

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΒΙΟΛΟΓΙΑ
ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ»

ΗΛΕΚΤΡΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗ ΑΠΟΚΡΙΣΗ ΕΝΗΛΙΚΩΝ ΔΑΚΟΥ
ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ, *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae) ΚΑΙ
Drosophila melanogaster (Diptera: Drosophilidae) ΣΤΙΣ
ΦΕΡΟΜΟΝΕΣ ΤΟΥ ΔΑΚΟΥ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
ΕΛΕΝΗ Ι. ΚΟΥΤΣΟΓΕΩΡΓΙΟΥ

Επιβλέπων: Χατζόπουλος Πολυδεύκης, καθηγητής

ΑΘΗΝΑ 2019



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΒΙΟΛΟΓΙΑ
ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ»

ΗΛΕΚΤΡΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗ ΑΠΟΚΡΙΣΗ ΕΝΗΛΙΚΩΝ ΔΑΚΟΥ
ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ, *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae) ΚΑΙ
Drosophila melanogaster (Diptera: Drosophilidae) ΣΤΙΣ
ΦΕΡΟΜΟΝΕΣ ΤΟΥ ΔΑΚΟΥ

ELECTROPHYSIOLOGICAL RESPONSE OF OLIVE FRUIT
FLY, *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae) AND VINEGAR
FRUIT FLY, *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae)
ADULTS TO THE OLIVE FRUIT FLY'S PHEROMONES

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
ΕΛΕΝΗ Ι. ΚΟΥΤΣΟΓΕΩΡΓΙΟΥ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Χατζόπουλος Πολυδεύκης, Καθηγητής (Επιβλέπων)

Σκουλάκης Ευθύμιος, Ερευνητής Α'

Κούρτη Ιωάννα, Καθηγήτρια

ΑΘΗΝΑ 2019



ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο δάκος της ελιάς, *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae) αποτελεί το σημαντικότερο εχθρό των ελαιόδεντρων, καθώς προκαλεί ποιοτική και ποσοτική υποβάθμιση των παραγόμενων προϊόντων της ελιάς, αλλά και οικονομική ζημία. Η καταπολέμησή του με χημικά μέσα, αν και αποτελεσματική, έχει αρνητική επίπτωση στο περιβάλλον και τη σύσταση του ελαιόλαδου, λόγω της παρουσίας υπολειμμάτων. Η μαζική παγίδευση αποτελεί μια εναλλακτική, βιολογική μέθοδο καταπολέμησης, που βασίζεται, μεταξύ άλλων, στη σεξουαλική επικοινωνία των εντόμων, μέσω της χρήσης φερομονικών παγίδων. Στην παρούσα εργασία εξετάστηκε ο τρόπος με τον οποίο τα άτομα του *B. oleae* αντιλαμβάνονται τη φερομόνη φύλου (spiroketal), αλλά και τη φερομόνη συνάθροισης (muscalure) του είδους, καθώς και η ηλεκτρική δραστηριότητα που προκαλούν αυτές στα οσφρητικά νευρικά κύτταρα. Εφαρμόστηκε η μέθοδος των ηλεκτροαντεννογραμμάτων (EAG) για την προσπάθεια χαρακτηρισμού και αποσαφήνισης των οσφρητικών υποδοχέων του *B. oleae* και της απόκρισης των οσφρητικών νευρικών του κυττάρων στις δύο φερομόνες. Οι ίδιες φερομόνες δόθηκαν ως ερέθισμα σε άτομα του είδους *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae), στα στελέχη Canton- S (άγριος τύπος), orco⁻, orco⁻IR8a⁻, W1118 (μάρτυρας) και πραγματοποιήθηκε σύγκριση των αποτελεσμάτων για τα δύο είδη εντόμων. Η φερομόνη spiroketal προκάλεσε μεγαλύτερη απόκριση από τη muscalure στα άτομα του *B. oleae* και της *D. melanogaster*, με το τελευταίο να παρουσιάζει μεγαλύτερη απόκριση και στις δύο φερομόνες, συγκριτικά με το *B. oleae*. Τα συζευγμένα θηλυκά άτομα άγριου τύπου της *D. melanogaster* έδειξαν μια αυξημένη ευαισθησία σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις των δύο φερομονών. Τα orco⁻ και orco⁻IR8a⁻ άτομα της *D. melanogaster* παρουσίασαν μηδενικό σήμα (flat line), γεγονός το οποίο αφενός επιβεβαιώνει την αναγκαιότητα του συνυποδοχέα orco για τη λειτουργία της οικογένειας ORs (Olfactory Receptors) των οσφρητικών υποδοχέων του εντόμου, αφετέρου δίνει κάποιες κατευθυντήριες γραμμές για το ρόλο της οικογένειας των IRs (Ionotropic Receptors) στην απόκριση του εντόμου στα οσφρητικά ερεθίσματα.

Λέξεις-κλειδιά: δάκος της ελιάς, ηλεκτροαντεννογραφία, όσφρηση, σεξουαλική επικοινωνία, φερομόνες, χημειούποδοχείς

ELECTROPHYSIOLOGICAL RESPONSE OF OLIVE FRUIT FLY, *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae) AND VINEGAR FRUIT FLY, *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae) ADULTS TO THE OLIVE FRUIT FLY'S PHEROMONES

ABSTRACT

The olive fruit fly, *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae) is considered the most serious olive tree pest, causing not only qualitative and quantitative damage, but economic as well. Although effective, chemical control methods are environmentally challenging and harmful for olive oil quality. Mass trapping is a biological method of controlling *B. oleae*, suggesting the use of the insect's sexual pheromones in pheromone traps. In this study, the ways that *B. oleae* males and females respond to the insect's sexual pheromone (spiroketal) and aggregation pheromone (muscalure), as well as the activation of their olfactory receptor neurons caused by them were explored. Electroantennographic (EAG) recordings were performed in an attempt to characterize *B. oleae*'s olfactory receptors that are engaged in the perception of the odor and measure the activity of its olfactory receptor neurons when given different concentrations of the two pheromones (spiroketal, muscalure). The two pheromones were also tested on *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae) males and females and results were compared. The strains used were: Canton- S (wild type), *orco*⁻, *orco*⁻*IR8a*⁻, W1118 (control). Spiroketal had a greater response than muscalure in both males and females of *B. oleae* and wild type *D. melanogaster*, with the latter showing greater activity to both pheromones than *B. oleae*. Mated wild type female *D. melanogaster* flies appeared to be more sensitive to lower concentrations of the two pheromones. *Orco*⁻ and *orco*⁻*IR8a*⁻ males and females showed no response (flat line) to either spiroketal or muscalure, showcasing the importance of the OR family in the perception of the odor and contributing to the clarification of the role of the IR family.

keywords: *bactrocera oleae*, chemosensors, EAG, olfaction, pheromones, sexual communication

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	3
ABSTRACT.....	3
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	5
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	6
1.1 ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΕΝΤΟΜΟΥ.....	6
1.2 ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ ΚΑΤΑΤΑΞΗ.....	7
1.3 ΠΡΟΚΑΛΟΥΜΕΝΕΣ ΖΗΜΙΕΣ.....	8
1.4 ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΤΑΠΟΛΕΜΗΣΗΣ.....	9
1.4.1 Χημική Καταπολέμηση.....	9
1.4.2 Βιολογική Καταπολέμηση.....	12
1.4.3 Μέθοδος των Στείρων Εντόμων (Sterile Insect Technique- SIT)..	13
1.5 ΟΙ ΦΕΡΟΜΟΝΕΣ ΤΟΥ ΔΑΚΟΥ.....	13
1.6 Η ΟΣΦΡΗΣΗ ΣΤΑ ΕΝΤΟΜΑ.....	16
1.6.1 Οικογένειες Οσφρητικών Υποδοχέων.....	17
i. Οικογένεια OR.....	17
ii. Οικογένεια IR.....	18
1.6.2 Μετάδοση Οσφρητικού Σήματος.....	19
1.7 ΗΛΕΚΤΡΟΑΝΤΕΝΝΟΓΡΑΦΙΑ (EAG).....	20
1.8 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	21
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	22
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	23
3.1 ΑΠΟΚΡΙΣΗ <i>Drosophila melanogaster</i> ΣΕ HEXANOL, SPIROKETAL, MUSCALURE.....	23
3.2 ΑΠΟΚΡΙΣΗ <i>Bactrocera oleae</i> ΣΕ SPIROKETAL, MUSCALURE.....	27
3.3 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΑΠΟΚΡΙΣΗΣ <i>D. melanogaster</i> ΚΑΙ <i>B. oleae</i> ΣΕ HEXANOL, SPIROKETAL, MUSCALURE.....	29
3.4 ΑΠΟΚΡΙΣΗ <i>orco</i> ⁻ ΚΑΙ <i>orco</i> ⁻ IR8a ⁻ <i>D. melanogaster</i> ΣΕ HEXANOL, SPIROKETAL, MUSCALURE.....	30
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	32
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	35

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Νευροβιολογίας του ΕΚΕΒΕ «Αλέξανδρος Φλέμινγκ», με επιστημονικό υπεύθυνο τον Δρ. Ευθύμιο Σκουλάκη. Θα ήθελα από καρδιάς να τον ευχαριστήσω για την φιλοξενία του στο εργαστήριό του και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε κατά τη διάρκεια της εκπόνησης αυτής της εργασίας. Ιδιαίτερη μνεία αξίζει στον μεταδιδάκτορα Αλέξανδρο Γαϊτανίδη, για την πολύτιμη καθοδήγησή του και την υπομονετική του βοήθεια όποτε τη χρειαζόμουν.

Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω την εταιρία ΒΙΟΡΥΛ Α. Ε., για την ευγενική παροχή των φερομονών, καθώς και όλα τα μέλη του εργαστηρίου Νευροβιολογίας για τη στήριξη και τη βοήθειά τους.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο δάκος της ελιάς, *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae) αποτελεί το σημαντικότερο εχθρό της ελιάς στην Ελλάδα καθώς και στις παραμεσόγειες χώρες. Είναι μονοφάγο έντομο και προσβάλλει αποκλειστικά τους καρπούς της ελιάς και της αγριελιάς. Η αντιμετώπισή του θεωρείται ιδιαίτερα δύσκολη, γι' αυτό και έχουν πραγματοποιηθεί πολλές έρευνες αφιερωμένες σε αυτή στο διάστημα των τελευταίων ετών.

1.1 ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ ΕΝΤΟΜΟΥ

Το ενήλικο άτομο έχει μέγεθος περίπου 5 mm και γενικό χρωματισμό ανοιχτοκάστανο έως σκοτεινοκάστανο. Ο θώρακας είναι σκοτεινότερου χρώματος και συνήθως έχει 3 κατά μήκος σκοτεινές γραμμές και χαρακτηρίζεται από την παρουσία του scutellum, που είναι συνήθως υπόλευκου ή υποκίτρινου χρωματισμού. Υπάρχουν επίσης διακριτές υπόλευκες – υποκίτρινες κηλίδες στα πλάγια του θώρακα. Οι πτέρυγες του ενήλικου ατόμου είναι διαφανείς, ιριδίζουσες, με ένα σκοτεινό στίγμα στην άκρη. Τα θηλυκά μπορούν εύκολα να διαχωριστούν από τα αρσενικά άτομα, λόγω της παρουσίας ευδιάκριτου ωοθέτη (Τζανακάκης & Κατσόγιαννος, 2003). Ο ωοθέτης έχει το βασικό του τμήμα μαύρο και μήκος περίπου 1 mm. Το αυγό του εντόμου είναι ελλειψοειδές επίμηκες, λευκό, με μήκος 8 mm και εναποτίθεται από το θηλυκό άτομο με τη βοήθεια του ωοθέτη στο μεσοκάρπιο του ελαιόκαρπου. Η προνύμφη είναι υπόλευκη ή ανοιχτοκίτρινη, τελικού μήκους 7-8 mm, με το πρόσθιο μέρος της στενότερο από το οπίσθιο. Δεν έχει κεφαλική κάψα και στο πρόσθιο μέρος τα στοματικά άγκιστρα και ο λοιπός κεφαλοφαρυγγικός σκελετός είναι σκοτεινόχρωμα (Τζανακάκης & Κατσόγιαννος, 2003). Η νύμφη είναι ελλειψοειδής, ανοιχτοκάστανη, με περίβλημα το σκληρυμένο δερμάτιο της αναπτυγμένης προνύμφης (Τζανακάκης & Κατσόγιαννος, 2003). Για την έξοδο του ενήλικου ατόμου σχηματίζεται χαρακτηριστική κυκλική σχισμή (κυκλόραφα) στο ένα άκρο του περιβλήματος της νύμφης (Μπρούμας & Κατσόγιαννος, 2009).



Εικόνα 1.1 Θηλυκό άτομο *B. oleae*
©Sedq.es

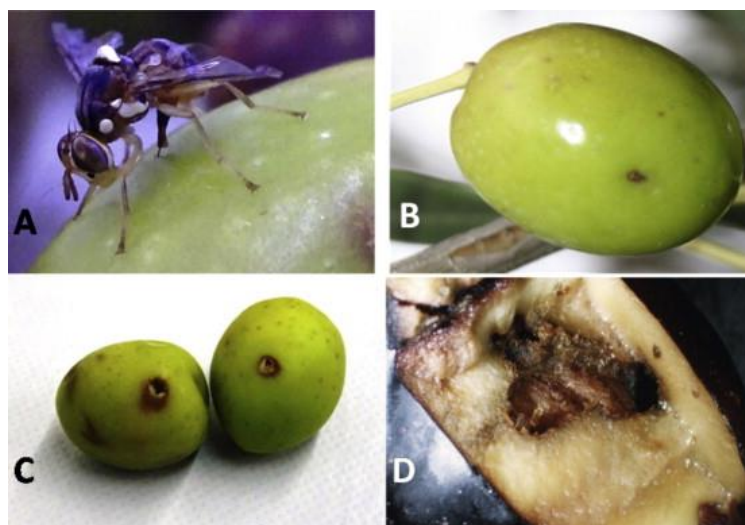
1.2 ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ ΚΑΤΑΤΑΞΗ

Ο δάκος της ελιάς κατατάχθηκε στο γένος *Bactrocera* λόγω της μορφολογίας των κοιλιακών του τεργιτών. Τα είδη του γένους *Bactrocera* χαρακτηρίζονται από διακριτούς κοιλιακούς τεργίτες και προσβάλουν κυρίως τροπικά και υποτροπικά είδη φρούτων. Αντίθετα, τα είδη του γένους *Dacus*, προσβάλουν κυρίως ενδημικά φυτά των οικογενειών *Asclepiadaceae* και *Curcubitaceae*. Στην οικογένεια Tephritidae και ειδικότερα στην υποοικογένεια *Dacinae*, στην οποία ανήκει ο δάκος της ελιάς, δεν υπάρχουν σαφείς ταξινομικοί προσδιορισμοί με αποτέλεσμα να δημιουργούνται προβλήματα στην συστηματική κατάταξη του δάκου. Ο Gmelin κατέταξε πρώτος τον δάκο της ελιάς, αρχικά ως *Musca oleae* (1790). Στη συνέχεια κατατάχθηκε ως *Dacus (Daculus) oleae*, *Dacus (Polistominetes) oleae* και *Daculus oleae*, για να καταλήξει στο σημερινό του όνομα, *Bactrocera (Daculus) oleae* (Drew, 1989). Σήμερα, η συστηματική κατάταξη του δάκου κατά White and Elson- Haris (1992) έχει ως εξής:

ΦΥΛΟ	Arthropoda
ΥΠΟΦΥΛΟ	Atelocerata
ΚΛΑΣΗ	Insecta
ΥΠΟΚΛΑΣΗ	Neoptera
ΔΙΑΙΡΕΣΗ	Holometabola
ΤΑΞΗ	Diptera
ΥΠΟΤΑΞΗ	Brachycera
ΔΙΑΙΡΕΣΗ	Schizophora
ΤΜΗΜΑ	Acalyptratae
ΥΠΕΡΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ	Tephritoidae
ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ	Tephritidae
ΥΠΟΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ	Dacinae
ΓΕΝΟΣ	Bactrocera
ΥΠΟΓΕΝΟΣ	Daculus
ΕΙΔΟΣ	oleae

1.3 ΠΡΟΚΑΛΟΥΜΕΝΗ ΖΗΜΙΑ

Η οικονομική σημασία του δάκου εστιάζεται στη σημαντική ποσοτική και ποιοτική υποβάθμιση που προκαλεί σε άγουρους και ώριμους καρπούς της ελιάς και της αγριελιάς. Έρευνες αναφέρουν ότι ο δάκος ευθύνεται για την καταστροφή της ολικής ελαιοπαραγωγής σε ποσοστό 5% (30% στις Μεσογειακές χώρες), με άμεσο οικονομικό αντίκτυπο την απώλεια περίπου 800 εκατομμυρίων δολαρίων ετησίως (Bueno & Jones, 2002). Η ζώνη της γεωγραφικής εξάπλωσης του δάκου περιλαμβάνει την πλειονότητα των περιοχών στις οποίες γίνεται εντατική καλλιέργεια ελαιόδεντρων, καθώς και περιοχές με ελαιόδεντρα ως αυτόχθονα είδη. Ο δάκος της ελιάς είναι διαδεδομένος στις παραμεσόγειες χώρες, ωστόσο υπάρχουν αναφορές για την εξάπλωσή του σε διάφορες περιοχές του κόσμου, συμπεριλαμβανομένης της Νότιας και Κεντρικής Αφρικής, της Εγγύς και Μέσης Ανατολής, της Κεντρικής Αμερικής (Μεξικό), καθώς και της Καλιφόρνια των ΗΠΑ (Rice, 2000, Nardi et al., 2005). Η παρουσία του εντόμου έχει καταγραφεί και στη Σερβία, η οποία ενδεχομένως αποτελεί το βορειότερο τμήμα εξάπλωσής του (Κωβαίος και συνεργάτες, 2001). Ο δάκος της ελιάς θεωρείται ότι αποικίζει νέες περιοχές με γοργούς ρυθμούς και γι' αυτό το λόγο, κάθε ελαιοπαραγωγική χώρα βρίσκεται ανά πάσα στιγμή σε κίνδυνο από πιθανή εισβολή του (Smith, 2001).



