



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ  
ΕΡΓΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ  
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ  
ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ

Μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία

Μοριακή και φυσιολογική επίδραση του BPA και του RH-5992 σε κανονικές συνθήκες φωτοπεριόδου και σε συνθήκες διάπαυσης, του εντόμου *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera:Noctuidae)

Ιωάννης Σ. Ζάκας

Επιβλέπων Καθηγητής:  
Χατζόπουλος Πολυδεύκης, Καθηγητής ΓΠΑ

ΑΘΗΝΑ 2023

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ  
ΕΡΓΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**Μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία**

Μοριακή και φυσιολογική επίδραση του BPA και του RH-5992  
σε κανονικές συνθήκες φωτοπεριόδου και σε συνθήκες διάπαυσης,  
του εντόμου *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera:Noctuidae)

Molecular and physiological impact of BPA and RH-5992 under LD photoperiod  
and deep diapause in *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae)

**Ιωάννης Σ. Ζάκασι**

Εξεταστική Επιτροπή:

Χατζόπουλος Πολυδεύκης, Καθηγητής ΓΠΑ (επιβλέπων)

Κούρτη Άννα, Καθηγήτρια ΓΠΑ

Μηλιώνη Δήμητρα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια ΓΠΑ

## **Μοριακή και φυσιολογική επίδραση του BPA και του RH-5992 σε κανονικές συνθήκες φωτοπεριόδου και σε συνθήκες διάπαυσης, του εντόμου *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae)**

ΠΜΣ Βιολογία Συστημάτων  
Τμήμα Βιοτεχνολογίας  
Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας

### **ΠΕΡΙΛΗΨΗ**

Στην παρούσα μελέτη ερευνήσαμε την επίδραση της δισφαινόλης Α (BPA) και του RH-5992, στις αναπτυξιακές και αναπαραγωγικές διεργασίες του εντόμου *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae) υπό φωτοπεριόδους LD (16L:8D) και SD (10L:14D, διάπαυση). Ένας αριθμός μορφολογικών και μοριακών παραγόντων εξετάστηκαν προκειμένου να προσδιοριστεί η τοξική και ενδοκρινική δράση αυτών των δύο χημικών ενώσεων.

Παρατηρήσαμε ότι το BPA, το RH-5992 και ο συνδυασμός του BPA / RH-5992 προκάλεσαν καθυστέρηση στην ανάπτυξη, με παράταση της μεταβατικής περιόδου μεταξύ προνυμφών και νυμφών. Οι χειρισμοί αυτοί μείωσαν επίσης την εμφάνιση των ενηλίκων ατόμων και προκάλεσαν δυσμορφίες στην ανάπτυξη και την μεταμόρφωση τους.

Στο μοντέλο μας το BPA εμφανίζει δραστηρότητες εκστεροειδούς, με τρόπο παρόμοιο με εκείνο του αγωνιστή εκδυσόνης RH-5992. Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η έκθεση σε σχετικές συγκεντρώσεις BPA στο περιβάλλον, κατά τα πρώτα στάδια του κύκλου ζωής της *Sesamia nonagrioides*, μπορεί να οδηγήσει σε διάφορες διαταραχές που μπορεί να είναι συνέπεια ενδοκρινικής διαταραχής.

Επιπροσθέτως, αναλύσεις RT-PCR χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό των επιδράσεων του BPA στη μεταγραφική ρύθμιση των γονιδίων Heat Shock Proteins SnoHsp20.8, SnoHsc70 και SnoHsp83, σε συνθήκες SD (10L:14D, διάπαυση).

Στην διάπαυση, τα επίπεδα έκφρασης των SnoHsp20.8 και SnoHsp83 δεν επηρεάζονται από το BPA, ενώ τα επίπεδα SnoHsc70 μειώθηκαν. Παρατηρήθηκε μια διαφορετική επίδραση του BPA σε κανονικές συνθήκες φωτοπεριόδου και σε συνθήκες διάπαυσης. Από τις κυτταρικές και μοριακές δοκιμές, τα αποτελέσματά μας έφεραν αποδείξεις ότι το BPA, όπως και το RH-5992, παρεμβαίνει στα εκδιστεροειδή μονοπάτια των εντόμων του είδους λεπιδόπτερα.

**Επστημονική περιοχή:** Μοριακή Βιολογία και Φυσιολογία Εντόμων

**Λέξεις κλειδιά:** Δισφαινόλη Α (BPA), RH-5992, Υποδοχέας Εκδυσόνης, Ultraspiracle γονίδιο (USP), Ενδοκρινική διαταραχή, *Sesamia nonagrioides*, Διάπαυση, Αναλογία φύλου

**Molecular and physiological impact of BPA and RH-5992 under LD photoperiod and deep diapause in *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae)**

*MSc Systems Biology  
Department of Biotechnology  
Laboratory of Molecular Biology*

**ABSTRACT**

In this study, we examined the physiological impact of bisphenol A (BPA) and RH- 5992 (tebufenozide) on the developmental and reproductive processes of *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae) under 16L:8D (long day, LD) and 10L:14D (short day, SD) photoperiods. A number of morphological and molecular factors were examined in order to identify the toxic and the endocrine-relative action of these two chemicals.

We observed that BPA, RH-5992 and the combination of BPA/RH-5992 caused a developmental delay by extending the transition period between larval and pupal instars. These chemicals also reduced adult emergence and caused molting malformations during development and metamorphosis. In the corn stalk borer, BPA exhibits ecdysteroid activities in a fashion similar to that of the ecdysone agonist RH-5992.

Additionally, semi-quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) analyses were used to identify the effects of BPA in the transcriptional regulation of heat shock protein genes SnoHsp20.8, SnoHsc70, and SnoHsp83 during SD conditions.

During diapause conditions, the expression levels of SnoHsp20.8 and SnoHsp83 were not affected by BPA, while SnoHsc70 mRNA levels were decreased. Here, we observed a differential impact of BPA during non-diapausing and diapausing conditions. These results suggest that exposure to environmentally relevant concentrations of BPA during the early stages of the corn borer's life cycle can result in various disorders that may be a consequence of endocrine disruption.

**Thesis' scientific area:** Molecular Biology and Physiology.

**Keywords:** Bisphenol A, RH-5992, Ecdysone receptor, Ultraspiracle gene, Sex ratio, Endocrine disruption, *Sesamia nonagrioides*, Diapause

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο της Μοριακής Βιολογίας του Τμήματος Βιοτεχνολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, στα πλαίσια της διπλωματικής μου εργασίας στο ΠΜΣ «ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ» και αποτέλεσε για μένα τη βάση για την ορθότερη προσέγγιση θεμάτων μοριακής βιολογίας και βιολογίας συστημάτων, που αποτελούν αντικείμενο του αναφερόμενου Τμήματος.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω, τον επιβλέπων της μεταπτυχιακής αυτής μελέτης κύριο Χατζόπουλο Πολυδεύκη, Καθηγητή του Τμήματος Βιοτεχνολογίας της Σχολής Εφαρμοσμένης Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, για την ανάθεση και επίβλεψη της εργασίας αυτής και την καθοδήγησή του κατά τη διάρκεια των μεταπτυχιακών σπουδών μου.

Ευχαριστώ θερμά για την πολύτιμη βοήθεια τον διευθυντή του ΠΜΣ «Βιολογία Συστημάτων» κύριο Χατζόπουλο Πολυδεύκη, για το προσωπικό ενδιαφέρον που επέδειξε κατά τη διάρκεια της μεταπτυχιακής μου διατριβής και για τη διεξαγωγή και ολοκλήρωση της μελέτης αυτής. Τον ευχαριστώ ιδιαίτερα για την υπομονή και την βοήθεια που μου παρείχε κατά την διάρκεια των μεταπτυχιακών μου σπουδών.

Δεν θα μπορούσα να παραβλέψω να ευχαριστήσω και την Δρ. Κούρτη Άννα καθώς και τον Δρ. Δημήτριο Κοντογιαννάτο για την πολύτιμη βοήθεια μου που παρείχαν όλα αυτά τα χρόνια, για τις όμορφες στιγμές που μου χάρισαν απλόχερα, καθώς και για τις γνώσεις που απέκτησα δουλεύοντας δίπλα τους.

Τέλος, ευχαριστώ την καθηγήτρια του εργαστηρίου της μοριακής βιολογίας Δρ. Μηλιώνη Δήμητρα, καθώς και όλο το προσωπικό του εργαστηρίου για την διάθεση των χώρων και του εργαστηριακού εξοπλισμού κατά τον απαραίτητο χρόνο της μεταπτυχιακής μου εργασίας, καθώς και την ανθρώπινη και επιστημονική αντιμετώπιση με την οποία με περιέβαλαν.

Κλείνοντας, ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στην οικογένειά μου που είναι πάντα δίπλα μου και με στηρίζουν σε ό,τι και αν κάνω στην ζωή μου.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b> .....	<b>1</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>2</b>
<b>ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ</b> .....	<b>3</b>
<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....	<b>6</b>
1.1 Η Ανάπτυξη των εντόμων.....	6
1.1.1 Δομή του ωοκυττάρου.....	6
1.1.2 Εμβρυογένεση.....	8
1.1.3 Μορφογένεση.....	10
1.1.4 Μεταμόρφωση.....	13
1.1.5 Ενήλικη φάση.....	15
1.2 Το ενδοκρινικό σύστημα των εντόμων.....	19
1.2.1 Οι ορμόνες των εντόμων.....	21
1.2.2 Ορμονική ρύθμιση της έκδυσης και της μεταμόρφωσης.....	27
1.3 Το αναπαραγωγικό σύστημα των εντόμων.....	31
1.3.1 Το θηλυκό αναπαραγωγικό σύστημα.....	31
1.3.2 Το αρσενικό αναπαραγωγικό σύστημα.....	32
1.3.3 Η σύζευξη των εντόμων.....	33
1.3.4 Έλεγχος της αναπαραγωγής.....	34
1.4 Ξενοοιστρογόνα και ενδοκρινικοί διαταρακτές.....	35
1.4.1 Δισφαινόλη Α (Bisphenol -A).....	37
1.4.2 Επίδραση της Δισφαινόλης Α στους οργανισμούς των οικοσυστημάτων.....	39
1.4.3 RH-5992 (Τεβουφenoζίδη).....	41
1.5 Η διάπαυση των εντόμων.....	41
1.5.1 Τύποι διάπαυσης.....	44
1.5.2 Ρύθμιση της διάπαυσης.....	45
1.5.3 Έκφραση γονιδίων αποκλειστικά κατά την διάπαυση.....	46
1.5.4 Ενδοκρινική ρύθμιση της διάπαυσης.....	48
1.5.5 Μηχανισμοί της διάπαυσης.....	51
1.6 Πρωτεΐνες καταπόνησης.....	51
1.6.1 Οικογένειες θερμοεπαγόμενων πρωτεϊνών και ο ρόλος τους στον οργανισμό των εντόμων.....	54
1.7 Η εστεράση της ορμόνης νεότητας (juvenile hormone esterase, JHE).....	55
1.8 Ταξινόμηση του εντόμου <i>Sesamia nonagrioides</i> .....	57
1.9 Σκοπός της παρούσας εργασίας.....	58

<b>2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ .....</b>	<b>60</b>
2.1 Τα έντομα και ο χειρισμός τους.....	60
2.2 ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ.....	60
2.2.1 Απομόνωση ολικού RNA από ιστό εντόμου .....	60
2.2.2 DNase Treatment .....	61
2.2.3 Phenol / Chloroform treatment .....	62
2.2.4 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης εκχυλισμάτων DNA/RNA.....	63
2.2.5 Παρασκευή cDNA από ολικό RNA με την μέθοδο της ανάστροφης μεταγραφής ..	64
2.2.6 Παρασκευή dNTPs mix.....	65
2.2.7 Σχεδιασμός εκκινητών .....	65
2.2.8 Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) .....	65
2.2.9 Παρασκευή διαλυμάτων ηλεκτροφόρησης .....	67
2.2.10 Ηλεκτροφόρηση DNA/RNA σε πηκτή αγαρόζης .....	68
2.2.11 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με μήτρα RNA (RT-PCR) .....	70
2.2.12 Ενίσχυση και ποσοτικός προσδιορισμός ακολουθιών cDNA .....	71
2.2.13 Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων .....	71
2.3 Χειρισμός εντόμων με δισφαινόλη και RH-5992.....	72
2.3.1 Δισφαινόλη στην τροφή.....	72
2.3.2 Δισφαινόλη και RH-5992 στην τροφή.....	72
2.3.3 Ενέσιμη δισφαινόλη.....	73
2.4 Στατιστική ανάλυση .....	73
<b>3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....</b>	<b>74</b>
3.1 Επίδραση της δισφαινόλης και του RH-5992 στην φυσιολογία των εντόμων.....	74
3.1.1 Επιβίωση και σωματική ανάπτυξη.....	74
3.1.2 Μέσος χρόνος μετάβασης από προνύμφη σε νύμφη .....	77
3.1.3 Μέσος χρόνος μετάβασης από νύμφη σε ακμαίο και η επι τοις % επιτυχή μετάβαση σε ακμαίο.....	78
3.1.4 Επίδραση στην μορφολογία των αναπτυξιακών σταδίων των προνυμφών .....	81
3.1.5 Επίδραση στην αναλογία του φύλου των εντόμων.....	82
3.2 Μοριακή επίδραση της δισφαινόλης.....	83
3.2.1 Επίδραση στις Hcr70, Hsr83 και Hsr20.8 στην διάπαυση.....	84
3.2.2 Επίδραση στον ECR και USP .....	85
<b>4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</b>	<b>87</b>
<b>5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>93</b>

