διαφορών σε επίπεδο DNA. Από την αλληλούχιση των γονιδίων προέκυψε, ότι οι διαφορές που παρατηρήθηκαν στην καταλυτική αποδοτικότητα της ή των JHE/JHEs, δεν οφείλονταν σε κάποια νουκλεοτιδική ποικιλομορφία των κωδικών περιοχών, όπως θα ήταν λογικά αναμενόμενο. Η μοναδική διαφορά που εντοπίστηκε, ήταν η ύπαρξη ενός πολυμορφισμού τύπου indel, μεγέθους 19 bp στο δεύτερο ιντρόνιο (του 3' άκρου), στα άτομα μόνο των σειρών εκείνων που επιλέχθηκαν για υψηλή JHE δραστηριότητα. Ο πολυμορφισμός αυτός δεν προκαλούσε κάποια ποικιλομορφία στην αμινοξική ακολουθία και κατά συνέπεια στην καταλυτική αποδοτικότητα της ώριμης πρωτεϊνης, αλλά ενίσχυε τα επίπεδα μεταγραφής του γονιδίου, στις σειρές εκείνες που επιλέχθηκαν για υψηλή JHE δραστηριότητα.

Στο έντομο *Sesamia nonagrioides* έχει απομονωθεί και χαρακηριστεί το γονίδιο *SnoJHER*, σε προηγούμενη έρευνα (Kontogiannatos et al., 2011).

1.7 Ταξινόμηση του εντόμου *Sesamia nonagrioides*

Το είδος *Sesamia nonagrioides* (Lefebvre) (Lepidoptera-Noctuidae), περιέγραψε για πρώτη φορά ο Lefebvre το 1827, δίνοντάς του το όνομα *Cossus nonagrioides.* Το 1852 ο Guenne κατατάσσει το έντομο στο γένος *Sesamia.* Το 1934, οι Rossi & Turati αναφερόμενοι στο είδος αυτό το κατατάσσουν στο *Sesamia vuteria* Stroll, δίνοντας σε παρένθεση σαν συνώνυμο το nonagrioides, συνωνυμία την οποία διευκρινίζει αργότερα ο Μπαρτζάκης (1970). Για το είδος αυτό υπήρχε σύγχυση όσον αφορά την ταυτότητά του, λόγω των διάφορων συνωνύμων, μερικά από τα οποία αφορούν άλλα είδη του γένους *Sesamia.* Μετά από συνεχείς αλλαγές, το έντομο τοποθετήθηκε εκ νέου στο γένος *Sesamia* από τους Tams & Bowden (1953). Σήμερα γίνεται αποδεκτή η ακόλουθη ταξινομική θέση του εντόμου:

Κλάση : Insecta
Τάξη : Lepidoptera
Υπόταξη : Heteroneura
Οικογένεια : Noctuidae
Γένος : S*esamia*
Είδος : *Sesamia nonagrioides (*Lef.).

Στην Ελλάδα η πρώτη αναφορά του εντόμου γίνεται από τον Σ. Καλογερέα (1930) σε κατάλογο εντόμων, τα οποία συνέλεξε κατά το διάστημα 1924-1927 στη Λάρισα. Ενδεχομένως το είδος να υπήρχε προηγουμένως, αφού ο Rebel (1916) αναφέρει ότι το είδος *S. cretica* βρέθηκε στην Κρήτη από τον συλλέκτη Frivaldskys, που από τον Freyer θεωρήθηκε ότι επρόκειτο για το είδος *S. hesperica* Rbr., συνώνυμο του είδους *S. nonagrioides.*

Οι Rossi & Turati (1934) αναφέρουν την ύπαρξη του γένους και στην Ελλάδα, χωρίς ωστόσο να καταγράφουν συγκεκριμένες περιοχές που απαντά. Σο 1939 ο Ισαακίδης σε κατάλογο εντόμων αναφέρει την ύπαρξη άλλου είδους του ίδιου γένους και συγκεκριμένα την *S. cretica.* Αναφορά του *S. cretica* γίνεται επίσης από τον Πελεκάση το 1962, σε αντίστοιχο κατάλογο εντόμων της περιόδου 1932-1962, χωρίς να αναφέρεται η ύπαρξη του *S. nonagrioides.* Ο Σταυράκης το 1967 ανέφερε ότι ο κυριότερος εχθρός του αραβόσιτου είναι το είδος *S. Nonagrioides,,* καταγράφοντας ωστόσο και την ύπαρξη του *S .cretica.* Τελευταία στην Ελλάδα δεν έχει αναφερθεί το είδος *S. cretica.* Όλες οι ερευνητικές εργασίες αναφέρονται στο *S. nonagrioides.*

Εικόνα 18. Προνύμφη, νύμφη και ακμαίο του εντόμου *S. nonagrioides.*

Εικόνα 19. Αυγά του εντόμου *S. nonagrioides* σε καλαμπόκι.

1.8 Σκοπός της παρούσας εργασίας

Η έρευνα των επιπτώσεων της δισφαινόλης στα ασπόνδυλα είναι ακόμη ελλιπής. Σκοπός μας είναι να μελετήσουμε τις φαινοτυπικές και μοριακές αλλαγές που προκαλεί το συγκεκριμένο ξενοοιστρογόνο στα έντομα. Ως οργανισμό μοντέλο, για να μελετήσουμε τις επιπτώσεις της BPA σε ένα χερσαίο έντομο, επιλέξαμε το νυκτόβιο λεπιδόπτερο *S. Nonagrioides,* αποικίες του οποίου διατηρούμε στο εργαστήριο. Οι διαφορετικοί χειρισμοί με δισφαινόλη (ενέσιμη μορφή ή μέσω της τροφής των εντόμων) θα μας βοηθήσουν να εκτιμήσουμε τον τρόπο που εισάγονται τα ξενοοιστρογόνα στον οργανισμό, ενώ με την μέτρηση του σωματικού βάρους και της θνησιμότητας των προνυμφών, θα καταλήξουμε στο βαθμό επικινδυνότητάς της για το έντομο. Στην παρούσα μελέτη θα εκτιμηθούν οι επιδράσεις της δισφαινόλης στα αναπτυξιακά στάδια του εντόμου καθώς και στην αναπαραγωγή. Επιπροσθέτως, θα μελετηθεί και η επίδρασή της σε δύο γενιές εντόμων της *S. Nonagrioides*. Για την μοριακή μελέτη της δράσης της δισφαινόλης θα χρησιμοποιήσουμε τα γονίδια των heat shock proteins (*Hspc*) γνωρίζοντας ότι οι πρωτεΐνες αυτές εμπλέκονται σε πολλές βιολογικές λειτουργίες του κυττάρου, αλληλεπιδρούν με ορμόνες, δρουν σαν μοριακοί συνοδοί και σηματοδοτούν βιολογικές αλλαγές στα κύτταρα ενόψει περιβαλλοντικής επίδρασης. Θέλοντας να μελετήσουμε την εκδυστεροειδική δράση της δισφαινόλης θα εξετάσουμε και τα μεταγραφικά επίπεδα του γονιδίου *SnoJHER*, το οποίο έχει απομονωθεί και χαρακτηριστεί σε προηγούμενη έρευνα (Kontogiannatos et al., 2011).

Ευελπιστούμε ότι με την μελέτη της επίδρασης της BPA στην *S. nonagrioides* θα καταλήξουμε σε χρήσιμα συμπεράσματα για τα όρια επικινδυνότητάς της στα ασπόνδυλα (έντομα), και ίσως οδηγηθούμε σε χρήσιμα συμπεράσματα για τον μοριακό μηχανισμό δράσης της στον οργανισμό των εντόμων.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Τα έντομα και ο χειρισμός τους

Η αποικία του εντόμου *Sesamia nonagrioides*, που χρησιμοποιήθηκε ως πειραματικό υλικό στην παρούσα εργασία, προήλθε από συλλογή φυσικού πληθυσμού στην περιοχή της Κωπαΐδας. Τα έντομα στο εργαστήριο διατηρούνται σε συνθήκες θερμοκρασίας 25 ±1°C, φωτοπεριόδου 16 ώρες φωτόφαση-8 ώρες σκοτόφαση και σχετικής υγρασίας 60-70%.

Τα τέλεια του εντόμου της εργαστηριακής εκτροφής διατηρούνται σε ξύλινα κλουβιά. Σε κάθε κλουβί τοποθετούνται 15 περίπου ζευγάρια εντόμων και μικρά φυτά καλαμποκιού 20-25 cm, στον κολεό των φύλλων των οποίων τα θηλυκά άτομα εναποθέτουν τα αυγά τους. Στα ακμαία προσφέρεται νερό με οδοντιατρικά τεμάχια βάμβακος που τοποθετούνται σε μικρά ποτήρια με νερό (3-4/κλουβί). Η συλλογή των αυγών γίνεται καθημερινά από τα φυτά. Τα αυγά τοποθετούνται για επώαση σε τρυβλία διαμέτρου 10 cm, πάνω σε διηθητικό χαρτί εμποτισμένο με προπιονικό οξύ 3‰ για την αποφυγή ανάπτυξης μικροοργανισμών.

Μετά την εκκόλαψη οι νεαρές προνύμφες τοποθετούνται σε πλαστικά διαφανή κουτιά σε ομάδες 20-30 ατόμων πάνω σε θρεπτικό τεχνητό υπόστρωμα (Tsitsipis, 1984). Μια φορά την εβδομάδα οι προνύμφες μεταφέρονται σε καθαρά κουτιά με νέο τεχνητό υπόστρωμα. Στις συνθήκες αυτές η διάρκεια ζωής των τέλειων είναι 10 περίπου ημέρες, η επώαση των αυγών πραγματοποιείται σε 6-7 ημέρες ενώ η προνυμφική ζωή έχει διάρκεια 30-40 ημέρες. Το στάδιο της νύμφης στις ίδιες συνθήκες, διαρκεί 10 περίπου ημέρες.

2.2 ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

2.2.1 Απομόνωση ολικού RNA από ιστό εντόμου

Το αντιδραστήριο TRIzol®, Invitrogen περιέχει φαινόλη και το χημικό αντιδραστήριο Guanidinium thiocyanate (GITC), το οποίο αποτελεί χαοτροπικό παράγοντα που αποδιατάσσει τις πρωτεϊνες, βοηθώντας έτσι την λύση των κυττάρων. Η αποδιατακτική του ικανότητα είναι χρήσιμη για την απομόνωση των RNAs αφού αναστέλλει την δράση των RNασών (και των DNασών) καταστρέφοντάς τες. Έτσι ολιγοπληθή και ευάλωτα RNA μόρια όπως είναι τα mRNAs προστατεύονται καλύτερα από την δράση των RNασών διευκολύνοντας την περαιτέρω χρήση τους.

- Οι ιστοί ζυγίζονται και τοποθετούνται στον πάγο για 5 min.

- Απαραίτητη ποσότητα ιστού και αντιδραστηρίου TRIzol τοποθετούνται σε eppendorf 1.5 ml σε αναλογία 50 mg ιστού:1000 μl TRIzol .

- Ακολουθεί ομογενοποίηση με χρήση πλαστικού γουδιού.

- Στο eppendorf με τον ομογενοποιημένο ιστό προστίθεται χλωροφόρμιο σε αναλογία 200 μl χλωροφόρμιο:1000 μl TRIzol.

- Ακολουθεί έντονη ανακίνηση και το eppendorf τοποθείται στον πάγο για 10 λεπτά.

- Στην συνέχεια το μίγμα φυγοκεντρείται στις 13.000 rpm στους 4oC για 20 min.

- Ακολούθως γίνεται μεταφορά της υδάτινης φάσης σε καινούριο eppendorf 1.5 ml και σε αυτό προστίθεται ισοπροπυλική αλκοόλη σε αναλογία 500 μl ισοπροπυλική αλκοόλη:1000 μl ΣRIzol.

- Το μίγμα τοποθετείται στους -20oC για 60 min.

- Αμέσως μετά το πέρας των 60 min ακολουθεί φυγοκέντριση στις 10.000 rpm για 20 min στους 4oC.

- Το περιεχόμενο του eppendorf απομακρύνεται ενώ στο εναπομείναν ίζημα προστίθενται 800 μl αιθανόλης 100%v/v.

- Ακολουθεί ανάδευση με μηχάνημα Vortex και φυγοκέντριση για 5 min στις 13.000 rpm στους 4oC .

- Μετά το τέλος της φυγοκέντρισης απομακρύνεται η αλκοόλη και το eppendorf αφήνεται να στεγνώσει στον πάγο.

- Τέλος γίνεται επαναδιάλυση των RNAs με προσθήκη 15-30 μl δις-απεσταγμένου/αποστειρωμένου νερού και αποθήκευση στους -80oC.

2.2.2 DNase Treatment

Για την καλύτερη αποτελεσματικότητα των πειραμάτων όπου θα χρησιμοποιηθούν τα εκχυλισμένα RNAs απαραίτητη είναι η καταστροφή των εναπομεινάντων στο εκχύλισμα υπολλειμάτων DNA με το ένζυμο RQ1 RNase-Free DNase (Promega). Το ένζυμο αυτό είναι μία DNaseI (ενδονουκλεάση) και διασπά μονόκλωνα και δίκλωνα μόρια DNA παράγοντας 3’-OH ολιγονουκλεοτίδια. 1 unit της RQ1 RNase-Free DNase καταστρέφει εντελώς 1 μg γενωματικού DNA λ φάγου εντός 10 min στους 37o C σε 50 μl ρυθμιστικού διαλύματος που περιέχει 40mM Tris HCl, 10mM NaCl, 6mM MgCl2 και 10mM CaCl2.

Για 25 μg RNA:

- Σε eppendorf 1.5 ml προστίθενται 5 μl 10X DNase buffer [400mM Tris-HCl (pH 8.0), 100mM MgSO4 και 10mM CaCl2].

- Προσθήκη 5 μl DNase (1U/μl) (40units).

- 1 μl RNase inhibitor (40U) (1 unit αναστέλλει το 50% της δραστηριότητας 5 ng RNase).

- ddH_2O μέχρι τελικό όγκο τα 50 μl.

- Ακολουθεί επώαση στους 37oC για 60 min.

- Αύξηση του όγκου στα 400 μl με προσθήκη αντίστοιχης ποσότητας ddH_2O (350 μl).

- Phenol/Chloroform treatment.

2.2.3 Phenol / Chloroform treatment

Για 400 μl δείγματος:

- Προσθήκη 400 μl φαινόλης έντονη ανακίνηση, φυγοκέντριση στις 13.000 rpm για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου.

- Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο eppendorf 1.5 ml και προστίθεται ένας όγκος φαινόλη/χλωροφόρμιο (πχ. για 400 μl δείγματος: 200 μl phenol:200 μl chloroform).

- Ακολουθεί φυγοκέντριση στις 13.000 rpm για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου.

- Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο eppendorf 1.5 ml, ογκομετρείται και προστίθεται ένας όγκος χλωροφόρμιο.

- Φυγοκέντριση στις 13.000 rpm για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου.

- Το υπερκείμενο μεταφέρεται εκ νέου σε νέο eppendorf 1.5 ml, ογκομετρείται και προστίθεται 1/10 του όγκου του CH_3COONa 3M pH=5.2, 2.5 όγκοι 100% v/v αιθανόλη και αν πρόκειται για RNA αφήνεται O/N στους -20oC και φυγοκεντρείται την επομένη στις 13.000 rpm για 30 min στους 4oC ενώ εάν πρόκειται για DNA φυγοκεντρείται άμεσα στις 13.000 rpm για 30 min στους 4oC.

- Τα ιζήματα αφού αφαιρεθεί η αιθανόλη και αφεθούν να στεγνώσουν επαναδιαλύονται σε 15-30 μl ddH_2O.

2.2.4 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης εκχυλισμάτων DNA/RNA

Τα εκχυλίσματα των DNA/RNA που απομονώνονται προσδιορίζονται ποσοτικά με την μέθοδο της φασμοτοσκοπίας υπεριώδους (UV). Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην ικανότητα των νουκλεϊνικών οξέων (DNA και RNA) να απορροφούν σε λmax=260 nm, των πρωτεϊνών στα 280 nm ενώ των φαινολικών στα 240 nm. Ποιοτικά κριτήρια της καθαρότητας των απομονωμένων RNAs είναι η αναλογία απορρόφησης μεταξύ νουκλεϊνικών οξέων φαινολικών και πρωτεϊνών. Το κλάσμα δηλαδή abs(260nm):abs(280nm)=1.8-2 και abs(260nm):abs (240nm)>1.

Διαδικασία:

- 500 μl ddH_2O φωτομετρούνται στα 260 nm και το φωτόμετρο μηδενίζεται.

- Ακολουθεί φωτομέτρηση στα 240 και 280 nm και καταγράφονται οι Abs.

- 5 μl δείγματος διαλύεται σε 495 μl ddH_2O και τοποθετείται σε κυψελίδα χαλαζία.

- Ακολουθεί φωτομέτρηση με φασματοφωτόμετρο υπεριώδους-ορατού (UV-Vis) στα 260, 240 και 280 nm.

- Από τις τιμές που θα προκύψουν αφαιρούνται οι απορροφήσεις του νερού στα αντίστοιχα μήκη κύματος.

- Ακολουθεί η εκτίμηση των ποιοτικών χαρακτηριστικών του δείγματος.

Η συγκέντρωση των νουκλεϊνικών οξέων στο δείγμα υπολογίζεται από τον τύπο:

[RNA](μg/ml)= ABS260nm x 40μg/ml x dilution factor

[DNA](μg/ml)= ABS260nm x 50μg/ml x dilution factor

Όπου dilution factor είναι η αναλογία του τελικού όγκου στην κυψελίδα προς τον όγκο του δείγματος που διαλύθηκε για να γίνει η φωτομέτρηση. Η συνήθης πρακτική διάλυσης 5 μl δείγματος σε 495 μl ddH2O δίνει dilution factor της τάξης του 100.

2.2.5 Παρασκευή cDNA από ολικό RNA με την μέθοδο της ανάστροφης μεταγραφής

Το ένζυμο SuperScriptTMII Reverse Transcriptase είναι μία μεταγραφάση με μειωμένη RNaseH δραστηριότητα και υψηλή θερμική αντοχή. Είναι ένα ένζυμο που έχει απομονωθεί από μετασχηματισμένα με το γονίδιο pol (Moloney Murine Leukemia Virus) κύτταρα *E.coli*. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την σύνθεση cDNA σε υψηλές θερμοκρασίες παρουσιάζοντας υψηλή εξειδίκευση ικανό να συνθέσει cDNA μεγέθους μεγαλύτερο από 12.3kb.

Η διαδικασία παρασκευής των cDNA χωρίζεται σε δύο διακριτά στάδια τα οποία μπορούν να περιγραφούν ως εξής:

Αποδιάταξη RNA:

Σε PCR tube,

- Προστίθενται 3 μl (500μg/ml) από 10μM OligodT12-18
- 1.5 μg ολικό RNA
- 5 μl dNTPs,10mM
- ddH2O μέχρι τελικό όγκο τα 12 μl

Το δείγμα θερμαίνεται στους 65oC για 5 min και στην συνέχεια τοποθετείται αμέσως στον πάγο.