Εικόνα 1.2 A: Το θηλυκό ωστοκέι στον ελαιόκαρπο. B: Οπή ωστοκίας. C: Οπή εξόδου του ενήλικου. D: Στοά στο εσωτερικό του καρπού.
© R. Malheiro

Ο δάκος αποτελεί κατά κανόνα μονοφάγο έντομο και προσβάλλει τους καρπούς τριών ποικιλιών του γένους *Olea*: *Olea europaea* var. *Sativa* (L.), *Olea europaea* var. *cuspidata* (Link), *Olea europaea* var. *chrysophilla* (Lam) (Tzanakakis, 2006). Έχει 3-4 γενεές το έτος στις περισσότερες περιοχές της Ελλάδας και ανάλογα με την περιοχή, διαχειμάζει ως ενήλικο σε προφυλαγμένες θέσεις ή ως νύμφη στο έδαφος (Τζανακάκης & Κατσόγιαννος, 2003). Ο

βιολογικός του κύκλος αποτελείται από 4 διακριτά στάδια ανάπτυξης και επηρεάζεται άμεσα από τις περιβαλλοντικές συνθήκες. Οι ευνοϊκότερες συνθήκες ανάπτυξης του εντόμου είναι 60-80% σχετική ατμοσφαιρική υγρασία και θερμοκρασία 20-25 °C, με οριακές τιμές 10 °C και 32 °C (Tsitsipis, 1980, Fletcher & Karatos, 1983). Σε άριστες συνθήκες τα ενήλικα άτομα μπορούν να επιβιώσουν για χρονικό διάστημα μεγαλύτερο των 6 μηνών και τρέφονται με νέκταρ, γύρη, μελιτώδη αποχωρήματα άλλων εντόμων, κυρίως κοκκοειδών, καθώς και από υγρές τροφές προερχόμενες από τραύματα φύλλων και καρπών όχι μόνο ελαιόδεντρων αλλά και γειτονικών φυτών άλλων ειδών (Mohammad, 2005, Tzanakakis, 2006). Όταν ο καρπός πλησιάζει στο τελικό του μέγεθος και είναι αρκετά μαλακός ώστε να μπορεί να τρυπηθεί από τον ωοθέτη του θηλυκού, αρχίζει η ωοτοκία (συνήθως τον Ιούλιο). Το θηλυκό άτομο, αφού ανοίξει με τον ωοθέτη του οπή ωοτοκίας στον καρπό, εισάγει στο μεσοκάρπιο ένα αυγό. Κατά κανόνα εισάγει ένα αυγό ανά καρπό, σε περιπτώσεις όμως πολύ πυκνού πληθυσμού ή λίγων καρπών, παρατηρούνται και περισσότερες από μία ωοθεσίες ανά καρπό (Τζανακάκης & Κατσόγιαννος, 2003). Κάθε θηλυκό εναποθέτει περίπου 12 αυγά την ημέρα, ενώ μπορεί να εναποθέσει καθ' όλη τη διάρκεια ζωής του έως και 400 αυγά (Katsoyannos, 1992). Η ωοπαραγωγή των ενήλικων θηλυκών επηρεάζεται από τις κλιματικές συνθήκες, την ποιότητα της διαίτας του θηλυκού και τη διαθεσιμότητα καρπών. Η προνύμφη, μετά την εκκόλαψή της, αρχίζει να διατρέφεται από τη σάρκα του καρπού, ανοίγοντας ακανόνιστη στοά. Κατά το τέλος της ανάπτυξής της πλησιάζει στην επιδερμίδα του καρπού, όπου ανοίγει ένα κοίλωμα μέσα στο οποίο νυμφώνεται. Η νύμφωση εντός του καρπού παρατηρείται κατά τους καλοκαιρινούς μήνες, ενώ το φθινόπωρο και το χειμώνα η προνύμφη εγκαταλείπει τον καρπό και νυμφώνεται στο έδαφος, ειδικά αν ο καρπός έχει προχωρήσει στην ωρίμανσή του (Τζανακάκης & Κατσόγιαννος, 2003).

Η προσβολή από δάκο επιταχύνει την ωρίμανση των καρπών και δημιουργεί πρόσφορο έδαφος για την ανάπτυξη παθογόνων μικροοργανισμών. Το νύγμα που δημιουργείται από την ωοαπόθεση των θηλυκών αποτελεί την πρώτη ένδειξη εισβολής του εντόμου και αμέσως μειώνει σημαντικά την εμπορική αξία της βρώσιμης ελιάς. Παράλληλα, η οπή ωοτοκίας του δάκου βοηθάει την εγκατάσταση δευτερογενών μολύνσεων από παθογόνους μύκητες που έχουν ως αποτέλεσμα την σήψη των καρπών, καθώς και την παραγωγή ελεύθερων λιπαρών οξέων σε υψηλά επίπεδα στο λάδι (Neuenschwander & Michelakis 1978, Muik et al. 2003). Επιπρόσθετα, στη θέση ωοτοκίας του δάκου συχνά ακολουθεί ωοτοκία του εντόμου *Prolasioptera berlesiana*, που βοηθάει εκ νέου στην περαιτέρω εξάπλωση του μύκητα (Τζανακάκης & Κατσόγιαννος, 2003). Η σοβαρότερη, ωστόσο, ζημία που υφίστανται οι ελαιόκαρποι, προκαλείται από το προνυμφικό στάδιο του εντόμου. Οι προνύμφες χρησιμοποιούν ως αποκλειστική διατροφική πηγή τους ιστούς του μεσοκαρπίου και δημιουργούν στοές στο εσωτερικό του καρπού. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα είτε την πρόωρη

πτώση των καρπών του ελαιόδεντρου, είτε τη μείωση της μάζας των ελαιόκαρπων, καθώς καταναλώνεται έως και το ¼ του μεσοκαρπίου από τις προνύμφες (Neuenschwander & Michelakis 1978).

1.4 ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΤΑΠΟΛΕΜΗΣΗΣ

Λόγω της μεγάλης οικονομικής σημασίας του δάκου της ελιάς, κρίνεται απολύτως αναγκαία η προσπάθεια καταπολέμησής του. Τα στοιχεία για την κατάλληλη εποχή επέμβασης λαμβάνονται από την παρακολούθηση της πυκνότητας του πληθυσμού του εντόμου.

1.4.1 Χημική Καταπολέμηση

Εφαρμόζεται εδώ και χρόνια με επιτυχία η χημική μέθοδος καταπολέμησης, δηλαδή ψεκασμοί με εντομοκτόνα, τόσο από το κράτος, όσο και από ελαιοπαραγωγούς. Έχουν επίσης δοκιμαστεί βιολογικές μέθοδοι, όπως η εξαπόλυση φυσικών εχθρών του δάκου, μαζικές εξαπολύσεις στειρωμένων με ακτινοβολία δάκων, μαζική παγίδευση, καθώς και συνδυασμός ορισμένων από τις παραπάνω μεθόδους (Τζανακάκης & Κατσόγιαννος, 2003).



Εικόνα 1.3 Παγίδα McPhail
© Peggy Greb, USDA; www.forestryimages.org

Η εφαρμογή χημικών για την καταπολέμηση του δάκου της ελιάς μπορεί να έχει προληπτικό ή κατασταλτικό χαρακτήρα. Οι δολωματικοί ψεκασμοί είναι μία προληπτική μέθοδος κατά την οποία χρησιμοποιούνται εντομοκτόνα μαζί με ελκυστικό διάλυμα υδρολυμένης πρωτεΐνης, προκειμένου τα έντομα να προσελκυσθούν, να τραφούν και να

θανατωθούν πριν να ξεκινήσουν την ωστοκία τους (Τζανακάκης & Κατσόγιαννος, 2003). Ο χρόνος πραγματοποίησης των δολωματικών ψεκασμών εξαρτάται από την πυκνότητα του πληθυσμού, την αναλογία θηλυκών: αρσενικών ατόμων και την ύπαρξη γόνιμων ωαρίων στα θηλυκά και εποπτεύεται από τα Ταμεία Προστασίας Ελαιοπαραγωγής, τα οποία υπάγονται στις κατά τόπους Διευθύνσεις Αγροτικής Ανάπτυξης ή τις Διευθύνσεις Γεωργίας του Υπουργείου Γεωργίας (Τζανακάκης & Κατσόγιαννος, 2003). Για την παρακολούθηση της πυκνότητας του πληθυσμού των ενηλίκων χρησιμοποιούνται παγίδες τύπου McPhail, που ως ελκυστικό περιέχουν υδατικό διάλυμα φωσφορικού ή θειικού αμμωνίου 2%, ή σε ορισμένες περιπτώσεις διάλυμα υδρολυμένης πρωτεΐνης 4% και βόρακα 1,5%. Οι επαναληπτικές εφαρμογές των ψεκασμών καθορίζονται από τον αριθμό των ακμαίων που συλλέγονται στις δακοπαγίδες παρακολούθησης. Συνήθως πραγματοποιούνται 1-2 θερινοί ψεκασμοί και 2-3 φθινοπωρινοί. Για την αποφυγή τοξικών υπολειμμάτων, συνιστάται μετά τα μέσα Σεπτεμβρίου η χρήση εντομοκτόνων μικρής τοξικότητας και μειωμένης λιποδιαλυτικότητας (Μπρούμας & Κατσόγιαννος, 2009).

Οι ψεκασμοί καλύψεως αποτελούν θεραπευτική μέθοδο καταπολέμησης του δάκου της ελιάς που σκοπεύει στη θανάτωση της προνύμφης και του αυγού, εντός του ελαιόκαρπου. Στην περίπτωση αυτή, ψεκάζεται ολόκληρο το δένδρο με υδατικά διαλύματα εγκεκριμένων εντομοκτόνων. Προϋπόθεση για τη διενέργεια ψεκασμών με χημικά εντομοκτόνα είναι το ποσοστό γόνιμης προσβολής (αυγά, προνύμφες, νύμφες, προνυμφικές στοές) του ελαιόκαρπου να έχει φτάσει το 5% για τις ελαιοποιήσιμες ποικιλίες και το 2% για τις βρώσιμες ελιές (Ζιώγας, 1996). Είναι απαραίτητο να τηρούνται με σχολαστικότητα τα ελάχιστα χρονικά όρια μεταξύ τελευταίας επέμβασης και συγκομιδής, ώστε να μην έχει το λάδι ανεπίτρεπτα όρια εντομοκτόνων (Τζανακάκης & Κατσόγιαννος, 2003). Στους ψεκασμούς καλύψεως χρησιμοποιούνται κατά κανόνα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα, αλλά και πυρεθροειδή σε μικρότερο βαθμό (Skouras et al., 2007).

Η αλόγιστη χρήση εντομοκτόνων και άλλων, συναφούς σύστασης χημικών παρασκευασμάτων, ωστόσο, εμπλέκεται στην ευρεία περιβαλλοντική ρύπανση, στην παρουσία χημικών καταλοίπων στα προϊόντα και το περιβάλλον της ελιάς, καθώς και στη διατάραξη της τροφικής αλυσίδας με δυσάρεστες συνέπειες για την ανθρώπινη υγεία (Denholm & Rowland 1992). Σε πολλές περιπτώσεις, ο ψεκασμός με εντομοκτόνα θανατώνει, εκτός από το δάκο, και άλλα ωφέλιμα έντομα, διαταράσσοντας την οικολογική ισορροπία. Επιπλέον, οι διαδοχικοί ψεκασμοί οδήγησαν στην ανάπτυξη μηχανισμών ανθεκτικότητας των εντόμων στις χρησιμοποιούμενες δραστικές ουσίες. Εντοπίστηκαν μάλιστα μεταλλάξεις σε γονίδια στα ανθεκτικά άτομα αλλά και στους απογόνους τους, που τους επέτρεπαν να επιβιώσουν, με

αποτέλεσμα την ανεπιτυχή δράση των εντομοκτόνων σε συνδυασμό με ταυτόχρονη πληθυσμιακή αύξηση των ανθεκτικών ατόμων (Vontas et al., 2001; 2002, Kakani et al., 2008).

1.4.2 Βιολογική Καταπολέμηση

Εκτός των ψεκασμών με εντομοκτόνα, αποτελεσματικότερη και πρακτικότερη, σε σχέση με άλλες μεθόδους, αποδείχθηκε η μαζική παγίδευση των ενηλίκων, με διάφορους τύπους παγίδων (τροφικών, χρωματικών, φερομονικών ή συνδυασμούς αυτών), οι οποίες πέρα από τη χρήση τους για την παρακολούθηση του πληθυσμού του δάκου μπορούν να μετατραπούν και σε μέσο καταπολέμησής του (Τζανακάκης & Κατσόγιαννος, 2003; Varela et al., 2005). Η λειτουργία των παγίδων αυτών βασίζεται στα ερεθίσματα που περιέχουν και στην ανταπόκριση των εντόμων σε αυτά, και είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική όταν ο πληθυσμός του δάκου είναι αραιός.

Ο βιολογικός έλεγχος του δάκου συνεπάγεται την μαζική εξαπόλυση φυσικών εχθρών του, δηλαδή παρασιτοειδών (πίνακας 1) και αρπακτικών (πίνακας 2) καθώς και παθογόνων μικροοργανισμών, με απώτερο σκοπό τον περαιτέρω περιορισμό του (Daane & Johnson, 2010). Ωστόσο, η αποτελεσματικότητα της μεθόδου αυτής εξαρτάται και πολλές φορές περιορίζεται από τις οικολογικές και περιβαλλοντικές απαιτήσεις του εκάστοτε οργανισμού που χρησιμοποιείται. Συνεπώς, αποτελεί συμπληρωματική μέθοδο καταπολέμησης, με προοπτικές βελτίωσης (Hoelmer et al., 2011).

Πίνακας 1. Παράσιτα προνύμφης δάκου.

<i>Eupelmus</i>	Eupelmidae	Hymenoptera
<i>urozonus</i>		
<i>Pnigalio</i>	Eulophidae	Hymenoptera
<i>mediterraneus</i>		
<i>Eurytoma</i>	Eurytomidae	Hymenoptera
<i>martelli</i>		
<i>Cyrtoptyx latipes</i>	Pteromalidae	Hymenoptera
<i>Opius concolor</i>	Braconidae	Hymenoptera

Πίνακας 2. Αρπακτικά έντομα δάκου.

Carabus banozi

Licinus aegyptiacus

Pterostichus creticus

Ocypus oleus

Ocypus fulvipennis

Scolopendra ortica

Η παρεμπόδιση της σύζευξης στοχεύει στην συσσώρευση της φερομόνης του εντόμου στο περιβάλλον του, ώστε να έρθει σε σύγκρουση και να μην μπορεί να αναγνωρίσει τη φυσική πηγή της φερομόνης (δηλαδή το άτομο του αντίθετου φύλου) (Montiel & Jones, 2002). Η φερομόνη των θηλυκών είναι ένα μίγμα 4 ουσιών με αφθονότερο και ελκυστικότερο το συστατικό 1,7-dioxaspiro[5.5]undecane, το οποίο είναι δυνατό να παραχθεί συνθετικά.

1.4.3 Μέθοδος των Στείρων Εντόμων (Sterile Insect Technique- SIT)

Η εξαπόλυση στειρωμένων με ακτίνες γ αρσενικών ατόμων αποσκοπεί στη μείωση του αναπαραγωγικού πληθυσμού και την αποτροπή δημιουργίας απογόνων. Για να εφαρμοστεί η μέθοδος αυτή είναι απαραίτητο η τεχνική στειρώσεως να μην αποτρέπει την επιβίωση και ζωή του εντόμου στη φύση, καθώς και τη σύζευξη με το αντίθετο φύλο. Πληροφορίες αναφέρουν πως η τεχνική αυτή σε συνδυασμό με δολωματικούς ψεκασμούς διατήρησε τον πληθυσμό σε χαμηλά επίπεδα (Economidou, 1977), παρόλα αυτά η ευρύτερη εφαρμογή της μεθόδου των στείρων αρσενικών είναι δύσκολη από τεχνικής απόψεως.

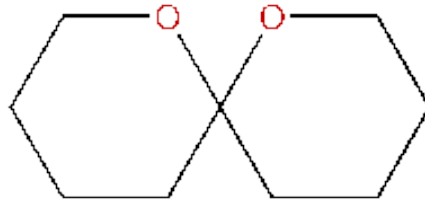
1.5 ΟΙ ΦΕΡΟΜΟΝΕΣ ΤΟΥ ΔΑΚΟΥ

Η χρήση σημειοχημικών ουσιών (semiochemicals), κυρίως φερομονών φύλου και τροφικών ελκυστικών, έχει αρχίσει να χρησιμοποιείται ευρέως για την παρακολούθηση της πληθυσμιακής κατανομής του δάκου της ελιάς, ιδίως στην περιοχή της Μεσογείου. Τα σημειοχημικά περιγράφονται ως ουσίες που μεταφέρουν μηνύματα μεταξύ έμβιων οργανισμών, φυτικών και ζωικών (Law & Regnier, 1971). Ειδικότερα, σημειοχημικές ουσίες που εκλύονται από ένα άτομο και προκαλούν την αντίδραση ενός άλλου ατόμου του ίδιου είδους, ονομάζονται φερομόνες (Karlson & Luscher, 1959). Αυτές μπορούν να ταξινομηθούν ανάλογα με τον τύπο της αντίδρασης που προκαλούν, σε φερομόνες συνάθροισης,

αναγνώρισης, ή φύλου (Shorey, 1977). Οι φερομόνες των διπτέρων που έχουν μελετηθεί μέχρι σήμερα είναι υδρογονάνθρακες και παράγονται σε ειδικά υποδερμικά κύτταρα της κοιλιακής χώρας (oenocytes) και εναποτίθενται στην επιφάνεια της επιδερμίδας (Dillwith & Blomquist, 1982; Ismail & Kremer, 1983; Langley & Carlson, 1983). Η δομή τους είναι όμοια με συστατικά του στρώματος των λιπιδίων της επιδερμίδας όλων των εντόμων (Blomquist et. al, 1998), επομένως οι φερομόνες αυτές των διπτέρων προκύπτουν από παραλλαγές των μονοπατιών σύνθεσης των επιδερμικών λιπιδίων (Blomquist et. al, 1987a; Nelson & Blomquist, 1995).

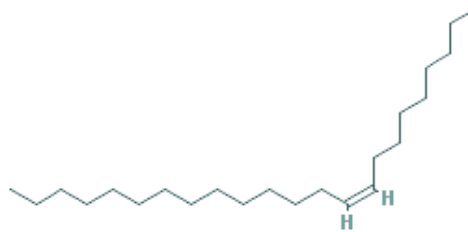
Η σύνθεση των φερομονών στα δίπτερα έχει μελετηθεί εκτενώς στη *Drosophila melanogaster* (Wicker & Jallon, 1995a; Pennanec'h et. al, 1997), αλλά και στην κοινή οικιακή μύγα, *Musca domestica* και στη μύγα τσετσέ, *Grossina morsitans* (*Muscidae*) (Carlson et. al, 1978; Langley & Carlson, 1983). Στα ενήλικα της *Drosophila* τα oenocytes βρίσκονται εντός της κοιλιακής στοιβάδας και ομαδοποιούνται σε ελικοειδείς δομές (Krupp & Levine, 2010). Οι σεξουαλικές της φερομόνες είναι ακόρεστοι υδρογονάνθρακες που προέρχονται από λιπαρά οξέα. Το είδος *Drosophila melanogaster* παρουσιάζει διμορφισμό όσον αφορά τις σεξουαλικές του φερομόνες, με υψηλά επίπεδα μονοενίων στα αρσενικά και διενίων στα θηλυκά (Wicker-Thomas et al., 2009). Συγκεκριμένα, στο στέλεχος Canton- S της *Drosophila*, τα Z7 και Z11-επτακοσαδιένιο (Z7, Z11-27: Hy) είναι σε αφθονία στα θηλυκά και λειτουργούν ως φερομόνες (Jallon, 1984; Ferveur et al., 1989; 1994).