# 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 σώματιο. 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.

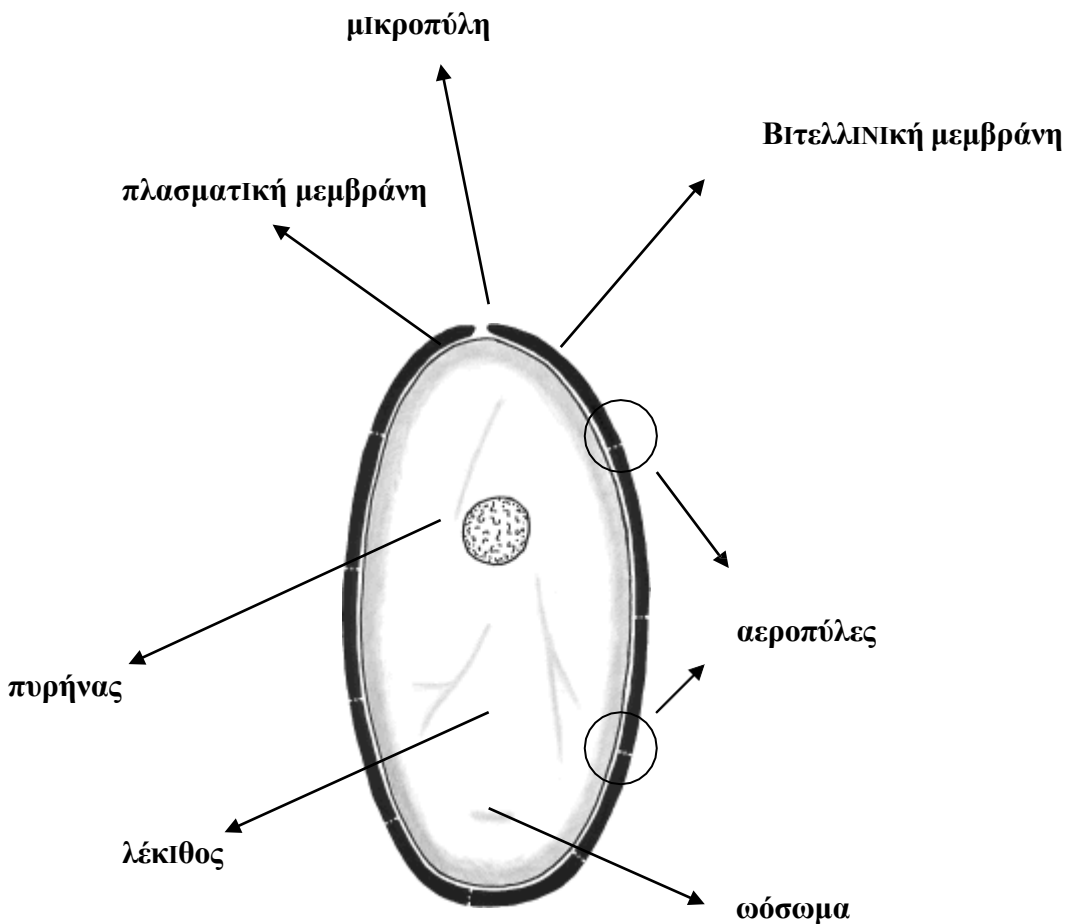
Το μεγαλύτερο μέρος του εσωτερικού του αυγού καταλαμβάνει η λέκιθος του. Η λέκιθος (ή κρόκος) αποτελεί μορφή αποθήκευσης τροφής στο ωοκύτταρο και το ποσό της κυμαίνεται. Σε αυγά που αναπτύσσονται έξω από το μητρικό σώμα, η εξάρτηση του εμβρύου από τη λέκιθο είναι ζωτικής σημασίας και μπορεί να αποτελεί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

Συνήθως τα συστατικά του ωοκυττάρου είναι άνισα κατανομημένα 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 εμβρυϊκή ανάπτυξη. Η ενεργοποίηση αυτή επακολουθεί της γονιμοποίησης στα σεξουαλικά αναπαραγόμενα έντομα, ενώ στα παρθενογενετικά αναπαραγόμενα 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).

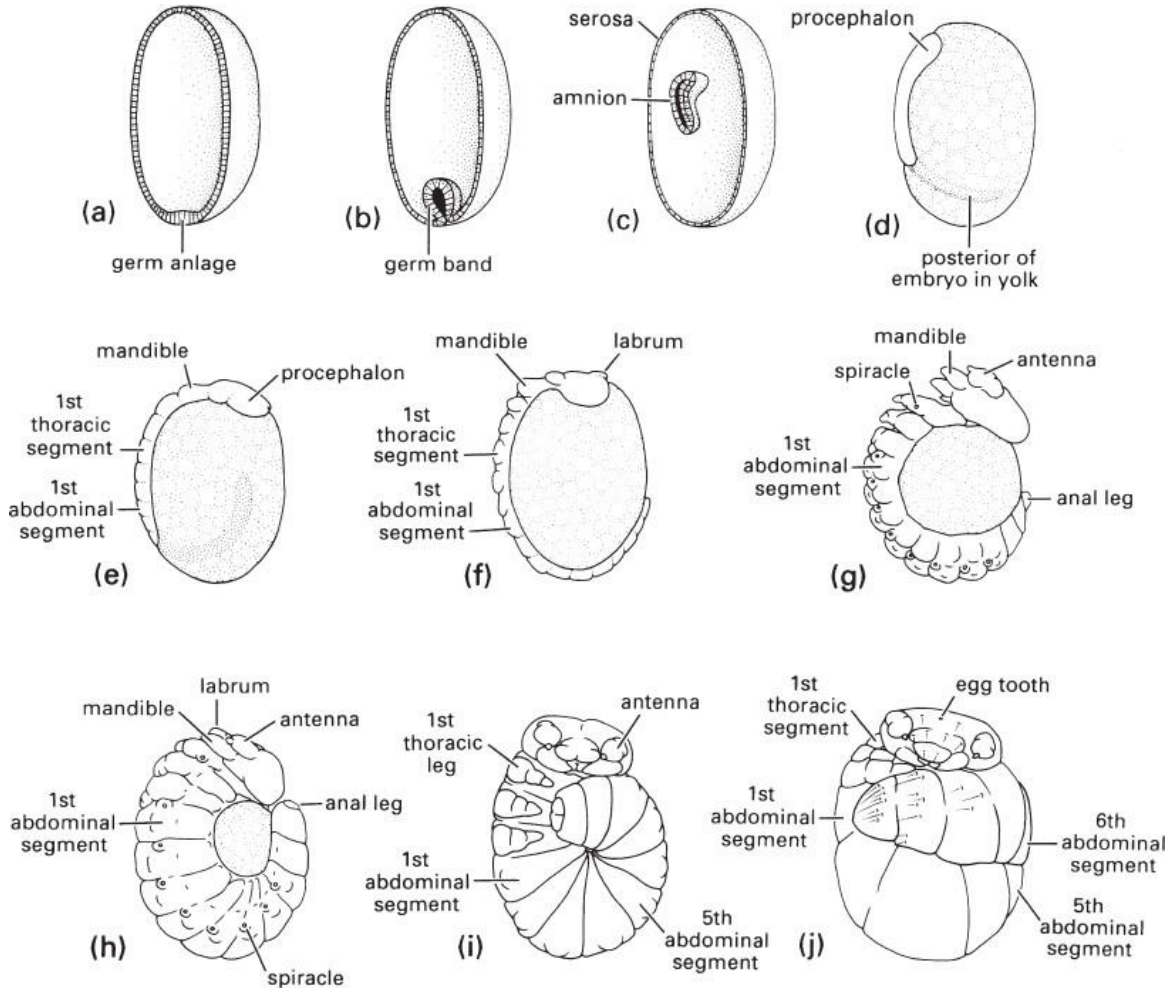
Το βλαστόδερμα, αποτελεί την βάση για την δημιουργία όλων των κυττάρων του λαρβικού σώματος, ενώ το κεντρικό μέρος της λεκίθου του αυγού παρέχει τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά για το αναπτυσσόμενο έμβρυο, τα οποία στην συνέχεια θα καταναλώνονται συνεχώς, μέχρι την στιγμή της εκκόλαψης (eclosion).

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 εμβρυϊκό κάλυμα 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 εμβρυογένεσης, τα ακραία τμήματα της γεννητικής ζώνης αυξάνονται καθ' όλη την λεκιθική μοίρα και συνενώνονται μέσω-ανωπλευρικά, 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 εμβρυϊκής ανάπτυξης, έτσι ώστε μέχρι την στιγμή της εκκόλαψης το

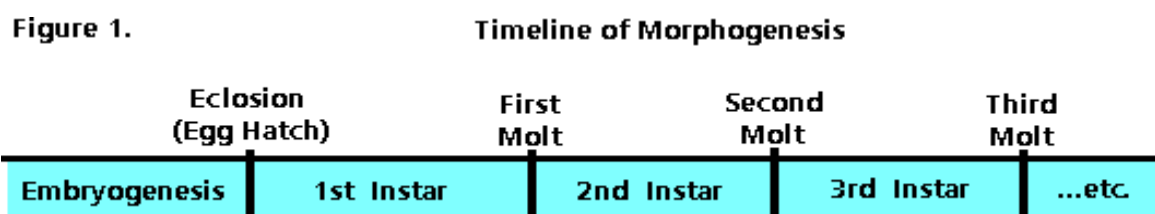
έμβρυο να έχει διαμορφωθεί σε ένα μικροσκοπικό πρώτο-έντομο, το οποίο καταλαμβάνει όλο τον χώρο του αυγού. Στα αμετάβολα και ημιμετάβολα έντομα, αυτό το στάδιο χαρακτηρίζεται και προνυμφικό (Gullan & Cranston, 2005).



**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 ωοπόθεση: (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 αβγό, 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 την 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, ως διαπαύουσες νύμφες ή διαπαύοντα ενήλικα, αφού το διπλό στρώμα της επιδερμίδας της νύμφης, στην πρώτη περίπτωση περιορίζει την απώλεια νερού κατά τη διάρκεια της αναπτυξιακής περιόδου.

Οι αλλαγές στη μορφή του σώματος, επέρχονται από τη διαφορετική 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 της νύμφης (rupal stage), κατά την διάρκεια του οποίου οι δομές του σώματος των ακμαίων διαμορφώνονται από τις προνυμφικές δομές (Gullan & Cranston, 2005).

Οι αλλαγές στην μορφή (μορφο-λογία) 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. Τρεις 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*).

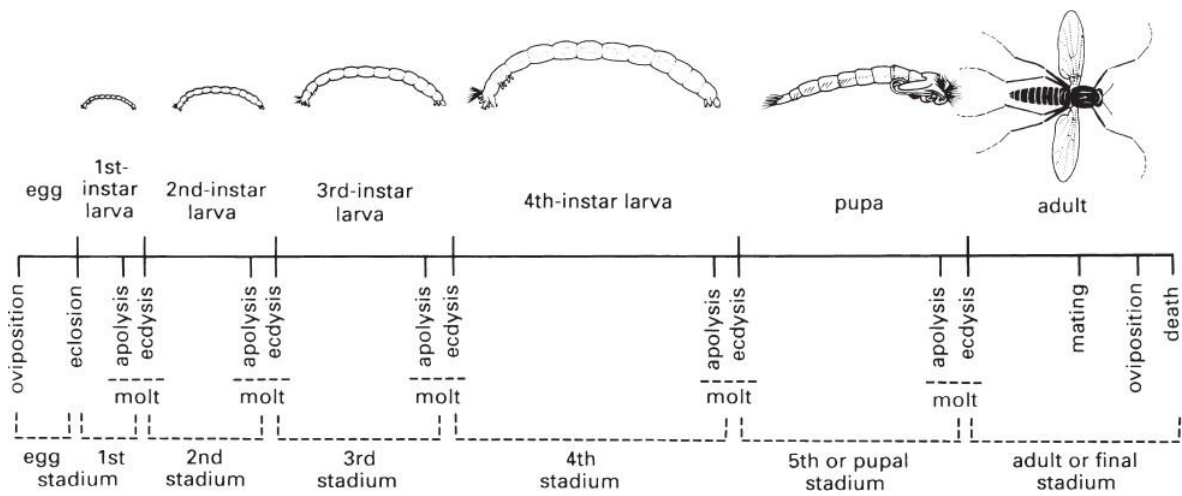
Αντιθέτως, όλα τα πτερυγωτά έντομα υποβάλλονται σε μια μεταμορφωτική διαδικασία, μεταξύ της ανώριμης φάσης της ανάπτυξης και της πτερωτής ή δευτερευόντως άπτερης φάσης των ενηλίκων. Αυτά τα έντομα μπορούν να υποδιαιρεθούν, σύμφωνα με δύο αναπτυξιακά προγράμματα, στα ημιμετάβολα (μερική ή ελλιπής μεταμόρφωση) (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, πλὴν 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 (rupal), 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).

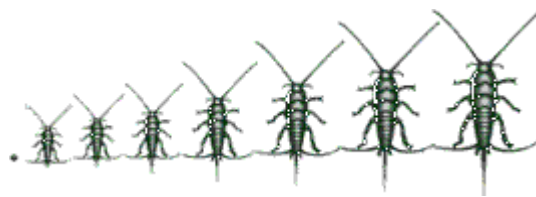
Στα νεώτερα εξελικτικά Holometabola, η έκφραση όλων των ενήλικων χαρακτηριστικών γνωρισμάτων καθυστερείται μέχρι το στάδιο της νύμφης. Εντούτοις στις περισσότερες τάξεις εντόμων, μεμονωμένες δομές συμπεριλαμβανομένων και των φτερών,

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.



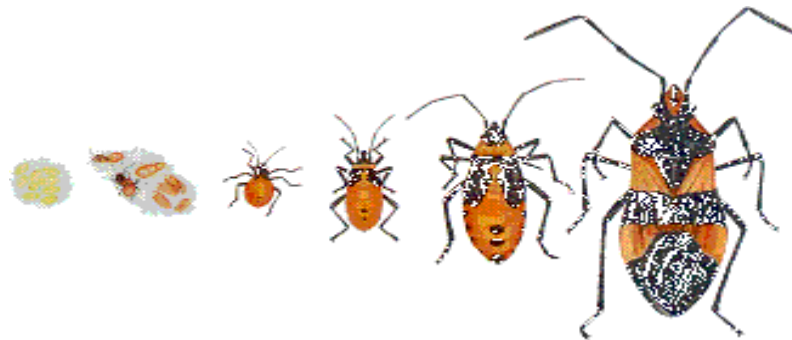
**Εικόνα 4.** Σχηματική αναπαράσταση του κύκλου ζωής της σκνίπας (Diptera: Chironomidae, *Chironomus*).