Παρασκευή cDNA:

- Προστίθενται 4 μl από 5x First Stand Buffer (250mM Tris-HCl, pH 8.3 σε θερμοκρασία δωματίου, 375mM KCl,15mM MgCl2) και 2 μl από 0,1M DTT.
- Για την παρεμπόδιση των RNασών προστίθεται 1 μl από το ένζυμο RNase OUT [40 unit/μl, (Cat. No. 10777-019)].
- Τέλος προστίθεται 1 μl (200 units) από το ένζυμο Superscript II RT και ddH2O μέχρι τελικό όγκο τα 20 μl.
- Γίνεται επώαση σε συσκευή PCR για 60 min στους 42oC και για 15 min στους 70oC για την παύση της αντίδρασης.

Το προϊόν της RT για να χρησιμοποιηθεί περαιτέρω σε αντιδράσεις PCR πρέπει να διαλυθεί με ddH2O σε τελικό όγκο 50 μl.
**Για την αφαίρεση του συμπληρωματικού RNA μπορεί να προστεθεί 1 μl από την E.Coli RNaseH (2 units) και στην συνέχεια επώαση στους 37oC για 2 min.

2.2.6 Παρασκευή dNTPs mix

Μίγμα δεσόξυ-τριφωσφορικών νουκλεοτιδίων (dNTPs mix) σε κατάλληλη συγκέντρωση είναι απαραίτητο τόσο για τις αντιδράσεις PCR όσο και για την ανάστροφη μεταγραφή των mRNAs σε cDNA.

1. Για τις αντιδράσεις PCR η αναγκαία συγκέντρωση των dNTPs σε 50 μl όγκο αντίδρασης είναι 0.2mM και γι΄ αυτό κρατείται dNTPs mix stock συγκέντρωσης 2mM.

Η διαδικασία παρασκευής του περιγράφεται ως εξής :

- Από εμπορικό stock συγκέντρωσης 100mM προστίθεται σε eppendorf 1.5 ml, 4 μl dATPs, 4 μl dCTPs, 4 μl dGTPs, 4 μl dTTPs και 184 μl ddH2O.

2. Για τις αντιδράσεις ανάστροφης μεταγραφής των mRNAs σε κρατείται dNTPs mix stock συγκέντρωσης 10mM.

Η διαδικασία παρασκευής του περιγράφεται ως εξής:

- Από εμπορικό stock συγκέντρωσης 100mM προστίθενται σε eppendorf 1.5 ml, 10 μl dATPs, 10 μl dCTPs, 10 μl dGTPs, 10 μl dTTPs και 60 μl ddH2O.

2.2.7 Σχεδιασμός εκκινητών

Για την εκπόνηση της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές των γονιδίων των θερμοεπαγώμενων πρωτεϊνών (*HSP*'s genes) που έχουν απομονωθεί και μελετηθεί σε προηγούμενες έρευνες (Gkouvitsas et al. 2008, 2009). Πιο αναλυτικά για τον προσδιορισμό της δράσης της BPA σε προνύμφες *S. nonagrioides* χρησιμοποιήσαμε τα *HSP*s γονίδια: *SnoHsp70* (GenBank accession number: DQ004584), *SnoHsc70* (GenBank accession number: EU430480), *SnoHsp83* (GenBank accession number: DQ198859), *SnoHsp20.4* (GenBank accession number: DQ336356) και *SnoHsp19.5* (GenBank accession number: EU668902), ως βιοδείκτες. Επίσης τα γονίδια *SnoECR* και *SnoUSP* που έχουν και απομονωθεί και μελετηθεί σε προηγούμενη έρευνα. Ως γονίδιο μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο της β- τουμπουλίνης (*Snoβ- tub*)(GenBank accession number: DQ147771).

Oligonucleotides	**Sequence (5′→3′)**
SnoHSP83-Rev	CCATTACAACATGGCAAACTGA
SnoHSP83-For	GTGCATGCTTCCCGTATCTAC
SnoHSP20,4-Rev	CTCTCTCCCTTTAAGGCTTCTG
SnoHSP20,4-For	GGCTACATCAGTCGGCAGTTC
SnoHSP19,5-Rev	GCACTAGATCACATCGCTTCAC
SnoHSP19,5-For	ACCAGAGTCGGTGGAATCTAAG
SnoHSP70-Rev	CAATATGGAAATGCAAGTCTGG
SnoHSP70-For	GGCTGAGAAGGACGAGTATGAG
SnoHSC70-Rev	GCATGCTGTATAATCTGTTGGA
SnoHSC70-For	AAGGAGCTGGAAGGAATCTG
SnoECR-Rev	GAGATGCACATGTTGGAGTTCTGC
SnoECR-For	AGATTACATTATTAAAGGCGTGCTC
SnoUSP-Rev	GAGTTACGGTGCAGGGTCATGC
SnoUSP-For	CTAAGTGGTTCCAAGCATCTCTG
SnoHSPTub-Rev	GGTGTGAGTGCTTTAGTTGTCC
SnoHSPTub-For	GAGCAGTTCACCGCTATGTTC

Πίνακας 1. Αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν.

2.2.8 Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR).

Για τις αντιδράσεις PCR χρησιμοποιείται το ένζυμο DyNAzyme EXT πολυμεράση (FINNZYMES). Σο ένζυμο αυτό λειτουργεί ως 5’-3’ πολυμεράση και εξωνουκλεάση, ενώ λειτουργεί και ως πολύ ασθενής 3’ 5’ εξωνουκλεάση. Επίσης είναι ικανό να προσθέτει μη συμπληρωματικό κατάλοιπο αδενίνης στο 3’ άκρο του DNA. Η ταχύτητα πολυμερισμού του είναι 1.3-1.5kb/1 min.

Για τις αντιδράσεις ημιποσοτικού PCR χρησιμοποιήθηκε ανάλογο σχήμα που εξαρτάται κάθε φορά από το πειραματικό υλικό. Όμως και εδώ σε γενικές γραμμές χρησιμοποιήθηκε το ίδιο σχήμα πολυμερισμού με την διαφορά ότι ο αριθμός των κύκλων του δευτέρου βήματος ήταν σαφώς μικρότερος και κυμαινόταν μεταξύ 23-29 κύκλων:

1 x	Αποδιάταξη του DNA για 2 min στους 94oC
23-29 x	Αποδιάταξη στους 94oC για 30’’
	Υβριδισμός στο Tm των εκκινητών για 30’’
	Επιμήκυνση στους 72oC για 30’’
1 x	Τελική επιμήκυνση στους 72oC για 10 min
	Παραμονή στους 10oC

Η θερμοκρασία υβριδισμού εξαρτάται τη θερμοκρασία τήξης (Tm) του εκκινητή. Η τελευταία με την σειρά της εξαρτάται από διάφορους παράγοντες και υπολογίζεται από τον θεωρητικό τύπο: Tm = 64.9°C + 41°C x (αριθμός G’s και C’s στον εκκινητή – 16.4)/N όπου N είναι ο αριθμός βάσεων του εκκινητή.

Οι αντιδράσεις PCR γίνονται σε τελικό όγκο 50 μl. Τα συστατικά της αντίδρασης προστίθενται σε eppendorf microcentrifuge PCR tube και η διαδικασία περιγράφεται ως εξής:

- 5 μl DyNAzyme EXT Buffer (10X), 15mM Mg2+ (τελική συγκέντρωση 1X, 1.5mM Mg2+)

- 5 μl από 2mM dNTPs (τελική συγκέντρωση 0,2mM).

- 1,5 μl (10μM) από κάθε εκκινητή (εμπρόσθιο/οπίσθιο) (τελική συγκέντρωση 0,3μM).

- Μήτρα gDNA ή cDNA, για το DNA η επιθυμητή συγκέντρωση αντιστοιχούσε σε 200 ng gDNA.

- DyNAzyme EXT πολυμεράση (1unit/μl).

- ddH2O μέχρι τελικό όγκο τα 50 μl.

- Τα συστατικά αναμιγνύονται με Vortex και φυγοκεντρούνται για λίγα δευτερόλεπτα στις 13.000 rpm.

- Αναλύονται σε πηκτή αγαρόζης ή/και τοποθετούνται σε καταψύκτη -20oC.

2.2.9 Παρασκευή διαλυμάτων ηλεκτροφόρησης.

Για την ηλεκτροφόρηση νουκλεϊνικών οξέων σε πηκτή αγαρόζης είναι αναγκαία η παρασκευή κάποιων επιπρόσθετων βοηθητικών διαλυμάτων. Τα διαλύματα αυτά διακρίνονται στα εξής: Ρυθμιστικό διάλυμα 50X TAE (για την υποβοήθηση της κινητικότητας των νουκλεϊνικών σε ηλεκτρικό πεδίο), το βρωμιούχο αιθίδιο (για την ορατοποίηση των διαχωρισμένων νουκλεϊνικών υπό την επίδραση UV) και το διάλυμα φόρτωσης 10X loading dye. Τα διαλύματα αυτά διατηρούνται υπό μορφή μητρικών, ενώ για την καθημερινή πρακτική χρησιμοποιούνται μίγματα αυτών όπως το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης σε gel αγαρόζης και το 6X loading dye με 50% w/v σακχαρόζη.

Ρυθμιστικό διάλυμα 50XTAE:

- Σε ογκομετρικό σωλήνα 1000 ml προστίθενται 24.2 g (w/v) Tris-base, 100 ml 0.5M EDTA pH=8.0, 57 ml CH3COOH και ddH2O μέχρι την συμπλήρωση όγκου 1000 ml.

- Το διάλυμα αποχύνεται σε κατάλληλο δοχείο αποθήκευσης για περαιτέρω χρήση.

Βρωμιούχο αιθίδιο:

- Παρασκευάζεται επιθυμητό σε όγκο διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου σε τελική συγκέντρωση 5 mg EtBr/ml dH2O.

- Το διάλυμα διατηρείται σε σκουρόχρωμο μπουκάλι σε θερμοκρασία δωματίου.

Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης σε gel αγαρόζης:

- 2% v/v 50X TAE, 0.005% v/v βρωμιούχο αιθίδιο σε τελικό όγκο 1000 ml ddH2O.

10x loading dye:

- Σε πλαστικό falcon 10 ml προστίθενται 2.5% w/v μπλέ της βρωμοφαινόλης (BPB), 2.5% w/v κυανούν του ξυλενίου (XC) και ddH2O μέχρι συμπλήρωσης του επιθυμητού όγκου. Για 10 ml 10X loading dye προστίθενται 0.25 g Bromophenol blue και 0.25 g Xelene cyanol σε 10 ml ddH2O.

6x loading dye:

- Για την υποβοήθηση της τοποθέτησης των δειγμάτων DNA στις οπές της πηκτής αγαρόζης χρησιμοποιείται 6X loading dye που περιέχει και 50% w/v σακχαρόζη. 5 g Sucrose διαλύονται σε 1 ml 10X loading dye και προστίθεται ddH2O μέχρι συμπλήρωσης των 10 ml.

2.2.10 Ηλεκτροφόρηση DNA/RNA σε πηκτή αγαρόζης.

Η πηκτή αγαρόζης χρησιμοποιείται για την ανάλυση κλασμάτων νουκλεϊνικών οξέων διαφορετικού μεγέθους και διαφορετικών διαμορφώσεων. Ο διαχωρισμός γραμμικών μορίων DNA είναι ανάλογος προς το μέγεθος των μοριών.

Τα μόρια των νουκλεϊνικών οξέων γίνονται ορατά με τη βοήθεια μίας χρωστικής που παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων. Η χρωστική αυτή ονομάζεται βρωμιούχο αιθίδιο και έχει την ιδιότητα να φθορίζει παρουσία υπεριώδους φωτός. Η περιεκτικότητα της πηκτής σε αγαρόζη εξαρτάται από το μέγεθος των μορίων που πρόκειται να διαχωριστούν. Συνήθως ποικίλλει από 0,8% ως 2% w/v αγαρόζη.

Διαδικασία:

- Για την παρασκευή πηκτής αγαρόζης x% w/v διαλύονται x gr αγαρόζης σε 100x ml ddH2O που περιέχει 50X TAE σε συγκέντρωση 1X.

- Το διάλυμα θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι πλήρους διάλυσης της αγαρόζης και ομογενοποίησής της.

- Προστίθεται βρωμιούχο αιθιδίο σε τελική συγκέντρωση 0,005% v/v.

- Το διάλυμα αποχύνεται σε κατάλληλο καλούπι και σε ειδικές θέσεις που φέρει τοποθετούνται οι ειδικές χτένες διαμόρφωσης των οπών.

- Η πηκτή αφείνεται να στερεοποιηθεί στο ειδικό καλούπι σε θερμοκρασία δωματίου.

- Τα προς ανάλυση δείγματα αναμιγνύονται με 2 μl χρωστικής (6X loading dye).

- Μετά την πήξη του μίγματος η κτένα απομακρύνεται και το καλούπι πήξης τοποθετείται στην συσκευή ηλεκτροφόρησης.

- Η τελευταία πληρώνεται με κατάλληλο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης (2% v/v 50x TAE, 0.005% v/v βρωμιούχο αιθίδιο σε ddH2O).

- Τα δείγματα (με την χρωστική) τοποθετούνται στις οπές της πηκτής σε όγκους ανάλογους του μεγέθους των οπών.

- Η συσκευή αφού συνδεθεί με τα κατάλληλα ηλεκτρόδια και αφού ρυθμιστεί η τάση ηλεκτροφόρησης (50-120 V, αναλόγως του μεγέθους της πηκτής και της περιεκτικότητάς της σε αγαρόζη) λαμβάνει χώρα η ηλεκτροφόρηση.

2.2.11 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με μήτρα RNA (RT-PCR)

Η αντίδραση PCR πραγματικού χρόνου είναι μία εναλλακτική και ταυτόχρονα επαναστατική μέθοδος λογαριθμικής ενίσχυσης και ποσοτικού προσδιορισμού ακολουθιών DNA. Σε αντίθεση με την αντίδραση RT- PCR, δίνει τη δυνατότητα παρακολούθησης της πορείας της αλυσιδωτής αντίδρασης, καθ’ όλη τη διάρκεια που λαμβάνει χώρα, σε πραγματικό χρόνο. Η ικανότητα παρακολούθησης της εξέλιξης της αντίδρασης δίνεται από τη μέτρηση των επίπεδων φθορισμού της χρωστικής SYBR Green, η οποία έχει την ικανότητα να φθορίζει κατά την πρόσδεσή της στα δίκλωνα μόρια του DNA (dsDNA). Με αυτό τον τρόπο πραγματοποιούνται μετρήσεις των επιπέδων του φθορισμού στο τέλος κάθε κύκλου της αντίδρασης με τη χρήση ρομποτικού σαρωτή. Συχνά η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με τη μέθοδο της RT-PCR, για τον ποσοτικό προσδιορισμό μικρών αλληλουχιών mRNA που έχουν μετατραπεί σε cDNA πρώτα, δίνοντας τη δυνατότητα μελέτης της έκφρασης γονιδίων σε συγκεκριμένους ιστούς, κύτταρα ή αναπτυξιακά στάδια.

Η παρουσία της SYBR Green I μας επιτρέπει, όπως αναφέρθηκε πριν, να παρακολουθούμε σε πραγματικό χρόνο τη συσσώρευση των προϊόντων του PCR. Κατά την διάρκεια της φάσης της αποδιάταξης της διπλής έλικας του DNA η SYBR Green βρίσκεται σε ελεύθερη μορφή και ο φθορισμός που παράγει είναι μικρός. Κατά τις φάσης της πρόσδεσης των εκκινητών και της επιμήκυνσης, όπου έχουμε διπλής έλικας DNA, η SYBR Green προσδένεται στη διπλή έλικα του DNA και ο φθορισμός που παράγει αυξάνεται σημαντικά (έως και 1000 φορές). Η αύξηση του σήματος του φθορισμού εξαρτάται από την αρχική ποσότητα της μήτρας του DNA που υπάρχει στην έναρξης της αντίδρασης του PCR. Η ανίχνευση του φθορισμού που παράγεται πραγματοποιείται από ένα ειδικό φωτόμετρο που ανιχνεύει το φθορισμό που παράγεται στα 520 nm. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η SYBR Green παράγει φθορισμό όταν προσδένεται σε οποιοδήποτε δίκλωνο μόριο DNA, όπως διμερή εκκινητών ή ανεπιθύμητα προϊόντα της αντίδρασης του PCR. Λόγω αυτού του φαινόμενου ο προσεκτικός σχεδιασμός των εκκινητών και οι προσεκτικοί χειρισμοί κατά την διάρκεια των πειραμάτων είναι αναγκαίοι για την αποφυγή μολύνσεων και κατ' έκταση την παραλαβή εσφαλμένων μετρήσεων φθορισμού.

Για την εκτέλεση της μεθόδου χρησιμοποιήθηκε η συσκευή Mx3005P (Stratagene), καθώς και το αντίστοιχο λογισμικό πρόγραμμα MxPro-3005P. Τα δείγματα τοποθετούνται σε πλακέτα ειδική για αυτή τη χρήση.

Για μία τυπική αντίδραση τελικού όγκου 10 μl αναμιγνύονται:

- 2X Fast Start SYBR-GREEN Master ROX (Roche): 5 μl
- cDNA (χρησιμοποιείται ως εκμαγείο): 1 μl
- Μίγμα (Forward+Reverse) εξειδικευμένων εκκινητών (0.5 μM): 4 μl

2.2.12 Ενίσχυση και ποσοτικός προσδιορισμός ακολουθιών cDNA

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό της έκφρασης των γονιδίων *SnoHsp83, SnoHsc70, SnoHsp70,* SnH*sp19.5* και SnH*sp20.4* χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο SYBR Green Brilliant (Stratagene). Τα πλασμίδια μάρτυρες κατασκευάστηκαν κλωνοποιώντας στον φορέα pGEM T-easy ένα τμήμα της κωδικής περιοχής των γονιδίων *SnoHsp83, SnoHsc70, SnoHsp70,* SnH*sp19.5* και SnH*sp20.4* χρησιμοποιώντας τους εκκινητές 3'F/3'R, ή τμήμα του γονιδίου της β-τουμπουλίνης χρησιμοποιώντας τους εκκινητές TubF/TubR. Τα πλασμίδια αυτά χρησιμοποιήθηκαν ως μήτρα προκειμένου να κατασκευαστούν οι καμπύλες μάρτυρα.

Οι αντιδράσεις έγιναν στο μηχάνημα Stratagene Mx3000P. Κάθε ένα δείγμα αναλύθηκε σε τρεις τεχνικές επαναλήψεις και υπολογίστηκε ο μέσος όρος. Η ποσότητα των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων *SnoHsp83, SnoHsc70, SnoHsp70,* SnH*sp19.5* και SnH*sp20.4* κανονικοποιήθηκε με τα επίπεδα έκφρασης της β-τουμπουλίνης.