Η αναπαραγωγή του δάκου βασίζεται σε μία φερομόνη φύλου, η οποία είναι εξαιρετικά πτητική, εκλύεται από παρθένα θηλυκά άτομα και προσελκύει τα ενήλικα αρσενικά (Haniotakis, 1974; Haniotakis et al., 1977). Το κύριο συστατικό της συγκεκριμένης φερομόνης έχει ταυτοποιηθεί και είναι το 1,7-dioxaspiro[5.5]undecane (spiroketal), το οποίο συνοδεύεται από χαμηλά επίπεδα (~10% στο σύνολο) υδροξυ-παραγώγων (Baker et al., 1980; Hungerford et al., 1998). Έχουν ανιχνευτεί επίσης πολύ χαμηλά επίπεδα (~0,4% και 0,1% αντίστοιχα) των δύο ισομερών του 2-μέθυλο-1,6-διοξάσπιρο[5.4]δεκανίου (Fletcher et al., 2002). Εκτός από τα θηλυκά άτομα, το αρσενικό *B. oleae* μπορεί επίσης να παράγει μετρήσιμες ποσότητες του κύριου συστατικού της φερομόνης, ιδίως σε περιόδους μειωμένης αναπαραγωγικής δραστηριότητας. Η φερομόνη αυτή του αρσενικού πιστεύεται ότι θα μπορούσε να αποτελέσει σήμα συνάθροισης κατά τη διάρκεια δύσκολων περιόδων, προκειμένου να παρουσιαστούν και άλλα άτομα του είδους στις πηγές τροφής (ελκυστικό τροφής) (Mazomenos & Pomonis, 1983). Συνεπώς, η ένωση 1,7-dioxaspiro[5.5]undecane δρα ως φερομόνη φύλου αλλά και ως ουσία συνάθροισης.



Εικόνα 1.5: 1,7-dioxaspiro[5.5]undecane
© Pubchem

Τα αρσενικά μπορούν επίσης να παράξουν την ουσία Z-(9)-tricosene (muscalure) στους ορθικούς αδένες, η οποία προσελκύει επιλεκτικά τα θηλυκά άτομα. Οι αδένες αυτοί εμπλέκονται στην παραγωγή και την αποθήκευση της σεξουαλικής φερομόνης των αρσενικών ατόμων του δάκου (Schultz and Boush, 1971; De Marzo, 1978). Το muscalure συμβάλει στη σεξουαλική επικοινωνία των ατόμων του *B. oleae* μέσω της παρουσίας του στους ορθικούς αδένες του αρσενικού (Canale et al., 2013b).



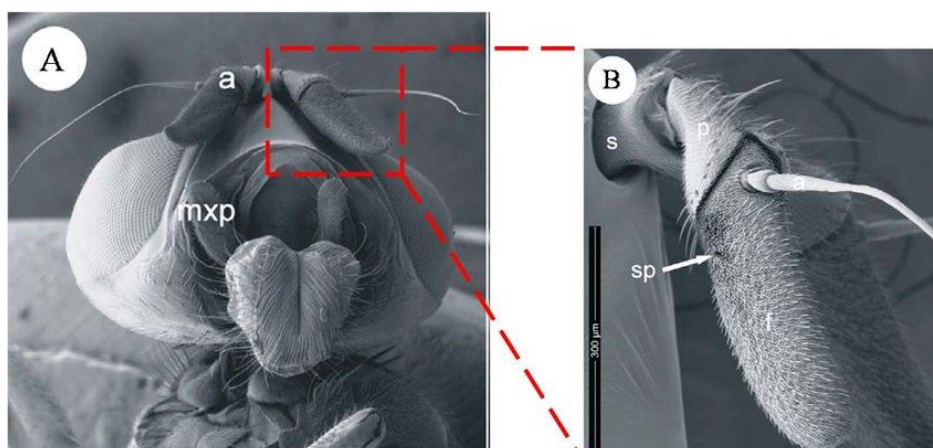
Εικόνα 1.4: Z-9-tricosene
© Pubchem

Εκτός από τις φερομόνες που εκλύονται από τα ίδια τα έντομα, σημαντικό ρόλο στη χημική επικοινωνία φυτών- εντόμων διαδραματίζουν και οι δευτερογενείς μεταβολίτες των φυτών. Οι πολύπλοκες σχέσεις φυτών και εντόμων θεωρείται ότι ρυθμίζονται από πληθώρα δευτερογενών μεταβολιτών, συνήθως μικρού μοριακού βάρους και μεγάλης πτητικότητας (Sondheimer, 1972; Harborne, 1993). Μια σειρά από πτητικά της ελιάς, όπως η τολουϊνη, η αμμωνία, το στυρόλιο, το αιθυλοβενζόλιο και το α-πινένιο, έχουν αποδειχθεί ελκυστικά του δάκου της ελιάς, ενώ άλλα, όπως το (E)-2-hexenal αποτελεί ισχυρό απωθητικό του εντόμου (Scarpati et al., 1993; Scarpati et al., 1996; Alfonso et al., 2014). Η vonanάλη, που αποτελεί συστατικό της φερομόνης φύλου του δάκου σε μικρή συγκέντρωση, προκάλεσε αυξημένη αντίδραση σε αρσενικά και θηλυκά άτομα του είδους (Botsi et al., 1995; Seris, 2011).

Στις πτητικές ουσίες των φυτών έχουν αποδοθεί σημαντικές λειτουργίες, αντιπροσωπεύοντας τους τρόπους με τους οποίους τα φυτά επικοινωνούν και αλληλεπιδρούν με το ευρύτερο περιβάλλον. Οι ουσίες αυτές συμμετέχουν στην αναπαραγωγή των φυτών, καθώς και στην ανάπτυξη μηχανισμών άμυνας σε αβιοτικές καταπονήσεις και άλλου είδους απειλές (Dudareva et al., 2006). Πτητικά συστατικά που εκλύονται από τους καρπούς και τα φύλλα της ελιάς αναγνωρίζονται από τις κεραίες των ατόμων του δάκου και φαίνεται να παίζουν καθοριστικό ρόλο στην επιλογή του φυτού- ξενιστή για ωοαπόθεση (Aluja & Mangan, 2008; Liscia et al., 2013).

1.6 Η ΟΣΦΡΗΣΗ ΣΤΑ ΕΝΤΟΜΑ

Τα έντομα θεωρείται ότι έχουν την ικανότητα να διακρίνουν μέσω των αισθητηρίων της όσφρησης τις πτητικές ουσίες που συναντούν στο περιβάλλον τους. Τα οσφρητικά σήματα φαίνεται να έχουν το σπουδαιότερο ρόλο στους μηχανισμούς των εντόμων για την ανακάλυψη και επιλογή του φυτού- ξενιστή. Στην περίπτωση της όσφρησης, τα έντομα χρειάζονται ένα εναρμονισμένο αισθητικό σύστημα, ικανό να συλλαμβάνει μικρές ποσότητες φερομόνης που εκλύονται από το αντίθετο φύλο, αλλά ταυτόχρονα και ένα ευρύτερο σύστημα χημικής αίσθησης που θα «κατηγοριοποιεί» τα φυτά σε αποδεκτά και μη-αποδεκτά. Έχουν αναφερθεί 4 είδη χημειοϋποδοχέων στα έντομα, ανάλογα με το είδος των χημικών ενώσεων και την αντίδραση που προκαλούν. Υπάρχουν υποδοχείς που αντιδρούν αποκλειστικά στις φερομόνες του είδους, άλλοι που αντιδρούν σε ομάδες παρόμοιων ουσιών (π.χ. αλκοόλες- εστέρες), άλλοι που αντιδρούν σε μια ομάδα παρόμοιων ουσιών, αλλά με διαφορετική ένταση σε κάθε ουσία και άλλοι που αντιδρούν σε ένα ευρύ φάσμα ουσιών. Η λειτουργική σημασία αυτών των οικογενειών υποδοχέων πιστεύεται ότι έγκειται στο γεγονός ότι επιτρέπουν σε διαφορετικές ουσίες να προκαλούν διαφορετικές αντιδράσεις στο έντομο που τις αποδέχεται (Shepherd, 1988).



Εικόνα 1.6: Κεφάλι (A) και κεραία (B) του *B. oleae*
©Anna Liscia

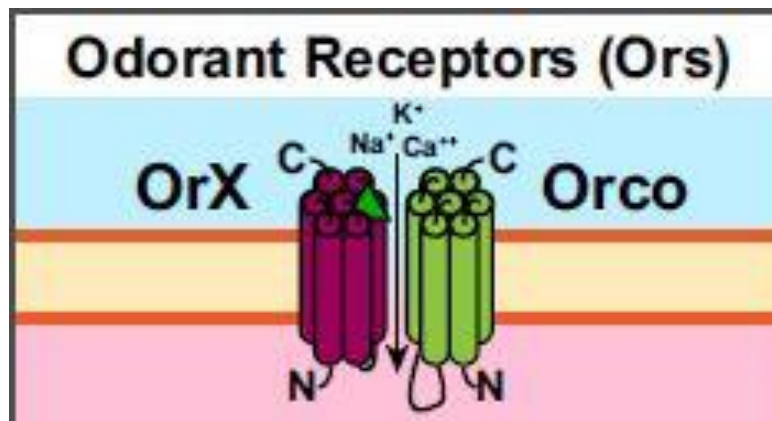
1.6.1 Οικογένειες Οσφρητικών Υποδοχέων

Οι πτητικές ουσίες αναγνωρίζονται από τα έντομα από τους οσφρητικούς υποδοχείς που εκφράζουν οι οσφρητικοί νευρώνες (olfactory sensory neurons – OSNs). Τα κύρια αισθητήρια όργανα των εντόμων είναι ένα ζεύγος κεραιών και ένα ζεύγος γναθικών προσακτρίδων (maxillary palps). Τα όργανα αυτά καλύπτονται από αισθητήριες τρίχες μέσα στις οποίες βρίσκονται οι δενδρίτες των οσφρητικών νευρώνων. Κάθε αισθητήρια τρίχα περιλαμβάνει τους δενδρίτες δύο έως τεσσάρων τύπων οσφρητικών νευρώνων. Οι περισσότερες γνώσεις που έχουμε μέχρι σήμερα για τους οσφρητικούς υποδοχείς και τη λειτουργία τους προέρχονται από έρευνες στο είδος *Drosophila melanogaster*. Λόγω των απεριόριστων γενετικών εργαλείων που προσφέρει η *Drosophila*, έχει πρωτοστατήσει στις μελέτες γύρω από τους χημειούποδοχείς και τα ευρήματα αυτά μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην προσπάθεια κατανόησης του οσφρητικού συστήματος διαφόρων εντόμων οικονομικής και υγειονομικής σημασίας (Depetris- Chauvin et. al, 2015).

i. Οικογένεια OR (Odorant Receptor Family)

Οι οσφρητικοί υποδοχείς στη μύγα είναι διμερή, αποτελούμενοι από μία κοινή σταθερή υπομονάδα (Orco) και μία από τις 62 μεταβλητές υπομονάδες (Or). Κάθε οσφρητικός νευρώνας εκφράζει τη σταθερή υπομονάδα και μόνο μία από τις μεταβλητές υπομονάδες. Επομένως, κάθε τύπος νευρώνα εκφράζει μόνο ένα τύπο υποδοχέα από τον οποίο και χαρακτηρίζεται.

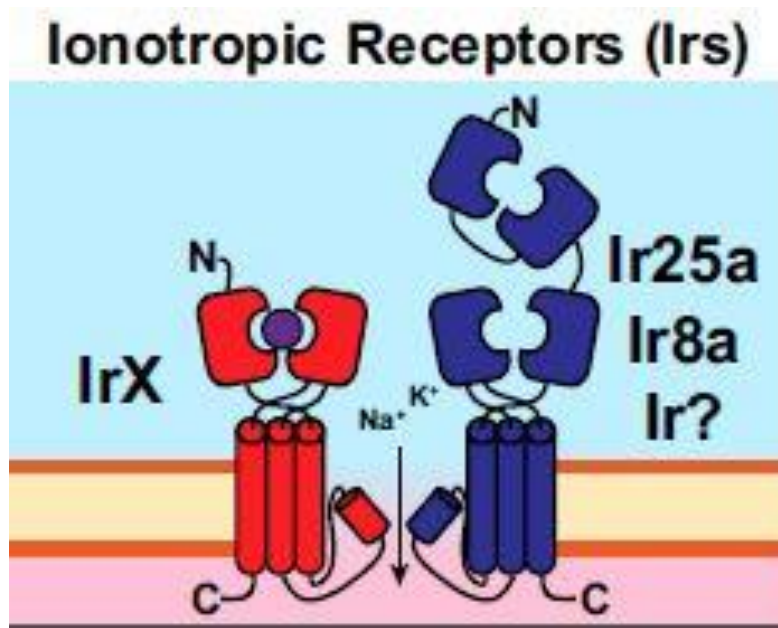
Σε αντίθεση με τους IRs και τους GRs, που εμφανίζονται σε διάφορα μέλη του ζωικού βασιλείου, οι ετεροδιμερείς ORs περιορίζονται στα έντομα (Penalva et al., 2009; Croset et al., 2010). Τα orco⁻ άτομα εμφανίζουν ηλεκτροφυσιολογική και συμπεριφορική ανεπάρκεια όσον αφορά την όσφρηση, γεγονός που υποδηλώνει ότι η υπομονάδα orco είναι απαραίτητη για όλους τους OR (Larsson et al., 2004). Οι πτητικές φερομόνες ανιχνεύονται από τους OR, και η απαίτηση του orco συνυποδοχέα για την απόκριση στα οσφρητικά ερεθίσματα είναι μοναδική στα έντομα. Η υπομονάδα orco εκφράζεται από όλους τους νευρώνες στα maxillary palps και περίπου από το 75% των νευρώνων στις κεραιές (Larsson et al., 2004; Neuhaus et al., 2005).



Εικόνα 1.7 Υποδοχείς OR
©Munger & Zufall, *Chemosensory transduction*, Ch. 6

ii. Οικογένεια IR (Ionotropic Receptors)

Είναι υποδοχείς που βρίσκονται στα κοιλοκωνικά τριχίδια (coeloconic) και εκφράζονται από οσφρητικούς νευρώνες που αποκρίνονται σε οξέα, αμίνες, αλδεΐδες και δεν εκφράζουν τους ORs (olfactory receptors), ούτε τους GRs (gustatory receptors). Οι IRs ανακαλύφθηκαν το 2009, έχουν βρεθεί 66 γονίδια στη *Drosophila* και αποτελούν την επέκταση των iGluR (ionotropic glutamate receptors), με συντηρημένα γλουταμινικά-συνδεδεμένα κατάλοιπα. Οι IRs που συνδέονται αποκλειστικά με τις κεραίες του εντόμου εκφράζονται στα κοιλοκωνικά τριχίδια, στην arista και στο sacculus (σακουλοειδής εσοχή). Κάποιοι IRs στη *D. melanogaster* φαίνεται να έχουν και λειτουργίες εκτός του οσφρητικού συστήματος και έρευνες τους έχουν συνδέσει με το γευστικό σύστημα. Οι IR25a και IR8a είναι οι πιο κοντινοί εξελικτικά στους iGluRs, και εκφράζονται από τα περισσότερα νευρικά κύτταρα που εκφράζουν τους IRs. Θεωρούνται απαραίτητοι για την απόκριση σε οσφρητικά ερεθίσματα και έχουν λάβει την ονομασία «υποδοχείς IRco». Η οικογένεια των IRs παρουσιάζει μια περίπλοκη, ολιγομερή δομή, που χαρακτηρίζει τις υποομάδες της.



Εικόνα 1.8 Υποδοχείς IR
©Munger & Zufall, *Chemosensory transduction*, Ch. 6

1.6.2 Μετάδοση του Οσφρητικού Σήματος

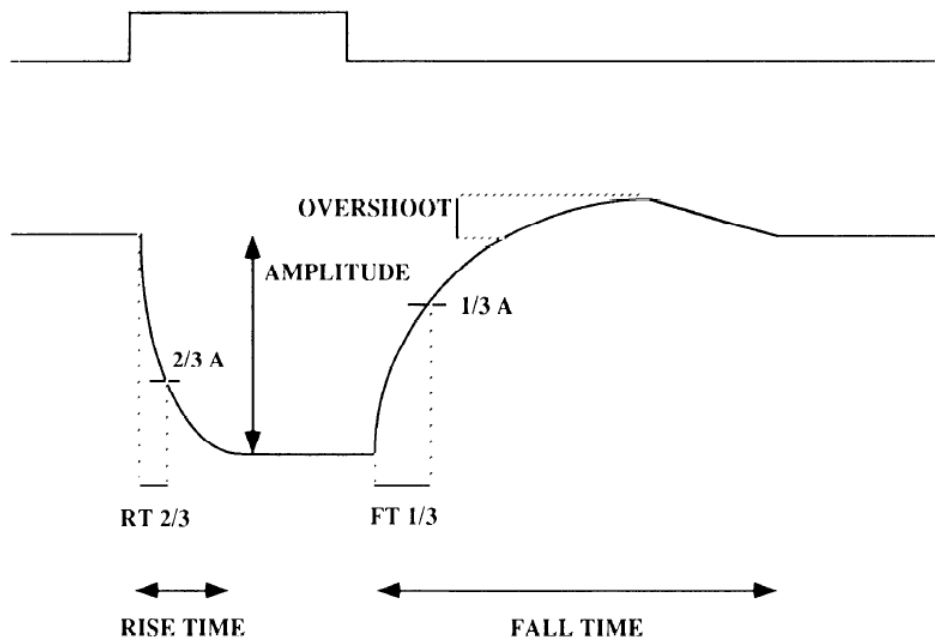
Είναι γνωστό ότι οι σημειοχημικές ουσίες, ιδιαίτερα οι φερομόνες, γίνονται αντιληπτές από τα έντομα μέσω αισθητήριων νευρώνων που βρίσκονται κυρίως στις κεραίες. Η οσφρητική ευαισθησία στις φερομόνες καθορίζεται από το μέγεθος και το σχήμα της κεραίας, καθώς και από τον αριθμό, τον τύπο και τις θέσεις των οσφρητικών υποδοχέων πάνω σε αυτή (Kaissling, 1971). Οι φερομόνες γίνονται αντιληπτές μέσω των οσφρητικών αισθητικών τριχιδίων (sensilla). Αυτά είναι επιδερμικές προεξοχές, ή τρίχες, πάνω στην κεραία, τα οποία στηρίζουν τους αισθητήριους δενδρίτες και τελικά μεταδίδουν το μήνυμα στο κεντρικό νευρικό σύστημα (Schneider, 1964). Τα τριχίδια αποτελούνται από λεπτά τοιχώματα και πόρους και κυριότερος ρόλος τους είναι να προσροφούν όσο το δυνατόν περισσότερα μόρια των χημικών ενώσεων που προσκρούουν στην κεραία του εντόμου. Κάθε πόρος καταλήγει σε ένα κοίλωμα, όπου αρκετοί σωληνίσκοι οδηγούν στο μεσοκυττάριο χώρο του οσφρητικού τριχιδίου. Οι σωληνίσκοι καταλήγουν στην επιφανειακή μεμβράνη των νευρικών δενδριτών, οι οποίοι διασχίζουν το κέντρο των τριχιδίων. Τα μόρια της φερομόνης προσκρούουν στην κεραία, εισχωρούν στους αισθητικούς πόρους κατευθείαν ή μετά από διάχυση πάνω στην επιφάνεια του τριχιδίου και, όταν βρεθούν εντός της κοιλότητας του πόρου, διαχέονται στους σωληνίσκους και έρχονται σε επαφή με τη μεμβράνη- υποδοχέα των αισθητικών δενδριτών (Steinbrecht & Muller, 1971, 1976; Schneider & Kaissling, 1957; Kaissling, 1987). Έπειτα

συναντούν πρωτεϊνικά μόρια- υποδοχείς και σχηματίζουν μαζί τους ενεργό σύμπλοκο, το οποίο προκαλεί στο δενδρίτη παροδική αλλαγή, γνωστή ως δυναμικό υποδοχής (receptor potential) (Hansen, 1978; Stadler, 1980; Kaissling & Thorson, 1980). Τα μόρια- υποδοχείς είναι πρωτεϊνικά μακρομόρια με δομή συμπληρωματική με αυτή των μορίων της οσμής, ως προς το μέγεθος, το σχήμα, ή τη θέση των ενεργών ομάδων (Bossert & Wilson, 1963).