**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.

#### 1.1.4 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 μετα-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 της νύμφης (pupal stage), 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 εγκεφάλου, για τη

μεταμόρφωση, οδηγώντας έτσι στην αλλαγή των επιπέδων των διαφόρων ορμονών. Η μεταμόρφωση στα περισσότερα σκανθάρια, 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 της νύμφης, το οποίο καλείται και ως εγκλεισμένο ενήλικο (Gullan & Cranston, 2005).

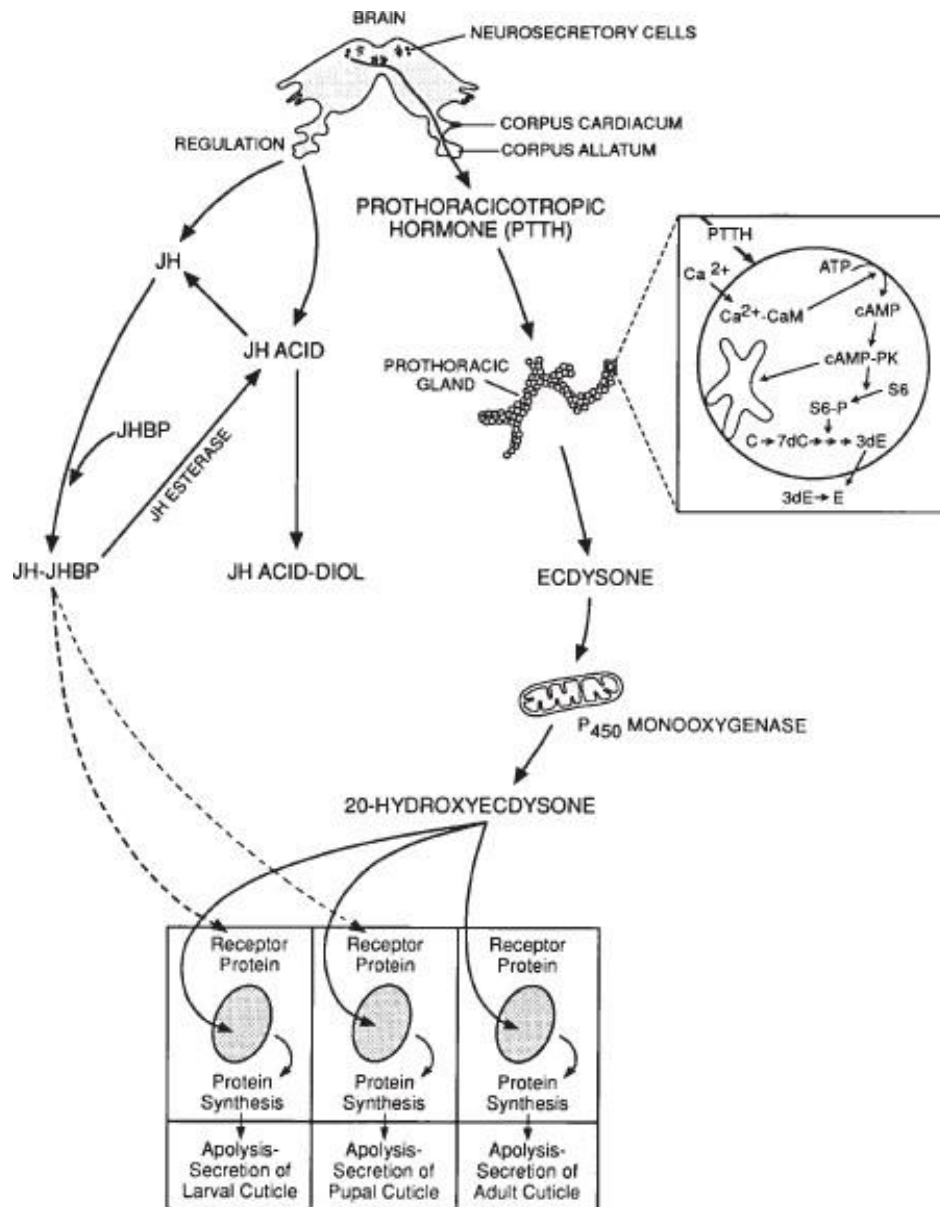
Εξωτερικά, ένα προστατευτικό περίβλημα ή ένα κουκούλι περιβάλλει τις νύμφες των περισσότερων ενηλίκων, με εξαίρεση τα ενήλικα ορισμένων κολεοπτέρων, διπτέρων, λεπιδοπτέρων και υμενοπτέρων.

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 (decticious), ώστε τα εγκλεισμένα ενήλικα να μπορέσουν να τμήσουν το κουκούλι κατά την έξοδό τους, ή μη ενισχυμένες (adecticious) 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 τη νύμφη, διευκολύνεται από ένα μεμβρανώδη σάκο του κεφαλιού του αναδύομενου ενηλίκου, το rtilinum. Στα 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.

### 1.1.5 Ενήλικη φάση

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

Στο ακμαίο, μπορεί να είναι αναπαραγωγικά ικανό σχεδόν αμέσως την έξοδό του από τη νύμφη 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. Στα ενήλικα ορισμένων ειδών, όπως εκείνα της τάξης των Ephemeroptera, 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. Στα 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 της νύμφης. Η μεταμόρφωση, εντούτοις, μπορεί να ολοκληρωθεί σε μερικές ώρες, ημέρες ή εβδομάδες πριν και το εγκλεισμένο ενήλικο μπορεί να παραμείνει στη νύμφη μέχρις ότου εμφανιστούν οι κατάλληλες περιβαλλοντικές συνθήκες για την έξοδό του από αυτό (Gullan & Cranston, 2005). Οι αλλαγές στη θερμοκρασία ή στο φως, 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). Στο 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. Στα 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).

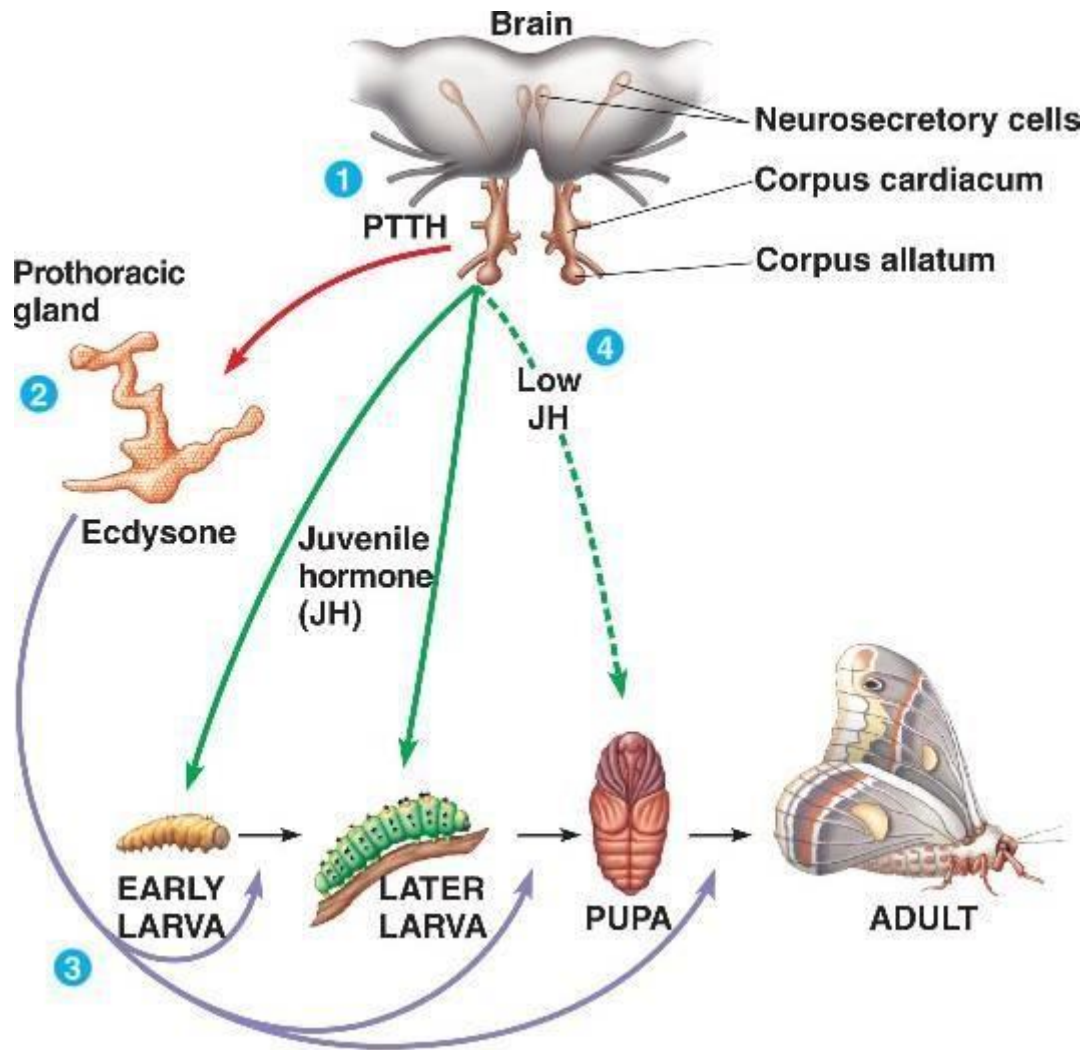
Σο ενήλικο που εξήλθε από τη νύμφη εμφανίζει μαλακή επιδερμίδα, η οποία επιτρέπει την επέκταση της επιφάνειας του σώματος με άμεση κατάποση του αέρα ή με λήψη του από τους τραχειακούς σάκους και με τοπική αύξηση της πίεσης της αιμολέμφου, ύστερα από έντονη μυϊκή δραστηριότητα. Σα φτερά κρεμιούνται με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

Ο χρωματισμός της επιδερμίδας και των επιδερμικών κυττάρων εμφανίζεται αμέσως πριν ή αμέσως μετά της εξόδου από τη νύμφη 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 της νύμφης, πολλά ολομετάβολα έντομα απεκκρίνουν ένα περιττωματικό ρευστό αποκαλούμενο μηκόνιο (meconium). Σο 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.

Στα 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 δευτέρους 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 εγέφαλο. 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 αδέν. 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).

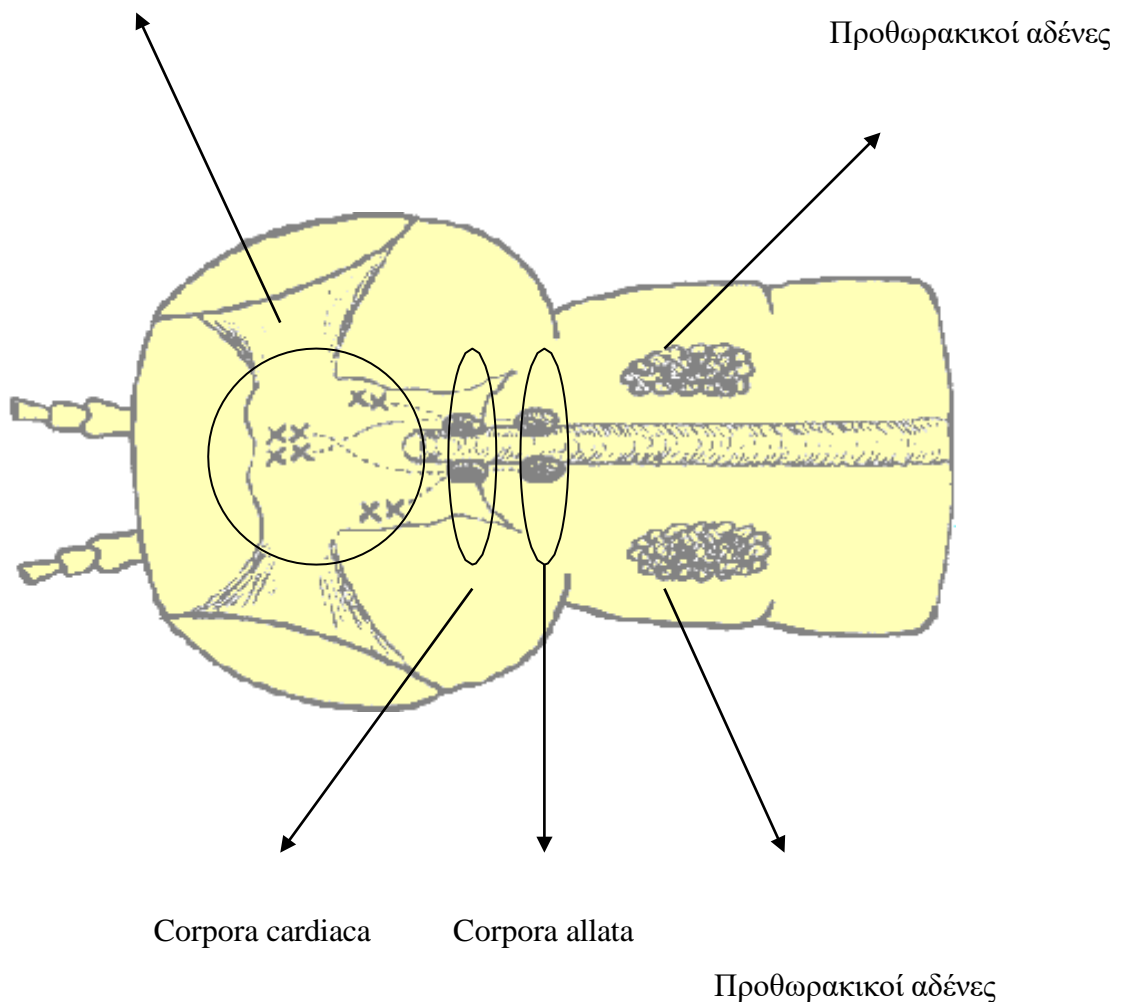
**3) Νευροεκκριτικά κύτταρα** [Neurosecretory cells (NSC) ή αλλιώς neuroendocrine cells]: είναι τροποποιημένοι νευρώνες, που εντοπίζονται στο νευρικό σύστημα, αλλά και στον εγκέφαλο. Αυτά τα κύτταρα παράγουν τις περισσότερες από τις γνωστές ορμόνες των εντόμων, με αξιοσημείωτη εξαίρεση την παραγωγή των 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.