2.2.13 Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων

Η στατιστική επεξεργασία έγινε με τη χρήση του προγράμματος SigmaStat 3.5, πραγματοποιώντας t-test για τη στατιστική σύγκριση της έκφρασης των βιολογικών χειρισμών. Τα διαγράμματα δημιουργήθηκαν με το πρόγραμμα SigmaPlot 10.0.

2.3 Χειρισμός εντόμων με δισφαινόλη

2.3.1 Δισφαινόλη στην τροφή

Μετά την εκκόλαψη, προνύμφες 2^{ου} σταδίου της *S. nonagrioides* τοποθετούνται σε πλαστικά διαφανή κουτιά σε θρεπτικό τεχνητό υπόστρωμα, σε ομάδες 20-30 ατόμων. Για την πραγματοποίηση του πειράματός μας, χρησιμοποιήσαμε 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις δισφαινόλης (1μg/L, 10μg/L και 100μg/L). Η δισφαινόλη αναμιγνύονταν προσεκτικά με την τεχνητή τροφή. Σε κάθε κουτί τροφής με δισφαινόλη τοποθετούσαμε 20 άτομα ίδιου αναπτυξιακού σταδίου (instar). Ταυτόχρονα, 20 άτομα όμοιας ανάπτυξης τοποθετούνταν σε κανονική τροφή, για να χρησιμοποιηθούν σαν μάρτυρες.

Οι παρατηρήσεις της φυσιολογία των εντόμων και οι μετρήσεις του σωματικού βάρους γινότανε κάθε 3 μέρες και η διάρκεια του πειράματος ήταν 20 μέρες.

Μετά το πέρας των παρατηρήσεων απομονώθηκαν 3 άτομα από κάθε χειρισμό, διατηρήθηκαν στο υγρό άζωτο και αποθηκεύτηκαν στους -80^{o} C μέχρι την μοριακή τους ανάλυση. Η διαδικασία επαναλήφθηκε 3 φορές με προνύμφες ίδιου instar και ίδιο εύρος δειγματοληψιών.

2.3.2 Ενέσιμη δισφαινόλη

Προνύμφες του εντόμου που αναπτύσσονταν σε κανονικές συνθήκες εκτροφής, χρησιμοποιήθηκαν για ένεση με δισφαινόλη, σε δύο συγκεντρώσεις, 12μg και 120μg. Οι προνύμφες ήταν στο ίδιο αναπτυξιακό στάδιο, 5^{o} instar και 3^{η} μέρα, κατάλληλο για μοριακή ανάλυση καθώς το στάδιο αυτό έχει μελετηθεί σε προηγούμενες έρευνες του εργαστηρίου και γνωρίζουμε τις μοριακές αποκρίσεις των υπό μελέτη γονιδίων.

Για την ακινητοποίηση των προνυμφών, και την καλύτερη ένεση στο σώμα τους, χρησιμοποιήσαμε φορμόλη και τις αναισθητοποιήσαμε. Η ένεση έγινε στο λίπος των εντόμων. Οι μάρτυρες αναισθητοποιήθηκαν όπως οι άλλες προνύμφες. Τα έντομα συνήλθαν απ την αναισθησία και κρατήθηκαν σε τεχνητό υπόστρωμα μέχρι να γίνει η συλλογή και διατήρησή τους στο υγρό άζωτο και αποθήκευσή τους στους -80^{o} C μέχρι την μοριακή τους ανάλυση.

Η δισφαινόλη διαλύθηκε σε αιθανόλη, ενώ χρησιμοποιήθηκαν για κάθε δειγματοληψία 2 μάρτυρες ένας με ενέσιμη αιθανόλη και ένας με ενέσιμο δις απεσταγμένο νερό για να βεβαιωθούμε ότι οι μοριακές αλλαγές που θα βλέπαμε δεν οφείλονται στο σοκ της ένεσης ή στην ποσότητα της αιθανόλης που χρησιμοποιήσαμε σαν διαλύτη, αλλά στην επίδραση της δισφαινόλης στα έντομα. Οι δειγματοληψίες έγιναν στις 3, 6, 12 και 24 ώρες και σε κάθε δειγματοληψία παίρναμε και τα δύο άτομα - μάρτυρες.

2.4 Στατιστική ανάλυση

Για την επαλήθευση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση των πληθυσμών που τοποθετήθηκαν σε τροφή που περιείχε συγκεντρώσεις δισφαινόλης των 1μg, 10μg και 100μg. Οι πληθυσμοί σε κάθε τροφή και οι επαναλήψεις τους εξετάστηκαν ως προς το σωματικό τους βάρος και την θνησιμότητα των προνυμφών από την δράση της δισφαινόλης.

Τα δεδομένα αναλύθηκαν με περιγραφική στατιστική χρησιμοποιώντας την έκδοση του πακέτου SPSS 16. Οι στατιστικές μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν βασίζονται σε t-test, χ^2 test και one-way ANOVA. Οι διαφορές θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές σε επίπεδο εμπιστοσύνης $p \leqslant 0.05$.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Επίδραση της δισφαινόλης στην φυσιολογία των εντόμων

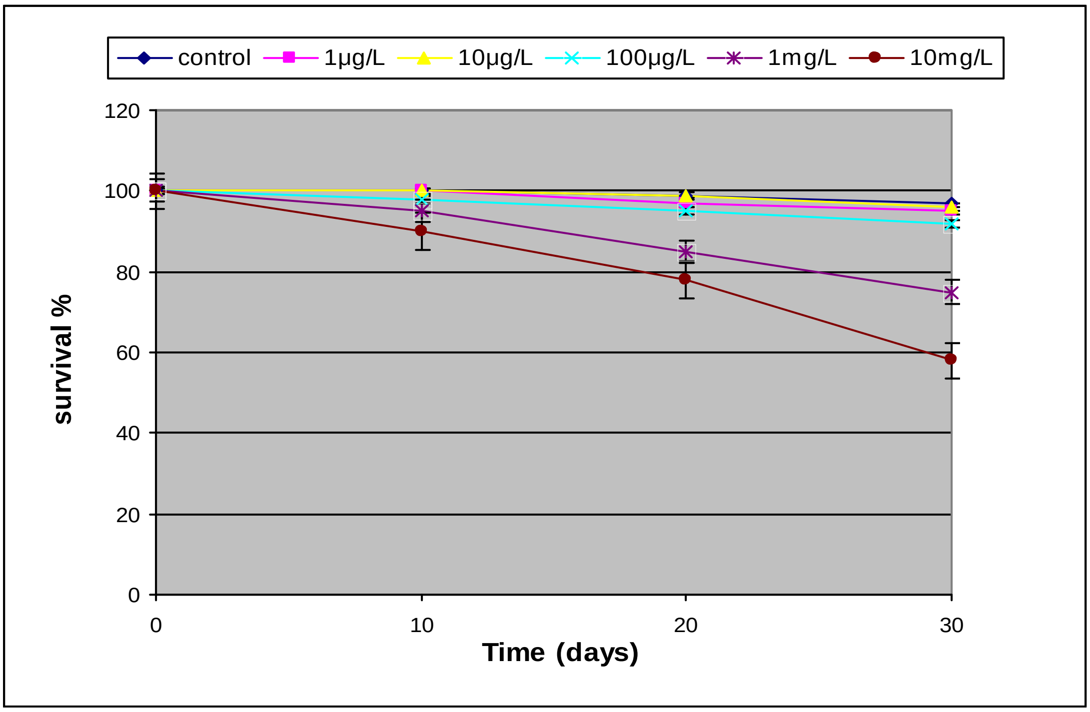
3.1.1 Επιβίωση και σωματική ανάπτυξη

Για τον προσδιορισμό των επιπτώσεων της δισφαινόλης στα οικοσυστήματα, μετρήσαμε τα ποσοστά επιβίωσης των προνυμφών που εκτέθηκαν σε διαφορετικές συγκεντρώσεις BPA και προσδιορίσαμε τις επιπτώσεις της στην ανάπτυξη των προνυμφών, με την μέτρηση του σωματικού τους βάρους.

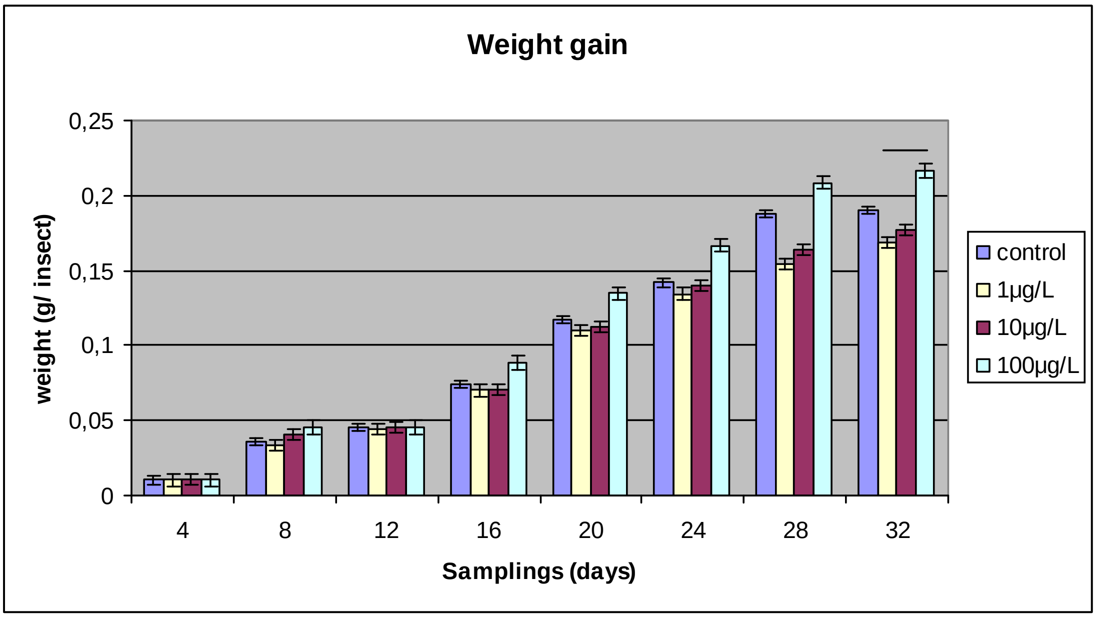
Επιλέξαμε τις συγκεντρώσεις της δισφαινόλης που δεν επηρέαζαν την επιβίωση των προνυμφών και μας επέτρεπαν να μελετήσουμε της πιθανές αλλαγές που προκαλεί η δισφαινόλη στα αναπτυξιακά στάδια των προνυμφών και στα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων. Διενεργήθηκαν 3 ανεξάρτητα πειράματα, το καθένα με 30 νύμφες 1^{ου} προνυμφικού σταδίου και οι μετρήσεις γίνονταν 0, 10, 20 και 30 ημέρες από την έναρξη κάθε πειράματος.

Σε σύγκριση με τα έντομα μάρτυρες, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($\rho<0,05$) στα ποσοστά θνησιμότητας στις συγκεντρώσεις των 1 μg / L, 10 μg / L και 100 μg / L BPA. Αντιθέτως, στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις των 1 mg / L και 10 mg / L BPA παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($\rho<0,05$) στα επίπεδα θνησιμότητας των προνυμφών σε σύγκριση με τα έντομα μάρτυρες (Πίνακας 2).

Ως παράμετρος της ανάπτυξης, μετρήθηκε το σωματικό βάρος και το μέγεθος της κεφαλής των προνυμφών S. nonagrioides σε διαφορετικές συγκεντρώσεις BPA. Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στο μέγεθος κεφαλής των προνυμφών (τα δεδομένα δεν περιέχονται). Συγκριτικά με τα έντομα μάρτυρες, οι συγκεντρώσεις των 1 μg / L ή 10 μg / L BPA εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στις προνύμφες, 32 ημέρες μετά την έναρξη του πειράματος. Είναι ενδιαφέρον ότι στην υψηλότερη δόση των 100 μg / L BPA το σωματικό βάρος των προνυμφών αυξήθηκε στατιστικά σημαντικά σε σχέση με τα έντομα μάρτυρες (Πίνακας 3).



Πίνακας 2. Δόσο- και χρονο-εξαρτώμενη επίδραση των συγκεντρώσεων BPA στην θνησιμότητα των προνυμφών *S. nonagrioides*. Οι διαφορές είναι στατιστικά σημαντικές ($p \leqslant 0.05$), ANOVA test (1mg: F=22,793, 10mg: F=44,150).

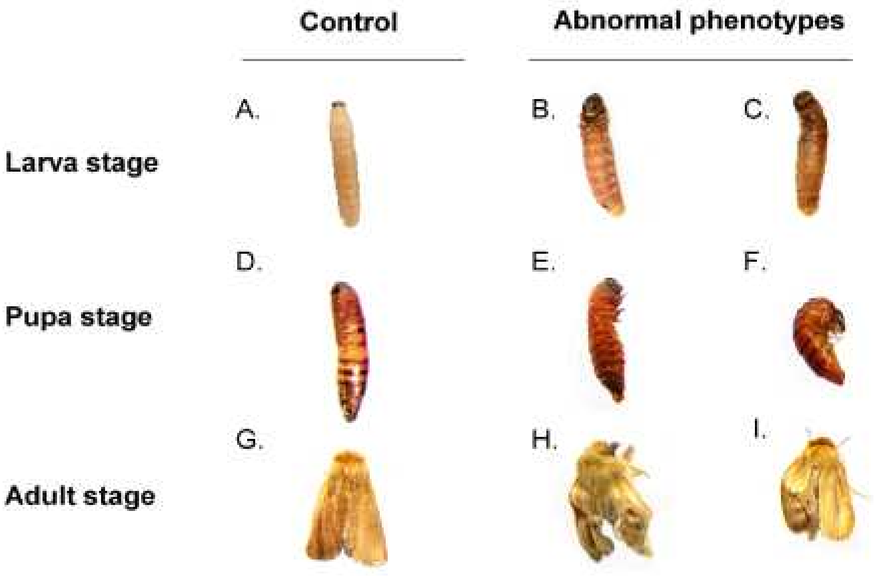


Πίνακας 3. Μέτρηση σωματικού βάρους προνυμφών που εκτέθηκαν σε 1μg/L και 10μg/L και 100μg/L BPA. Στις μικρότερες συγκεντρώσεις προέκυψαν προνύμφες με

χαμηλότερο σωματικό βάρος, ενώ στη μεγαλύτερη συγκέντρωση οι προνύμφες εμφάνισαν υψηλότερο σωματικό βάρος σε σύγκριση με τα άτομα μάρτυρες. (Έλεγχος t-test σε διάστημα εμπιστοσύνης 95%).

3.1.2 Επίδραση στην μορφολογία των αναπτυξιακών σταδίων των προνυμφών

Για την αξιολόγηση της επίδρασης της δισφαινόλης στην ανάπτυξη των αναπτυξιακών σταδίων της *S. nonagrioides*, προνύμφες 1^{ου} αναπτυξιακού σταδίου τοποθετήθηκαν για 5 εβδομάδες σε τεχνητή τροφή με διαφορετικές συγκεντρώσεις BPA. Οι μορφολογικές μεταβολές που παρατηρήθηκαν υπό τις διαφορετικές συγκεντρώσεις BPA εμφανίζονται στην Εικόνα 20 και στον Πίνακα 4. Στην Εικόνα 20 παρουσιάζονται εικόνες εντόμων με φυσιολογικό φαινότυπο και εικόνες εντόμων με μη φυσιολογικούς φαινότυπους μετά την επίδραση της δισφαινόλης. Τα έντομα που εκτέθηκαν στην χαμηλότερη συγκέντρωση του 1 μg / L BPA δεν παρουσίασαν υψηλό ποσοστό μη –φυσιολογικών φαινοτύπων. Στις υψηλότερες συγκεντρώσεις δισφαινόλης, των 10 μg, 100 μg, 1mg και 10 mg / L BPA, τα ποσοστά των μη φυσιολογικών φαινοτύπων αυξήθηκαν (Πίνακας 4). Στην συγκέντρωση των 100mg / L, το 33% των προνυμφών του 6^{ου} προνυμφικού σταδίου, το 43% των νυμφών και το 50% των ενηλίκων εμφάνισαν μη φυσιολογικούς φαινοτύπους (Πίνακας 4). Λαμβάνοντας υπόψιν τα παρακάτω δεδομένα, η επίδραση της δισφαινόλης φαίνεται να επηρεάζει σημαντικά ($p \leq 0.05$) τα μορφολογικά στάδια των εντόμων *S. nonagrioides*.



Εικόνα 20. Επίδραση της δισφαινόλης στα αναπτυξιακά στάδια του εντόμου *S. nonagrioides.* (A), (D), (G) έντομα στα στάδια της προνύμφης, νύμφης και ενήλικου εντόμου με φυσιολογικό φαινότυπο, (B), (C), (E), (F), (H), (I) έντομα στα στάδια της προνύμφης, νύμφης και ενήλικου εντόμου με μη φυσιολογικό φαινότυπο.

Bpa concentration	Total insects	Number of trials	Abnormal phenotypes: % Larval larval arrest[a]	% Larval pupal arrest[a]	% Adult wing abnormalities[a]
control	30	3	0	0	0
1µg/L	30	3	[illegible]	[illegible]	0
10µg/L	30	3	3	3	4
100µg/L	30	3	[illegible]	[illegible]	6
1mg/L	30	3	27	41	35
10mg/L	30	3	[illegible]	43	50

[a] Percentage based on total number tested at each concentration. The relationship between concentration and %abnormality is significant ($P \leq 0.05$, χ^2 test).

Πίνακας 4. Η επίδραση των συγκεντρώσεων δισφαινόλης σε έντομα διαφορετικών αναπτυξιακών σταδίων. Για τον στατιστικό έλεγχο των ποσοστών των μη φυσιολογικών φαινοτύπων χρησιμοποιήθηκε ο έλεγχος χ^2 test.

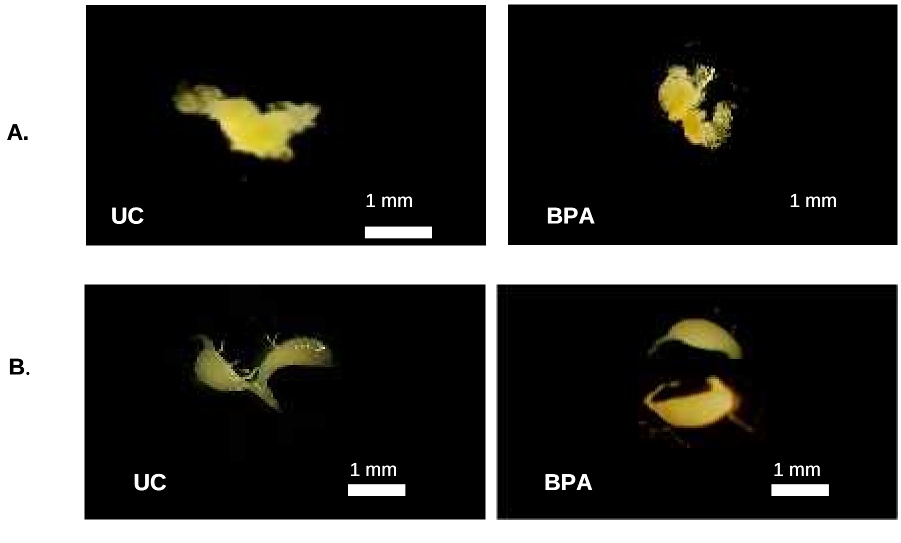
3.1.3 Επίδραση στο αναπαραγωγικό σύστημα των εντόμων

Για την μελέτη της επίδρασης της δισφαινόλης στο αναπαραγωγικό σύστημα των εντόμων, προνύμφες του 1ου προνυμφικού σταδίου εκτέθηκαν μέσω της τροφής μέχρι το στάδιο της νύμφης σε συγκεντρώσεις των 1μg/L, 10μg/L και 100μg/L BPA.