Η δημιουργία του δυναμικού υποδοχής αποτελεί την πρώτη αντίδραση μιας σειράς ηλεκτροχημικών αντιδράσεων. Αυτές οι παροδικές αλλαγές συνδυάζονται και σχηματίζουν ένα γενεσιουργό δυναμικό (generator potential) στην επιφάνεια του δενδρίτη, και όταν το δυναμικό αυτό ξεπεράσει ένα όριο (threshold), δημιουργούνται διαδοχικά δυναμικά ενεργείας που κινούνται ταχύτατα προς τον εγκέφαλο. Συνεπώς, η αντίληψη της φερομόνης και άλλων οσφρητικών ερεθισμάτων δεν είναι απλή διαδικασία, αλλά βασίζεται στην περίπλοκη αλληλεπίδραση των υποδοχέων και του κεντρικού νευρικού συστήματος, που ερμηνεύει τις πληροφορίες των υποδοχέων και τις μεταφράζει σε αντιδράσεις συμπεριφοράς (Moncrieff, 1951; Amoore, 1970; Klopping, 1971). Η ένταση της απόκρισης των οσφρητικών νευρώνων του εντόμου σε ένα οσφρητικό ερέθισμα μπορεί να καταγραφεί με τις κατάλληλες μεθόδους.

1.7 ΗΛΕΚΤΡΟΑΝΤΕΝΝΟΓΡΑΦΙΑ (EAG)

Η ηλεκτροαντεννογραφία (Electroantennography- EAG) είναι μια ηλεκτροφυσιολογική τεχνική που επιτρέπει τον έλεγχο της ευαισθησίας ενός εντόμου σε μια σημειοχημική ουσία. Ένα ζεύγος ηλεκτροδίων βρίσκεται σε επαφή με την κεραία και τον οφθαλμό του εντόμου, συνιστώντας ένα κλειστό ηλεκτρικό κύκλωμα και ακολουθεί διέγερση με δραστική πτητική ουσία. Η διέγερση αυτή προκαλεί εκπόλωση των οσφρητικών νευρώνων της κεραίας, η οποία με τη σειρά της δημιουργεί μια διαφορά δυναμικού στα ηλεκτρόδια, που μπορεί να ενισχυθεί και να καταγραφεί (Schneider, 1957). Το ηλεκτροαντεννογράφημα αποτελεί το άθροισμα των δυναμικών ενεργείας των νευρικών αισθητικών κυττάρων (summated receptor potential) (Schneider, 1962). Το μέγεθος της απόκρισης στο ερέθισμα αυξάνεται με την αύξηση της συγκέντρωσης της πτητικής ουσίας και εξαρτάται από τη φύση της, το είδος του εντόμου, το φύλο του κ.α.



Εικόνα 1.9: Χαρακτηριστικό ηλεκτροαντεννογράφημα ©Alcorta et. al, 1991

Στην εικ. 1.9 φαίνεται ένα χαρακτηριστικό ηλεκτροαντεννογράφημα. Το πλάτος (amplitude) της απόκρισης αντιπροσωπεύει το άθροισμα της συνολικής δραστηριότητας των οσφρητικών νευρώνων της κεραίας του εντόμου τη δεδομένη στιγμή που δίνεται το ερέθισμα. Rise time είναι ο χρόνος που απαιτείται για να φτάσει το σήμα τα 2/3 του μέγιστου πλάτους και Fall time ο χρόνος που απαιτείται για την επιστροφή στο 1/3 του μέγιστου πλάτους.

1.8 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο δάκος της ελιάς είναι αναμφίβολα ο σημαντικότερος εντομολογικός εχθρός του ελαιόδεντρου. Το ενήλικο θηλυκό προσβάλλει τον καρπό αφήνοντας το αυγό του και η εκκολαπτόμενη προνύμφη τρέφεται από τη σάρκα του ελαιόκαρπου. Έτσι, αφενός ο καρπός καθίσταται μη βρώσιμος και αφετέρου υποβαθμίζεται η ποιότητα του παραγόμενου ελαιόλαδου. Η αντιμετώπισή του πραγματοποιείται κατά κύριο λόγο με τη χρήση χημικών εντομοκτόνων, με τις γνωστές συνέπειες τόσο για τους παραγωγούς και τους καταναλωτές, όσο και για το περιβάλλον. Η καταπολέμηση με τη χρήση παγίδων μαζικής παγίδευσης είναι μέθοδος φιλική προς το περιβάλλον, όμως όχι αρκετά αποτελεσματική. Οι υπάρχουσες παγίδες βασίζονται σε τροφικά ελκυστικά (υδρολυμένες πρωτεΐνες, όξινο ανθρακικό αμμώνιο) και σε εξατμιστήρες της φερομόνης του εντόμου. Εν τούτοις, μόνο ένα 20-25% των θηλυκών εντόμων έλκονται από αυτές, αφενός λόγω της πολύ μικρής ακτίνας δράσης των τροφικών ελκυστικών και αφετέρου της περιορισμένης προσελκυστικής ικανότητας των χρησιμοποιούμενων ουσιών.

Η παρούσα διπλωματική εργασία στοχεύει στο χαρακτηρισμό των οσφρητικών υποδοχέων του δάκου και του τρόπου με τον οποίο τα άτομα του είδους αντιλαμβάνονται τις σεξουαλικές του φερομόνες, για τον εμπλουτισμό των υπάρχοντων γνώσεων γύρω από τη σεξουαλική επικοινωνία των εντόμων και τις ουσίες που θεωρούνται ελκυστικές. Θα μπορούσε, με τον τρόπο αυτό, να συμβάλει στην προσπάθεια αναζήτησης της ουσίας που προσελκύει περισσότερο (στην κατάλληλη συγκέντρωση) τα άτομα του δάκου, έτσι ώστε να εφαρμοστεί σε παγίδες μαζικής παγίδευσης για τη βιολογική καταπολέμηση του εντόμου.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Πραγματοποιήθηκαν εξωκυττάρια καταγραφές σε ακινητοποιημένα αρσενικά και θηλυκά άτομα *B. oleae* και *D. melanogaster* (Canton- S) 5 ημερών, που διατηρήθηκαν σε συνθήκες θερμοκρασίας 25 °C και 40-60% σχετικής υγρασίας. Τα άτομα δάκου που χρησιμοποιήθηκαν ήταν παρθένα, ενώ για τις καταγραφές σε *Drosophila*, εκτός από παρθένα θηλυκά, χρησιμοποιήθηκαν και συζευγμένα αρσενικά και θηλυκά άτομα. Τα ενήλικα άτομα *B. oleae* προέκυψαν από προσβεβλημένες ελιές των ν. Πιερίας και Χαλκιδικής που διατηρήθηκαν στο εργαστήριο υπό συνθήκες 25 °C και 40-60% ΣΥ. Κάθε άτομο ακινητοποιήθηκε μέσα στο ρύγχος μιας πιπέτας, με το κεφάλι να ξεπροβάλλει κατά το ήμισυ. Η κεραία στερεώθηκε ξαπλωτά στην επιφάνεια μιας καλυπτρίδας, με τη βοήθεια γυάλινου ηλεκτροδίου.

Για τις καταγραφές χρησιμοποιήθηκε μικροσκόπιο φθορισμού (BX51, Olympus) και γυάλινα ηλεκτρόδια, κατασκευασμένα με puller P1000 (Shutter Instruments). Σε κάθε έντομο, ένα ηλεκτρόδιο εισήχθη στον οφθαλμό (ηλεκτρόδιο γείωσης) και η μύτη ενός δεύτερου ακουμπούσε στην κεραία, χωρίς να την τρυπήσει (καταγραφικό). Τα ηλεκτρόδια περιείχαν διάλυμα 0,17 M NaCl.

Το σήμα ενισχύθηκε με τον ενισχυτή Multiclamp 700B (Molecular Devices) και ψηφιοποιήθηκε με τον Digidata 1440 (Molecular Devices), με ρυθμό δειγματοληψίας 10000 Hz. Η αποθήκευση και η ανάλυση των καταγραφών έγινε με το πρόγραμμα pclamp 10.3 (Molecular Devices).

Το οσφρητικό ερέθισμα δόθηκε με την αντλία (stimulus controller) CS-55 (Syntech), η οποία παρείχε συνεχόμενη ροή αέρα και επέτρεπε την εισαγωγή οσφρητικού ερεθίσματος χωρίς την παραγωγή μηχανικού παρασίτου στην κεραία του εντόμου. Οι οσμές προμηθεύτηκαν αμιγείς από την ΒΙΟΡΥΛ Α.Ε., διαλύθηκαν σε μυριστικό ισοπροπύλιο (Isopropyl myristate, IPM, Sigma-Aldrich) και 20 μ L του διαλύματος τοποθετήθηκαν σε ένα κομμάτι διηθητικού χαρτιού διαστάσεων 0,3x5 cm (Whatman, GE Healthcare). Το χαρτί στη συνέχεια τοποθετήθηκε μέσα σε μια πιπέτα Pasteur και προσαρμόστηκε στην ειδική εγκοπή της αντλίας.

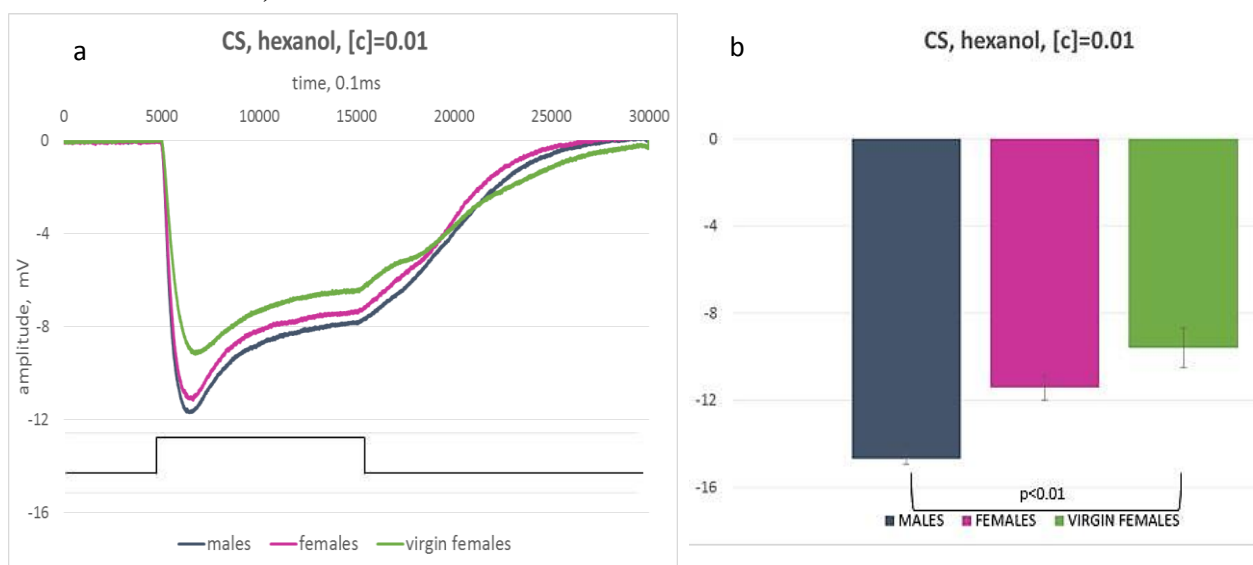
Ο σωληνίσκος που μετέφερε το ερέθισμα στο έντομο απείχε 1 cm από την κεραία. Τα οσφρητικά ερεθίσματα δόθηκαν κατά αύξουσα σειρά συγκέντρωσης (v/v): 0.0001, 0.001, 0.01, 0.05, είχαν διάρκεια 1 sec και μεταξύ τους μεσολαβούσε χρόνος 20 sec.

Καταγράφηκε η απόκριση ενήλικων ατόμου δάκου στις φερομόνες spiroketal και muscalure και η απόκριση ενήλικων ατόμων *Drosophila* στις προαναφερθείσες φερομόνες, και επιπλέον στην εξανόλη (μάρτυρας).

Διαφορές στην απόκριση των δύο ειδών στις διαφορετικές συγκεντρώσεις και φερομόνες αξιολογήθηκαν με t-test (Excel).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

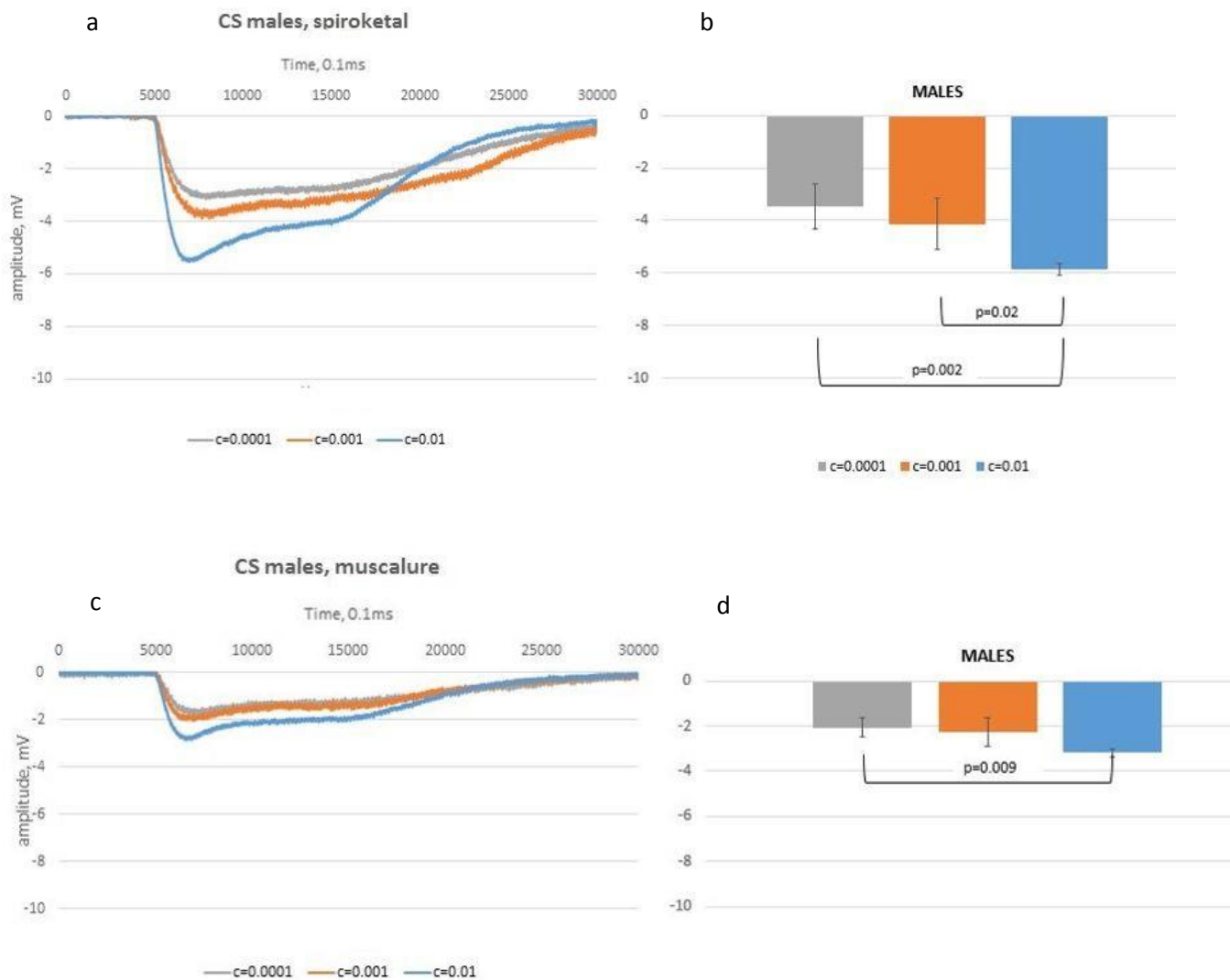
3.1 ΑΠΟΚΡΙΣΗ *Drosophila melanogaster* ΣΕ HEXANOL (ΜΑΡΤΥΡΑΣ), SPIROKETAL, MUSCALURE



Διαγρ. 3.1: το σχήμα (a) και το μέσο πλάτος απόκρισης (b) συζευγμένων αρσενικών και θηλυκών και παρθένων θηλυκών ατόμων *Drosophila* στην εξανόλη, σε συγκέντρωση 0.01.