Νευροεκκριτικά κύτταρα



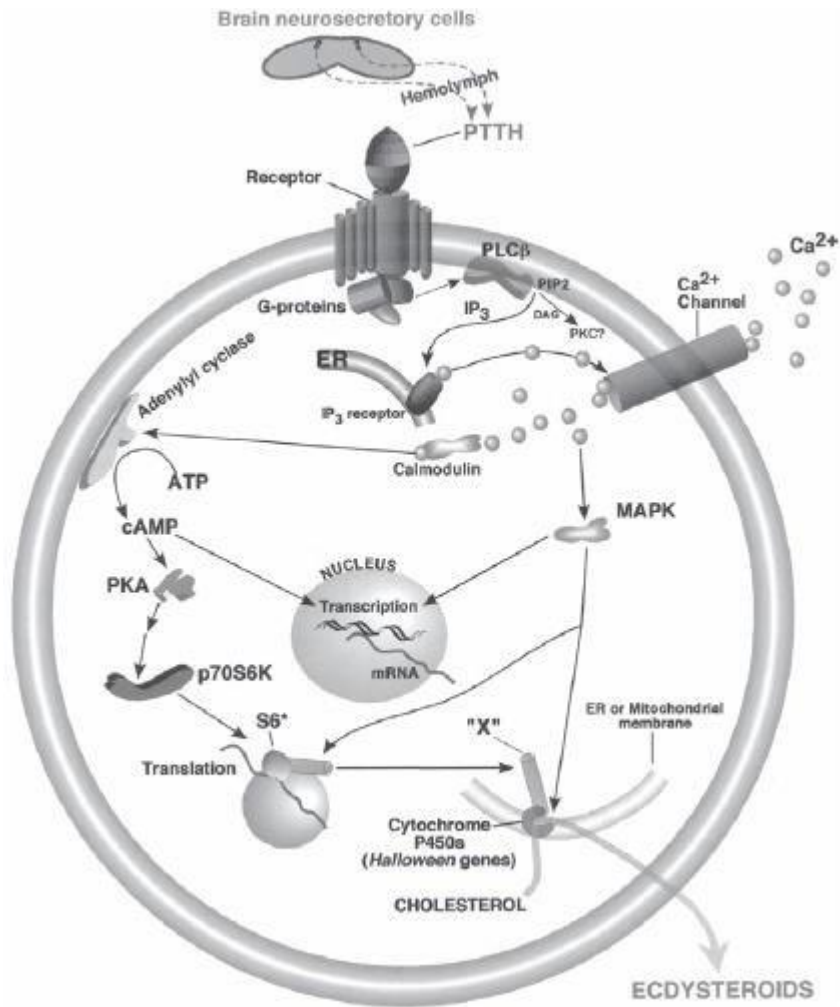
**Εικόνα 10.** Τα κυριότερα κέντρα παραγωγής ορμονών στα έντομα.

### 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 & Cranston, 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 δραστηριότητα 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 προθωρακιότροπου ορμόνης (PTTH) οδηγεί στη σύνθεση και απελευθέρωση των εκδυστεροειδών.

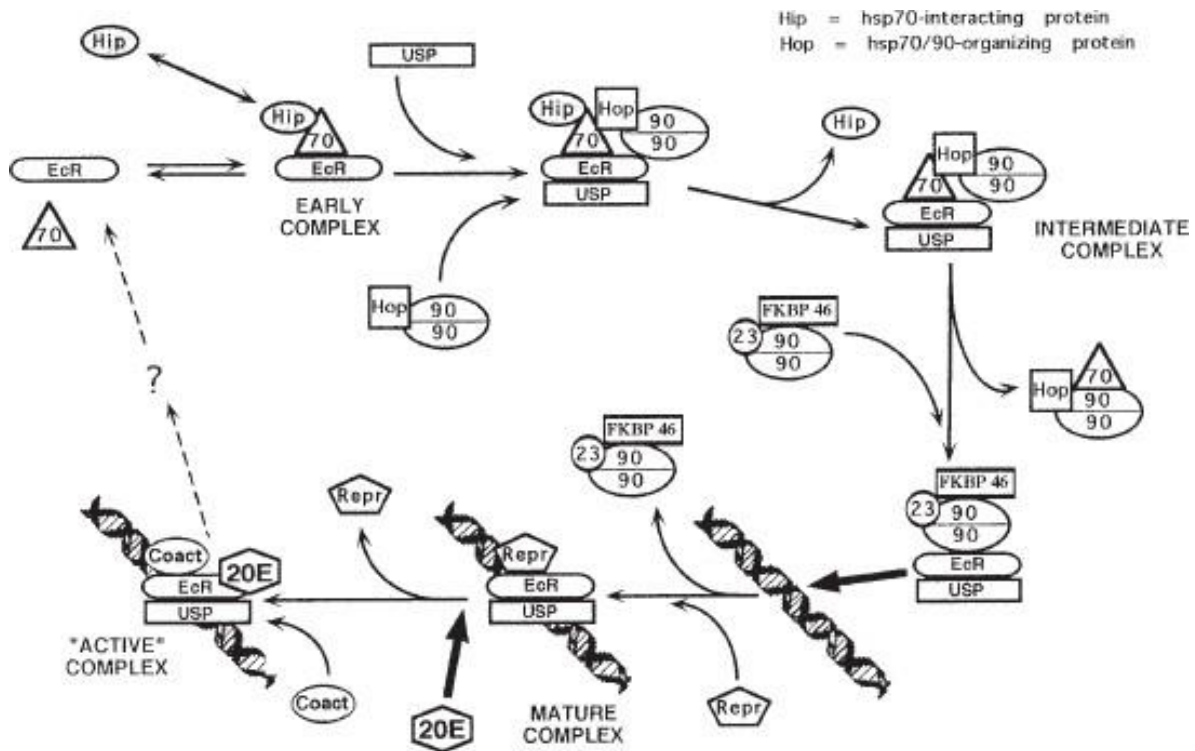


### 1.2.1.1 Τα εκδυστεροειδή

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 θυροειδούς 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 τοξικότητα στον οργανισμό των αρθροπόδων. Βασικός στόχος ορισμένων εντομοκτόνων, όπως η τεβουφenoζίδη, είναι η δέσμευση του υποδοχέα της έκδυσης των εντόμων- στόχων, δρώντας ως χημικά ανάλογα της ορμόνης της έκδυσης [Dhadialla et al., 1998].

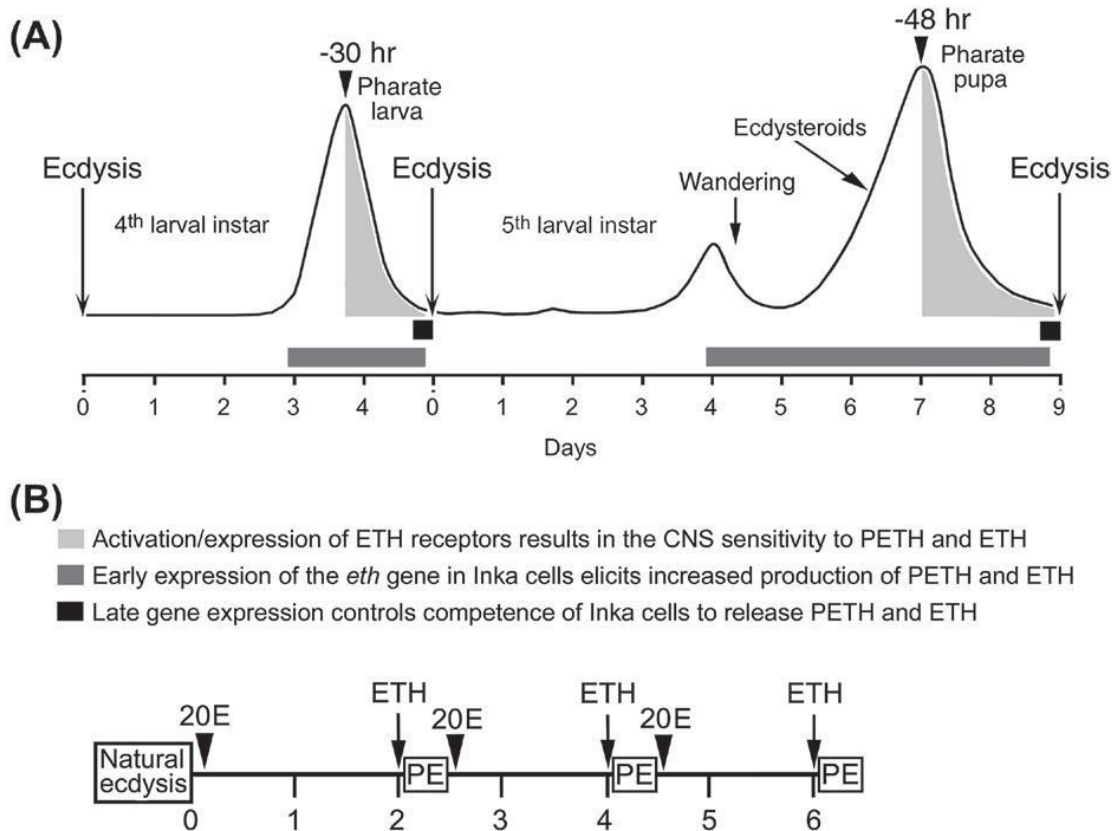
Τα ξενοβιοτικά δρουν ως εκδυστεροειδικοί ανταγωνιστές παρεμβαίνοντας στις διαδικασίες έκδυσης καθώς και στην εμβρυική ανάπτυξη του οστρακοειδούς, *Daphnia magna* [LeBlanc et al., 2000].

### 1.2.1.2 Η ορμόνη επαγωγής της έκδυσης (ETH) 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 επιτραχειακών αδένων. Η λειτουργία των επιτραχειακών αδένων και η ταυτοποίηση μίας λειτουργικής πεπτιδικής ορμόνης έχει μελετηθεί επαρκώς στην *Manduca* (Zitnan et al., 1996). Ένεση των ορμονών που παράγονται στου επιτραχειακού 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 επιτραχειακών αδένων. Αυτό το πεπτίδιο ονομάστηκε *Manduca ecdysis triggering hormone* ή Mas-ETH (Zitnan et al., 1996). Έγχυση με συνθετική ETH 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 nM κατά την έναρξη της διαδικασίας της έκδυση (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*. (A) 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. (B) 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 πρωθωρακιοτρόπο ορμόνη (PTTH). Αυτή η ξαφνική έκκριση της PTTH διεγείρει τους προθωρακικούς αδένες και εκκρίνουν τις ορμόνες της έκδυσης (molting hormones), τα εκδυστεροειδή.

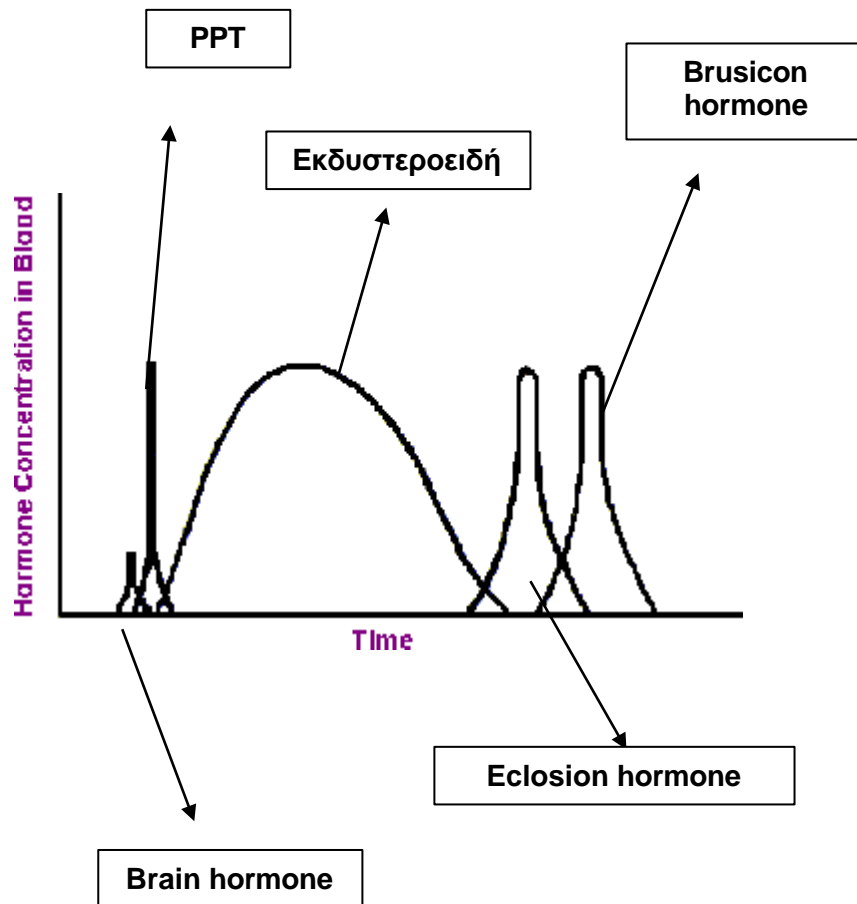
Οι ορμόνες της έκδυσης επηρεάζουν πολλά κύτταρα σε όλο το σώμα, αλλά η κύρια λειτουργία τους είναι να πυροδοτήσουν μια σειρά από φυσιολογικές διεργασίες (apolysis) που οδηγούν σε σύνθεση του νέου εξωσκελετού. Κατά τη διάρκεια αυτών των διαδικασιών, ο νέος εξωσκελετός συνθέτεται ως ένα μαλακό, ζαρωμένο στρώμα κάτω από τα σκληρά μέρη του παλιού εξωσκελετού. Η διάρκεια της απόλυσης 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 απ τον παλιό με την διαδικασία της έκδυσης.