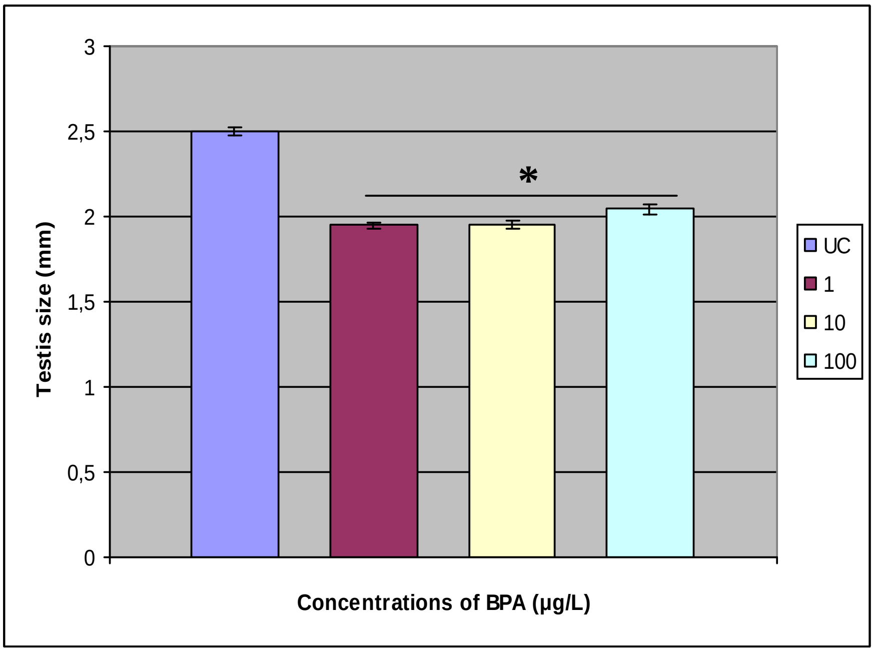
Όταν εξήλθαν τα ενήλικα άτομα απομονώθηκαν οι όρχεις και οι ωοθήκες των ατόμων (Εικόνα 21) και μετρήθηκε το μέγεθος των αναπαραγωγικών τους οργάνων. Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν άτομα που τρεφόντουσαν κανονικά.

Παρατηρήθηκε ότι στα ενήλικα αρσενικά άτομα, συγκριτικά με τα άτομα μάρτυρες, το μέγεθος των όρχεων ήταν στατιστικά σημαντικά μειωμένο στα άτομα που εκτέθηκαν σε συγκεντρώσεις δισφαινόλης (Εικόνα 22). Δεν παρατηρήθηκαν δοσο- εξαρτώμενες στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p \leq 0.05$) στα άτομα που εκτέθηκαν στις διαφορετικές συγκεντρώσεις δισφαινόλης των 1, 10 και 100μg/L.

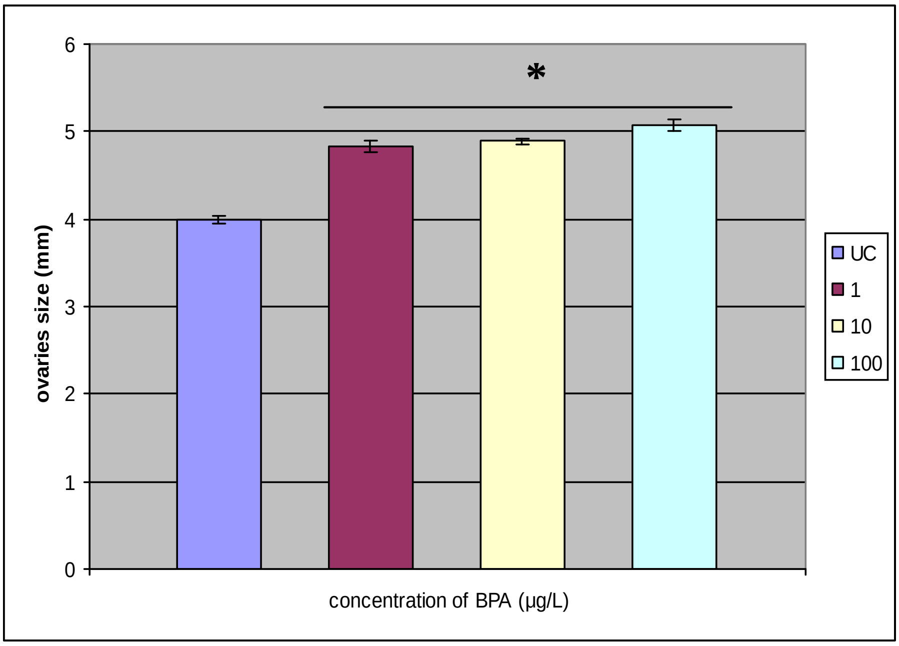
Στα θηλυκά ενήλικα άτομα, συγκριτικά με τα άτομα μάρτυρες, παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στο μέγεθος των ωοθηκών (Εικόνα 23). Το μέγεθος των ωοθηκών αυξήθηκε ανεξαρτήτου συγκεντρώσεων στα άτομα που εκτέθηκαν στις συγκεντρώσεις δισφαινόλης των 1, 10 και 100μg/L.



Εικόνα 21. (A) Εικόνα του μεγέθους των όρχεων σε ενήλικο άτομο μάρτυρα και σε άτομο μετά από χειρισμό με δισφαινόλη, **(B)** Εικόνα του μεγέθους ωοθηκών σε ενήλικο άτομο μάρτυρα και σε άτομο μετά από χειρισμό με δισφαινόλη.



Εικόνα 22. Προνύμφες 1ου προνυμφικού σταδίου εκτέθηκαν σε συγκεντρώσεις δισφαινόλης των 1,10 και 100μg/L μέχρι το στάδιο της νύμφης και μετρήθηκε το μέγεθος των όρχεων. Συγκριτικά με τα άτομα μάρτυρες, το μέγεθος των όρχεων μειώθηκε στατιστικά σημαντικά ($p \leq 0.05$).

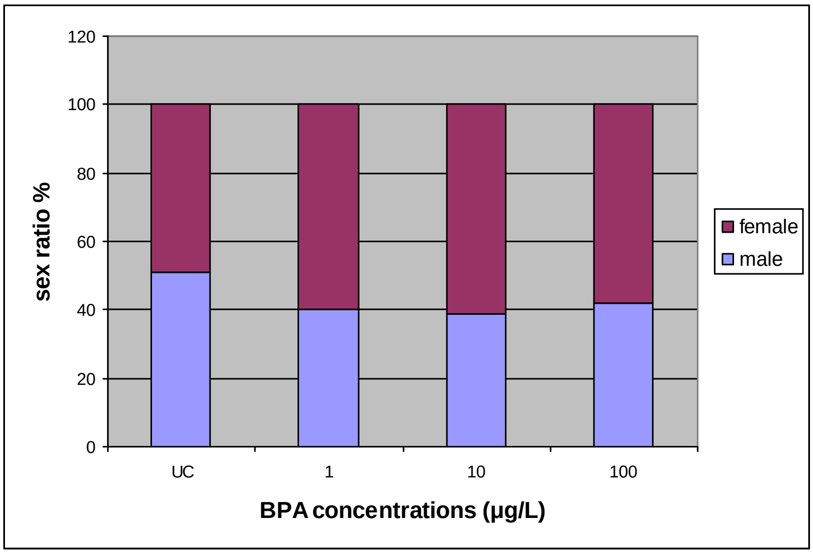


Εικόνα 23. Προνύμφες 1ου προνυμφικού σταδίου εκτέθηκαν σε συγκεντρώσεις δισφαινόλης των 1,10 και 100μg/L μέχρι το στάδιο της νύμφης και μετρήθηκε το μέγεθος των ωοθηκών. Συγκριτικά με τα άτομα μάρτυρες, το μέγεθος των ωοθηκών αυξήθηκε στατιστικά σημαντικά ($p \leq 0.05$).

3.1.4 Επίδραση στην αναλογία του φύλλου των εντόμων

Για την μελέτη της επίδρασης της δισφαινόλης στο αναλογία του φύλλου των ενήλικων ατόμων, προνύμφες του 1^{ου} προνυμφικού σταδίου εκτέθηκαν μέσω της τροφής μέχρι το στάδιο της νύμφης σε συγκεντρώσεις των 1μg/L, 10μg/L και 100μg/L BPA.

Στο στάδιο της νύμφης αξιολογήθηκε η αναλογία φύλλου στα έντομα που εκτέθηκαν στις διαφορετικές συγκεντρώσεις δισφαινόλης. Συγκριτικά με τα άτομα control όπου η αναλογία είναι 50% θηλυκά και 50% αρσενικά, τα άτομα που εκτέθηκαν στην δισφαινόλη μέσω της τροφής τους παρουσίασαν 40% αρσενικά άτομα και 60% θηλυκά άτομα. Δεν φάνηκε να υπάρχει δοσο- εξαρτώμενη επίδραση της δισφαινόλης στην αναλογία φύλλου του εντόμου (Εικόνα 24).



Εικόνα 24. Αναλογία φύλλου σε άτομα μάρτυρες (UC) και σε άτομα που εκτέθηκαν από το 1ο προνυμφικό στάδιο σε συγκεντρώσεις δισφαινόλης των 1,10 και 100μg/L.

3.1.5 Επίδραση της δισφαινόλης σε δύο γενιές εντόμων

Για την μελέτη της επίδρασης της δισφαινόλης σε βάθος γενεών, έντομα του $1^{ου}$ προνυμφικού σταδίου εκτέθηκαν στις συγκεντρώσεις των 1, 10 και 100μg/L BPA μέχρι το στάδιο της νύμφης. Τα ενήλικα άτομα αφέθηκαν να αναπαραχθούν χωρίς παρουσία δισφαινόλης. Οι προνύμφες της δεύτερης γενιάς εκτέθηκαν εκ νέου στις συγκεντρώσεις των 1, 10 και 100μg/L BPA μέσω της τεχνητής τους τροφής. Παρατηρήθηκαν και καταγράφηκαν οι φαινοτυπικές δυσμορφίες που προκλήθηκαν από την επίδραση της δισφαινόλης σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια σε όλες τις συγκεντρώσεις δισφαινόλης. Στο στάδιο της νύμφης καταγράφηκε η αναλογία φύλλου και στο στάδιο των ενήλικων ατόμων μετρήθηκαν τα αναπαραγωγικά όργανα των εντόμων που εκτέθηκαν στη μεγαλύτερη συγκέντρωση δισφαινόλης των 100μg/L. Για την σύγκριση των αποτελεσμάτων, προνύμφες του εντόμου Sesamia nonagrioides τρέφονταν κανονικά για δύο γενιές. Οι δειγματοληψίες πραγματοποιούνταν την ίδια χρονική στιγμή για τα άτομα μάρτυρες και τα άτομα που είχαν εκτεθεί σε συγκεντρώσεις δισφαινόλης μέσω της τεχνητής τους τροφής στην $1^{η}$ και στη $2^{η}$ γενιά.

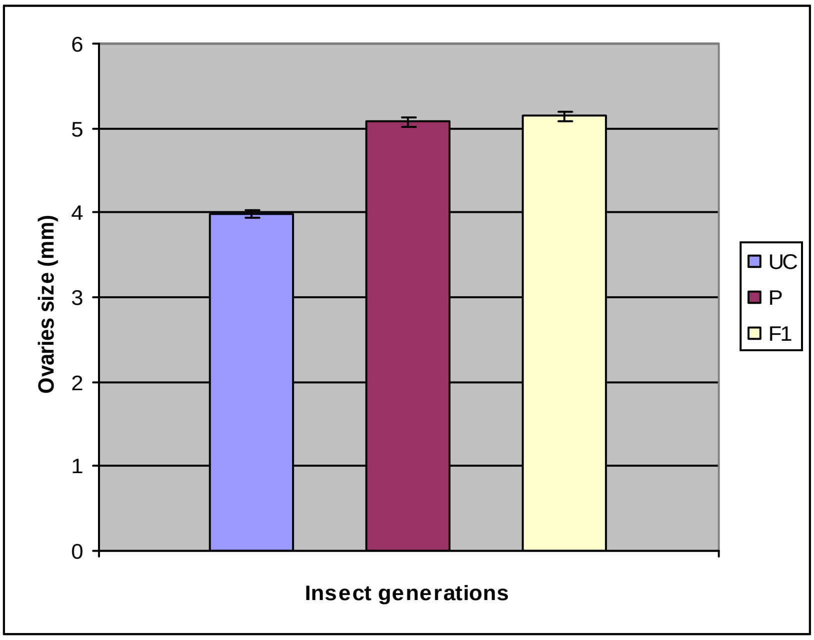
Στα έντομα της δεύτερης γενιάς που εκτέθηκαν σε συγκεντρώσεις δισφαινόλης των 1, 10 και 100μg/L BPA παρατηρήθηκαν 10% φαινοτυπικές δυσμορφίες στο στάδιο των προνυμφών, 13% μη φυσιολογικοί φαινότυποι στο στάδιο της νύμφης και 16% μη φυσιολογικά ενήλικα άτομα (Πίνακας 5).

Στο στάδιο της νύμφης, η αναλογία θηλυκών και αρσενικών επηρεάστηκε σε σύγκριση με τα έντομα control. Στα έντομα της δεύτερης γενιάς τα θηλυκά αποτελούσαν το 60% του πληθυσμού και τα αρσενικά έντομα το 40% του πληθυσμού. Συγκριτικά με την parental γενιά που είχε εκτεθεί στις ίδιες συγκεντρώσεις δισφαινόλης, δεν φάνηκε να υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές (τα δεδομένα δεν παρουσιάζονται).

Τα ενήλικα άτομα των εντόμων που είχαν εκτεθεί και στις δύο γενιές στη μεγαλύτερη συγκέντρωση δισφαινόλης των 100μg/L μελετήθηκαν ως προς το μέγεθος των αναπαραγωγικών τους οργάνων. Για την καλύτερη αξιολόγηση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκαν συγκριτικά τα αποτελέσματα από τα έντομα $1^{ης}$ γενιάς που είχαν εκτεθεί μέσω της τεχνητής τους τροφής στην ίδια συγκέντρωση δισφαινόλης καθώς και έντομα μάρτυρες. Παρατηρήθηκε ότι στα θηλυκά άτομα, το μέγεθος των ωοθηκών ήταν στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερο ($p \leq 0.05$) σε σύγκριση με τα έντομα μάρτυρες. Μεταξύ της 1ης και της 2ης γενιάς εντόμων που εκτέθηκαν στην συγκέντρωση των 100μg/L δισφαινόλης δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ($p \leq 0.05$) (Εικόνα 25). Στα αρσενικά ενήλικα άτομα, το μέγεθος των όρχεων ήταν στατιστικά σημαντικά μειωμένο (p≤ 0.05) συγκριτικά με τα άτομα μάρτυρες (Εικόνα 26). Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της 1ης και 2ης γενιάς εντόμων.

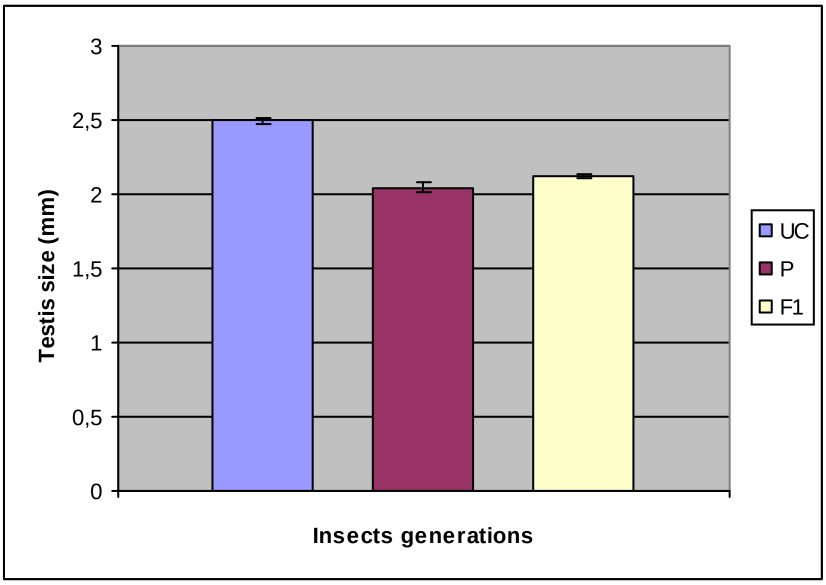
Bpa concentration	Total insects	Number of trials	Abnormal phenotypes % Larval-larval arrest [a]	% Larval-pupal arrest [a]	% Adult wing abnormalities [a]
control	30	3	0	0	0
1μg/L	30	3	1	1	0
10μg/L	30	3	3	7	7
100μg/L	30	3	10	13	16

Πίνακας 5. Η επίδραση των συγκεντρώσεων δισφαινόλης σε έντομα δεύτερης γενιάς στα διάφορα αναπτυξιακά τους στάδια. Για τον στατιστικό έλεγχο των ποσοστών των μη φυσιολογικών φαινοτύπων χρησιμοποιήθηκε ο έλεγχος χ^2 test.



Εικόνα 25. Προνύμφες 1ης και 2ης γενιάς εκτέθηκαν στην συγκέντρωση των 100μg/L BPA από το 1ο προνυμφικό στάδιο έως το στάδιο της νύμφης και μετρήθηκε το μέγεθος των ωοθηκών.

Συγκριτικά με τα άτομα μάρτυρες, το μέγεθος των ωοθηκών αυξήθηκε στατιστικά σημαντικά ($p \leq 0.05$). Δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της 1ης και 2ης γενιάς εντόμων.



Εικόνα 26. Προνύμφες 1ης και 2ης γενιάς εκτέθηκαν στην συγκέντρωση των 100μg/L BPA από το 1ο προνυμφικό στάδιο έως το στάδιο της νύμφης. Στο στάδιο των ενήλικων ατόμων μετρήθηκε το μέγεθος των όρχεων. Συγκριτικά με τα άτομα μάρτυρες, το μέγεθος των όρχεων μειώθηκε στατιστικά σημαντικά ($p \leq 0.05$). Δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της 1ης και 2ης γενιάς εντόμων.