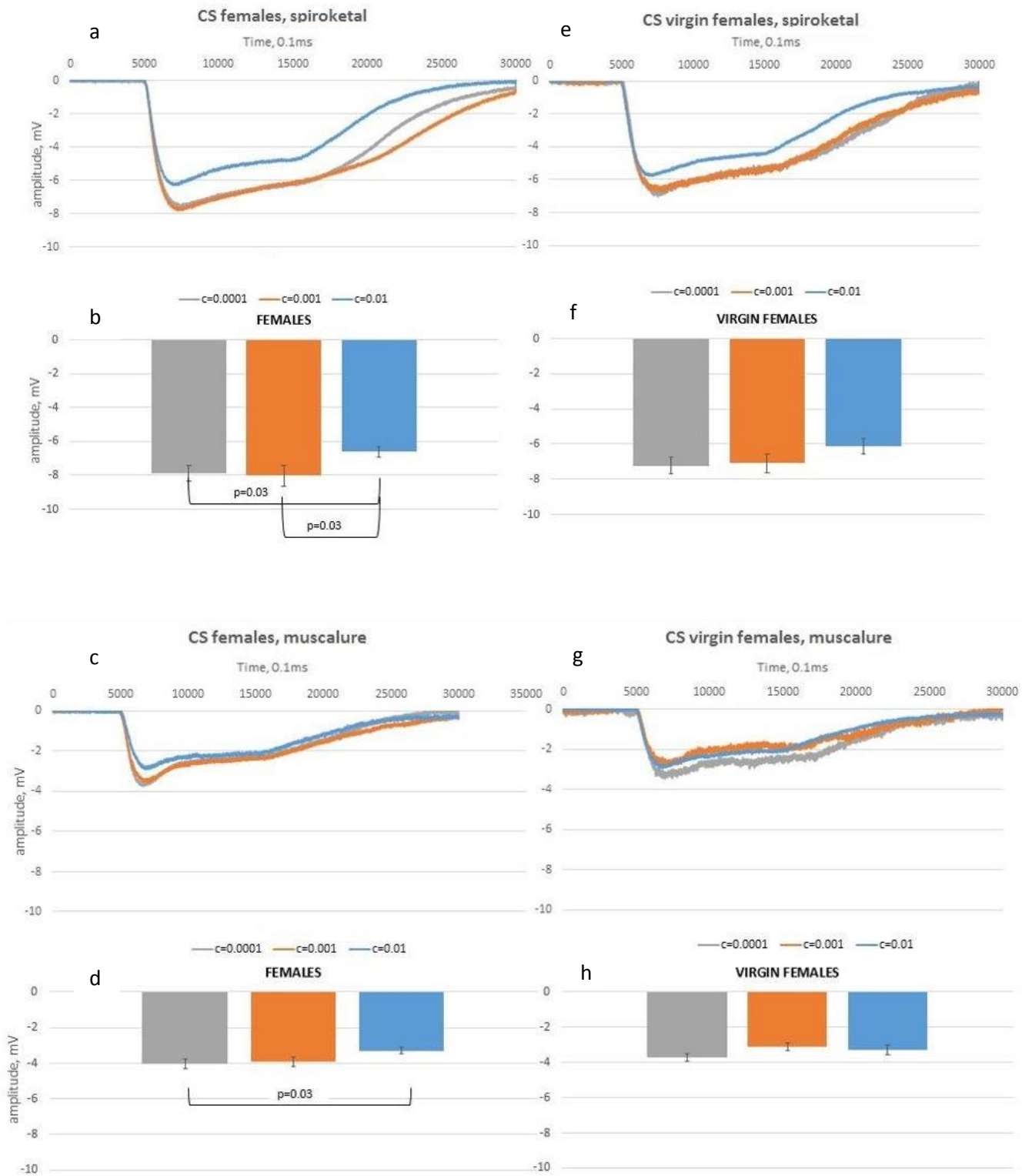
Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, οι περισσότερες έρευνες που αφορούν στη δραστηριότητα των οσφρητικών υποδοχέων, έχουν πραγματοποιηθεί στο είδος *Drosophila melanogaster*. Η *Drosophila* προσφέρει πλήθος γενετικών εργαλείων για τη χαρτογράφηση του οσφρητικού συστήματος των εντόμων οικονομικής και υγειονομικής σημασίας και στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε ως οργανισμός μοντέλο για την εξήγηση της απόκρισης του δάκου.

Αρχικά στη *Drosophila* ελέγχθηκε η απόκριση στην εξανόλη, μια καλά χαρακτηρισμένη οσμή που χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας. Παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά του πλάτους απόκρισης στην εξανόλη ανάμεσα σε συζευγμένα αρσενικά και παρθένα θηλυκά άτομα ($p < 0.01$) (διαγρ. 3.1).



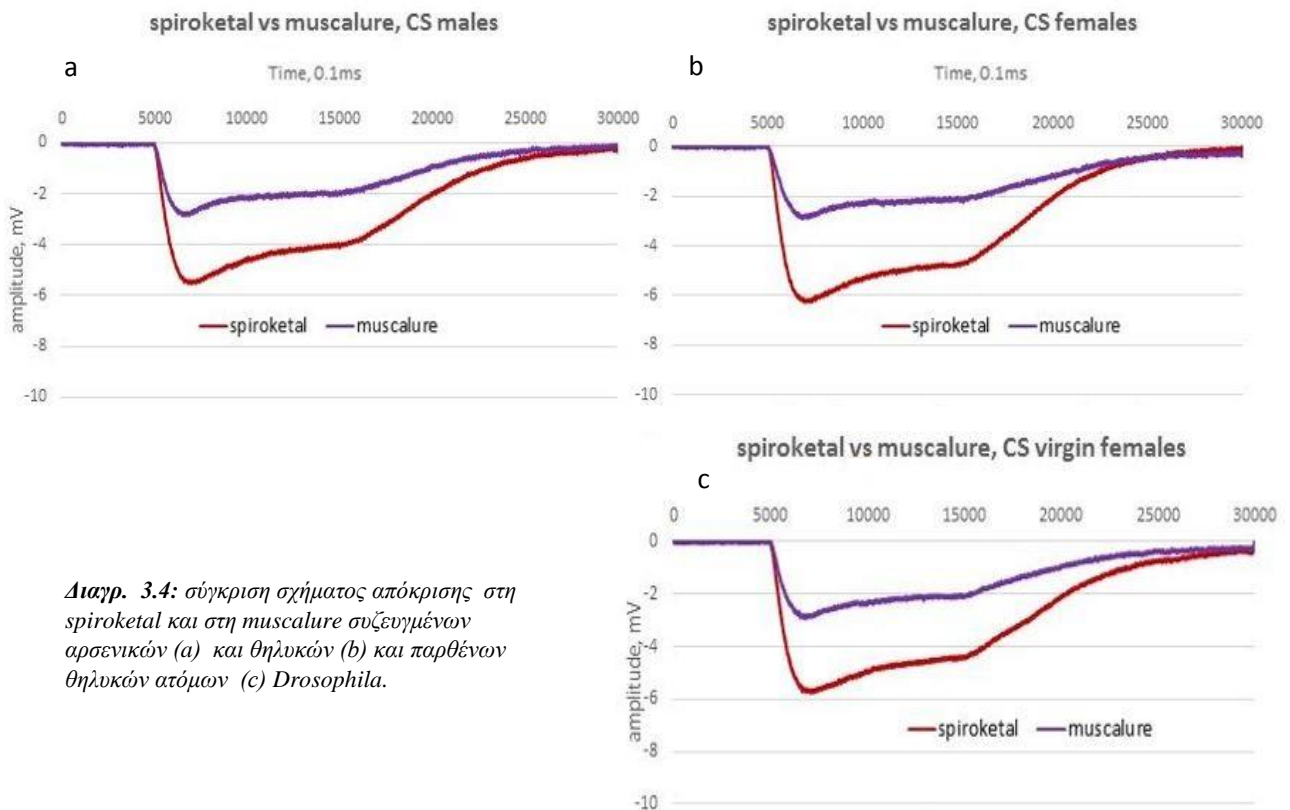
Διαγρ. 3.2: το σχήμα και το μέσο πλάτος απόκρισης συζευγμένων αρσενικών ατόμων *Drosophila* στη spiroketal (a,b) και τη muscalure (c,d) , σε 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις (0.0001, 0.001, 0.01).

Τα συζευγμένα αρσενικά άτομα *Drosophila* έδειξαν σημαντικά μεγαλύτερη απόκριση σε μεγαλύτερη συγκέντρωση spiroketal και muscalure (0.01) ($p \leq 0.02$) (διαγρ. 3.2).



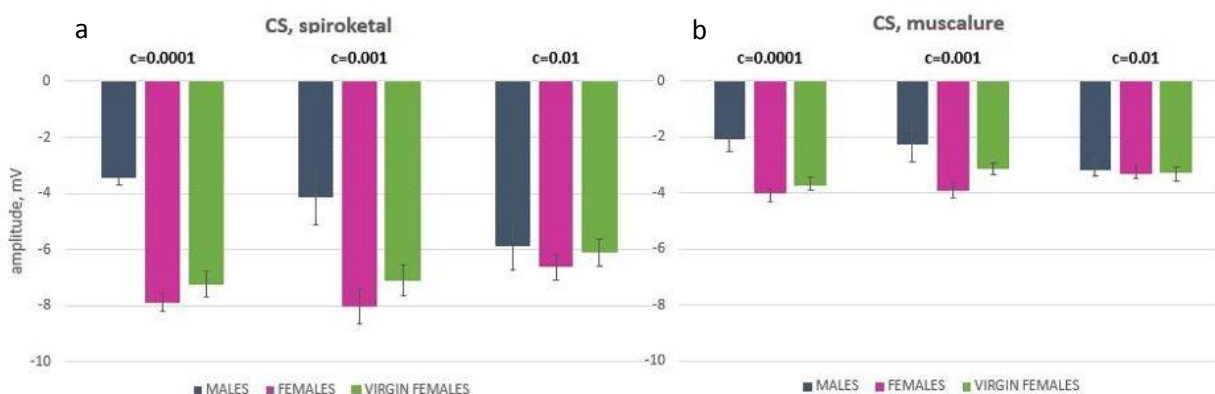
Διαγρ. 3.3: το σχήμα και το μέσο πλάτος της απόκρισης συζευγμένων θηλυκών (a,b) και παρθένων θηλυκών (e,f) απόμων *Drosophila* στη spiroketal σε 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις (0.0001, 0.001, 0.01). Διαγρ. c, d, g, h : Αντίστοιχα για τη muscalure.

Αντιθέτως, τα συζευγμένα θηλυκά άτομα *Drosophila* έδειξαν μεγαλύτερη απόκριση στις χαμηλότερες συγκεντρώσεις spiroketal (0.0001, 0.001), αλλά και muscalure (0.0001) ($p=0.03$). (διαγρ. 3.3)



Διαγρ. 3.4: σύγκριση σχήματος απόκρισης στη spiroketal και στη muscalure συζευγμένων αρσενικών (a) και θηλυκών (b) και παρθένων θηλυκών ατόμων (c) *Drosophila*.

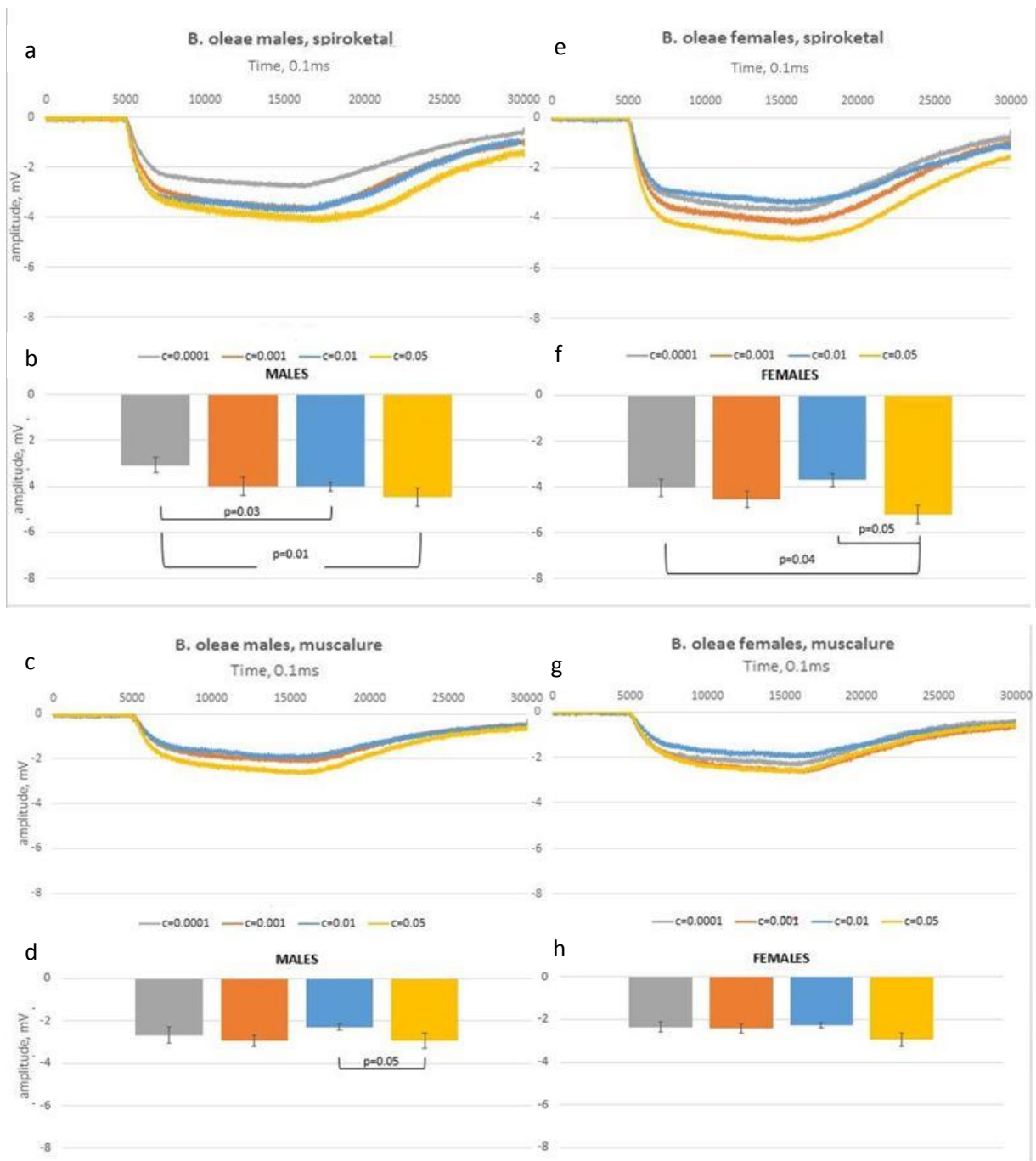
Το σχήμα της απόκρισης της *Drosophila* στις δύο φερομόνες είναι παρόμοιο, αλλά παρατηρήθηκε σημαντικά μεγαλύτερο πλάτος απόκρισης στη spiroketal σε αντίθεση με τη muscalure (διαγρ. 3.4).



Διαγρ. 3.5: μέσο πλάτος απόκρισης συζευγμένων αρσενικών και θηλυκών και παρθένων θηλυκών *Drosophila* σε 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις spiroketal (a) και muscalure (b) (0.0001, 0.001, 0.01)

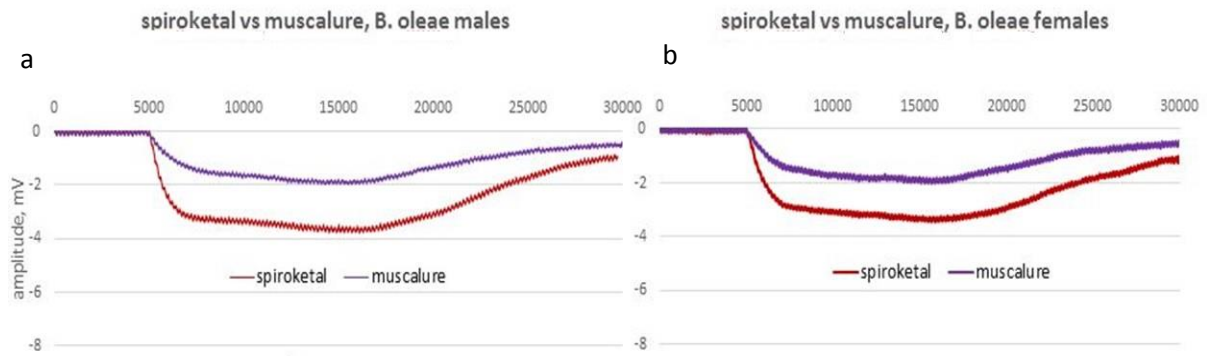
Συζευγμένα αρσενικά και θηλυκά και παρθένα θηλυκά άτομα *Drosophila*, έδειξαν μεγαλύτερη απόκριση στη spiroketal απ' ότι στη muscalure ($p < 0.05$). Τα αρσενικά έδειξαν μεγαλύτερη απόκριση σε μεγαλύτερη συγκέντρωση (0.01) spiroketal, απ' ότι σε μικρότερες (0.0001, 0.001), ενώ τα συζευγμένα θηλυκά φάνηκαν πιο ευαίσθητα σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις των 2 φερομονών ($p < 0.05$) (διαγρ. 3.5).

3.2 ΑΠΟΚΡΙΣΗ *Bactrocera oleae* ΣΕ SPIROKETAL, MUSCALURE



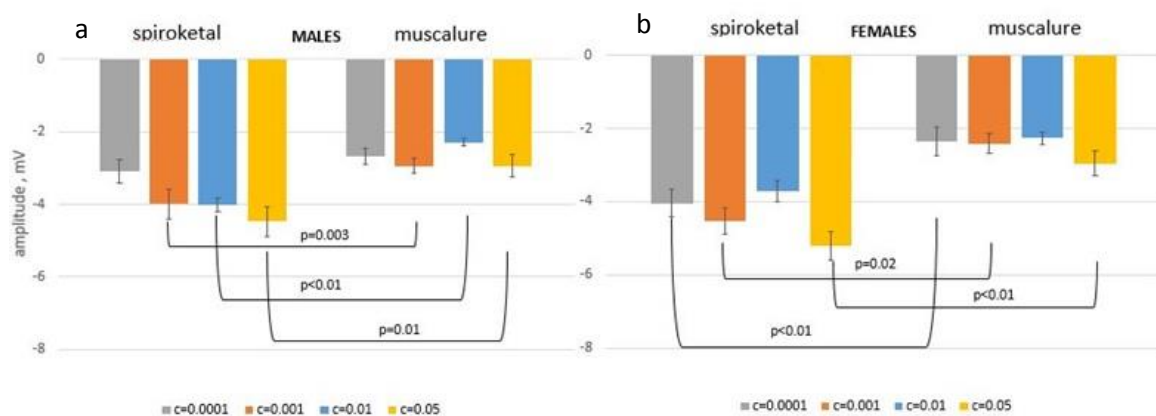
Διαγρ. 3.6: η απόκριση των αρσενικών ατόμων του δάκου στη φερομόνη spiroketal (διαγρ. a, b) και στη muscalure (διαγρ. c, d) σε 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις (0.0001, 0.001, 0.01, 0.05). Διαγρ. e, f, g, h: Αντίστοιχα για τα θηλυκά

Παρατηρήθηκε σημαντικά μεγαλύτερη απόκριση ($p \leq 0.05$) των αρσενικών ατόμων του δάκου στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις (0.01, 0.05) των δύο φερομονών. Τα θηλυκά άτομα έδειξαν στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερη απόκριση ($p \leq 0.05$) σε υψηλότερες συγκεντρώσεις της φερομόνης spiroketal, ενώ δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στην απόκρισή τους ανάμεσα στις διαφορετικές συγκεντρώσεις της φερομόνης muscalure (διαγρ. 3.6).