Όσο τα επίπεδα των εκδυστεροειδών παραμένουν πάνω από ένα κρίσιμο όριο στην αιμοδέμφο, 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 ενήλικων 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,

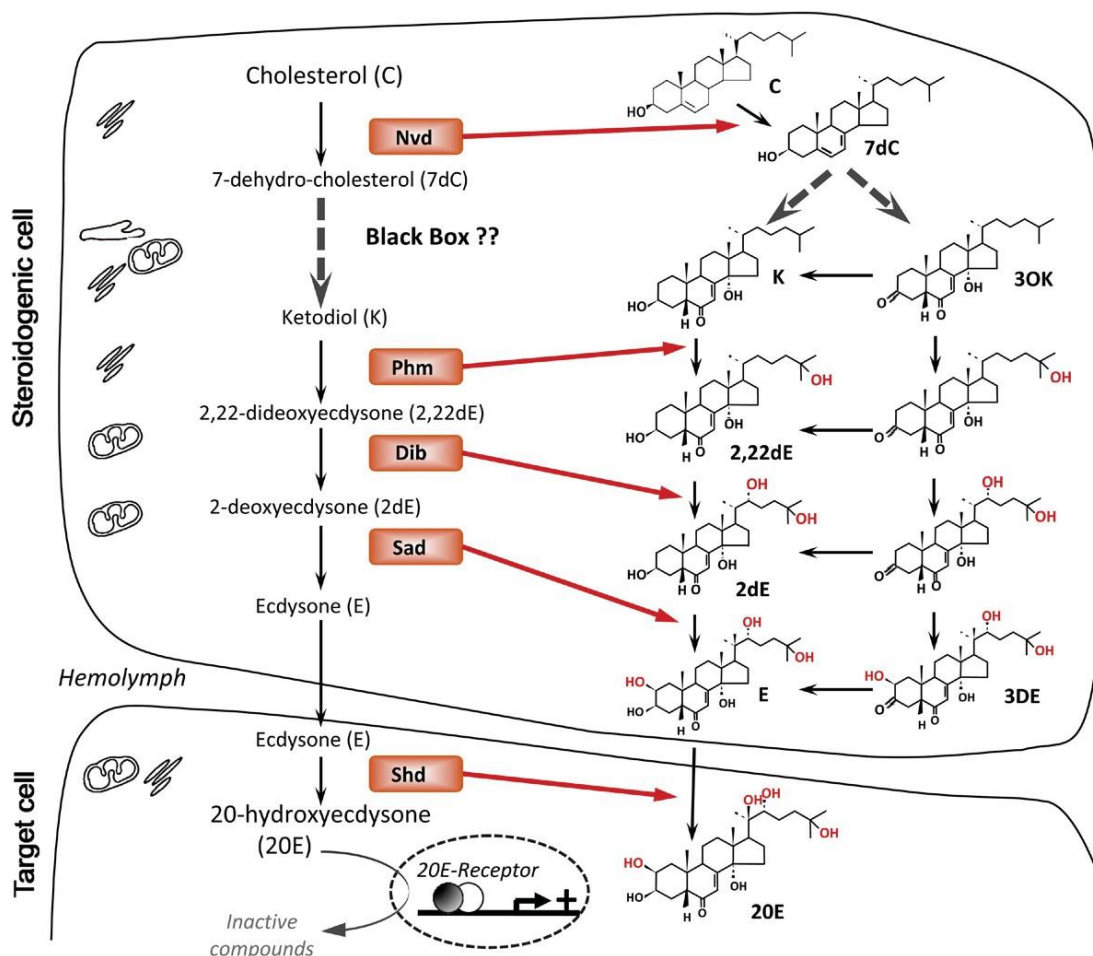
παράγοντας εκ νέου την ορμόνη της νεότητας. Σε ενήλικα θηλυκά, η ορμόνη αυτή διεγείρει την παραγωγή των αυγών. Σε ενήλικα αρσενικά άτομα, διεγείρει τους αδένες που χρειάζονται για την παραγωγή πρωτεϊνών που απαιτούνται στο σπερματικό υγρό. Σε περίπτωση απουσίας της ορμόνης της νεότητας τα ενήλικα έντομα μένουν σεξουαλικά στείρα



**Πίνακας 1.** Γραφική απεικόνιση της συγκέντρωσης των ορμονών στην αιμόλεμφο 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. Διάφορες μελέτες έχουν αποδείξει ότι μεταβάλλοντας την συγκέντρωση των ορμονών στην αιμολέμφο, είτε με χορήγηση εκδυστεροειδούς είτε με JH, παρατηρούνται φαινοτυπικές δυσμορφίες στα αναπτυξιακά στάδια των διαφόρων οργανισμών (Riddiford and Ajami, 1973, Kurushima and Ohtaki, 1975, Lafont et al., 1977, Trouman et al., 1980).

Η στεροειδής ορμόνη 20-Hydroxyecdysone (20HE) είναι μία από τις σημαντικότερες ορμόνες, δρα σαν εκδυστεροειδές, ρυθμίζοντας όλα τα στάδια της ανάπτυξης του εντόμου, τις εκδύσεις και την διαδικασία 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.

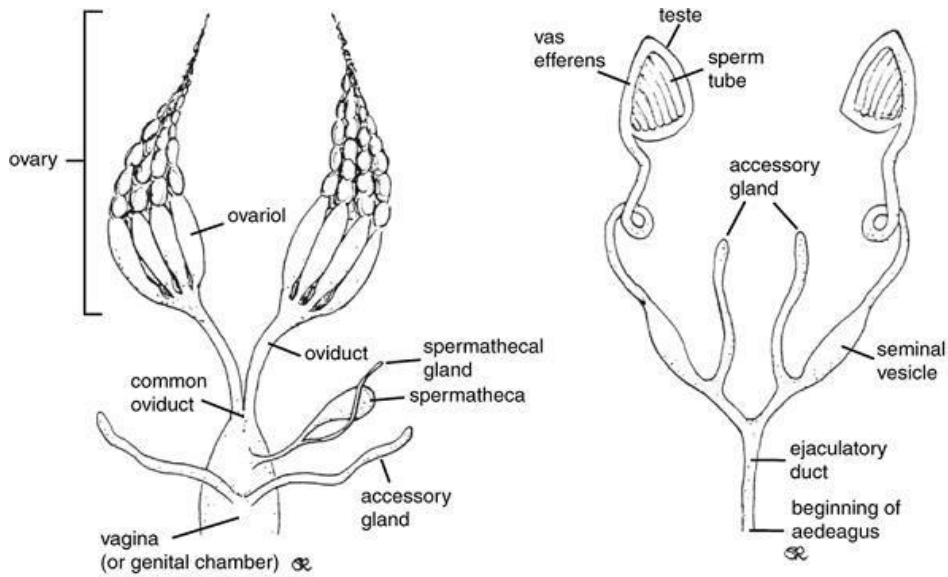
Κατά την κάθοδο του από τον άζυγο αγωγό το ωάριο μπορεί να γονιμοποιηθεί από σπέρμα που βρίσκεται στη σπερματοθήκη. Κάποια έντομα, όπως οι βασίλισσες των μελισσών, ελέγχουν τη γονιμοποίηση των ωαρίων. Το σπέρμα είναι δυνατό να διατηρήσει τη ζωτικότητα του μέσα στη σπερματοθήκη για μεγάλο χρονικό διάστημα.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

Σε χαμηλότερο σημείο του άζυγου αγωγού εκβάλλουν οι κολλητήριοι ή βοηθητικοί αδένες. Αυτοί εκκρίνουν ουσίες για κάλυψη των ωών ή για την προσκόλληση των 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 αυτήν 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 ανάπτυξης 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 νότο του θήλεος ή αντίθετα (*Diptera*). Σε ορισμένα *Coleoptera* τα άρρενα είναι εφωδιασμένα με ισχυρότατες άνω γνάθους για να συγκρατούν σταθερά το θήλυ κατά τη διάρκεια 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 φύλων 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 φύλα 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 ή μη ενός κατάλληλου φωτόκιου χώρου. Επιπροσθέτως, οι εξωτερικές επιδράσεις μπορούν να τροποποιηθούν με διάφορους εσωτερικούς παράγοντες όπως η διατροφική κατάσταση και η ωρίμανση των ωοκυττάρων. Το ζευγάρι 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 την 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 Ξενοιστρογόνα και ενδοκρινικοί διαταρακτές

Τα **ξενοιστρογόνα** 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, οΐστρος και γόνο (γονίδιο, που σημαίνει "για τη δημιουργία") και κυριολεκτικά σημαίνει «ξένα οιστρογόνα». Τα ξενοιστρογόνα συχνά ονομάζονται και **ενδοκρινικοί διαταρακτές** καθώς επηρεάζουν βασικές λειτουργίες του ενδοκρινολογικού συστήματος των διάφορων οργανισμών (Hahn et al., 2002).

Σε βιοχημικό επίπεδο τα ξενοιστρογόνα 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 ξενοιστρογόνων 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 φύλων 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 βιοσυσσωρευτούν. 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' ό,τι 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)**

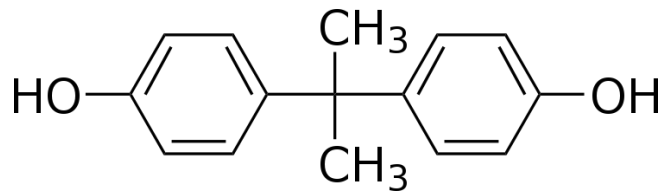
Η δισφαινόλη Α είναι μία χημική ένωση που χρησιμοποιείται στην παραγωγή των πολυκαρβονικών πλαστικών (PC polycarbonates) και των εποξυ-ρητινών (epoxyresins). Από τις πολυκαρβονικές ενώσεις παράγεται το ελαφρύ, σκληρό και χρωματιστό πλαστικό που χρησιμοποιείται σε πιάτα, ποτήρια, μπουκάλια, μαχαιροπήρουνα, 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 δρουν συνδεδεμένα με τους υποδοχείς των οιστρογόνων (ERs) ή τους SXR (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, δρουν 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 συγκέντρωση 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 πιθανών 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 συγκεντρώσεων 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 επικινδυνότητας 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 δισφαινόλη 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 αβγών 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.

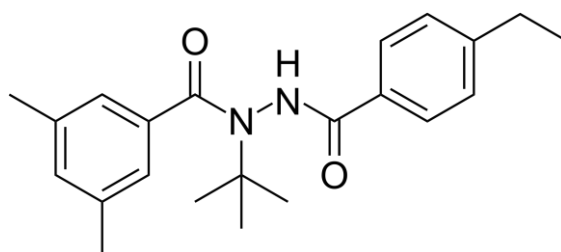
Σε κυτταρικές σειρές του εντόμου *D. melanogaster*, βρέθηκε ότι η δισφαινόλη σε υψηλές συγκεντρώσεις, δρα ως εκδυστεροειδικός ανταγωνιστής (Dinan et al. 2001).

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 οργανισμών σε BPA φαίνεται να παρεμβαίνει στην ομοιόσταση του οργανισμού, μεταβάλλοντας την συγκέντρωση των φυσικών ορμονών στην αμολέμφο. 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).

### 1.4.3 RH-5992 (Τεβουφenoζίδη)

Το RH-5992 (Τεβουφenoζίδη) είναι ένας αγωνιστής εκδυσόνης ικανός να προκαλεί πρόωρες αλλά ελλιπείς προνύμφες λεπιδοπτέρων (Wing et al., 1988, Retnakaran et al., 1995). Μορφολογικές και υπερδομικές μελέτες αποκάλυψαν ότι το πρώτο μέρος των επαγόμενων από RH-5992 εκδύσεων (ολίσθηση κεφαλής και απόλυση) είναι φυσιολογικό, ενώ το δεύτερο μέρος (έκλυση) είναι ελαττωματικό (Retnakaran et al., 1997). Το RH-5992 και οι σχετικές διβενζοϋλ-υδραζίνες έχουν αποδειχθεί ότι δρουν μέσω του υποδοχέα της εκδυσόνης (Wing, 1988, Dhadialla et al., 1998) και ότι προκαλούν την έκφραση των γονιδίων απόκρισης εκδυσόνης E75 και HR3 σε πρώιμο στάδιο και τέλη πρωίμου ως 20-υδροξυ-εκδυσόνη (20E · Palli et al., 1995, Palli et al., 1996a, Palli et al., 1996b, Retnakaran et al., 1995). Η τοξικότητα του RH-5992 έχει αποδοθεί στην επιμονή του στους ιστούς, γεγονός που προκαλεί παρεμπόδιση στο δεύτερο μέρος της ρυθμιστικής αλληλουχίας που προκαλείται από το εκδυστεροειδές και απαιτεί μείωση του τίτλου της ορμόνης. Σύμφωνα με αυτήν την υπόθεση, παρατηρήθηκε ότι η έκφραση γονιδίων που απαιτούν μείωση του τίτλου ορμόνης για την επαγωγή τους, όπως αυτά που κωδικοποιούν Dopa αποκαρβοξυλάση (Ddc) και την πρωτεΐνη νυμφών Lcp-14 στην επιδερμίδα, αποτρέπεται από την RH- 5992 (Retnakaran et al., 1995).