3.2 Μοριακή επίδραση της δισφαινόλης στην τροφή

Οι προνύμφες του εντόμου *Sesamia nonagrioides* τοποθετήθηκαν από το $1^{ο}$ προνυμφικό στάδιο σε συγκεντρώσεις δισφαινόλης των 1μg/L και 10μg/L μέσω της τεχνητής τους τροφής. Τα πειράματα επαναλήφθηκαν 3 φορές με προνύμφες του ίδιου προνυμφικού σταδίου. Οι προνύμφες παρέμειναν μέχρι το $6^{ο}$ προνυμφικό στάδιο στην τεχνητή τους τροφής. Ταυτόχρονα, άτομα όμοιας ανάπτυξης τοποθετούνταν σε κανονική τροφή, για να χρησιμοποιηθούν σαν άτομα μάρτυρες.

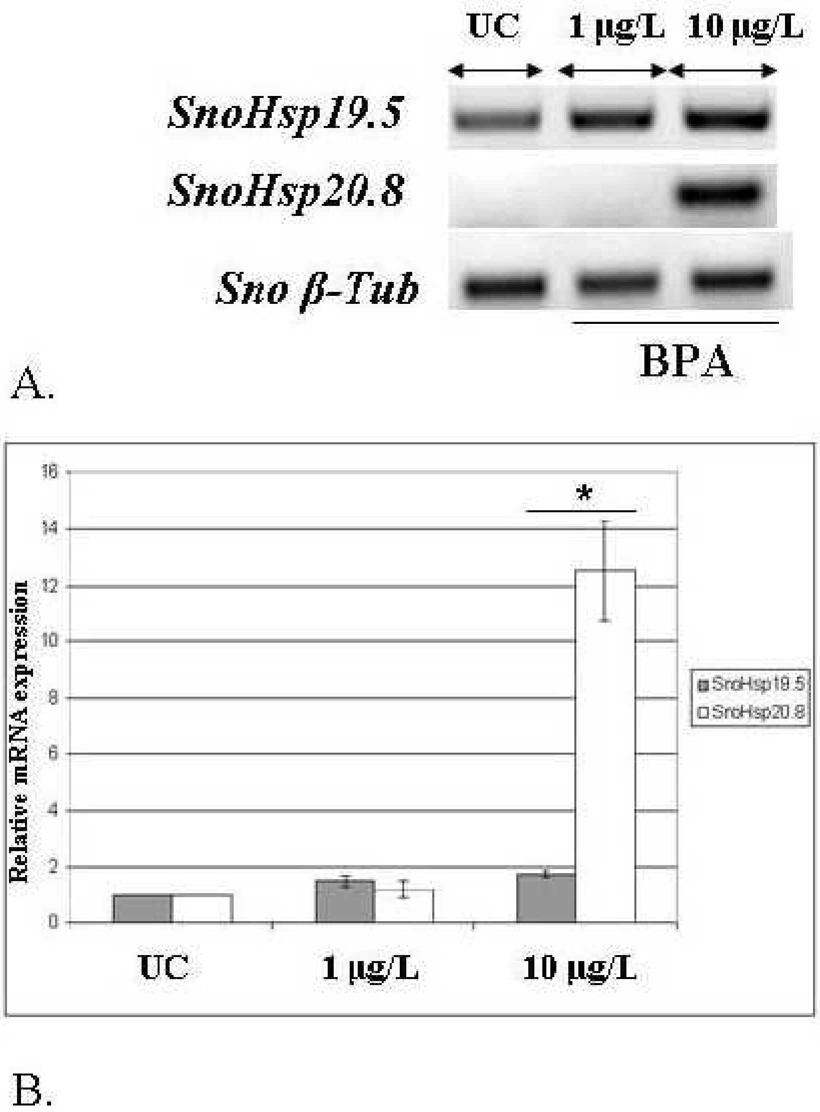
Τα επίπεδα μεταγραφής των γονιδίων που χρησιμοποιήσαμε στη μελέτη μας, αναλύθηκαν με ημιποσοτικό RT-PCR. Σαν γονίδιο- μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε η β-τουμπουλίνη. Τα γονίδια των HSP's αναλύθηκαν με την μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης με μήτρα RNA (RT-PCR).

3.2.1 Επίδραση στις μικρές *Hsp's* (sm*HSP*s)

Τα *SnoHsp19.5* (GenBank accession number:EU668902) και *SnoHsp20.8* (GenBank accession number:DQ336356) έχουν απομονωθεί και χαρακτηρισθεί στην *S. nonagrioides*. Τα γονίδια αυτά επάγονται ιδιαίτερα σε συνθήκες θερμικής καταπόνησης και παρουσιάζουν ταχεία ανταπόκριση στο στρες (Gkouvitsas et al., 2008).

Μετά από έκθεση των προνυμφών σε συγκεντρώσεις δισφαινόλης των 1μg/L και 10μg/L, τα μεταγραφικά επίπεδα του *SnoHsp19.5* φαίνεται να αυξάνονται δοσο-εξαρτώμενα (Εικόνα 22). Στην συγκέντρωση των 10μg/L τα μεταγραφικά επίπεδα του *SnoHsp19.5* αυξάνονται περίπου 2 folds.

Η δισφαινόλη φαίνεται να επηρεάζει τα μεταγραφικά επίπεδα του *SnoHsp20.8* στην μεγαλύτερη συγκέντρωση των 10μg/L BPA, σχεδόν 12 folds (Εικόνα 27).
Δεν υπάρχουν βιβλιογραφικές αναφορές για την επίδραση της δισφαινόλης στις sm*HSP*s.



Εικόνα 27. Η επίδραση της δισφαινόλης στα μεταγραφικά επίπεδα των γονιδίων HSP στο 6^{ο} προνυμφικό στάδιο των εντόμων *S. nonagrioides*. Οι προνύμφες εκτέθηκαν σε τεχνητή τροφή σε συγκεντρώσεις δισφαινόλης των 1μg/L and 10μg/L για περίπου 30 ημέρες. (A) Ανάλυση των μεταγραφικών επιπέδων με ημιποσοτική RT-PCR. Το γονίδιο της β-tubulin χρησιμοποιήθηκε σαν γονίδιο control. (B) Ανάλυση των μεταγραφικών επιπέδων με Real-Time PCR. Η ποσότητα των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων *SnHsp19.5* και *SnHsp20.4* κανονικοποιήθηκε με τα επίπεδα έκφρασης της β-τουμπουλίνης ($p \leqslant 0.05$, t test).

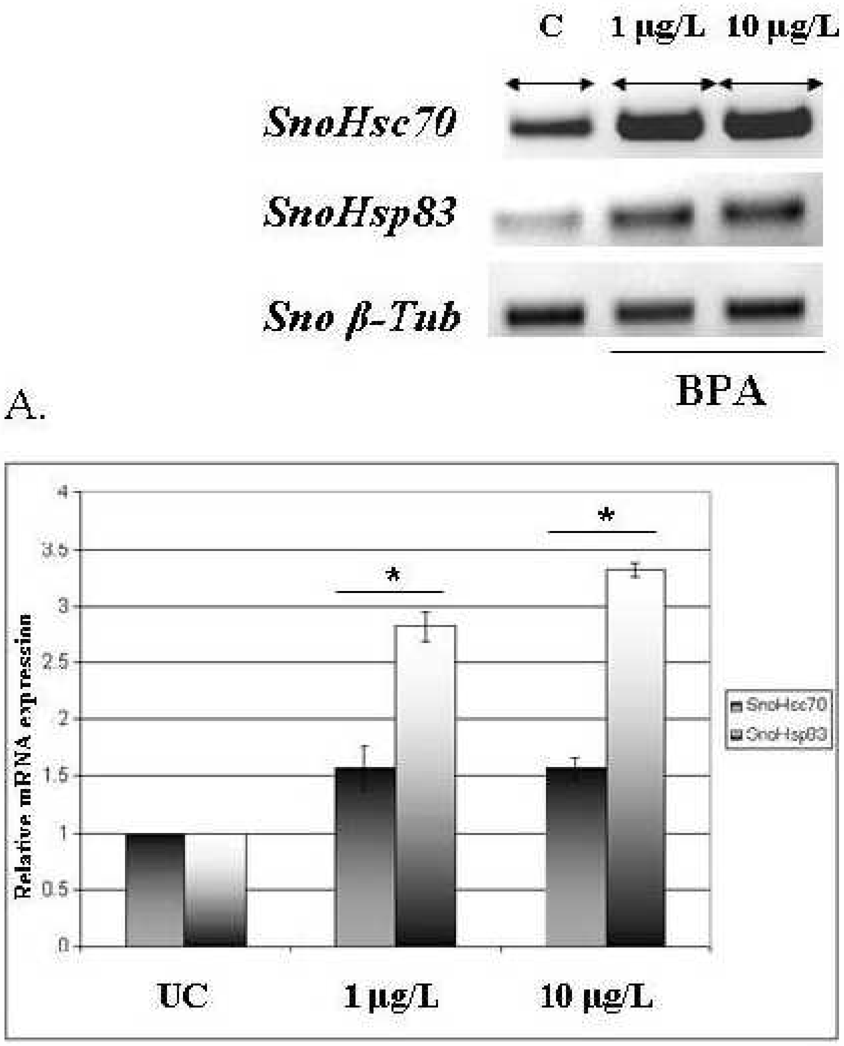
3.2.2 Επίδραση στις Hsp 70, Hcp70 και Hsp83

Σε προηγούμενη έρευνα φαίνεται ότι τα μεταγραφικά επίπεδα του γονιδίου *SnoHsp83* αυξάνονται γρήγορα μετά την θερμική καταπόνηση συγκρινόμενα με το control (Gouvitsas et al., 2009).

Τα επίπεδα του *SnoHsp83* παρουσιάζουν μεγάλη αύξηση μετά την προσθήκη δισφαινόλης στην τροφή (Εικόνα 28), η οποία δεν φαίνεται να επηρεάζεται από την συγκέντρωση της δισφαινόλης, καθώς αύξηση παρουσιάζεται και στις δύο συγκεντρώσεις δισφαινόλης των 1μg/L και 10μg/L. Στην συγκέντρωση των 10μg/L τα μεταγραφικά επίπεδα του *SnoHsp83* αυξήθηκαν 3,5 φορές παραπάνω σε σχέση με το control.

Τα μεταγραφικά επίπεδα του γονιδίου *SnoHcp70* αυξήθηκαν και στις δύο συγκεντρώσεις δισφαινόλης. Μεγαλύτερη αύξηση των μεταγραφικών επιπέδων παρουσιάστηκε στην μικρότερη συγκέντρωση δισφαινόλης του 1μg/L από ότι στα 10μg/L (Εικόνα 28).

Τα μεταγραφήματα του *SnoHsp70* γονιδίου, το οποίο θεωρείται γονίδιο-δείκτης κυτταρικού stress, δεν παρουσίασαν καμία διαφορά με την προσθήκη δισφαινόλης στην τροφή των εντόμων (τα δεδομένα δεν παρουσιάζονται) σε καμία συγκέντρωση.



B.

Εικόνα 28. Η επίδραση της δισφαινόλης στα μεταγραφικά επίπεδα των *SnoHcp70* και *SnoHsp83* στο 6^{ο} προνυμφικό στάδιο των εντόμων *S. nonagrioides*. Οι προνύμφες εκτέθηκαν σε τεχνητή τροφή σε συγκεντρώσεις δισφαινόλης των 1μg/L and 10μg/L για περίπου 30 ημέρες. (A) Ανάλυση των μεταγραφικών επιπέδων με ημιποσοτική RT-PCR. Το γονίδιο της β-tubulin χρησιμοποιήθηκε σαν γονίδιο μάρτυρας. (B) Ανάλυση των μεταγραφικών επιπέδων με Real-Time PCR. Η ποσότητα των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων *SnoHsp83, SnoHsc70,* κανονικοποιήθηκε με τα επίπεδα έκφρασης της β-τουμπουλίνης ($p \leqslant 0.05$, t test).

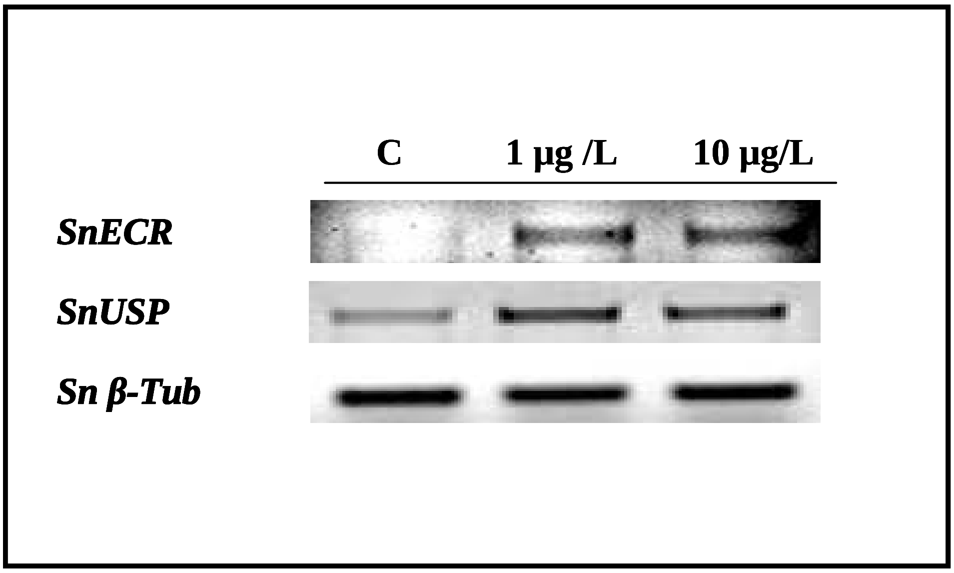
3.2.3 Επίδραση στον ECR και USP

Σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των εντόμων παίζουν η ορμόνη νεότητας (JH) και τα εκδυστεροειδή, επηρεάζοντας τα στάδια των προνυμφών, τις εκδύσεις και την μεταμόρφωση. Η στεροειδής ορμόνη 20-hydroxyecdysone (ecdysone), ενεργοποιεί και συντονίζει τα διαδοχικά στάδια του κύκλου ζωής του εντόμου. Στην D. melanogaster, ο υποδοχέας της εκδυσόνης αποτελείται από ένα ετεροδιμερές της πρωτεΐνης που κωδικοποιείται από τον EcR και το ultraspiracle (USP) γονίδιο (Koelle et al., 1991).

Τα μεταγραφικά επίπεδα των γονιδίων *SnoECR* και *SnUSP* αναλύθηκαν αναλύθηκαν με ημιποσοτικό RT-PCR. Σαν γονίδιο- μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε η β-τουμπουλίνη.

Στην παρούσα μελέτη, τα μεταγραφικά επίπεδα του *SnECR* επηρεάζονται από την προσθήκη δισφαινόλης στην τεχνητή τροφή των εντόμων και στις δύο συγκεντρώσεις των 1μg/L και 10μg/L BPA (Εικόνα 29).

Ομοίως, τα μεταγραφικά επίπεδα του γονιδίου *SnUSP* αυξήθηκαν και στις δύο συγκεντρώσεις δισφαινόλης των 1μg/L και 10μg/L σε σύγκριση με τα μεταγραφικά επίπεδα του γονιδίου control (Εικόνα 29).



Εικόνα 29. Μεταγραφικά επίπεδα των γονιδίων *SnoECR* και *SnUSP* μετά από έκθεση στις συγκεντρώσεις των 1μg/L και 10μg/L BPA μέσω της τεχνητής τροφής των εντόμων.

3.3 Μοριακή επίδραση της ενέσιμης δισφαινόλης

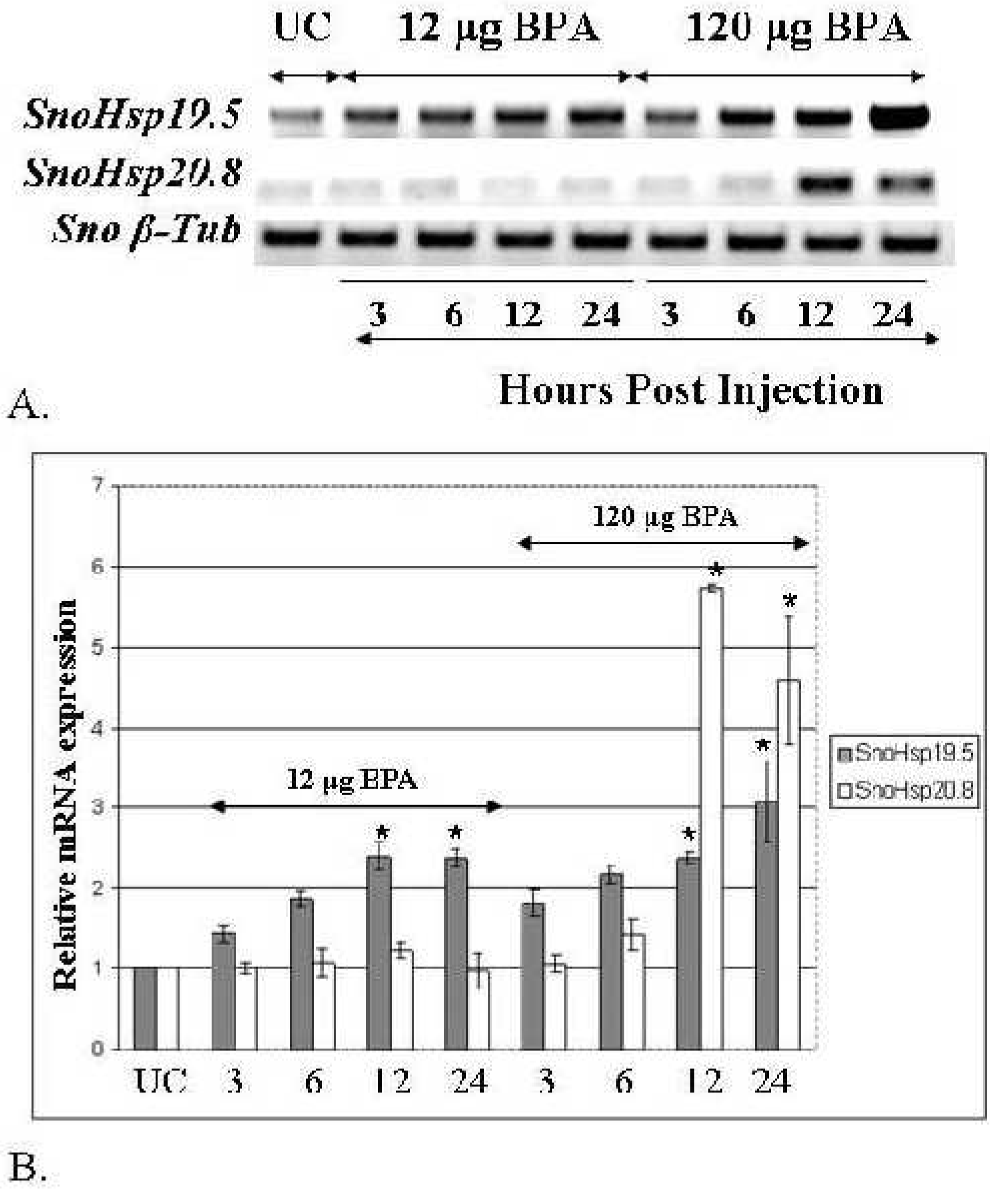
Προνύμφες του εντόμου που αναπτύσσονταν σε κανονικές συνθήκες εκτροφής, χρησιμοποιήθηκαν για χειρισμό δισφαινόλης με ένεση, σε δύο συγκεντρώσεις, 12μg και 120μg. Οι προνύμφες ήταν στο ίδιο αναπτυξιακό στάδιο ($5^{ο}$ instar -$3^{η}$ μέρα), κατάλληλο για μοριακή ανάλυση, καθώς το στάδιο αυτό έχει μελετηθεί σε προηγούμενες έρευνες του εργαστηρίου και γνωρίζουμε τις μοριακές αποκρίσεις των υπό μελέτη γονιδίων. Οι ενέσεις έγιναν στο λίπος των εντόμων μετά από αναισθησία τους, τα δείγματα διατηρήθηκαν στους -80^{o} C μέχρι την μοριακή τους ανάλυση.