Διαγρ. 3.7: σύγκριση του σχήματος απόκρισης αρσενικών (a) και θηλυκών (b) ατόμων δάκου στη spiroketal και στη muscalure.

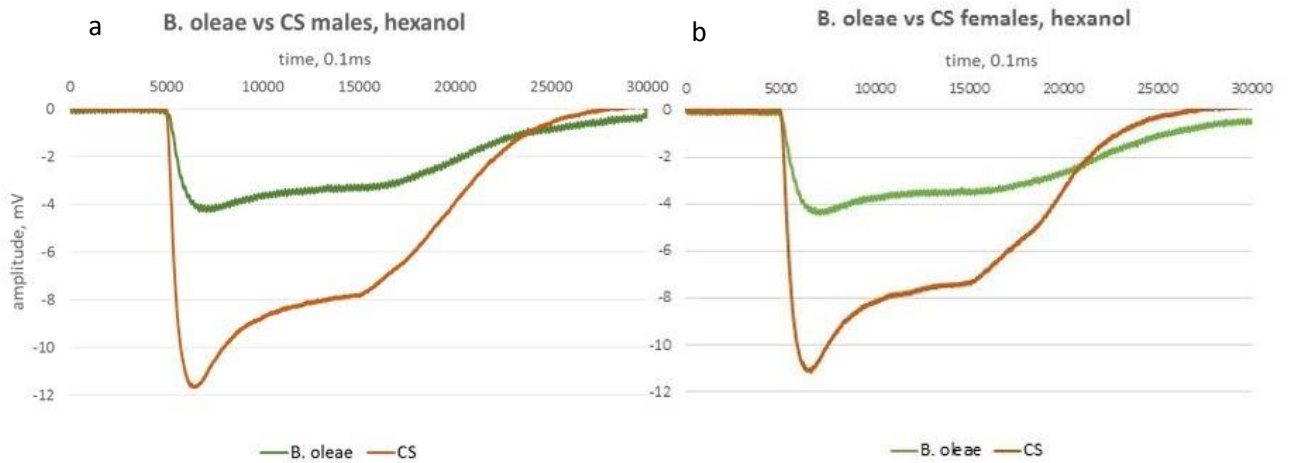
Θηλυκά και αρσενικά άτομα του δάκου παρουσίασαν παρόμοιο σχήμα απόκρισης στις δύο φερομόνες και σημαντικά μεγαλύτερη απόκριση στη spiroketal συγκριτικά με τη muscalure (διαγρ. 3.7).



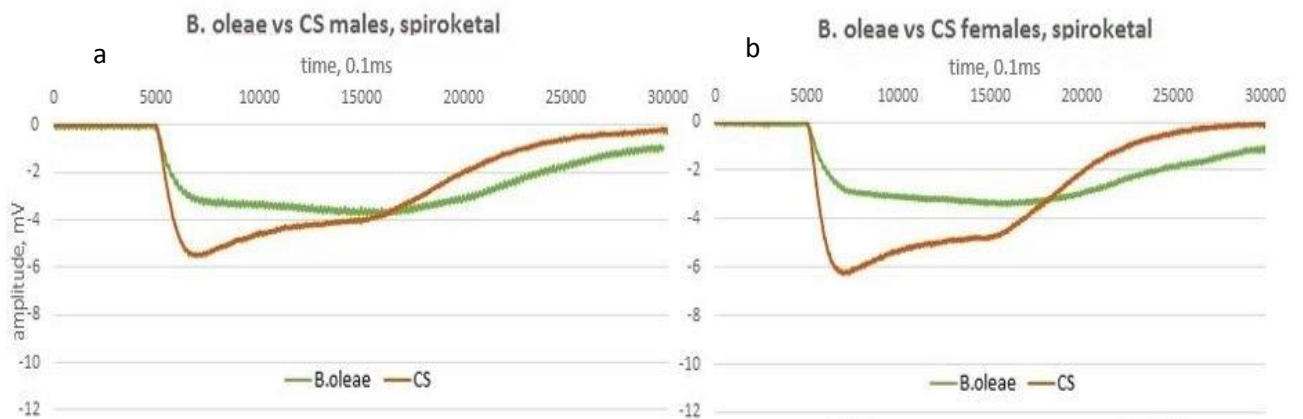
Διαγρ. 3.8: μέσο πλάτος απόκρισης αρσενικών (a) και θηλυκών (b) ατόμων δάκου στη spiroketal και στη muscalure, σε 4 διαφορετικές συγκεντρώσεις (0.0001, 0.001, 0.01, 0.05)

Τόσο στα αρσενικά (συγκεντρώσεις 0.001, 0.01, 0.05) όσο και στα θηλυκά άτομα δάκου (συγκεντρώσεις 0.0001, 0.001, 0.05), παρατηρήθηκε σημαντικά μεγαλύτερη απόκριση στη spiroketal απ' ό τι στη muscalure ($p < 0.05$) (διαγρ. 3.8).

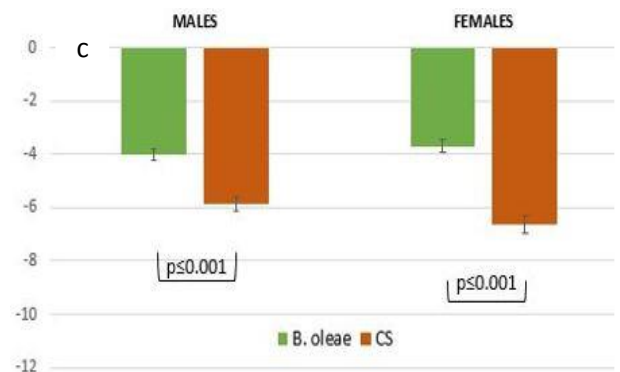
3.3 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΑΠΟΚΡΙΣΗΣ *Bactrocera oleae* ΚΑΙ *Drosophila melanogaster* ΣΕ HEXANOL, SPIROKETAL, MUSCALURE

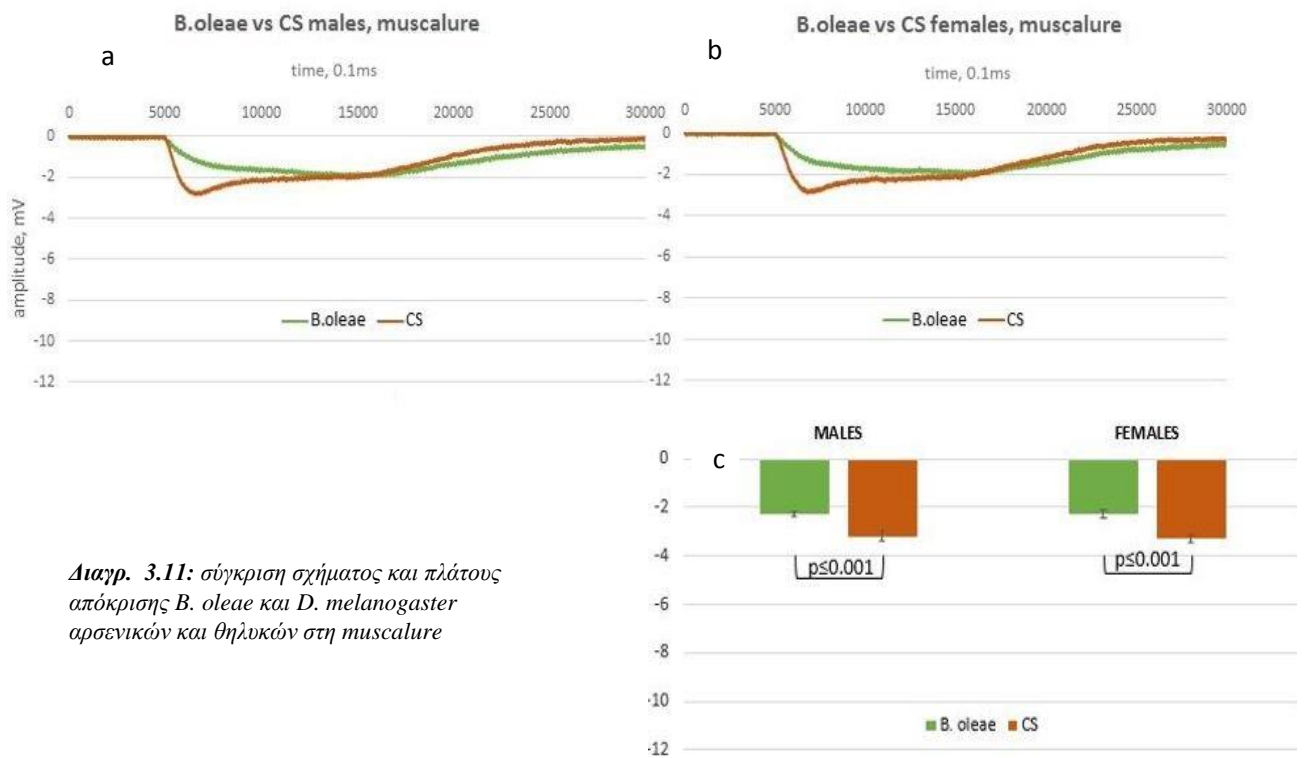


Διαγρ. 3.9: σύγκριση *B.oleae* και *D. melanogaster* αρσενικών (a) και θηλυκών (b) όσον αφορά το σχήμα της απόκρισης στην εξανόλη



Διαγρ. 3.10: σύγκριση *B. oleae* και *D. melanogaster* αρσενικών και θηλυκών (a, b), όσον αφορά το σχήμα και το πλάτος της απόκρισης (c) στο spiroketal

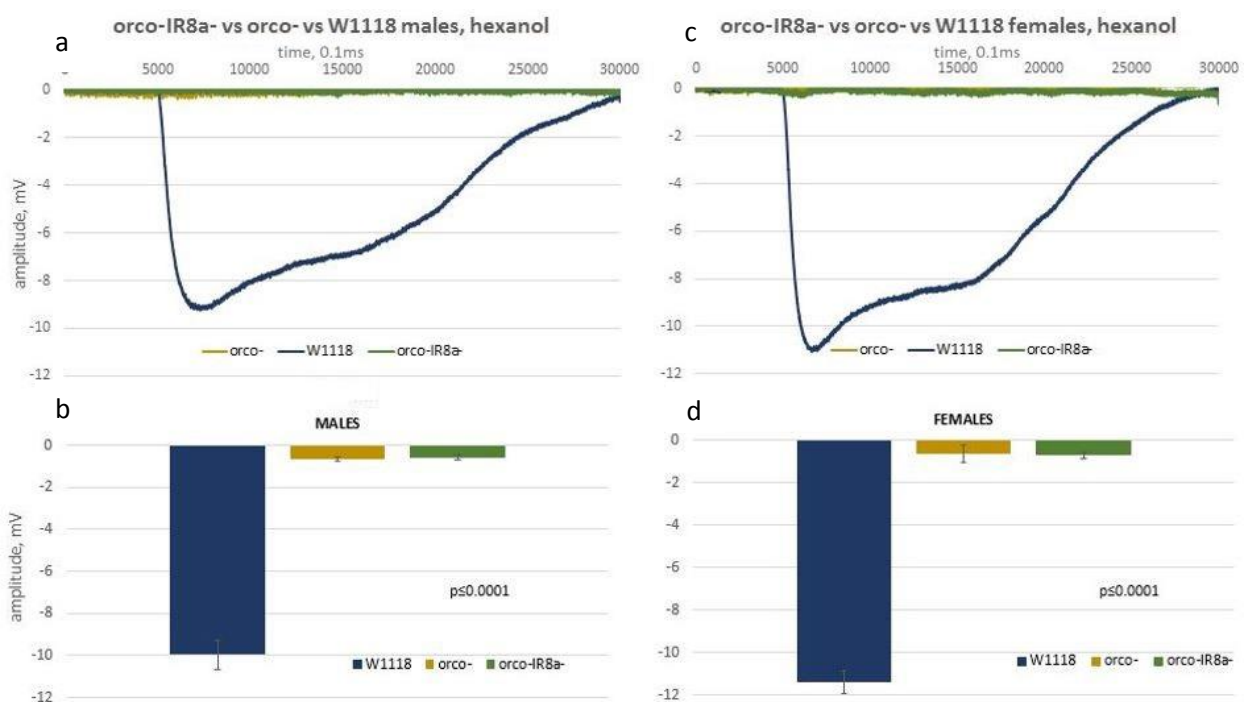




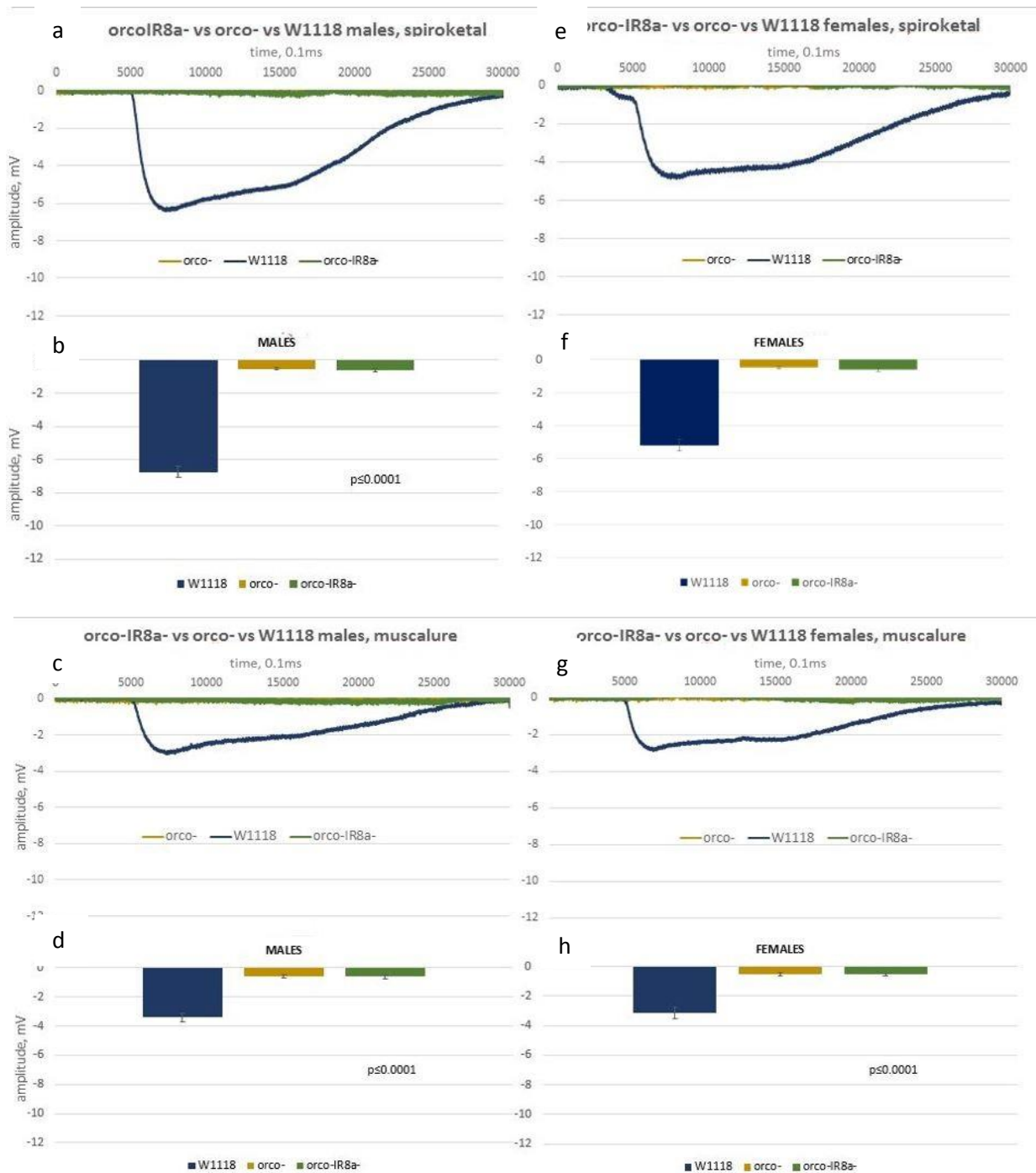
Διαγρ. 3.11: σύγκριση σχήματος και πλάτους απόκρισης *B. oleae* και *D. melanogaster* αρσενικών και θηλυκών στη muscalure

Παρατηρήθηκε διαφορετικό σχήμα απόκρισης ανάμεσα στο δάκο και τη *Drosophila* και σημαντικά μεγαλύτερη απόκριση της *Drosophila* στα 3 οσφρητικά ερεθίσματα (hexanol, spiroketal, muscalure) ($p \le 0.001$) (διαγρ. 3.9-3.11).

3.4 ΑΠΟΚΡΙΣΗ *orco*⁻ ΚΑΙ *orco-IR8a*⁻ *Drosophila melanogaster* ΣΕ HEXANOL, SPIROKETAL, MUSCALURE



Διαγρ. 3.12: Η απόκριση των *orco*⁻ και *orco-IR8a*⁻ αρσενικών (a,b) και θηλυκών (c,d) ατόμων *D. melanogaster* στην εξανόλη. Άτομα W1118 χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρας



Διαγρ. 3.13: απόκριση των *orco*- και *orco-IR8a*- ατόμων *D. melanogaster* στο *spiroketal* (a, b) και στο *muscalure* (c, d). Διαγρ. e, f, g, h: Αντίστοιχα για τα θηλυκά

Πραγματοποιήθηκαν πειράματα σε *orco*⁻ *D. melanogaster*, όπου έχει αποσιωπηθεί ο υποδοχέας *orco* και σε *orco-IR8a*⁻ *D. melanogaster*, όπου έχει αποσιωπηθεί ο υποδοχέας *orco* και επιπλέον η υποομάδα των υποδοχέων *IR8a*, χρησιμοποιώντας ως μάρτυρα το στέλεχος W1118. Μελετήθηκε η απόκρισή τους στις ίδιες οσμές (*hexanol* ως μάρτυρας, *spiroketal*, *muscalure*).