**Εικόνα 18.** Χημική δομή του RH-5992 (Τεβουφenoζίδη).

### 1.5 Η διάπαυση των εντόμων

Τα έντομα έχουν αναπτύξει την ικανότητα να προσλαμβάνουν τα περιβαλλοντικά ερεθίσματα, που σχετίζονται με εποχιακές αλλαγές και να αντιδρούν σ' αυτά υφιστάμενα ειδικές φυσιολογικές, μορφολογικές αλλά και αλλαγές συμπεριφοράς, που τα προετοιμάζουν έτσι ώστε να αντεπεξέλθουν σε επικείμενες δυσμενείς συνθήκες του περιβάλλοντος. Αυτές οι αλλαγές

συνιστούν το “σύνδρομο της διάπαυσης”, μια σημαντική οικολογική προσαρμογή των ειδών, που τους επιτρέπει να συγχρονίζουν τους βιολογικούς τους κύκλους, με τις επικρατούσες περιβαλλοντικές συνθήκες (Tauber et al., 1986).

Η γεωγραφική εξάπλωση ενός είδους, επηρεάζεται από τον τύπο διάπαυσης που το χαρακτηρίζει. Η κατάσταση της διάπαυσης επηρεάζει την πληθυσμιακή αφθονία των εντόμων εποχιακά, αλλά και την εμφάνιση τους από μια περιοχή σε άλλη. Η σύγχρονη καταπολέμηση των εντόμων βασίζεται στην αρχή, ότι οι διάφορες επεμβάσεις θα πρέπει να πραγματοποιηθούν πριν οι πληθυσμοί των εχθρών των καλλιεργειών φθάσουν σε επίπεδα, όπου η καταστροφή δεν μπορεί πλέον να αποφευχθεί. Η μελέτη της πρόκλησης, εγκατάστασης και περάτωσης της διάπαυσης σε σχέση με τους ρυθμούς ανάπτυξης του εντόμου, είναι καθοριστική για την εφαρμογή ενός σύγχρονου τρόπου καταπολέμησης.

Αυτή πρέπει α. να προβλέπει με ακρίβεια το χρόνο πρόκλησης και περάτωσης της διάπαυσης, μετανάστευσης, ανάπτυξης και αναπαραγωγής των εχθρών στον αγρό, β. να μπορεί να χειρισθεί τους περιβαλλοντικούς και γενετικούς παράγοντες, που σκοπό έχουν τον περιορισμό των πληθυσμών και γ. να μπορεί να επιλέξει τα καλύτερα προσαρμοσμένα είδη ή βιότυπους για την εφαρμογή βιολογικής καταπολέμησης. Το γεγονός ότι οι καταστάσεις αναστολής ανάπτυξης στα έντομα, δεν οφείλεται μόνο στη δραστηριοποίηση τους λόγω της άμεσης επίδρασης των χαμηλών θερμοκρασιών, παρατηρήθηκε το 1869 στα αυγά του *Bombyx mori*. Πρώτος ο Wheeler το 1893 χρησιμοποίησε τον όρο «διάπαυση», θέλοντας να περιγράψει ένα στάδιο στην εμβρυογένεση της ακρίδας *Xiphidium ensiferum*, αργότερα δε ο Henneguy το 1904 αποσαφήνισε την έννοια συμπεριλαμβάνοντας παρόμοιες περιόδους “αναστολής της οντογενετικής ανάπτυξης” στα διάφορα στάδια των εντόμων.

Ως διάπαυση ορίζεται μια δυναμική, ελεγχόμενη νευροορμονικά κατάσταση του βιολογικού κύκλου των εντόμων, την οποία χαρακτηρίζει η έντονα χαμηλή μεταβολική δραστηριότητα των οργανικών. Η κατάσταση αυτή συνδέεται α. με μειωμένοι μορφογένεση, β. με αυξημένη αντοχή στις περιβαλλοντικές ακρότητες και γ. με αλλαγή στη συμπεριφορά. (Tauber et al., 1986).

Ο Beck (1980) ορίζει ως διάπαυση, τη γενετικά ελεγχόμενη κατάσταση μειωμένης ανάπτυξης (μορφογένεσης ή αναπαραγωγής) των εντόμων, της οποίας η έκφραση ρυθμίζεται από περιβαλλοντικούς παράγοντες (κυρίως τη φωτοπερίοδο). Η κατάσταση αυτή αποτελεί μία ιδιαίτερη στρατηγική επιβίωσης των εντόμων κατά τη διάρκεια περιόδων δυσμενών συνθηκών, όπως είναι π.χ. οι χαμηλές θερμοκρασίες του χειμώνα, οι υψηλές θερμοκρασίες του θέρους, η ξηρασία ή ακόμα η περιορισμένη διαθεσιμότητα τροφής. Η διαδικασία εισόδου στη διάπαυση

αρχίζει πολύ πριν ξεκινήσουν οι δυσμενείς συνθήκες. Με την εγκατάσταση της διάπαυσης, η μεταβολική μεν δραστηριότητα του εντόμου μειώνεται, συντελούνται όμως κάποιες φυσιολογικές αλλαγές.

Όταν ολοκληρωθούν οι αλλαγές αυτές, το έντομο περατώνει τη διάπαυση του και επαναδραστηριοποιείται μορφογενετικά ή αναπαραγωγικά, εφόσον βέβαια εν τω μεταξύ έχουν αποκατασταθεί ευνοϊκές για την ανάπτυξη συνθήκες (π.χ. θερμοκρασίας). Τα ερεθίσματα που προκαλούνται από τους περιβαλλοντικούς παράγοντες (ρυθμιστές της διάπαυσης) ονομάστηκαν συμβολικά ερεθίσματα (token stimuli), γιατί οι παράγοντες αυτοί δεν είναι απαραίτητα οι ίδιοι ευνοϊκοί ή δυσμενείς για την επιβίωση των ζώων, αλλά λειτουργούν ως δείκτες που “προαγγέλλουν” αλλαγή άλλων περιβαλλοντικών παραγόντων. Αυτοί οι παράγοντες είναι κυρίως ή φωτοπερίοδος (εναλλαγή φωτόφασης-σκοτόφασης), η θερμοκρασία, η υγρασία, η διαθεσιμότητα τροφής και η πληθυσμιακή πυκνότητα (Nelson et al., 2010).

Με τον όρο φωτοπερίοδος, εννοούμε την εναλλαγή φωτός και σκότους σε ένα κύκλο που στη φύση έχει διάρκεια 24 ωρών, σε πειράματα όμως εργαστηρίου διερευνούμε και φωτοπεριόδους διαφορετικής διάρκειας. Σε κάθε περίπτωση, η φάση φωτός της φωτοπεριόδου ονομάζεται «φωτόφαση» και η φάση του σκότους «σκοτόφαση». Από όλους τους παράγοντες που αναφέραμε, η φωτοπερίοδος είναι ο πλέον σημαντικός από περιβαλλοντική άποψη, γιατί είναι ο μόνος παράγων του περιβάλλοντος που εμφανίζει απόλυτη κανονικότητα, συνέπεια και ακρίβεια στην επανάληψη του (Goto et al., 2010).

Έτσι, δεν είναι περίεργο ότι πολλά ζώα αλλά και φυτά στην περίοδο της εξέλιξης τους, ανέπτυξαν την ικανότητα να χρησιμοποιούν τη φωτοπερίοδο σαν αξιόπιστη περιβαλλοντική πληροφορία, με βάση την οποία ρυθμίζουν διάφορες δραστηριότητες κατά τρόπο που ευνοεί την επιβίωση τους. Οι δραστηριότητες αυτές μπορεί να έχουν ετήσιο κύκλο, όπως π.χ. η μετανάστευση, η αναπαραγωγή, η διάπαυση κλπ, ή ημερήσιο κύκλο όπως π.χ. η σεξουαλική δραστηριότητα, η ωοθεσία, η έξοδος ακμαίων στα έντομα κλπ (Nelson et al., 2010).

Η επίδραση της φωτοπεριόδου στην πρόκληση της διάπαυσης, ελέγχεται πειραματικά με την έκθεση διαφόρων πληθυσμών εντόμων, για μέρος ή ακόμα για όλη τη ζωή τους, σε σταθερές συνθήκες φωτοπεριόδου, διατροφής και θερμοκρασίας. Οι καμπύλες της φωτοπεριοδικής αντίδρασης συνοψίζουν την αντίδραση ολόκληρου του πληθυσμού ενός είδους. Η φωτόφαση που προκαλεί διάπαυση στο 50% των ατόμων ενός πληθυσμού που εκτίθεται σ’ αυτήν, χαρακτηρίζεται ως κρίσιμη (critical daylength).

Η κρίσιμη αυτή φωτόφαση, είναι δυνατόν να είναι χαρακτηριστική, με την έννοια ότι διαφοροποιείται η αντίδραση του πληθυσμού σημαντικά πριν ή μετά την τιμή της. Έτσι, σε μερικά

είδη εντόμων, είναι δυνατόν μια αλλαγή 10-15 min στη διάρκεια της φωτόφασης να προκαλέσει μια σημαντική αλλαγή στο ποσοστό του πληθυσμού που εισέρχεται σε διάπαυση. Η διαθεσιμότητα τροφής και η υγρασία, είναι δυνατό να λειτουργούν ως κύριος παράγοντας ρύθμισης της διάπαυσης, για οργανισμούς που εκδηλώνουν καλοκαιρινή διάπαυση ή για έντομα που ζουν σε τροπικές περιοχές, όπου οι φωτοπεριοδικές και θερμοκρασιακές διακυμάνσεις είναι μικρές. Τέλος, η πληθυσμιακή πυκνότητα αν και είναι δύσκολο να διαχωριστεί από την τροφή, έχει βρεθεί ότι επηρεάζει το ποσοστό της διάπαυσης (Saunders et al., 2004).

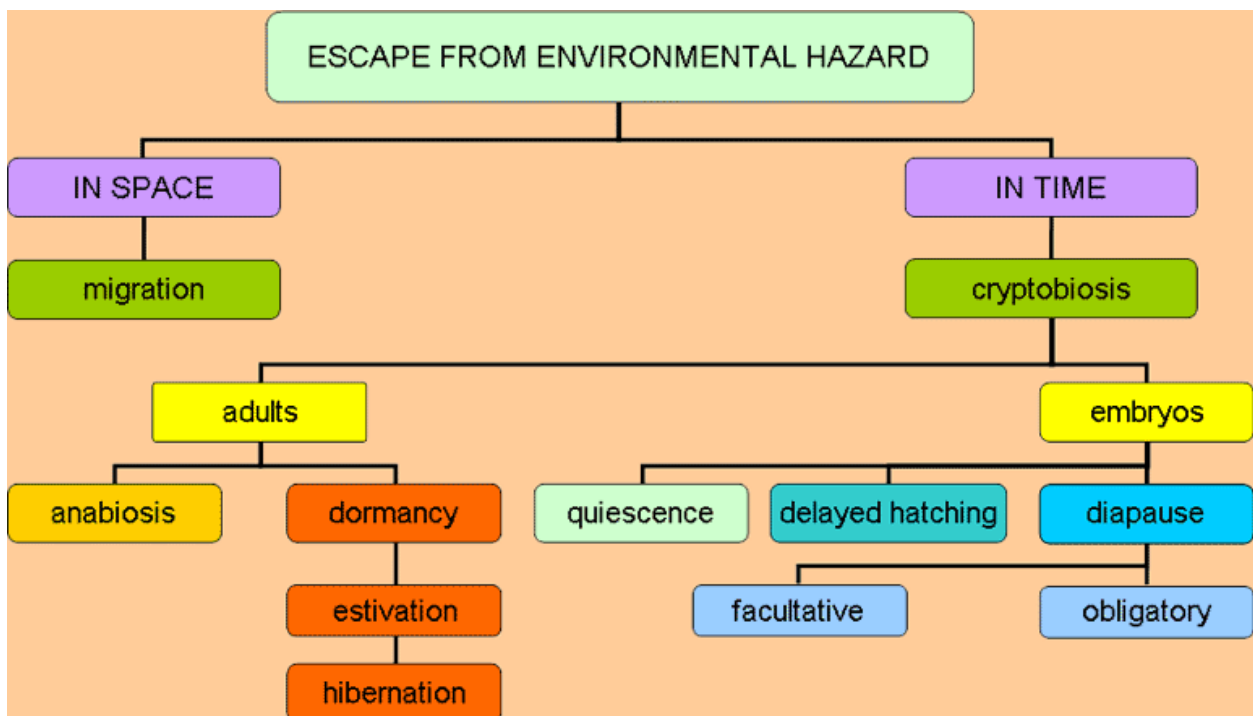
Η ολοκλήρωση της διάπαυσης (diapause development), επηρεάζεται επίσης από τη δράση διαφόρων παραγόντων. Οι σπουδαιότεροι από αυτούς είναι η φωτοπερίοδος, η θερμοκρασία, το νερό, τα θρεπτικά στοιχεία κλπ. Η επίδραση της φωτοπερίοδου στην περάτωση της διάπαυσης έχει επιβεβαιωθεί σε αρκετά έντομα. Η διάρκεια και η περάτωση της διάπαυσης μπορεί να επιταχυνθούν αν τα διαπαύοντα άτομα ενός πληθυσμού εκτεθούν για μία περίοδο σε χαμηλές θερμοκρασίες. Ωστόσο, δεν έχουν αναφερθεί περιπτώσεις όπου το ψύχος από μόνο του ενεργεί ως βασικός παράγων για την περίπτωση της διάπαυσης. Συνήθως, απαιτείται αλληλεπίδραση χαμηλών ή και υψηλών θερμοκρασιών με τη φωτοπερίοδο, για την ολοκλήρωση της κατάστασης διάπαυσης (Denlinger et al, 2001).