Τα επίπεδα μεταγραφής των γονιδίων HSP's που χρησιμοποιήσαμε στη μελέτη μας, αναλύθηκαν με ημιποσοτικό RT-PCR. Σαν γονίδιο- μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε η β-τουμπουλίνη. Τα γονίδια των HSP's αναλύθηκαν επίσης με την μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης με μήτρα RNA (Real Time PCR).

3.3.1 Επίδραση στις μικρές *Hsp*'s (sm*HSP*s)

Τα μεταγραφικά επίπεδα των *SnoHsp19.5* και *SnoHsp20.8* φάνηκαν να αυξάνονται μετά τον χειρισμό με δισφαινόλη (Εικόνα 30). Οι ενέσεις έγιναν σε συγκεντρώσεις BPA των 12μg και 120μg και οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν στις 3,6,12 και 24 ώρες μετά την ένεση.

Τα μεταγραφικά επίπεδα του *SnoHsp19.5* φαίνονται να αυξάνονται απ' τη δράση της δισφαινόλης ανεξαρτήτου δόσης, αφού παρουσιάστηκε αύξηση στα 12 μg και στα 120 μg. Η ανάλυση των μεταγραφικών αποτελεσμάτων με την μέθοδο της Real Time PCR υποδεικνύουν ότι η αύξηση τους δεν είναι δοσο-εξαρτώμενη. Παρουσιάζεται μεγαλύτερη αύξηση των μεταγραφικών επιπέδων του *SnoHsp19.5* στις 12 ώρες μετά την ένεση, ενώ τα μεταγραφικά επίπεδα του γονιδίου στις 24 ώρες μετά την ένεση φαίνεται να μειώνονται. Αντιθέτως τα μεταγραφικά επίπεδα του *SnoHsp20.8* αυξήθηκαν στην μεγαλύτερη δόση, στη συγκέντρωση των 120 μg BPA στις 12 και 24 ώρες μετά την ένεση (Εικόνα 30).



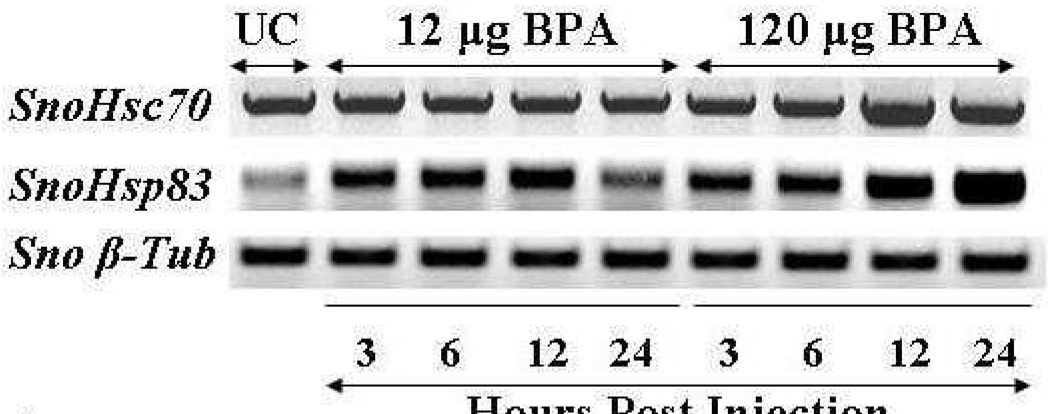
Εικόνα 30. Η επίδραση της δισφαινόλης στα μεταγραφικά επίπεδα των *SnoHsp19.5* και *SnoHsp20.8* μετά από ενέσεις των εντόμων με συγκεντρώσεις των 12μg και 120μg BPA. Οι δειγματοληψίες έγιναν στις 3, 6, 12 και 24 ώρες μετά τις ενέσεις. (A) Ανάλυση των μεταγραφικών επιπέδων με ημιποσοτική RT-PCR. Το γονίδιο της β-tubulin χρησιμοποιήθηκε σαν γονίδιο control. Τα έντομα control ενέθησαν με αιθανόλη 100%. (B) Ανάλυση των μεταγραφικών επιπέδων με Real-Time PCR. Η ποσότητα των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων *SnoHsp19.5* και *SnoHsp20.8* κανονικοποιήθηκε με τα επίπεδα έκφρασης της β-τουμπουλίνης ($p \leqslant 0.05$, t test).

3.3.2 Επίδραση στις Hsp 70, Hcp70, Hsp83

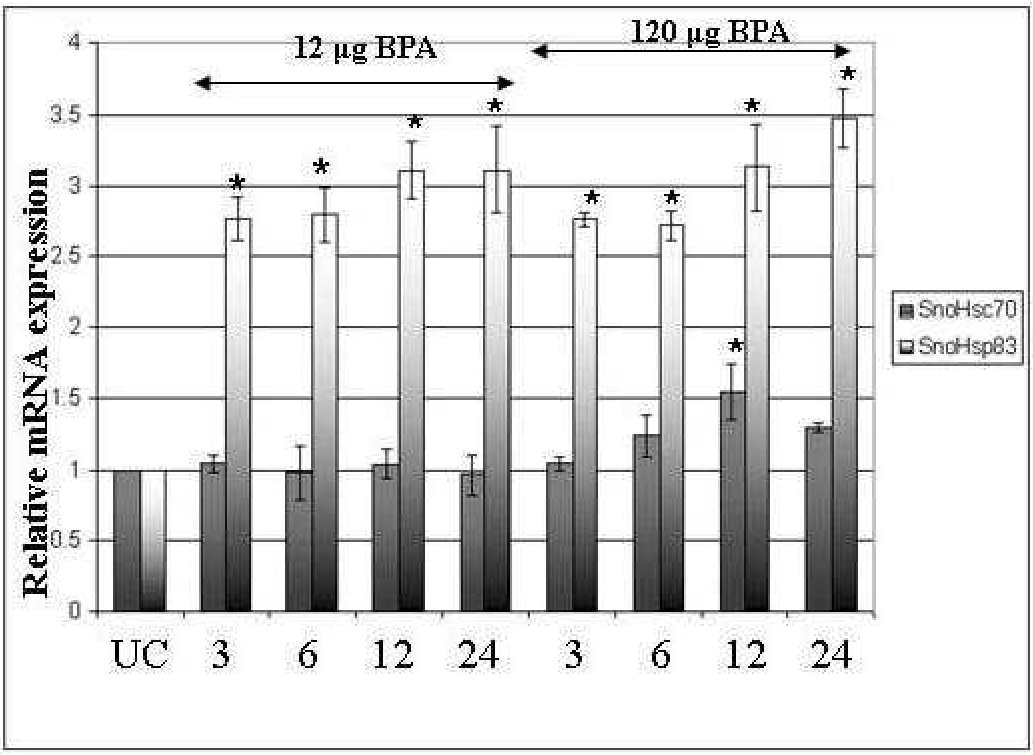
Η δράση της δισφαινόλης αύξησε τον αριθμό των *SnoHsp83* mRNAs στα κύτταρα των προνυμφών και στις δύο συγκεντρώσεις των 12 μg και 120μg BPA (Εικόνα 31).

Το γονίδιο της *SnoHsp70* δεν έδειξε καμία αλλαγή στα μεταγραφικά του επίπεδα (τα δεδομένα δεν παρουσιάζονται), ενώ αντιθέτως το γονίδιο της *SnoHcp70* φαίνεται να επηρεάζεται απ' την παρουσία δισφαινόλης στα κύτταρα, σημειώνοντας αύξηση των μεταγραφικών επιπέδων του. Η αύξηση φαίνεται μεγαλύτερη στη συγκέντρωση των 120μg BPA στις 12 και 24 ώρες μετά την ένεση (Εικόνα 31).

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων με την μέθοδο της Real Time PCR έδειξε ότι τα μεταγραφικά επίπεδα του γονιδίου *SnoHsp83* δεν παρουσίασαν δοσο - εξαρτώμενη αύξηση, καθώς τα επίπεδα του γονιδίου αυξάνονται και στις δύο συγκεντρώσεις των 12 μg και 120μg BPA (Εικόνα 31). Το γονίδιο της *SnoHsp70* δεν έδειξε καμία αλλαγή στα μεταγραφικά του επίπεδα (τα δεδομένα δεν παρουσιάζονται). Τα μεταγραφικά επίπεδα του γονιδίου *SnoHcp70* αυξάνονται στην μεγαλύτερη συγκέντρωση των 120μg BPA στις 12 ώρες μετά την ένεση (Εικόνα 31).



A.



B.

Εικόνα 31. Η επίδραση της δισφαινόλης στα μεταγραφικά επίπεδα των *SnoHsp83*και *SnoHsc70* μετά από ενέσεις των εντόμων με συγκεντρώσεις των 12μg και 120μg BPA. Οι δειγματοληψίες έγιναν στις 3, 6, 12 και 24 ώρες μετά τις ενέσεις. (Α) Ανάλυση των μεταγραφικών επιπέδων με ημιποσοτική RT-PCR. Το γονίδιο της β-tubulin χρησιμοποιήθηκε σαν γονίδιο control. Τα έντομα control ενέθησαν με αιθανόλη 100%. (Β) Ανάλυση των μεταγραφικών επιπέδων με Real-Time PCR. Η ποσότητα των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων *SnoHsp83*και *SnoHsc70* κανονικοποιήθηκε με τα επίπεδα έκφρασης της β-τουμπουλίνης ($p \leqslant 0.05$, t test).

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η δισφαινόλη είναι ένα ξενοοιστρογόνο, το οποίο έχει διαπιστωθεί ότι προκαλεί αρνητικές επιπτώσεις στους ανθρώπους, καθώς και στους πληθυσμούς των οικοσυστημάτων. Σε βιοχημικό επίπεδο η δισφαινόλη δρα ως ένας εκλεκτικός ρυθμιστής των οιστρογονικών υποδοχέων στα θηλαστικά (Lemos et al., 2009). Ένα ευρύ φάσμα των σημαντικών επιπτώσεων της έχει αναφερθεί στην αναπαραγωγή και την ανάπτυξη, το ανοσοποιητικό σύστημα και το νευρικό σύστημα σε πειραματόζωα (Lemos et al., 2010).

Η έρευνα της επίδρασης της δισφαινόλης στους οργανισμούς είναι πολύ σημαντική για την κατανόηση των μηχανισμών δράσης της, όπως και τον βαθμό επικινδυνότητας της για την διατήρηση της ισορροπίας της βιοποικιλότητας σε ευπαθείς οργανισμούς, όπως τα έντομα (Cousins et al., 2002). Οι Crain et al. (2007) σε συγκριτική μελέτη της επίδρασης της δισφαινόλης στα οικοσυστήματα, αναφέρουν ότι συγκέντρωση δισφαινόλης στο νερό ή στο χώμα, οδηγεί σε αυξημένη θνησιμότητα των πληθυσμών που ζουν εκεί. Αναφέρονται επίσης μορφολογικές δυσμορφίες οργανισμών, λόγω της ενδοκρινικής διαταραχής που προκαλεί η δισφαινόλη σε ενδοκρινικούς αδένες, όπως ο θυροειδής (Heimeier et al., 2010).

Στην παρούσα εργασία, προνύμφες του εντόμου S. nonagrioides τοποθετήθηκαν σε τεχνητή τροφή, που περιείχε διαφορετικές συγκεντρώσεις δισφαινόλης των 1μg/L, 10μg/L,100μg/L, 1mg/L, 10mg/L και 100mg/L. Οι προνύμφες έμειναν στην τεχνητή τροφή μέχρι το 6ο προνυμφικό στάδιο και μετρήθηκαν τα ποσοστά θνησιμότητας τους. Σε σύγκριση με τα έντομα-μάρτυρες, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($\rho<0,05$) στα ποσοστά θνησιμότητα στις συγκεντρώσεις των 1 μg / L, 10 μg / L και 100 μg / L BPA. Αντιθέτως, στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις των 1 mg / L και 10 mg / L BPA παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($\rho<0,05$) στα επίπεδα θνησιμότητας των προνυμφών, σε σύγκριση με τα έντομα-μάρτυρες (Πίνακας 2).

Ως παράμετρος της ανάπτυξης, μετρήθηκε το σωματικό βάρος και το μέγεθος της κεφαλής των προνυμφών S. nonagrioides σε διαφορετικές συγκεντρώσεις BPA. Το μέγεθος του μήκους της κεφαλής των προνυμφών δεν είχε καμία διαφορά σε καμία από τις συγκεντρώσεις δισφαινόλης σε σύγκριση με τα έντομα έντομα-

μάρτυρες (τα δεδομένα δεν παρουσιάζονται). Συγκριτικά με τα έντομα-μάρτυρες, 32 ημέρες μετά την έναρξη του πειράματος, οι συγκεντρώσεις των 1 μg / L ή 10 μg / L BPA εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στις προνύμφες. Είναι ενδιαφέρον ότι στην υψηλότερη δόση των 100 μg / L BPA το σωματικό βάρος των προνυμφών αυξήθηκε στατιστικά σημαντικά σε σχέση με τα 32 ημέρες μετά την έναρξη του πειράματος (Πίνακας 3).

Βιβλιογραφικές πηγές αναφέρουν, ότι η δράση της δισφαινόλης επηρεάζει τόσο τα μορφολογικά στάδια των οργανισμών όσο και το αναπαραγωγικό τους σύστημα. Έρευνες σε σπονδυλωτά και ασπόνδυλα δείχνουν ότι η δράση της δισφαινόλης επηρεάζει τον αριθμό των γεννήσεων, των αποβολών και το ανδρικό αναπαραγωγικό σύστημα (Crain et al., 2007). Έρευνες σε αμφίβια, Xenopus laevis (Sone et al., 2004) και Rana nigromaculata (Yang et al., 2005), δείχνουν προβλήματα στην ανάπτυξη, όπως δυσμορφίες στην ουρά και μικρότερο μήκος σώματος, συγκρινόμενα με άτομα -μάρτυρες.

Οι μορφολογικές και αναπτυξιακές διαδικασίες των εντόμων καθοδηγούνται από την ορμόνη της έκδυσης και την ορμόνη νεότητας, καθώς και από άλλες νευροορμόνες, όπως η ορμόνη της έγκλησης. Η διαδικασία της έκδυσης και μεταμόρφωσης έχει μελετηθεί εκτενώς σε διάφορα είδη εντόμων (Nijhout, 1994; Riddiford, 1994, 1996). Οι μορφολογικές και δομικές αλλαγές που υφίσταται η επιδερμίδα των προνυμφών κατά την διάρκεια της ανάπτυξης, καθορίζονται από τον έλεγχο έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων, την συγκέντρωση των επιπέδων της ορμόνης της έκδυσης στην αιμολέμφο των εντόμων και στην παρουσία ή απουσία της ορμόνης νεότητας. Οποιαδήποτε αλλαγή στην ορμονική ομοιόσταση του οργανισμού του εντόμου κατά την διάρκεια των αναπτυξιακών του σταδίων, είτε από εξωγενείς ορμόνες, είτε από συνθετικά ανάλογα ορμονών (αγωνιστές ή ανταγωνιστές), μπορεί να οδηγήσουν στην διαταραχή της ανάπτυξης ή την δημιουργία μη φυσιολογικών αναπτυξιακών σταδίων.

Οι μορφολογικές αλλαγές και οι χρονικές στιγμές που υφίσταται το έντομο την διαδικασία της έγκλησης έχουν μελετηθεί επαρκώς στο στάδιο της νύμφης της Drosophila (Kimura and Truman, 1990; McNabb et al., 1997; Park et al., 1999). Η ορμόνη της έγκλησης απελευθερώνεται 6-7 ώρες πριν την ολοκλήρωση της διαδικασίας της έγκλησης και η επιδερμίδα του εντόμου περνάει μια σειρά από μορφολογικές αλλαγές, οι οποίες είναι ορατές και χαρακτηρίζονται ως λεία επιδερμίδα (S), λεία/ κοκκώδης (S/ G), κοκκώδης (G), και τέλος, λευκή (W).

Ορισμένα βήματα διαφέρουν σε διάρκεια μεταξύ θηλυκών και αρσενικών εντόμων. Στα θηλυκά έντομα το στάδιο της λείας επιδερμίδας διαρκεί περίπου 5,5 ώρες πριν πραγματοποιηθεί η μετάβαση στην λεία/ κοκκώδη επιδερμίδα, ενώ στα αρσενικά έντομα το στάδιο της λείας επιδερμίδας διαρκεί μόνο λίγα λεπτά. Η έναρξη του τελευταίου σταδίου της έγκλησης, το στάδιο της λευκής (W) επιδερμίδας, εμφανίζεται κατά τη διόγκωση των θυλάκων της τραχείας και προοικονομεί την έναρξη της προ-έκδυσης. Η διαδικασία της προ-έγκλησης ξεκινάει στις νύμφες περίπου 1 ώρα πριν την έναρξη της έγκλησης και αποτελείται από κοιλιακές συσπάσεις του σώματος του εντόμου. Όπως περιγράφεται στην Drosophila, ενέσεις ETH σε ενήλικα έντομα επιταχύνουν την έναρξη της προ- έγκλησης (Park et al., 1999).

Στην παρούσα μελέτη, για την επίδραση της δισφαινόλης στα αναπτυξιακά στάδια του εντόμου, προνύμφες 1ου προνυμφικού σταδίου εκτέθηκαν στις συγκεντρώσεις δισφαινόλης που δεν επηρέαζαν την θνησιμότητα των εντόμων. Τα έντομα που εκτέθηκαν στην χαμηλότερη συγκέντρωση του 1 μg / L BPA δεν παρουσίασαν υψηλό ποσοστό μη–φυσιολογικών φαινοτύπων. Στις υψηλότερες συγκεντρώσεις δισφαινόλης, των 10 μg, 100 μg, 1mg και 10 mg / L BPA, τα ποσοστά των μη φυσιολογικών φαινοτύπων αυξήθηκαν (Πίνακας 4). Στην συγκέντρωση των 100mg / L, το 33% των προνυμφών του 6ου προνυμφικού σταδίου, το 43% των νυμφών και το 50% των ενηλίκων εμφάνισαν μη φυσιολογικούς φαινοτύπους (Πίνακας 4).