Το αποτέλεσμα έδειξε μηδενικό σήμα (flat line), σε όλες τις οσμές.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής αποτελούν σημαντικό εύρημα για την διερεύνηση των οσφρητικών υποδοχέων του δάκου της ελιάς και τον τρόπο με τον οποίο τα άτομα του συγκεκριμένου είδους αντιλαμβάνονται τις φερομόνες. Το γεγονός ότι η *Drosophila* έδειξε να αποκρίνεται στις φερομόνες του δάκου επιτρέπει τη χρησιμοποίησή της ως μοντέλο οργανισμό σε επόμενες έρευνες που θα αφορούν στο οσφρητικό σύστημα του δάκου.

Η ηλεκτροφυσιολογική απόκριση της *Drosophila* σε οσφρητικά ερεθίσματα αποτελεί ηλεκτρικό φαινόμενο, που δείχνει το μέγεθος της συνολικής δραστηριότητας των οσφρητικών νευρώνων της κεραίας του εντόμου, σε μια δεδομένη χρονική στιγμή (Schneider, 1962). Οι φερομόνες που χρησιμοποιήθηκαν αποτελούν δύο πτητικές ουσίες που ανήκουν στην ευρύτερη οικογένεια των υδρογονανθράκων (hydrocarbons) και έχει προηγουμένως βρεθεί ότι η οικογένεια αυτή προκαλεί ηλεκτροφυσιολογική απόκριση σε πλήθος δίπτερον εντόμων (Park et al., 2002), μεταξύ αυτών και η *Drosophila* (Ferveur, 1997). Εντούτοις, δεν παρέχει πληροφορίες για το αν η απόκριση αυτή μεταφράζεται σε κάποια συμπεριφορά ή εφόσον μεταφράζεται, το είδος της συμπεριφοράς αυτής (προσέλκυση/απόθεση) και για να διερευνηθεί αυτό χρειάζονται πειράματα συμπεριφοράς. Σημαντικό εύρημα αποτελεί επίσης η ευαισθησία των συζευγμένων θηλυκών σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις των 2 φερομονών (0.0001, 0.001). Η σύζευξη ενδεχομένως να επηρεάζει με κάποιο τρόπο την ηλεκτροφυσιολογική απόκριση του εντόμου στις χαμηλότερες συγκεντρώσεις της φερομόνης, καθώς δεν παρατηρήθηκε το ίδιο φαινόμενο στα παρθένα θηλυκά άτομα *Drosophila* που χρησιμοποιήθηκαν.

Από την άλλη, το πλάτος της απόκρισης (amplitude) του δάκου στις φερομόνες του είδους ήταν της τάξης των -5 mV, κάτι το οποίο συμφωνεί με προηγούμενες ηλεκτροφυσιολογικές καταγραφές που έχουν πραγματοποιηθεί στο δάκο (Der Pers, 1984; Canale et al., 2012; 2014; Malheiro et al., 2015). Το χαμηλό πλάτος απόκρισης του εντόμου δεν υποδεικνύει μειωμένη ευαισθησία, ή περιορισμένη ικανότητα του εντόμου να αντιλαμβάνεται το οσφρητικό ερέθισμα (Jacob, 2018), εξάλλου το πλάτος της απόκρισης εξαρτάται τόσο από τον αριθμό και το δυναμικό των οσφρητικών υποδοχέων που ενεργοποιούνται (Kaissling, 1986; Lucas and Renou, 1992), όσο και από τη θέση που τοποθετείται το καταγραφικό ηλεκτρόδιο πάνω στην κεραία (Bigiani et al., 1989; Crnjar et al., 1989). Οι καταγραφές που έγιναν δε στόχευαν σε συγκεκριμένους οσφρητικούς υποδοχείς, ή σε συγκεκριμένες ομάδες αυτών, διότι δε γνωρίζαμε ποιες είναι οι ομάδες εκείνες που συμβάλουν στην αντίληψη της φερομόνης από το συγκεκριμένο είδος. Στο κομμάτι αυτό θα βοηθούσε η περαιτέρω έρευνα με την τεχνική των Single Sensillum Recordings (SSR), που μπορεί να εντοπίσει νευρώνες που υπάρχουν σε μικρότερους αριθμούς στην κεραία και

χαρακτηρίζει την απόκριση από άποψη συγκεκριμένων υποδοχέων και όχι σαν τη συνολική δραστηριότητα αυτών, που προκύπτει από το ηλεκτροαντεννογράφημα (Nagai, 1983).

Όσον αφορά στη σεξουαλική φερομόνη του δάκου, χρησιμοποιήθηκε το 1,7-dioxaspiro[5.5]undecane, το συστατικό που υπάρχει σε μεγαλύτερη συγκέντρωση (Mazomenos and Pomonis 1983). Η απόκριση ενδεχομένως να ήταν υψηλότερη στο ολοκληρωμένο μίγμα των ουσιών που αποτελούν τη φερομόνη φύλου του είδους, λόγω πιθανής συνεργιστικής δράσης αυτών. Ενδιαφέρον θα ήταν, επίσης, να μελετηθεί η απόκριση του δάκου σε μίγμα των φερομονών spiroketal και muscalure και να ερευνηθεί το ενδεχόμενο να δρουν αυτές οι δύο ουσίες συνεργιστικά.

Ο δάκος φαίνεται να έχει παρόμοιο σχήμα απόκρισης στις δύο φερομόνες. Το ίδιο και η *Drosophila*. Αυτό υποδηλώνει ότι οι δύο αυτές πτητικές ουσίες ανιχνεύονται από λειτουργικά παρόμοιες ομάδες οσφρητικών υποδοχέων των δύο ειδών. Ωστόσο, συγκρίνοντας την απόκριση ανάμεσα στα δύο είδη, υπάρχει σημαντική διαφορά στο πλάτος, με τη *Drosophila* να παρουσιάζει μεγαλύτερη απόκριση όχι μόνο στην εξάνολη (μάρτυρας), πράγμα αναμενόμενο λόγω της προτίμησης του είδους στις αλκοόλες (Depetris- Chauvin et al., 2015), αλλά και στις φερομόνες του δάκου. Δεδομένου ότι το πλάτος της απόκρισης αντιπροσωπεύει τη συνολική δραστηριότητα των ενεργών οσφρητικών υποδοχέων στην κεραία τη δεδομένη στιγμή που δίνεται το ερέθισμα, υπάρχει περίπτωση το σύνολο των υποδοχέων του δάκου που ενεργοποιούνται ως απάντηση στο ερέθισμα να είναι μικρότερο, ή το άθροισμα της συνολικής τους δραστηριότητας να δίνει μικρότερο πλάτος, ή ακόμα και να συμβάλουν διαφορετικά είδη υποδοχέων στην αντίληψη της φερομόνης από τα δύο είδη. Πρόσφατες έρευνες με φυλογενετικές, μοριακές και μορφολογικές αναλύσεις έδειξαν ότι περίπου τα μισά γονίδια OR είναι συντηρημένα ανάμεσα σε είδη της οικογένειας Tephritidae και στο είδος *D. melanogaster*, ωστόσο τα OR γονίδια της *D. melanogaster* σχετίζονται περισσότερο με εστέρες και κετόνες, ενώ τα ορθόλογά τους στα είδη της οικογένειας Tephritidae με πιο πολύπλοκες ομάδες χημικών ουσιών, όπως αλκοόλες και τερπένια (Jacob et al., 2017).

Σε κάθε περίπτωση, τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι η αντίληψη των δύο φερομονών γίνεται από τους ORs, καθώς το μηδενικό σήμα που παρατηρήθηκε στα *orco*⁻ και στα *orco*⁻IR8a⁻ άτομα της *Drosophila*, όταν τους δόθηκε spiroketal και muscalure δείχνει είτε ότι δεν υπάρχει καμία απόκριση στο ερέθισμα, δηλαδή δεν ενεργοποιείται καμία άλλη ομάδα οσφρητικών υποδοχέων εκτός από τους ORs και τους IR8a αντίστοιχα, είτε ότι το σύνολο της δραστηριότητας των εναπομείνοντων υποδοχέων είναι 0. Η δημιουργία του συμπλόκου OR/*orco* για τη διέγερση του οσφρητικού νευρώνα καθιστά την ενεργοποίηση του *orco* κομβικό σημείο για την αναγνώριση των οσμών και μοριακό στόχο για την αποτροπή των αντίστοιχων οσφρητικών αποκρίσεων (Stengl and Funk, 2013). Ο καίριος ρόλος του *orco* έχει

μελετηθεί εκτενώς στη *Drosophila* (Smith, 1996; Masse et al., 2009; Galizia, 2014; Seki et al., 2017) και σε διάφορα έντομα (DeGennaro et al., 2013; Yan et al., 2018) και τα ευρήματά μας επιτρέπουν τις προτάσεις ότι εξ' επαγωγής και στο δάκο, η ανίχνευση των φερομονών γίνεται μέσω διμερικών ORs, που εμπλέκουν τη σταθερή υπομονάδα *orco* του δάκου, αλλά και να χρησιμοποιηθούν διαγονιδιακά άτομα *Drosophila* για τη διερεύνηση του ρόλου του *orco* στο δάκο, με απώτερο σκοπό την καταπολέμησή του με βιολογικές μεθόδους.

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, τα κύρια όργανα όσφρησης των διπτέρων είναι ένα ζεύγος κεραιών και ένα ζεύγος γναθικών προσακτρίδων (*maxillary palps*). Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκε η απόκριση του δάκου στις φερομόνες μέσω των οσφρητικών υποδοχέων που βρίσκονται στην κεραία. Οι οσφρητικοί υποδοχείς του εντόμου εκφράζονται με διαφορετική συχνότητα σε διάφορες περιοχές της κεραίας και της γναθικής προσακτρίδας και παρουσιάζουν διαφορετική ευαισθησία στις πτητικές ουσίες που συναντούν, ανάλογα με τη μορφολογία του οργάνου (Jacob et al., 2017). Θα ήταν λοιπόν ενδιαφέρον, να μελετηθούν και οι ομάδες οσφρητικών υποδοχέων που βρίσκονται στις γναθικές προσακτρίδες, καθώς και το πώς ανταποκρίνονται οι οσφρητικοί νευρώνες των οργάνων αυτών στις δύο αυτές πτητικές ουσίες.

Συμπερασματικά, τα ευρήματα της παρούσας διατριβής αποτελούν σημαντική προσθήκη στην προσπάθεια ταυτοποίησης των οσφρητικών υποδοχέων του δάκου της ελιάς και της κατανόησης της λειτουργίας του οσφρητικού συστήματος και της χημικής επικοινωνίας του είδους. Τα αποτελέσματά μας υποστηρίζουν τη δημιουργία διαγονιδιακών ατόμων *D. melanogaster* και τη χρήση τους ως μοντέλο οργανισμό σε επόμενες έρευνες για την αποσαφήνιση των οσφρητικών μηχανισμών του είδους *B. oleae*. Ωστόσο, κρίνεται απαραίτητη η διενέργεια πειραμάτων συμπεριφοράς για την περαιτέρω εξήγηση της απόκρισης των εντόμων στα οσφρητικά ερεθίσματα και το πώς αυτή επηρεάζει την επικοινωνία τους.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Alfonso I, Vacas S, Primo J. Role of α -copaene in the susceptibility of olive fruits to *Bactrocera oleae* (Rossi). *J Agric Food Chem*. 2014 Dec 10;62(49):11976-9. doi: 10.1021/jf504821a.
2. Aluja M, Mangan RL. Fruit fly (Diptera: Tephritidae) host status determination: critical conceptual, methodological, and regulatory considerations. *Annu Rev Entomol* 2008 Jan; 53: 473-502.
3. Amoore, J. E. Primary odor correlated with molecular shape by scanning computer, *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 1970, 21, 99. *Bactrocera oleae* (Rossi). *J Agric Food Chem* 2014 Nov; 62 (49): 11976-11979.
4. Baker, R., R. Herbert, P. E. Howse & O.T. Jones. 1980. Identification and synthesis of the major sex pheromone of the olive fly (*Dacus oleae*). *J. Chem. Soc. Chem. D Commun*. 1106: 52-53.
5. Bigiani, A., Scalera, G., Crnjar, R., Barbarossa, I. T., Magherini, P. C., and Pietra, P. (1989). Distribution and function of the antennal olfactory sensilla in *Ceratitis capitata* Wied. (Diptera, Trypetidae). *Bol. di Zool.* 56, 305–311. doi: 10.1080/11250008909355655
6. Blomquist G, Dillwith JW, Adams TS: Biosynthesis and endocrine regulation of sex pheromone production in Diptera. In *Pheromone Biochemistry* Edited by: Prestwich GD, Blomquist G. London: Academic Press; 1987:217-250.
7. Bossert, W. H., and Wilson, E. W. The analysis of olfactory communication among animals, *J. Theor. Biol.*, 1963, 5, 443-469.
8. Botsi A, Yannakopoulou K, Perly B, Hadjoudis E. Positive or adverse effects of methylation on the inclusion behavior of cyclodextrins. A comparative NMR study using pheromone constituents of the olive fly. *J Org Chem* 1995 Jun; 60 (13): 4017-4023.
9. Bueno, M. A. & Jones, O. (2002). Alternative methods for controlling the olive fly, *Bactrocera oleae*, involving semiochemicals. *IOBC wprs Bull.* 25.
10. Canale, A., Germinara, S.G., Carpita, A. et al. Behavioural and electrophysiological responses of the olive fruit fly, *Bactrocera oleae* (Rossi) (Diptera: Tephritidae), to male- and female-borne sex attractants. *Chemoecology* (2013) 23: 155.
11. Canale, A., Benelli, G., Germinara, G.S., Fusini, G., Romano, D., Rapalini, F., Desneux, N., Rotundo, G., Raspi, A., Carpita, A., 2015. Behavioural

- and electrophysiological responses to overlooked female pheromone components in the olive fruit fly, *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae). *Chemoecology* 25, 147–157.
12. Carlson, David & Langley, P.A. & Huyton, P.M.. (1978). Sex Pheromone of the Tsetse Fly: Isolation, Identification, and Synthesis of Contact Aphrodisiacs. *Science* (New York, N.Y.). 201. 750-3. 10.1126/science.675256.
 13. Chen S, Luetje CW. Identification of new agonists and antagonists of the insect odorant receptor co-receptor subunit. *PLoS One*. 2012; 7(5):e36784.
 14. Christense, Thomas A., *Methods in Insect Sensory Neuroscience*, p. 319 - 338, CRC Press, ISBN 9780849320248
 15. Clyne, P. J. et al. A novel family of divergent seven-transmembrane proteins: candidate odorant receptors in *Drosophila*. *Neuron* 22, 327–338 (1999).
 16. Crnjar R, Scalera G, Liscia A, Angioy AM, Bigiani A, Pietra P, Barbarossa IT (1989) Morphology and EAG mapping of the antennal receptors in *Dacus oleae*. *Entomol. Exp. Appl.* 51:77–85.
 17. Croset V, Rytz R, Cummins SF, et al. Ancient protostome origin of chemosensory ionotropic glutamate receptors and the evolution of insect taste and olfaction. *PLoS Genet.* 2010;6(8):e1001064.
 18. Daane KM & Johnson MW (2010) Olive fruit fly: Managing an ancient pest in modern times. *Annu Rev Entomol* 55: 151-69.
 19. De Kramer JJ, Kaissling K-E, Keil T (1984) Passive electrical properties of insect olfactory sensilla may produce the biphasic shape of spikes. *Chem. Senses.* 8:289–295.
 20. De Marzo L, Nuzzaci L, Solinas M (1978) Studio anatomico, istologico, ultrastrutturale e fisiologico del retto ed osservazioni etologiche in relazione alla possibile produzione di feromoni sessuali nel maschio di *Dacus oleae* (Gmelin). *Entomologica*, XIV:203–266
 21. DeGennaro Matthew, McBride Carolyn S., Seeholzer Laura, Nakagawa Takao, Dennis Emily J., Goldman Chloe, Jasinskiene Nijole, James Anthony A., and Vosshall Leslie B. Orco mutant mosquitoes lose strong preference for humans and are not repelled by volatile DEET. *Nature*. 2013 June 27; 498(7455): 487–491. doi:10.1038/nature12206.
 22. Der Pers, J., Haniotakis, G., & King, B. (1984). Electroantennogram responses from olfactory receptors in *Dacus oleae*. *ENTOMOLOGIA HELLENICA*, 2, 47-53. doi:http://dx.doi.org/10.12681/eh.13901
 23. Den Otter CJ, Saini RK (1985) Pheromone perception in the tsetse fly *Glossina morsitans morsitans*. *Entomol. Exp. Appl.* 39:155–161.

24. Denholm I & Rowland MW (1992) Tactics for managing pesticide resistance in arthropods: theory and practice. *Annu Rev Entomol* 37: 91- 112.
25. Depetris-Chauvin Ana, Galagovsky Diego, Grosjean Yael Chemicals and chemoreceptors: ecologically relevant signals driving behavior in *Drosophila* *Frontiers in Ecology and Evolution* Vol. 3 (2015)
URL=<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fevo.2015.00041>
DOI=10.3389/fevo.2015.00041 ISSN=2296-701X
26. Dillwith, J.W. & Blomquist, G.J. *Experientia* (1982) 38: 471.
<https://doi.org/10.1007/BF01952644>
27. Drew, R.A.I., (1989). – Chapter 1.1 Taxonomic Characters used in identifying
28. Dudareva N, Negre F, Nagegowda DA, Orlova I. Plant volatiles: recent advances and future perspectives. *Crit Rev Plant Sci* 2006; 25 (5): 417-440.
29. Economopoulos AP, Avtzis N, Zervas G, Tsitsipis J, Haniotakis G, Tsiropoulos G, Manoukas A (1977) Experiments on control of olive Xy, *Dacus oleae* (Gmelin), by combined effect of insecticides and releases of gamma-ray sterilized insects. *J Appl Entomol* 83:201–215.
30. Firestein S, How the olfactory system makes sense of scents. *Nature*. 2001 Sep 13; 413(6852): 211–218. doi: 10.1038/35093026
31. Ferveur, J.-F, Cobb, M. and Jallon, J.-M. (1989). Complex chemical messages in *Drosophila*. In *Neurobiology of Sensory Systems* (ed R Singh and N. Strausfeld). pp. 397-409. Plenum Press, London.
32. Ferveur, J.-F., Cobb, M., Oguma, Y. and Jallon, J.-M. (1994). Pheromones: the fruit fly's perfumed garden. In *The Differences Between The Sexes* (ed. R.V. Short and E. Balaban). pp. 363-378. Cambridge University Press, Cambridge, England.
33. Ferveur, Jean-François. (1997). The pheromonal role of cuticular hydrocarbons in *Drosophila melanogaster*. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*. 19. 353-8. 10.1002/bies.950190413.
34. Fletcher BS, Kapatos ET (1983) The influence of temperature, diet and olive fruits on the maturation rates of female olive flies at different times of the year, *Entomol, Exp. Appl.* 33, 244–52
35. Fletcher, M. T., Mazomenos, B. E., Georgakopoulos, J. H., Konstantopoulou, M. A., Wood, B. J., De Voss, J. J., and Kitching, W. Sex pheromone biosynthesis in the female olive fruit-fly. Double labelling from [18O₂]-dioxygen into 1,7-dioxaspiro[5.5]undecane, *Chem. Commun.*, 2002, 1302-1303.