### 1.5.1 Τύποι διάπαυσης

Ορισμένα είδη εντόμων εκδηλώνουν υποχρεωτική διάπαυση (obligatory), δηλαδή κάθε άτομο κάθε γενιάς διαπαύει ανεξάρτητα από τις περιβαλλοντικές συνθήκες που επικρατούν. Τα πιο πολλά από τα είδη αυτά είναι μονοκυκλικά (monovoltine ή univoltine), έχουν δηλαδή μια γενιά το χρόνο. Αλλά είδη εντόμων εκδηλώνουν προαιρετικής φύσεως διάπαυση (facultative), δηλαδή η διάπαυση εκδηλώνεται στα άτομα κάποιας γενεάς ή γενεών, ανάλογα με τις περιβαλλοντικές συνθήκες που επικρατούν κατά τη διάρκεια κάποιου σταδίου (ή σταδίων), που χαρακτηρίζονται ως «κρίσιμα στάδια» τα οποία προηγούνται του σταδίου όπου εκδηλώνεται η διάπαυση. Τα έντομα αυτά έχουν δύο ή και περισσότερες γενεές το χρόνο και χαρακτηρίζονται ως πολυκυκλικά (multivoltine) (Beck, 1980). Ο όρος προαιρετική διάπαυση, υπονοεί ότι η διάπαυση μπορεί να αρθεί κάτω από συγκεκριμένους περιβαλλοντικούς παράγοντες και περιγράφει όλες εκείνες τις περιπτώσεις, όπου οι περιβαλλοντικοί παράγοντες που τις ρυθμίζουν είναι γνωστοί και αναστρέψιμοι.

Προνομφική διάπαυση: Το φαινόμενο της διάπαυσης σε ένα είδος, εκδηλώνεται σε ένα

εντελώς καθορισμένο στάδιο ανάπτυξης του (ωό, προνύμφη, νύμφη ή ενήλικο). Γενικά τα έντομα προσλαμβάνουν τα προκαλούντα τη διάπαυση ερεθίσματα, κατά τη διάρκεια χαρακτηριστικών σταδίων της ζωής τους. Κατά κανόνα, τα ευαίσθητα στάδια σε κάποιο ερέθισμα που προκαλεί διάπαυση είναι διαφορετικά από τα στάδια όπου εκδηλώνεται η διάπαυση για την ίδια γενεά ή στις επόμενες γενεές. Η νυμφική διάπαυση του *Papilio machaon*, για παράδειγμα, καθορίζεται από την ευαισθησία των προνυμφών στις μικρής διάρκειας φωτοφάσεις. Για την εκδήλωση της προνυμφικής διάπαυσης υπεύθυνοι είναι διάφοροι νευροορμονικοί μηχανισμοί (Beck, 1980).



**Εικόνα 19.** Περιβαλλοντική προσαρμογή και τύποι διάπαυσης

### 1.5.2 Ρύθμιση της διάπαυσης

Έχουν περιγραφεί περιβαλλοντικοί και ορμονικοί ρυθμιστές για τη διάπαυση, όμως η κατανόηση της μοριακής της ρύθμισης τώρα επιδιώκεται. Πολλά γονίδια δεν είναι ενεργά κατά τη διάρκεια της διάπαυσης, ενώ άλλα εκφράζονται αποκλειστικά τότε. Ο τερματισμός της διάπαυσης, συνοδεύεται από μια ταχεία ελάττωση της έκφρασης των γονιδίων που είναι θετικά ρυθμισμένα με αυτή και αύξηση της έκφρασης πολλών γονιδίων, τα οποία δεν είναι θετικά ρυθμισμένα με αυτή. Περιβαλλοντικοί και ορμονικοί ρυθμιστές της διάπαυσης έχουν βρεθεί μέχρι τώρα, όμως η κατανόηση της ρύθμισης της διάπαυσης σε μοριακό επίπεδο δεν είναι ακόμα

κατανοητή. Οι τάξεις των γονιδίων που ενεργοποιούνται, μπορούν να διακριθούν βάσει της εικόνας έκφρασης τους. Μερικά ενεργοποιούνται μέσα στη διάπαυση, άλλα εκφράζονται μόνο στην αρχή (early diapause), αργά (late diapause), ή ενδιάμεσα (intermittently). (Kostal, 2006).

Ο τερματισμός της διάπαυσης, συνοδεύεται από μία γρήγορη ελάττωση της έκφρασης πολλών γονιδίων, τα οποία ελαττώνουν τη ρύθμιση τους κατά τη διάρκεια της διάπαυσης. Μια σύγκριση της διάπαυσης των εντόμων, με άλλες μορφές χειμερίας νάρκης σε φυτά και ζώα, δείχνει ότι η καταστολή αυτή γίνεται από μια ομάδα γονιδίων –που παράγουν heat shock πρωτεΐνες-, ένα χαρακτηριστικό κοινό για διαφορετικούς τύπους νάρκης. Η ρύθμιση της διάπαυσης, αποτελεί ένα πολύ ενδιαφέρον αναπτυξιακό πρόβλημα (Denlinger et al., 2001).

Μορφές της γονιδιακής έκφρασης: Η έκφραση γονιδίων που συνδέονται με τη διάπαυση, παρατηρήθηκε σε διάφορους ιστούς του σώματος. Η δραστηριότητα στον εγκέφαλο είναι ίσως η πιο ενδιαφέρουσα από τις ρυθμιστικές πλευρές, γιατί ο εγκέφαλος λειτουργεί σαν αποθήκη του διαπαυσικού προγράμματος. Από συγκρίσεις πρωτεϊνών του εγκεφάλου σε διαπαυσιακά και μη άτομα, δύο συμπεράσματα υπάρχουν σχετικά με τη διάπαυση: α. Η διάπαυση αναγκάζει πολλά γονίδια να σιωπήσουν. Β. Ένας μικρός αριθμός γονιδίων εκφράζεται αποκλειστικά κατά το διάστημα αυτό (Denlinger et al., 2005).

### **1.5.3 Έκφραση γονιδίων αποκλειστικά κατά την διάπαυση**

Το πρώτο τέτοιο γονίδιο που απομονώθηκε, είναι αυτό που κωδικοποιεί μια μικρή heat shock πρωτεΐνη, 23 – kDa. Σε μη διαπαύοντα άτομα, το μετάγραφο είναι υψηλά εκφρασμένο σε σχέση με την περιβαλλοντική καταπόνηση, όπως είναι το θερμό και ψυχρό σοκ. Σε διαπαύουσες νύμφες, το γονίδιο ενεργοποιείται κατά την είσοδο στη διάπαυση. Η έκφραση του ανέρχεται κατά τη διάρκεια της διάπαυσης, ακόμα και σε συνθήκες μη καταπόνησης, όπως είναι οι 200C. Έξι ώρες μετά τον τερματισμό της διάπαυσης, έχει απενεργοποιηθεί. Η ενεργοποίηση του hsp23 κατά τη διάρκεια της διάπαυσης, οδηγεί σε μια ενεργοποίηση επιπρόσθετων heat shock πρωτεϊνών, οι περισσότερες των οποίων είναι υψηλά συντηρημένες και ανήκουν στην οικογένεια 70-kDa. Μέλη αυτής της οικογένειας εκφράζονται σε όλα τα επίπεδα στη διάρκεια της διάπαυσης και η αντίδραση τους είναι ταυτόσημη με αυτή των hsp23. Το επίπεδο έκφρασης αλλάζει ανάλογα με τον ιστό, αλλά και για τις δύο, μεγαλύτερη έκφραση εμφανίζεται στον εγκέφαλο και ακολούθως στην επιδερμίδα, ενώ πολύ μικρή στο λίπος. Πάντως, δεν ενεργοποιούνται όλα τα γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες καταπόνησης.



Για παράδειγμα, το γονίδιο που κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 90-kDa, απενεργοποιείται στη διάρκεια της διάπαυσης. Αυτό δείχνει τον ξεχωριστό ρόλο των διάφορων heat shock πρωτεϊνών κατά τη διάρκεια της διάπαυσης. Ποιός ακριβώς είναι ο ρόλος των πρωτεϊνών αυτών, δεν είναι ακόμα γνωστό, αλλά δύο είναι πιθανοί: α. Οι hsp23 και hsp70 ίσως εξασφαλίζουν ένα ψυχρό-προστατευτικό ρόλο. Σαν μοριακά τσαπερόνια, οι heat shock πρωτεΐνες υπεισέρχονται στον κύριο μεταβολισμό των ενζύμων ή στη δομή των πρωτεϊνών στη διάρκεια των χαμηλών θερμοκρασιών του χειμώνα. β. Εναλλακτικά, οι heat shock πρωτεΐνες, ίσως συμβάλουν άμεσα στη ρύθμιση της διάπαυσης, εξασφαλίζοντας ένα συγκροτημένο κυτταρικό κύκλο, ο οποίος συνδέεται με την έκφραση των δύο αυτών μικρών heat shock πρωτεϊνών (Denlinger et al., 2001).

Γονίδια που υπολειτουργούν κατά τη διάπαυση: Η μιτοχονδριακή πρωτεΐνη των φωσφορικών αλάτων μεταφοράς, ανήκει στην κατηγορία αυτή. Η έκφραση των hsp90 φαίνεται να ενεργοποιείται όταν εμφανιστούν εκδυστροϊδή και απενεργοποιείται όταν εξαφανιστούν.

Γονίδια που εκφράζονται νωρίς στη διάπαυση: Ένα γονίδιο που εκφράζεται νωρίς στη διάπαυση, είναι το pScD41. Το γονίδιο αυτό απομονώθηκε και η ακολουθία των νουκλεοτιδίων του έδειξε ότι είναι ένα ρετροτρανσπόζον. Το samui, ένα ψυχρό-συνδεδεμένο γονίδιο στο μεταξοσκώληκα, εκφράζεται επίσης νωρίς στη διάπαυση. Σ' αυτό το είδος, μια περίοδος ψύχους δύο μηνών στους 5ο C, είναι απαραίτητη για τον τερματισμό της διάπαυσης. Στις 30 ημέρες, εμφανίζεται η δράση του γονιδίου της υδρογονάσης (sdh). Η SDH χρησιμεύει στο μετασχηματισμό του σορβικού οξέος σε γλυκογόνο, τα ενεργειακά αποθέματα του οποίου απαιτούνται κατά το τέλος της διάπαυσης, για την ολοκλήρωση της εμβρυογένεσης.

Γονίδια που εκφράζονται αργά στη διάπαυση: Ένα από τα καλύτερα μελετημένα γονίδια αυτού του διαστήματος, είναι αυτό που κωδικοποιεί τη σορπιτόλ-δε-υδρογονάση (SDH, Sorbitol dehydrogenase). Ένα άλλο γονίδιο, που κωδικοποιεί τη ντεφενσιν, μια πρωτεΐνη γνωστή για την αντιμικροβιακή της δράση, ενεργοποιείται αυτό το διάστημα. Η έκφραση της αυξάνει μετά παραμονή αρκετού χρόνου στους 2ο C, και παραμένει σ' αυτό το επίπεδο όσο παραμένουν οι λάρβες σε χαμηλή θερμοκρασία. Μια άλλη πρωτεΐνη του κεντρικού νευρικού συστήματος (CNS), σε ένα νυκτόβιο (*Galleria mellonella*), εμφανίζεται στον εγκέφαλο και μάλλον συνδέεται με την επανάληψη της ανάπτυξης (Denlinger et al., 2005).

Τερματισμός της διάπαυσης: Όταν τερματίζεται η διάπαυση, μπορούμε να δούμε πολλές αλλαγές στην εικόνα έκφρασης των γονιδίων. Τα έντομα τάχιστα αυξάνουν τη μεταβολική ταχύτητα και την ανάπτυξη τους. Μεγαλύτερο ενδιαφέρον έχουν τα σήματα τα οποία ξεκινούν την έναρξη του τερματισμού. Σε κάποια είδη, με τοπική εφαρμογή εξανίου, τα έντομα βγαίνουν από τη διάπαυση και έτσι μπορούμε άμεσα να τα μελετήσουμε.

Έτσι, μετά απ' αυτή την εφαρμογή, φάνηκε να εμφανίζονται απενεργοποιημένες οι δύο heat shock πρωτεΐνες, ενώ εμφανίζονται άλλες, όπως είναι η EcR. Πάντως, τα μοριακά γεγονότα που συμβαίνουν νωρίς στον τερματισμό της διάπαυσης είναι πολύ λίγο γνωστά. Προ-θωρακοτροπικές ορμόνες (PTTH) καθώς και άλλες ορμόνες που διευθύνουν τα γεγονότα του τερματισμού είναι γνωστές, αλλά τα κρίσιμα ερωτήματα εστιάζονται σε γεγονότα που συμβαίνουν στον εγκέφαλο, που καθοδηγεί την έκλυση αυτών των ορμονών στον κατάλληλο χρόνο, απαλλάσσοντας το έντομο από την αναπτυξιακό περιορισμό που βρισκόταν στο διάστημα της διάπαυσης.

Ο τερματισμός της διάπαυσης δεν είναι εντελώς κατανοητός και διαφέρει ανάμεσα στα είδη. Ένας κύκλος γεγονότων που συμβαίνουν στη διάρκεια της διάπαυσης του *S. crassipalpis*, δείχνει τη συσσώρευση κάποιων περιοδικά εκφρασμένων γονιδίων που συνδέονται με τη σύνθεση της JH καθώς και με την παραγωγή μεταβολικών ενζύμων που συμμετέχουν στην κατανάλωση του οξυγόνου. Ένα τέτοιο γονίδιο, είναι αυτό που κωδικοποιεί για την 60S ριβοσωμική πρωτεΐνη P0 (60S acidic ribosomal protein P0), που είναι μια ενδονουκλεάση. Το γονίδιο εκφράζεται έντονα στις ημέρες με χαμηλή κατανάλωση οξυγόνου (Denlinger et al., 2005).