Στο στάδιο της νύμφης, αναπτύσσονται τα φτερά των ενήλικων ατόμων (Oberlander, 1985). Μία κορυφή της συγκέντρωσης των εκδυστεροειδών στην αιμολέμφο των εντόμων ενεργοποιεί την δράση της χιτίνης και άλλων ορμονών, που σχετίζονται με την διαδικασία σχηματισμού των φτερών των ενήλικων ατόμων. Για τον φυσιολογικό σχηματισμό των φτερών, μελέτες αναφέρουν ότι η σταθερή και διαρκής παρουσία της ορμόνης της έκδυσης (20E) είναι απαραίτητη (Milkolajczyk et αϊ., 1995). Στο στάδιο του ενήλικου ατόμου, λαμβάνουν χώρα πολλαπλές κυτταρικές διαιρέσεις της επιδερμίδας του εντόμου, σχηματίζοντας τις κυτταρικές σειρές που κατά το στάδιο της μεταμόρφωσης θα αποτελέσουν τα φτερά του ενήλικου ατόμου. Απαραίτητη προϋπόθεση αποτελεί η σταθερή συγκέντρωση της ορμόνης της έκδυσης, έτσι ώστε τα φτερά του ενήλικου ατόμου να φτάσουν το απαραίτητο μήκος και να έχουν φυσιολογικό φαινότυπο (Nardi and Magee-Adams, 1968).

Στην παρούσα μελέτη, υψηλό ποσοστό ενήλικων εντόμων που είχαν εκτεθεί σε συγκεντρώσεις δισφαινόλης από το 1ο προνυμφικό στάδιο, εμφάνισαν κατσαρά φτερά, υποδηλώνοντας την ενδοκρινική επίδραση της δισφαινόλης στο στάδιο της νύμφης. Τα αποτελέσματά μας υποδηλώνουν ότι η δισφαινόλη επιδρά σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια του εντόμου S. nonagrioides.

Στο τελευταίο προνυμφικό στάδια, ο οργανισμός των προνυμφών υποβάλλεται σε μεγάλες αλλαγές στην ρύθμιση της ανάπτυξης, που συνδέονται με αλλαγές στην πρόσληψη των θρεπτικών ουσιών και στις ορμόνες, που δρουν ως ρυθμιστές της εξωτερικής ανάπτυξη των ιστών. Στα λεπιδόπτερα τρεις ορμόνες ελέγχουν την μορφολογία και την ανάπτυξη των κυττάρων των φτερών (imaginal disks) κατά τη διάρκεια του σταδίου της μεταμόρφωσης: η ορμόνη bombyxin (insulin-like hormone Bbx), η ορμόνη της έκδυσης (ecdysone) και η ορμόνη νεότητας (JH). Η ανάπτυξη των φτερών των ενήλικων ατόμων επηρεάζεται από τους αγωνιστές της ορμόνης της έκδυσης. Τα άτομα που είχαν εκτεθεί σε αγωνιστές της ορμόνης της έκδυσης ήταν στείρα (Sundaram et al 2002) ή αναπτύσσονταν ασύγχρονα, επηρεάζοντας την αναπαραγωγή και τον πληθυσμό (Biddinger et al 2006).

Σε πειράματα που έγιναν στο έντομο *Ostrinia nubilalis* (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae) (Trisyono & Chippendale 1997) και στο έντομο *S. littoralis* (Adel & Sehnal 2000), προνύμφες που εκτέθηκαν σε συγκεντρώσεις αγωνιστών της ορμόνης της έκδυσης, υπέστησαν πρόσθετη έκδυση στο 6ο ή 7ο προνυμφικό στάδιο. Σε παρόμοια μελέτη στο έντομο *S. exigua*, έκθεση σε αγωνιστής της ορμόνης της έκδυσης είχε σαν αποτέλεσμα δύο επιπλέον προνυμφών εκδύσεις (Smagghe & Degheele 1994). Η αύξηση του μήκους του προνυμφικού σταδίου των εντόμων είναι ανεπιθύμητη καθώς οι προνύμφες προκαλούν σοβαρές ζημιές στις καλλιέργειες. Στην παρούσα μελέτη, δεν μελετήθηκε η επιμήκυνση των προνυμφικών σταδίων του εντόμου Sesamia nonagrioides.

Η επίδραση των αγωνιστών της ορμόνης της έκδυσης έχουν μελετηθεί σε αρκετά είδη εντόμων, στα στάδια της προνύμφης και του ενήλικου ατόμου. Οι μελέτες αυτές αναφέρουν καθυστέρηση ή επιτάχυνση της ανάπτυξης (Adel & Sehnal 2000, Biddinger et al 2006), μείωση του σωματικού βάρους προνυμφών και νυμφών (Pineda et al 2007, Zamora et al 2008), επίδραση στη θνησιμότητα και στους φαινοτύπους των εντόμων (Gobbi et al 2000, Pineda et al 2004), δυσμορφίες στα φτερά των ενήλικων ατόμων (Trisyono & Chippendale 1998, Sundaram et al 2002) και δαταραχή της διάπαυσης (Eizaguirre et al 2007).

Στην έρευνά μας, για την μελέτη της επίδρασης της δισφαινόλης στο αναπαραγωγικό σύστημα των εντόμων, προνύμφες 1ου προνυμφικού σταδίου εκτέθηκαν σε συγκεντρώσεις δισφαινόλης των 1μg/L, 10μg/L και 100μg/L έως το στάδιο της νύμφης. Μετά την έγκληση των προνυμφών, μετρήθηκε η αναλογία φύλου μεταξύ θηλυκών και αρσενικών εντόμων (Εικόνα 24). Η έκθεση των εντόμων στη δισφαινόλη φαίνεται ότι επηρέασε την αναλογία φύλου. Σε σύγκριση με τα έντομα μάρτυρες που η αναλογία ήταν 50% αρσενικά και 50% θηλυκά έντομα, τα έντομα που εκτέθηκαν στις συγκεντρώσεις δισφαινόλης εμφάνισαν 40% αρσενικά έντομα και 60% θηλυκά έντομα. Στη συνέχεια, μετρήθηκε το μήκος των ωοθηκών και των όρχεων των ενήλικων ατόμων που εκτέθηκαν στις συγκεντρώσεις των 1μg/L, 10μg/L και 100μg/L BPA. Σε σύγκριση με τα άτομα μάρτυρες, το μέγεθος των όρχεων φαίνεται ότι μειώθηκε στατιστικά σημαντικά (Εικόνα 22), ενώ το μέγεθος των ωοθηκών αυξήθηκε με στατιστικά σημαντική διαφορά (Εικόνα 23). Δεν παρατηρήθηκε δοσο- εξαρτώμενη σχέση μεταξύ των συγκεντρώσεων δισφαινόλης και του μεγέθους των αναπαραγωγικών οργάνων του εντόμου S. nonagrioides.

Δεν υπάρχουν πολλές βιβλιογραφικές αναφορές για την επίδραση των αγωνιστών της ορμόνης της έκδυσης στην αναλογία του φύλου. Στο έντομο *S. frugiperda* τα ενήλικα άτομα δεν παρουσίασαν καμία αλλαγή μετά από έκθεσή των προνυμφών τους σε συγκεντρώσεις αγωνιστών της ορμόνης της έκδυσης. Αντιθέτως, σε έντομα *P. idaeusalis* (Biddinger et al, 2006) αναφέρθηκε μεγάλη αλλαγή στην αναλογία αρσενικών και θηλυκών ατόμων (2:1 αρσενικά:θηλυκά) μετά από έκθεση προνυμφών στην tebufenozide. Ο μηχανισμός δράσης των αγωνιστών της ορμόνης της έκδυσης δεν έχει μελετηθεί επαρκώς. Τα εκδυστεροειδή εμπλέκονται στις διαδικασίες βιτελογένεσης και στην ωρίμανση των ωοθηκών του εντόμου *P. interpunctella* (Shirk et al., 1990). Η ορμόνη της έκδυσης (20-hydroxyecdysone) ενεργοποιεί άμεσα και έμμεσα διαφορετικές πτυχές της ωρίμανσης των ωοθηκών των θηλυκών ατόμων. Η επίδρασή της καθίσταται εμφανής κατά την διάρκεια των εκδύσεων. Η ωρίμανση των ωοθηκών και η διαφοροποίησή τους από το στάδιο των οκτάδων σε ωοκύτταρα (Orikasa et al. 1993), η έξοδος των ωοκυττάρων από τις ωοθήκες και η βιτελλογένεση (Pan, 1977), είναι μερικές από τις διαδικασίες που ενεργοποιούνται από την δράση της ορμόνης της έκδυσης στο στάδιο της μεταμόρφωσης. Η ανίχνευση των υποδοχέων της εκδυσόνης σε ιστό ωοθηκών, ενισχύει την πεποίθηση ορμονικού ελέγχου των αναπαραγωγικών οργάνων. Η μελέτη των συγκεντρώσεων της ορμόνης της έκδυσης και της ορμόνης της νεότητας στον οργανισμό των εντόμων κατά το τελικό στάδιο της νύμφης στα έντομα Hyalophora (Williams 1952) και Bombyx (Ohnishi 1987) υποδηλώνει την επίδραση των ορμονών αυτών στο αναπαραγωγικό σύστημα των εντόμων.

Η επίδραση της δισφαινόλης (BPA) στην ανάπτυξη και αναπαραγωγή του *Chironomus riparius* καθορίστηκε σε δύο γενιές (Watts et al., 2000). Οι διαφορετικές συγκεντρώσεις δισφαινόλης δεν επηρέασαν τον αριθμό των απογόνων, ούτε την αναλογία φύλου στην πρώτη και δεύτερη γενιά εντόμων.

Στην παρούσα μελέτη, η επίδραση της δισφαινόλης σε δύο γενιές εντόμων μελετήθηκε με την έκθεση προνυμφών 1ου προνυμφικού σταδίου του εντόμου S. nonagrioides σε συγκεντρώσεις δισφαινόλης των 1μg/L, 10μg/L και 100μg/L. Μελετήθηκε η θνησιμότητα των εντόμων 2ης γενιάς χωρίς να παρατηρηθούν σημαντικές διαφορές (τα αποτελέσματα δεν παρουσιάζονται) και καταγράφηκαν οι φαινοτυπικές δυσμορφίες στα στάδια της προνύμφης, της νύμφης και του ενήλικου ατόμου. Παρατηρήθηκε ότι στην συγκέντρωση των 100μg/L BPA, οι φαινοτυπικές δυσμορφίες παρατηρήθηκαν στο 10% των εντόμων στο στάδιο της προνύμφης, 13% στο στάδιο της νύμφης και στο 16% στο στάδιο των ενήλικων ατόμων (Πίνακας 5). Προνύμφες του 1ου προνυμφικού σταδίου εκτέθηκαν στη συγκέντρωση των 100μg/L BPA έως το 6ο προνυμφικό στάδιο. Σε σύγκριση με τα άτομα μάρτυρες, το μέγεθος των ωοθηκών αυξήθηκε αλλά σε σύγκριση με την πατρική γενιά το μέγεθος των ωοθηκών δεν παρουσίασε κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά (Εικόνα 25). Ομοίως, το μέγεθος των όρχεων των ενήλικων ατόμων δεν παρουσίασε καμία διαφορά συγκριτικά με την πατρική γενιά αλλά ήταν στατιστικά σημαντικά μειωμένο σε σύγκριση με τα άτομα μάρτυρες (Εικόνα 26). Από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης υποδεικνύεται ότι η επίδραση της δισφαινόλης δεν λειτουργεί αθροιστικά σε έντομα που εκτίθενται σε δισφαινόλη για δύο συνεχόμενες γενιές. Σε σύγκριση με τα άτομα μάρτυρες παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές μορφολογικές αλλαγές. (Εικόνα 25). Ομοίως, το μέγεθος των όρχεων των ενήλικων ατόμων δεν παρουσίασε καμία διαφορά συγκριτικά με την πατρική γενιά, αλλά ήταν στατιστικά σημαντικά μειωμένο σε σύγκριση με τα άτομα-μάρτυρες (Εικόνα 26). Από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης υποδεικνύεται, ότι η επίδραση της δισφαινόλης δεν λειτουργεί αθροιστικά σε έντομα που εκτίθενται σε δισφαινόλη για δύο συνεχόμενες γενιές. Σε σύγκριση με τα άτομα-μάρτυρες, παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές μορφολογικές αλλαγές. Σε σύγκριση με την πατρική γενιά, η δεύτερη γενιά δεν εμφάνισε στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο φαινοτυπικών δυσμορφιών, στα αναπαραγωγικά όργανα και στην αναλογία φύλλου. Βιβλιογραφικές αναφορές αναφέρουν επίδραση εκδυστεροειδών στα αναπαραγωγικά όργανα εντόμων δεύτερης γενιάς (Seth et al 2004, Smagghe et al 2004) και αλλαγές στην αναλογία του φύλλου στην πρώτη και δεύτερη γενιά (Biddinger et al 2006).

Λαμβάνοντας υπ΄ όψιν τα μορφολογικά αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, παρέχονται ενδείξεις για την παρεμβολή της δισφαινόλης στο ενδοκρινικό σύστημα των εντόμων, επηρεάζοντας τα αναπτυξιακά στάδια και το αναπαραγωγικό σύστημα του εντόμου.

Για την μελέτη των φαινοτυπικών αυτών αλλαγών σε μοριακό επίπεδο, μελετήθηκαν τα μεταγραφικά επίπεδα γονιδίων που δρουν σαν βιολογικοί μάρτυρες, όπως οι HSP’s (Lee et al., 2006), καθώς και τα επίπεδα γονιδίων που επηρεάζονται άμεσα από την δράση εκδυστεροειδών, όπως το SnoEcR και SnoUSP.

Στην έρευνα μας μελετήσαμε τις αποκρίσεις των SnHsp19.5 και SnHsp20.4 γονιδίων μετά από χειρισμό με δισφαινόλη (Εικόνα 27). Τα μεταγραφικά επίπεδα και των δύο γονιδίων αυξήθηκαν από την δράση της BPA, ανεξαρτήτως χειρισμού (ένεση ή τροφή). Το γονίδιο SnHsp19.5 παρουσίασε αύξηση των μεταγραφικών επιπέδων του και στις δύο συγκεντρώσεις δισφαινόλης 1μg/L και 10μg/L, στην τροφή. Επίσης, το γονίδιο παρουσίασε αύξηση των μεταγραφικών επιπέδων του μετά τις ενέσεις, σε συγκεντρώσεις δισφαινόλης των 12μg και 120μg, σε όλες τις ώρες δειγματοληψίας. Αντιθέτως, το SnHsp20.4 γονίδιο αυξήθηκε στην μεγαλύτερη συγκέντρωση δισφαινόλης, μετά από ένεση των 120μg. Αύξηση των μεταγραφικών του επιπέδων παρατηρήθηκαν και στις δύο συγκεντρώσεις δισφαινόλης 1μg/L και 10μg/L, στην τροφή. Δεν υπάρχουν βιβλιογραφικές αναφορές για την επίδραση της δισφαινόλης στις smHSPs. Οι smHSPs προσδίδουν αντοχή στους οργανισμούς σε συνθήκες περιβαλλοντικής καταπόνησης όπως η ζέστη, το κρύο, η αλατότητα και η ξηρασία, (Feder and Hofmann, 1999). Συμμετέχουν επίσης, στους μηχανισμούς απόπτωσης και οργάνωσης του κυτταροσκελετού (Haslbeck, 2002) και παίζουν σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση της διάπαυσης των εντόμων (Denlinger et al, 2000).Υπάρχει συσχετισμός μεταξύ των συγκεντρώσεων των εκδυστεροειδών και των επιπέδων RNA των μικρών Hsp's (smHSP's). Σε έρευνες στην *Drosophila*, προσθήκη της 20-OH-ecdyson οδηγεί σε in vivo αυξημένα επίπεδα των mRNA's των smHSP's. Στη *Drosophila* η δράση εκδυστεροειδών προκαλεί την αυξημένη έκφραση των HSP's σε συγκεκριμένα αναπτυξιακά στάδια (Thomas και Lengyel, 1986). Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι η δράση της δισφαινόλης επηρεάζει την έκφραση των smHSP's σε προνύμφες του 5ου αναπτυξιακού σταδίου της S. nonagrioides. Επιπλέον, τα SnoHsp19.5 και SnoHsp23 γονίδια παρουσιάζουν αύξηση των μεταγραφικών τους επιπέδων μετά από ένεση με την ορμόνη της έκδυσης, η οποία είναι γνωστή για τη ρύθμιση γονιδίων που σχετίζονται με την ανάπτυξη των εντόμων (Ridifford et al, 2000).

Η δισφαινόλη φαίνεται να επιδρά με τρόπο παρόμοιο με τα εκδυστεροειδή, επηρεάζοντας τα αναπτυξιακά στάδια των εντόμων άμεσα, αλληλεπιδρώντας με γονίδια που επηρεάζουν καθοριστικά την ανάπτυξη (π.χ ορμόνη της έκδυσης) αλλά και έμμεσα, αλληλεπιδρώντας με γονίδια που εμπλέκονται σε γονιδιακά μονοπάτια της ανάπτυξης (π.χ οι smHSP's). Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι τα γονίδια SnoHsp83 και SnoHsc70 ενεργοποιούνται από την BPA. Το γονίδιο SnoHsp83 παρουσίασε αύξηση των μεταγραφικών του επιπέδων, παρουσία δισφαινόλης στην τροφή, καθώς και μετά τις ενέσιμες συγκεντρώσεις των 12μg και 120μg BPA. Ομοίως, τα μεταγραφικά επίπεδα στο γονίδιο SnoHsc70 αυξήθηκαν μετά από τους χειρισμούς με δισφαινόλη (ένεση και τροφή) (Εικόνα 28 και Εικόνα 31).

Στο έντομό S. nonagrioides, δεν παρουσιάστηκε καμία διαφορά στα μεταγραφικά επίπεδα του γονιδίου SnoHsp70 (τα αποτελέσματα δεν παρουσιάζονται), σε αντίθεση με βιβλιογραφικές αναφορές για την επίδραση της δισφαινόλης στα μεταγραφικά επίπεδα του γονιδίου (Planello et. al., 2008).

Έκθεση των εντόμων σε δισφαινόλη μέσω της τροφής, φαίνεται ότι επηρεάζει και τα μεταγραφικά επίπεδα των SnoECR και SnoUSP γονιδίων. Τα μεταγραφικά επίπεδα των γονιδίων αυξήθηκαν και στις δύο συγκεντρώσεις δισφαινόλης 1μg/L και 10μg/L, στην τροφή (Εικόνα 29).