36. Galizia, G. C., Olfactory coding in the insect brain: data and conjectures. *European Journal of Neuroscience*, Vol. 39, pp. 1784–1795, 2014
37. Haniotakis, G. E. 1974. Sexual attraction of the olive fruit fly, *Dacus oleae* (Gmelin). *Environ. Entomol.* 3: 82-86.
38. Haniotakis, G. E., B. E. Mazomenos & J. H. Tumlinson. 1977. A sex attractant of the olive fruit fly, *Dacus oleae*, and its biological activity under laboratory and field conditions. *Entomol. Exp. Appl.* 21: 81-87.
39. Hansen, K. *Insect chemoreception in Taxis and Behaviour*, ed. Hazelbaner, G. L., Chapman and Hall, London, 1978, pp. 233-292.
40. Hansson BS, Hallberg E, Löfstedt C, Steinbrecht RA (1994) Correlation between dendrite diameter and action potential amplitude in sex pheromone specific receptor neurons in male *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *Cell Tissue Res.* 26:503–512.
41. Harborne J.B., “Introduction to Ecological Biochemistry” Academic Press 1993 Third Edition
42. Hoelmer, Kim & A. Kirk, Alan & H. Pickett, Charles & Daane, Kent & Johnson, Marshall. (2011). Prospects for improving biological control of olive fruit fly, *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae), with introduced parasitoids (Hymenoptera). *Biocontrol Science and Technology.* 21. 1005-1025. 10.1080/09583157.2011.594951.
43. Hungerford, N. L., Mazomenos, B. E., Konstantopoulou, M. A., Krokos, F. D., Haniotakis, G. E., Hübener, A., Fletcher, M. T., Moore, C. J., De Voss, J. J., and Kitching, W. Biogenesis of sex pheromones in the female olive fruit-fly, *Chem. Commun.*, 1998, 863-864.
44. Ismail Mohammad Taher, Kremer Michel, Determination of the site of pheromone emission in the virgin females *Culicoides nubeculosus* Meigen (Diptera: Ceratopogonidae), *Journal of Insect Physiology*, Volume 29, Issue 3, 1983, Pages 221-224, [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(83\)90088-4](https://doi.org/10.1016/0022-1910(83)90088-4).
45. Jacob, Vincent & Scolari, Francesca & Delatte, Helene & Gasperi, Giuliano & Jacquin-Joly, Emmanuelle & Malacrida, Anna & Duyck, Pierre-François. (2017). Current source density mapping of antennal sensory selectivity reveals conserved olfactory systems between tephritids and *Drosophila*. *Scientific Reports.* 7. 10.1038/s41598-017-15431-4.
46. Jacob VEJM (2018) Current Source Density Analysis of Electroantennogram Recordings: A Tool for Mapping the Olfactory Response in an Insect Antenna. *Front. Cell. Neurosci.* 12:287. doi: 10.3389/fncel.2018.00287

47. Jallon, J.(1984).A few chemical word sex changed by *Drosophila* during courtship and mating. *Behav.Genet.* 14,441–476.doi:10.1007/BF01065444
48. Jones PL, Pask GM, Rinker DC, Zwiebel LJ. Functional agonism of insect odorant receptor ion channels. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011;108(21):8821e8825.
49. Jones PL, Pask GM, Romaine IM, et al. Allosteric antagonism of insect odorant receptor ion channels. *PLoS One.* 2012; 7(1):e30304.
50. Kaissling, K. E. (1986). Chemo-electrical transduction in insect olfactory receptors. *Annu. Rev. Neurosci.* 9, 121–145. doi: 10.1146/annurev.ne.09.030186.001005
51. Kaissling, K. E. Insect olfaction, in handbook of Sensory Physiology, ed. Beidler, L. M., Springer- Verlag, Berlin, Heidelberg, and N. Y., 1971, 4, pp. 351-431.
52. Kaissling, K. E. R. H. Wright Lectures on insect olfaction. Simon Fraser University, Burnaby, B. C. Canada, 1987.
53. Kaissling, K. E., and Thorson, J. Insect olfactory sensilla. Structural, chemical and electrical aspects of the functional organization, in *Receptors for Neurotransmitters, Hormones and Pheromones in Insects*, eds Sattelle, D. F., Hall, L. M., and Hildebrand, J. G., Elsevier/North-Holland, Amsterdam, 1980, pp. 261- 282.
54. Kakani EG, Ioannides IM, Margaritopoulos JT, Seraphides NA, Skouras PJ, Tsitsipis JA, Mathiopoulos KD (2008) A small deletion in the olive Xy acetylcholinesterase gene associated with high levels of organophosphate resistance. *Insect Biochem Mol Biol* 38:781–787
55. Karlson, P.; Luscher, M. (1959) ‘Pheromones’ A new term for a class of biologically active substances. *Nature* 183, 55-56.
56. Katsoyannos P (1992) Olive pests and their control in the Near East. *FAO Plant Production and Protection Paper No 115.*
57. Kelling FJ (2001) Olfaction in houseflies: morphology and electrophysiology, Ph.D. thesis, University of Groningen, the Netherlands.
58. Klopffing, H. L. Olfactory theories and the odours of small molecules, *J. Agr. Food Chem.*, 1971, 19, 999.
59. Krupp JJ, Levine JD. Dissection of oenocytes from adult *Drosophila melanogaster*. *J Vis Exp.* 2010;(41):2242. Published 2010 Jul 18. doi:10.3791/2242
60. Langley, P.A. & Carlson, David. (1983). Biosynthesis of contact sex pheromone in the female tsetse fly, *Glossina morsitans morsitans* Westwood. *Journal of Insect Physiology.* 29. 825-831. 10.1016/0022-1910(83)90148-8.
61. Law J.H., And Regnier F.E. “Pheromones.” (1971). *Ann. Rev. Biochem.* 40 : 533-548.

62. Liscia, Anna & Angioni, Piera & Sacchetti, Patrizia & Poddighe, Simone & Granchiotti, Aurelio & Setzu, Maria & Belcari, Antonio. (2013). Characterization of olfactory sensilla of the olive fly: Behavioral and electrophysiological responses to volatile organic compounds from the host plant and bacterial filtrate. *Journal of insect physiology*. 59. 10.1016/j.jinsphys.2013.04.008.
63. Lucas, P., and Renou, M. (1992). Electrophysiological study of the effects of deltamethrin, bioresmethrin, and DDT on the activity of pheromone receptor neurones in two moth species. *Pestic. Biochem. Physiol.* 43, 103–115. doi: 10.1016/0048-3575(92)90024-T
64. Malheiro, R., Antonio Ortizc, Susana Casal, Paula Baptista, José Alberto Pereira. Electrophysiological response of *Bactrocera oleae* (Rossi) (Diptera:Tephritidae) adults to olive leaves essential oils from different cultivars and olive tree volatiles. *Industrial Crops and Products* 77 (2015) 81–88.
65. Masse Nicolas Y., Turner Glenn C., and Jefferis Gregory S.X.E. Olfactory Information Processing in *Drosophila* (Review). *Current Biology* 19, R700–R713, 2009
66. Mazomenos, B. E., and Pomonis, J. G. Male olive fruit fly pheromone: Isolation, identification and lab. bioassays, in *Fruit Flies of Economic Importance*, ed. Cavalloro, R., Proc. of the CEC/IOBC International Symposium, Athens, Greece, 1983, pp. 96-103.
67. Mohammad Athar, (2005). Infestation of Olive Fruit Fly, *Bactrocera oleae*, in California and Taxonomy of its Host Trees *Agric. conspec. sci.* Vol. 70 (2005) No. 4.
68. Moncrieff, R. W. The gypsy moth may provide the perfumer with a new fixative, *Mfg. Chem.*, 1951, 16, 167.
69. Muik B, Lendl B, Molina-Diaz A, Avora-Canãda MJ (2003) Fourier transform Raman spectrometry for the quantitative analysis of oil content and humidity in olives. *Appl Spectrosc* Feb 57: 223-227.
70. Munger, SD, Zuffal F, *Chemosensory Transduction*, p. 31-37, 102-110, 2016 Elsevier Inc.
71. Nagai, T. On the Relationship Between the Electroantennogram and Simultaneously Recorded Single Sensillum Response of the European Corn Borer, *Ostrinia nubilalis*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 85-91 (1983).
72. Nardi F, Carapelli A, Dallai R, Roderick GK, Frati F (2005) Population structure and colonization history of the olive fly, *Bactrocera oleae* (Diptera, Tephritidae). *Mol Ecol* 14:2729–2738

73. Neuenschwander P & Michelakis S (1978) Infestation of *Dacus oleae* (Gmel.) (Diptera, Tephritidae) at harvest time and its influence on yield and quality of olive oil in Crete. *J Appl Entomol* 86: 420-33.
74. Neuhaus EM, Gisselmann G, Zhang W, Dooley R, Störtkuhl K, Hatt H. Odorant receptor heterodimerization in the olfactory system of *Drosophila melanogaster*. *Nat Neurosci.* 2005;8(1):15e17.
75. Kye Chung Park, Samuel A. Ochieng, Junwei Zhu, Thomas C. Baker. Odor discrimination using insect electroantennogram responses from an insect antennal array. *Chem Senses.* 2002 May; 27(4): 343–352
76. Pask GM, Bobkov YV, Corey EA, Ache BW, Zwiebel LJ. Blockade of insect odorant receptor currents by amiloride derivatives. *Chem Senses.* 2013
77. Penalva-Arana DC, Lynch M, Robertson HM. The chemoreceptor genes of the waterflea *Daphnia pulex*: many Grs but no Ors. *BMC Evol Biol.* 2009;9(79):79.
78. Pennanec'h M, Ferveur J-F, Pho DB, Jallon J-M: Insect fatty acid related pheromones: a review of their biosynthesis, hormonal regulation and genetic control. *Ann Soc Ent Fr* 1991, 27:245-263.
79. Rice RE (2000) Bionomics of the olive fruit fly *Bactrocera (Dacus) oleae*. *UC Plant Protection Quarterly* 10: 1-5.
80. Scarpati M.L., Lo Scalzo R., Vita G. “*Olea europea* volatiles attractive and repellent to the olive fruit fly (*Dacus oleae* Gmelin)” *J. Chem. Ecol* 1993 19:881- 891
81. Scarpati ML, Scalzo R, Vita G, Gambacorta A. Chemiotropic behavior of female olive fly (*Bactrocera oleae* Gmel.) on *Olea europaea* L.. *J Chem Ecol* 1996 May; 22 (5): 1027-1036.
82. Schneider D. “Electrophysiological investigation on the olfactory specificity of sexual attracting substances in different species of moths” *J. Insect Physiol.* 1962 8 : 15-30.
83. Schneider D. “Electrophysiologische Untersuchungen von Chemo- und Mechanorezeptoren der Antenne des Seidenspinners *Bombyx mori*” *L.Z. Vergl. Physiol.* 1957 40: 8-41.
84. Schneider, D. *Insect Antennae*, *Annu. Rev. Ent.*, 1964, 9, 103-122.
85. Schneider, D., and Kaissling, K. E. Der bau der Antenne des Seidenspinners *Bombyx mori* L. Sensillen, Cuticulate, Bildungen und innerer Bau, *Zool. Jahrb. Abt. Anat. Ontog. Tiere*, 1957, 76, 223- 250.
86. Schultz CA, Boush GM (1971) Suspected sex pheromone glands in three economically important species of *Dacus*. *J Econ Entomol* 64:347–349

87. Seki, Yoichi, Dweck Hany K. M., Rybak Jürgen, Wicher Dieter, Sachse Silke and Hansson Bill S. Olfactory coding from the periphery to higher brain centers in the *Drosophila* brain. *BMC Biology* (2017) 15:56
88. Seris E. Estudio de trampas y atrayentes para la mejora de la selectividad del trapeo masivo de *Bactrocera oleae* (Rossi) (Diptera: Tephritidae). Madrid: Universidad Politécnica de Madrid; 2011
89. Shepherd G.M. "Neurobiology" Oxford University Press Inc. 1988
90. Shorey H.H. (1977) "Interaction of insects with their chemical environment" p. 1-5 In H.H.Shorey and J.J.McKelvey Jr (eds.) "Chemical control of insect behaviour" Wiley, New York.
91. Skouras, P. J., Margaritopoulos, J. T., Seraphides, N. A., Ioannides, I. M., Kakani, E. G., Mathiopoulos, K. D., Tsitsipis, J. A. (2007). Organophosphate resistance in olive fruit fly, *Bactrocera oleae*, populations in Greece and Cyprus. *Pest manag. Sci.* 63: 42-48.
92. Smith, D. P., Olfactory mechanisms in *Drosophila melanogaster*. *Current Opinion in Neurobiology* 1996, 6:500-505
93. Smith, H.T., (2001). FruitFly Cooperative Control Program: Final Environmental Impact Statement, United States Department of Agriculture (USDA) (2001).
94. Sondheimer E. & Simeone J.B., "Chemical Ecology", Ed. Academic Press 1972
95. Stadler, E. Chemoreception in Arthropods: sensory physiology and ecological chemistry, in *Animals and Environmental Fitness*, ed. Gilles, R., Pergamon Press, london, 1980, pp. 233-241.
96. Steinbrecht, R. A., and Muller, B. Fine structure of the antennal receptors of the bedbug, *Cimex lectularius*, L. *Tiss. Cell*, 1976, 8, 615-636.
97. Steinbrecht, R. A., and Muller, B. On the stimulus conducting structures in insect olfactory receptors, *Z. Zeellforsch*, 1971, 117, 570-575.
Tephritidae. pp 3-7 In A.S. Robinson and G.H.S. Hooper "Fruit Flies, their biology, Natural Enemies and Control", Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
98. Stengl, M. and Funk, N. W. The role of the coreceptor Orco in insect olfactory transduction. *J Comp Physiol A* (2013) 199:897–909. DOI 10.1007/s00359-013-0837-3
99. Tillman JA, Seybold Steven J., Jurenka Russell A., Blomquist Gary J. Insect pheromones—an overview of biosynthesis and endocrine regulation. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 29 (1999) 481–514
100. Tsitsipis JA (1980) Effect of constant temperatures on larval and pupal development of olive fruit flies reared on artificial diet. *Environ Entomol* 9: 764-68.

101. Tzanakakis, M. E. (2006). Insects and mites feeding on olive. Brill Academic Publishers, Boston, MA.
102. Wicker-Thomas C, Guenachi I, Keita YF. Contribution of oenocytes and pheromones to courtship behaviour in *Drosophila*. *BMC Biochem.* 2009;10:21. Published 2009 Aug 11. doi:10.1186/1471-2091-10-21
103. Vermeulen A, Rospars JP (2001) Electrical circuitry of an insect olfactory sensillum. *Neurocomputing* 38–40:1011–1017.
104. Vontas, J. G., Cosmidis, N., Loukas, M., Tsakas, S., Hejazi, M. J., Ayoutanti, A., Hemingway, J. (2001). Altered acetylcholinesterase confers organophosphate resistance in *Bactrocera oleae*. *Pestic biochemical physiology.* 71: 124-132.
105. Vontas, J. G., Hejazi, M. J., Hawkes, N. J., Cosmidis, N., Loukas, M., Hemingway, J. (2002). Resistance- associated point mutations of acetylcholinesterase, in the olive fruit fly *Bactrocera oleae*. *Insect molecular biology.* 11: 329-336.
106. Vosshall, L. B., Amrein, H., Morozov, P. S., Rzhetsky, A. & Axel, R. A spatial map of olfactory receptor expression in the *Drosophila* antenna. *Cell* 96, 725–736 (1999).
107. Vosshall, L. B., Wong, A. M. & Axel, R. An olfactory sensory map in the fly brain. *Cell* 102, 147–159 (2000).
108. Wicker, C., Jallon, J.M. (1995). Influence of ovary and ecdysteroids on pheromone biosynthesis in *Drosophila melanogaster*, Diptera: Drosophilidae. *Europ. J. Ent.* 92(1): 197—202.
109. White I.M. and M. Elson-Harris. (1992). Fruit flies of economic significance: their identification and bionomics. Ed. C.A.B. International, U.K.
110. Yan, Hua & Opachaloemphan, Comzit & Mancini, Giacomo & Yang, Huan & Gallitto, Matthew & Mlejnek, Jakub & Leibholz, Alexandra & Haight, Kevin & Ghaninia, Majid & Huo, Lucy & Perry, Michael & Slone, Jesse & Zhou, Xiaofan & Traficante, Maria & Penick, Clint & Dolezal, Kelly & Gokhale, Kaustubh & Stevens, Kelsey & Fetter-Pruneda, Ingrid & Desplan, Claude. (2017). An Engineered orco Mutation Produces Aberrant Social Behavior and Defective Neural Development in Ants. *Cell.* 170. 736-747.e9. 10.1016/j.cell.2017.06.051.
111. Ζιώγας, Ν. Β., (1996). «Ο δάκος της ελιάς». Σελ. 25-26, 44-45, 48-52, 89-97.
112. Κωβαίος, Δ. Σ., Μπρούφας, Γ. Δ., και Γεωργαντζή, Δ., (2001). Ταχύς εγκλιματισμός στο κρύο του δάκου της ελιάς *Bactrocera oleae* (Rossi), σε συνθήκες εργαστηρίου και υπαίθρου. Πρακτικά 9ου Πανελληνίου Εντομολογικού Συνεδρίου, Ιωάννινα, 13-16 Νοεμβρίου. σελ. 34-42.

113. Μπούμας, Θ. και Κατσόγιαννος, Π., (2009). Εχθροί της ελιάς. Γεωργία – Κτηνοτροφία 6: 102-126.
114. Νεοκοσμίδη, Α 2004. Ανάπτυξη Ανοσοαναλυτικού Προσδιορισμού της Φερομόνης του Δάκου της Ελιάς με τη Χρήση Σειράς Πολυκλωνικών Αντισωμάτων, Διδακτορική διατριβή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών.
115. Σταυράκης, Ν 2000. Μελέτη των Πτητικών Δευτερογενών Μεταβολιτών στις Ποικιλίες Ελιάς, Διδακτορική διατριβή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης.
116. Τζανακάκης, Μ.Ε. & Κατσόγιαννος, Β.Ι. (2003). Έντομα Καρποφόρων Δέντρων και Αμπέλου. Εκδόσεις Αγρότυπος. Θεσσαλονίκη, σελ. 265.