Η στεροειδής ορμόνη 20-hydroxyecdysone (ecdysone), ενεργοποιεί και συντονίζει τα διαδοχικά στάδια του κύκλου ζωής του εντόμου. Στην *D. melanogaster*, ο υποδοχέας της εκδυσόνης αποτελείται από ένα ετεροδιμερές της πρωτεΐνης που κωδικοποιείται από τον EcR και το ultraspiracle (USP) γονίδιο (Koelle et al., 1991). Το ετεροδιμερές EcR/USP ενεργοποιείται από ένα σύμπλεγμα μοριακών συνοδών (τσαπερόνια), που απαιτείται για την ενεργοποίηση των στεροειδών υποδοχέων στα σπονδυλωτά. Το σύμπλεγμα που απαιτείται για την ενεργοποίηση του υποδοχέα της εκδυσόνης, αποτελείται από τις HSP90 και HSC70 (Εικόνα

11). Έρευνες σε σπονδυλωτά υποδεικνύουν ότι η δισφαινόλη Α δρα με υποδοχείς των οιστρογόνων, ενεργώντας έτσι ως in vivo ψευδο- οιστρογόνο (Waring και Harris, 2005). Αν και ο ρόλος των οιστρογόνων στην φυσιολογία των εντόμων είναι ακόμα αντικείμενο μεγάλης συζήτησης (Porte et al., 2006), είναι σαφές ότι δεν είναι πλέον ορμόνη που επηρεάζει αποκλειστικά τα σπονδυλωτά. Τα αποτελέσματα από διάφορα in vitro και in vivo μοντέλα δείχνουν ότι οι μηχανισμοί δράσης της BPA και τα γονίδια με τα οποία αλληλεπιδρά, είναι ποικίλες και πολύπλοκες. Τα γονίδια SnoHsp83 και SnoHsc70, των οποίων τα μεταγραφικά επίπεδα επηρεάζονται από την δράση της BPA, απαιτούνται για την ενεργοποίηση του υποδοχέα της εκδυσόνης. Ο υποδοχέας αυτός ανήκει στην υπερ-οικογένεια των υποδοχέων στεροειδών ορμονών, που περιλαμβάνει και άλλους γνωστούς υποδοχείς σε σπονδυλωτά, όπως των οιστρογόνων, των ανδρογόνων, της ορμόνης του θυρεοειδούς και υποδοχείς γλυκοκορτικοειδών. Οι πυρηνικοί υποδοχείς που αλληλεπιδρούν με στεροειδείς ορμόνες, είναι οι πρώτοι στόχοι των χημικών ουσιών ενδοκρινικής διαταραχής σε σπονδυλωτά. Η δισφαινόλη Α δρα σαν ξενοοιστρογόνο, που μπορεί να ενεργοποιήσει την έκφραση οιστρογονικών υποδοχέων (Min et al, 2003, Richter et al, 2007). Βιβλιογραφικές αναφορές αναφέρουν ότι η δισφαινόλη αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα των οιστρογόνων σαν αγωνιστής και προκαλεί οιστρογονική in vivo δράση στους οργανισμούς (Colerangle et al., 1997). Έχει αναφερθεί επίσης, ότι η δισφαινόλη δρα ως ένας ήπιος εκδυστεροειδικός ανταγωνιστής σε επίπεδο κυττάρων (Dinan et al., 2001).

Οι μορφολογικές αλλαγές που επιφέρει η δισφαινόλη στα αναπτυξιακά στάδια του εντόμου *S. nonagrioides* και οι μοριακές αλλαγές των μεταγραφικών επιπέδων γονιδίων που εμπλέκονται άμεσα και έμμεσα στην ανάπτυξη των εντόμων, επιδεικνύουν την άμεση επίπτωση που έχει στο ενδοκρινικό και αναπαραγωγικό σύστημα του οργανισμού. Η αύξηση των μεταγραφικών επιπέδων των γονιδίων που εμπλέκονται στην φυσιολογία των εκδύσεων των εντόμων, υποδεικνύει την εκδυστεροειδική δράση της δισφαινόλης στο έντομο *S. nonagrioides*.

Παρ' όλα τα μέχρι τώρα δημοσιευμένα αποτελέσματα, ο ακριβής μοριακός μηχανισμός της δράσης της δισφαινόλης δεν είναι ακόμα εξακριβωμένος. Για την κατανόηση του μοριακού μηχανισμού δράσης της δισφαινόλης θα πρέπει να γίνουν περισσότερες έρευνες στους ζωικούς οργανισμούς.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

1. Δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στα ποσοστά θνησιμότητας στις μικρές συγκεντρώσεις BPA. Αντιθέτως, παρατηρήθηκαν διαφορές στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις των 1 mg / L και 10 mg / L BPA.

2. Λαμβάνοντας υπόψη τους μη φυσιολογικούς φαινοτύπους που παρατηρήθηκαν σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια του εντόμου *S. nonagrioides,* συμπεραίνουμε ότι η δισφαινόλη δρα ως διαταράκτης του ενδοκρινικού συστήματος των εντόμων. Επηρεάζει την ορμονική ομοιόσταση του οργανισμού και επιδρά άμεσα στα μεταβολικά μονοπάτια της ανάπτυξης, εμποδίζοντας την διαδικασία της έκδυσης. Επηρεάζονται όλες οι δομικές και μορφολογικές αλλαγές που συμβαίνουν κατά την ανάπτυξη του οργανισμού και παρουσιάζονται ενδιάμεσοι φαινότυποι σε προνυμφικό στάδιο, ενδιάμεσοι φαινότυποι προνύμφης- νύμφης και ενήλικα άτομα με κατσαρά φτερά.

3. Η δισφαινόλη φάνηκε να επηρεάζει και το αναπαραγωγικό σύστημα των εντόμων. Το μήκος των ωοθηκών παρουσίασε στατιστικά σημαντική αύξηση, ενώ το μήκος των όρχεων μειώθηκε στατιστικά σημαντικά . Δεν παρατηρήθηκε δοσο- εξαρτώμενη σχέση στο μέγεθος των αναπαραγωγικών οργάνων και στις συγκεντρώσεις δισφαινόλης. Η δισφαινόλη φάνηκε να επηρεάζει την αναλογία θηλυκών- αρσενικών εντόμων.

4. Δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ της πρώτης και δεύτερης γενιάς εντόμων. Μεταξύ των εκτιθέμενων ατόμων παρουσιάστηκαν ίδια ποσοστά μη φυσιολογικών φαινοτύπων σε κάθε αναπτυξιακό στάδιο, ενώ δεν παρουσιάστηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ούτε στο μήκος των αναπαραγωγικών οργάνων και την αναλογία φύλλου. Δεν παρατηρήθηκε επίσης δοσο-εξαρτώμενη επίδραση της δισφαινόλης στον οργανισμό των εντόμων.

5. Τα μεταγραφικά επίπεδα των HSP γονιδίων, που δρουν ως βιολογικοί μάρτυρες ενδοκρινικής διαταραχής του οργανισμού των εντόμων, επηρεάστηκαν ανεξαρτήτως χειρισμού (BPA μέσω τροφής ή ένεσης).

I. Η αύξηση των μεταγραφικών επιπέδων των *smHSPs* υποδεικνύει την επίδραση της δισφαινόλης στην ανάπτυξη, μέσω γονιδιακών μονοπατιών στα οποία συμμετέχουν.

II. Τα γονίδια *SnHsp83* και SnHsc70, των οποίων τα μεταγραφικά επίπεδα επηρεάζονται από την δράση της BPA, απαιτούνται για την ενεργοποίηση του υποδοχέα της εκδυσόνης.

III. Εκθεση των εντόμων σε δισφαινόλη μέσω της τροφής, φαίνεται ότι επηρεάζει και τα μεταγραφικά επίπεδα των *SnoECR* και *SnoUSP* γονιδίων.

Τα αποτελέσματα αυτά ενισχύουν την άποψη ότι η δισφαινόλη δρα με τρόπο παρόμοιο με τα εκδυστεροειδή, επηρεάζοντας τα αναπτυξιακά στάδια των εντόμων άμεσα, αλληλεπιδρώντας με γονίδια που επηρεάζουν καθοριστικά την ανάπτυξη (πχ ορμόνη της έκδυσης) αλλά και έμμεσα, αλληλεπιδρώντας με γονίδια που εμπλέκονται σε γονιδιακά μονοπάτια της ανάπτυξης (πχ οι smHSP's).

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Adams TS. 1999. Hematophagy and hormone release. Ann Entomol Soc Am 92:1–13.

Chen, B., Zhong, D. and Monteiro, A.(2006)Comparative genomics and evolution of the Hsp90 family of genes across all kingdoms of organisms. *BMC Genomics* 7: 1–19.

Cousins, I.T., C.A. Staples, G.M. Klecka and D. Mackay, A multimedia assessment of the environmental fate of BPA, Hum. Ecol. Risk Assess. 8 (2002), pp. 1107–1135.

Crain et al., 2007 D.A. Crain, M. Eriksen, T. Iguchi, S. Jobling, H. Laufer, G.A. LeBlanc and L.J. Guillette Jr., An ecological assessment of bisphenol-A: evidence from comparative biology, Reprod. Toxicol. 24 (2007), pp. 225–239.

Denlinger, D.L., Rinehart, J.P. and Yocum, G.D. (2001) Stress proteins: a role in insect diapause? In *Insect Timing: Circadian Rhythmicity to Seasonality*. (Denlinger, D.L., Giebultowicz, J. and Saunders, D.S., eds), pp. 155–171. Elsevier, Amsterdam.

Dhadialla TS, Carlson GR, Le DP. 1998. New insecticides with ecdysteroidal and juvenile hormone activity. *Annu Rev Entomol* 43:545–569.

Feder, M.E. and Hofmann, G.E. (1999) Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annu Rev Physiol* 61: 243–282.

Fullbright G, Lacy ER, Büllesbach EE. 1997. The prothoracicotropic hormone bombyxin has specific receptors on insect ovarian cells. European Journal of Biochemistry 245:774-780.

Gkouvitsas, T., Kontogiannatos, D., Kourti, A., 2008. Differential expression of two small Hsps during diapause in the corn stalk borer *Sesamia nonagrioides* (Lef). J. Insect Physiol. 54, 1503-10.

Gkouvitsas, T., Kontogiannatos, D., Kourti, A., 2009. Cognate Hsp70 gene is induced during deep larval diapause in the moth *Sesamia nonagrioides*. Insect Mol. Biol. 18, 253-264.

Gkouvitsas, T., Kontogiannatos, D., Kourti, A., 2009. Expression of the *Hsp83* gene in response to diapause and thermal stress in the moth *Sesamia nonagrioides.* Insect Mol. Biol. 18, 759-768

Gehring, U., 1998. Steroid hormone receptors and heat shock proteins. Vitam. Horm. 54, 167–205.

Gohar M, Souty C. 1984. Action temporelle d'ecdysteroides sur la synthese proteique ovarienne in vitro chez le Crustace isopode terrestrial Porecllio dilatatus. Reprod Nutr Dev 24:137–145.

Hahn, T., Schenk, K., Schulz, R., 2002. Environmental chemicals with known endocrine potential affect yolk protein content in the aquatic insect Chironomus riparius. Environ. Pollut. 120, 525–528.

Hall BL, Thummel CS. The RXR homolog Ultraspiracle is an essential component of the *Drosophila* ecdysone receptor. Development 1998;125:4709–17.

Happ GM. 1992. Maturation of the male reproductive system and its endocrine regulation. Annu Rev Entomol 37:303–320.

Hartl, F.U. and Hayar-Hartl, M. (2002) Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* 295: 1852–1858..

Heimeier A. Rachel, Yun-Bo Shi, Amphibian metamorphosis as a model for studying endocrine disruption on vertebrate development: Effect of bisphenol A on thyroid hormone action, General and Comparative Endocrinology.

Horn DHS, Middleton EJ, Wunderlich JA, Hampshire F. 1966. Identity of the moulting hormones of insects and crustaceans. Chem Commun 1966:339–340.

Iwamuro, S., Yamada, M., Kato, M., Kikuyama, S., 2006. Effects of bisphenol A on thyroid hormone-dependent up-regulation of thyroid hormone receptor a and b and down-regulation of retinoid X receptor c in Xenopus tail culture. Life Sci. 79, 2165–2171.

Jurgella, G.F., Marwah, A., Malison, J.A., Peterson, R., Barry, T.P., 2006. Effects of xenobiotics and steroids on renal and hepatic estrogen metabolism in lake trout. Gen. Comp. Endocrinol. 148, 273–281.

Jones Ga PAS. Ultraspiracle: an invertebrate nuclear receptor for juvenile hormones. Proc Natl Acad Sci USA 1997;94:13499–503.

Kang, J.H., Aasi, D., Katayama, Y., 2007. Bisphenol A in the aquatic environment and its endocrine-disruptive effects on aquatic organisms. Crit. Rev. Toxicol. 37, 607–625.

Kiang, J. and Tsokos, G. (1998) Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry, and physiology. *Pharmacol Ther* 80: 183–201.

Kregel, K.C. (2002) Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *J Appl Physiol* 92: 2177–2186.

Koelle et al., 1991 M.R. Koelle, W.S. Talbot, W.A. Segraves, M.T. Bender, P. Cherbas and D.S. Hogness, The Drosophila EcR gene encodes an ecdysone receptor, a new member of the steroid receptor superfamily, Cell 67 (1991), pp. 59–77.

Kontogiannatos D., Michail X., Kourti A., Molecular characterization of an ecdysteroid inducible carboxylesterase with GQSCG motif in the corn borer, *Sesamia nonagrioides*. J. Insect Physiol. (2011).

LeBlanc GA, Mu X, Rider CV. 2000. Embryotoxicity of the alkylphenol degradation product 4-nonylphenol to the crustacean *Daphnia magna*. *Environ Health Perspect* 108:1133–1138.

Lee, S.M., Lee, S.B., Park, C.H., Choi, J., 2006. Expression of heat shock protein and hemoglobin genes in Chironomus tentans (Diptera, Chironomidae) larvae exposed to various environmental pollutants: a potential biomarker of freshwater monitoring. Chemosphere 65, 1074–1081.

Lindquist, S. (1986) The heat shock response. *Ann Rev Biochem* 55: 1151–1191.

Mahroof, R., Zhu, K.Y., Neven, L., Subramanyam, B. and Bai, J. (2005) Expression patterns of three heat shock protein 70 genes among developmental stages of the red flour beetle, *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Comp Biochem Physiol* A 141, 247–256.

Min, J., Lee, S.K., Gu, M.B., 2003. Effects of endocrine disrupting chemicals on distinct expression patterns of estrogen receptor, cytochrome P450 aromatase and p53 genes in Oryzias latipes liver. J. Biochem. Mol. Toxicol. 17, 272–277.

Mu XRC, Hwang GS, Hoy H, Leblanc GA. signal disruption: anti-ecdysteroidal activity of bisphenol A involves cross talk between signaling pathways. Covert Environ Toxicol Chem 2005;24: 146–52.

Lemos Marco F.L., Ana Cristina Esteves, Bart Samyn, Isaak Timperman, Jozef van Beeumen, Antonio Correia, Cornelis A.M. van Gestel, Amadeu M.V.M. Soares, Protein differential expression induced by endocrine disrupting compounds in a terrestrial isopod, Chemosphere 79 (2010)570–576.

Lemos M.F.L., C.A.M. van Gestel, A.M.V.M. Soares, Reproductive toxicity of the endocrine disrupters vinclozolin and bisphenol A in the terrestrial isopod Porcellio scaber, Chemosphere 78 (2010) 907–913.

O´ Connor, J.C., Chapin, R.E., 2003. Critical evaluation of observed adverse effects of endocrine active substances on reproduction and development, the immune system, and the nervous system. Pure Appl. Chem. 75, 2099–2123.

Orikasa C, Yamauchi H, Nagasawa H, Suzuki H, Nagata M. 1993. Induction of oocyte-nurse cell differentiation in the ovary by the brain during the initial stage of oogenesis in the silkworm Bombyx mori (Lepidoptera: Bombycidae). Applied Entomology and Zoology 28:303-311.

Pan ML. 1977. Juvenile hormone and vitellogenin synthesis in the Cecropia silkworm. Biological Bulletin 153: 336-345.

Pan ML, Bell WJ, Telfer WH. 1969. Vitellogenic blood protein synthesis by insect fat body. Science 165: 393-394.

Parsell, D.A. and Lindquist, S. (1993)The function of heat-shock proteins in stress tolerance – degradation and reactivation of damaged proteins. *Annu Rev Genet* 27: 437–496.

Planello R., J.L. Martınez-Guitarte, G. Morcillo, The endocrine disruptor bisphenol A increases the expression of HSP70 and ecdysone receptor genes in the aquatic larvae of Chironomus riparius, Chemosphere 71 (2008) 1870–1876.

Riddiford LM, Cherbas P, Truman JW. 2000. Ecdysone reseptors and their biological actions. Vitam Hom 60, 1-73.

Segner et al., 2003 H. Segner, K. Carroll, M. Fenske, C.R. Janssen, G. Maack, D. Pascoe, C. Schäfers, G.F. Vanderbergh, M. Watts and A. Wenzel, Identification of endocrine-disrupting effects in aquatic vertebrates and invertebrates: report from the European IDEA project, Ecotox. Environ. Saf. 54 (2003), pp. 302–314.

Sone K, Hinago M, Kitayama A, Morokuma J, Ueno N,Watanabe H, et al. Effects of 17beta-estradol, nonylphenol, and bisphenol-A on developing *Xenopus laevis* embryos. Gen Comp Endocrinol 2004;138:228–36.

Taenzler et al., 2007 V. Taenzler, E. Bruns, M. Dorgerloh, V. Pfeifle and L. Weltje, Chironomids: suitable tests organisms for risk assessment investigations on the potential endocrine disrupting properties of pesticides, Ecotoxicology 16 (2007), pp. 221–230.

Watts, M.M., Pascoe, D., Carroll, K., 2001. Chronic exposure to 17aethinylestradiol and bisphenol A-effects on development and reproduction in the freshwater invertebrate Chironomus riparius (Diptera: Chironomidae). Aquat. Toxicol. 55, 113–124.

Welshons et al., 2006 W.V. Welshons, S.C. Nagel and F.S. Vom Saal, Large effects from small exposures. III. Endocrine mechanisms mediating effects of Bisphenol A at levels of human exposure, Endocrinology 147 (2006), pp. S56–S69.

Yang FX, Xu Y, Wen S. Endocrine-disrupting effects of nonylphenol, bisphenol A and *p,p_*-DDE on *Rana nigromaculata* tadpoles. Bull Environ Contam Toxicol 2005; 75:1168–75.

Yao TP, Segraves WA, Oro AE, McKeown M, Evans RM. 1992. Drosophila ultraspiracle modulates ecdysone receptor function via heterodimer formation. Cell 71:63–72.

Young, J.C., Moarefi, I. and Hartl, F.U. (2001) Hsp90: a specialized but essential protein-folding tool. *J Cell Biol* 154: 267–273.