#### 1.5.4 Ενδοκρινική ρύθμιση της διάπαυσης

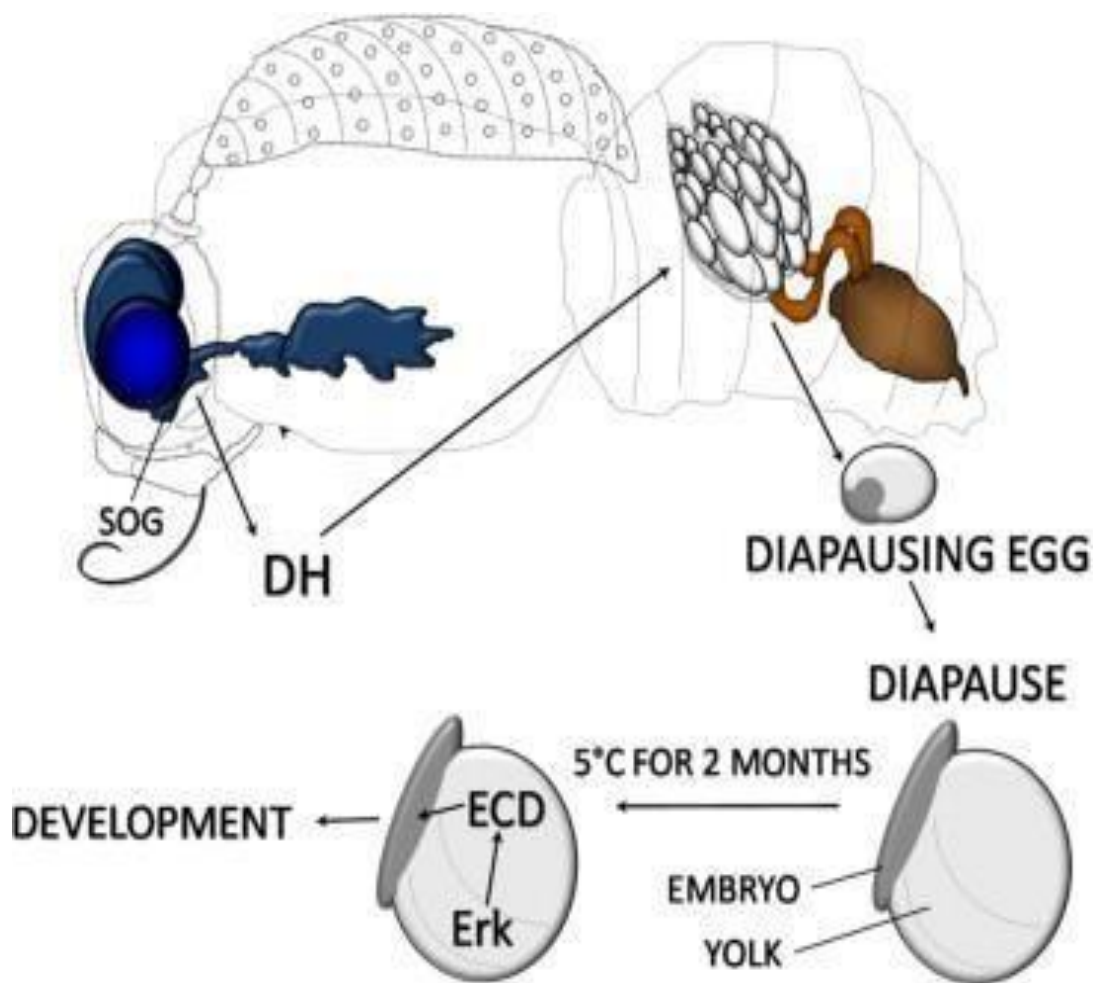
Όταν έχει επιτευχθεί το σωστό στάδιο διάπαυσης, το έντομο ξαναρχίζει την ανάπτυξη του, ενεργοποιώντας ένα νέο μεταβολικό μηχανισμό, ο οποίος τον «προμήθευε κατά τη διάρκεια της μεταβολικής καταστολής και τότε «αποφασίζει» το σωστό χρόνο, για επανάληψη της οργάνωσης του. Θα δούμε κάποια ορμονικά συστήματα, τα οποία κατευθύνουν τη διάπαυση και τη γονιδιακή έκφραση, που συνδέεται με το στάδιο αυτό. Αρκετές ορμόνες-κλειδιά χρησιμεύουν σαν ρυθμιστές της διάπαυσης, αλλά ακριβώς ποιες ορμόνες εμπλέκονται, εξαρτάται από το είδος του εντόμου και το αναπτυξιακό στάδιο στο οποίο συμβαίνει.

Η εμβρυϊκή διάπαυση, ελέγχεται με διάφορους τρόπους, με καλύτερη μελετημένη αυτή που αφορά το μεταξοσκώληκα (*B. mori*) (Εικ. 19). Σε αυτό το είδος, η διάπαυση επηρεάζεται από τη δράση της ορμόνης διάπαυσης. Η ορμόνη διάπαυσης, που είναι ο ρυθμιστής της εμβρυϊκής διάπαυσης στο *B. mori*, είναι ένα νευροπεπτίδιο που κωδικοποιείται από το ίδιο γονίδιο με το νευροπεπτίδιο της βιοσύνθεσης της φερομόνης. Αυτό το γονίδιο, εκφράζεται κατά το χρόνο εισαγωγής στη διάπαυση και υπάρχουν ενδείξεις ότι η έκφραση του mRNA, προάγεται από τα υψηλά επίπεδα ντοπαμίνης, που εμφανίζονται στο κεντρικό νευρικό σύστημα και στην αιμολέμφο των θηλυκών, που παράγουν διαπαύοντες απογόνους. Η ορμόνη διάπαυσης διεγείρεται από τη

δράση της τρεχαλόζης στα αναπτυσσόμενα ωάρια. (Yamashita, 1996).

Η δράση της τρεχαλόζης, δημιουργεί υψηλά επίπεδα γλυκογόνου στα ώριμα ωάρια, απαραίτητη προϋπόθεση για διάπαυση. Το γλυκογόνο μετατρέπεται τότε σε γλυκερόλη και σορβιτόλη. Μια πρωτεΐνη-κινάση, που εξαρτάται από  $Ca^{2+}$ , υπεισέρχεται όπως φαίνεται. Η πρωτεΐνη κινάση, είναι ένας παρεμποδιστής, που ελαττώνει τη δραστηριότητα της τρεχαλόζης. Η ορμόνη της διάπαυσης, μόνο στο *B. mori* εμφανίζεται ως ρυθμιστής της διάπαυσης. Στο έντομο *Lymantria dispar*, η διάπαυση υποχρεώνεται να γίνει στα τελευταία στάδια ανάπτυξης, αφού έχει ολοκληρωθεί η εμβρυϊκή ανάπτυξη. Αυτή η διάπαυση, παραμένει μέσω της παραγωγής εκδυστεροϊδών, η ισχύς των οποίων ελαττώνεται, πριν η ανάπτυξη προχωρήσει (Denlinger et al., 2005).

Ο κεντρικός ρόλος των εκδυστεροϊδών στη ρύθμιση της διάπαυσης δείχνει, ότι γονίδια που συνδέονται με τη δράση τους, ίσως να είναι αποφασιστικά για τη ρύθμιση της διάπαυσης. Στους ιστούς-στόχους, τα εκδυστεροϊδή συνδέονται με τον υποδοχέα της εκδυσόνης (EcR) και διμερίζονται με το ultraspiracle (USP). Με την έναρξη της διάπαυσης, το EcR ενεργοποιείται και παραμένει μέχρι το τέλος της, ενώ το USP εκφράζεται εντονότερα, όταν τελειώνει η διάπαυση, που σημαίνει ότι μπορεί να σχετίζεται με διεργασίες που οδηγούν σε τερματισμό της (Denlinger et al., 2005).



**Εικόνα 20.** Μητρικός έλεγχος της εμβρυϊκής διάπαυσης στο μεταξοσκώληκα *Bombyx mori*. Η ορμόνη διάπαυσης (**DH**=Diapause Hormone) παράγεται από το γάγγλιο suboesophageal (**SOG**=Suboesophageal ganglion) της μητέρας που αναπτύσσεται σε συνθήκες μεγάλης ημέρας και υψηλής θερμοκρασίας, το καλοκαίρι. Τα DH σήματα στις ωοθήκες, επάγουν την ανάπτυξη των προορισμένων για διάπαυση αυγών. Σε αυτά τα αυγά, η εμβρυϊκή διάπαυση συμβαίνει μετά την ανάπτυξη του κεφαλικού λοβού και την ακόλουθη κατάτμηση στο μεσόδερμα. Τα έμβρυα χρειάζονται 2 -3 μήνες σε χαμηλές θερμοκρασίες (περίπου 5oC) για να μπορούν να συλλάβουν την διάπαυση και συνεχίζουν την ανάπτυξη σε υψηλή θερμοκρασία. Στη φάση αυτή, είναι ενεργοποιημένη η πορεία **ERK** (signal-regulated kinase (ERK)) στα κύτταρα του κρόκου και προάγει την παραγωγή των της 20-OH εκδυσόνης (**ECD**, Ecdysone). Τα σήματα ECD προκαλούν στο έμβρυο την απομάκρυνση των εμποδίων που επιβάλλονται προς ανάπτυξη (Yamashita, 1996).

### 1.5.5 Μηχανισμοί της διάπαυσης

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, ο παράγων που κύρια ρυθμίζει την είσοδο των ειδών σε διάπαυση είναι η φωτοπερίοδος. Αυτό σημαίνει ότι τα έντομα μπορούν να διακρίνουν τις διάφορες φάσεις και να ρυθμίζουν την αναστολή ή μη της ανάπτυξης τους. Το γεγονός ότι τα έντομα έχουν την ικανότητα να ξεχωρίζουν τη μικρή από τη μεγάλη ημέρα, έχει οδηγήσει αρκετούς ερευνητές στη σκέψη ου πιθανόν να υπάρχει ένα είδος εσωτερικού και κληρονομήσιμου μηχανισμού, ο οποίος επιτρέπει τη μέτρηση της διάρκειας της φωτόφασης ή σκοτόφασης ή και των δύο και την αντίδραση σ' αυτές τις συνθήκες με την αλλαγή του μεταβολισμού τους. Η λειτουργία ενός τέτοιου μηχανισμού προϋποθέτει α) την ύπαρξη κάποιων φωτοδεικτών στα έντομα για τη διαπίστωση της νύκτας ή ημέρας, β) την παρουσία ενός ρολογιού που να μετρά τη διάρκεια των φάσεων της φωτοπεριόδου και να συνδυάζει αυτές τις πληροφορίες και γ) τη ρύθμιση των μεταβολικών διαδικασιών για την είσοδο σε διάπαυση, μέσω ενός τελικού συστήματος ορμονών.

Η διάπαυση, όπως και άλλες λειτουργίες (αναπαραγωγή, μεταβολισμός κλπ) των εντόμων, ελέγχεται από το ενδοκρινικό σύστημα. Το σύστημα αυτό συγκροτούν αδένες και ειδικά κύτταρα, που εκκρίνουν ορμόνες, δηλαδή χημικούς “αγγελιοφόρους” που σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις δρουν και επηρεάζουν τις φυσιολογικές αντιδράσεις του εντόμου. Οι πηγές των ορμονών που παίζουν κάποιο ρόλο στο φαινόμενο της διάπαυσης είναι: τα νευροεκκριτικά κύτταρα του εγκεφάλου (εκκρίνουν την ορμόνη του εγκεφάλου -brain hormone), οι προθωρακικοί αδένες (εκκρίνουν την εκδυσόνη -ecdysone), το ζεύγος των αδένων που ονομάζεται corpora allata (έκκριση της νεανικής ορμόνης - juvenile hormone) και το ζεύγος των corpora cardiaca. Ανάλογα με το στάδιο στο οποίο εκδηλώνεται η διάπαυση, οι νευροορμονικοί μηχανισμοί που είναι υπεύθυνοι γι' αυτήν, είναι διαφορετικοί. (Denlinger et al., 2005).

### 1.6 Πρωτεΐνες καταπόνησης

Κατά τη 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 θερμοεπαγόμενων 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 θερμοεπαγόμενες 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 θερμοεπαγόμενων γονιδίων. Είναι επίσης πολύ πιθανό το σύστημα αντίληψης της καταπόνησης σε κυτταρικό επίπεδο να είναι η απόκλιση από την πρωτεϊνική ομοιότητα, 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 θερμοεπαγόμενων πρωτεϊνών είναι η ιδιότητα των μοριακών συνοδών (molecular chaperones) που είναι απαραίτητοι για την διατήρηση ή την αντικατάσταση της πρωτεϊνικής ομοιότητας. 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 ομοιότητας 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 αυτό-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 πολυπεπτιδικών αλυσίδων *en vivo* γεννάστε και σε πολύ υψηλή συγκέντρωση ολικής πρωτεΐνης. Παράλληλα κατά τη διάρκεια της μετάφρασης ή της μεταφοράς σε κάποια μεμβράνη, τα νεοσυντιθέμενα πολυπεπίδια 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 πολυπεπίδιο 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 ύπαρξής τους, είτε κατά την σύνθεσή τους, τη μεταφορά τους σε κάποιο υποκυτταρικό διαμέρισμα είτε κατά την αποδόμησή τους (Denlinger et al., 2001).

### 1.6.1 Οικογένειες θερμοεπαγόμενων πρωτεϊνών και ο ρόλος τους στον οργανισμό των εντόμων

Οι θερμοεπαγόμενες πρωτεΐνες ομαδοποιούνται σε 3 κατηγορίες ανάλογα με το μοριακό τους βάρος: 90kDa ή HSP90, 70kDa ή HSP70, και τις μικρές θερμοεπαγόμενες 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 σιγάλα διαμεταγώγισης 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 πολυπεπίδια 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 κρυσταλλοειδή πρωτεΐνη την  $\alpha$ -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 φωσφορυλίωσης 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).

### **1.7 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 των τίτλο τους. Ανήκουν στην ευρύτερη οικογένεια των  $\alpha/\beta$  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 εμβρυϊκά 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 ίδιου 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 έκφρασης 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* (Campbell et al., 1998), έχουν αναφερθεί στοιχεία που υποστηρίζουν την ύπαρξη περισσότερων 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 πρωτεΐνης. 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 πρωτεΐνης, αλλά ενίσχυε τα επίπεδα μεταγραφής του γονιδίου, στις

σειρές εκείνες που επιλέχθηκαν για υψηλή JHE δραστηριότητα.

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

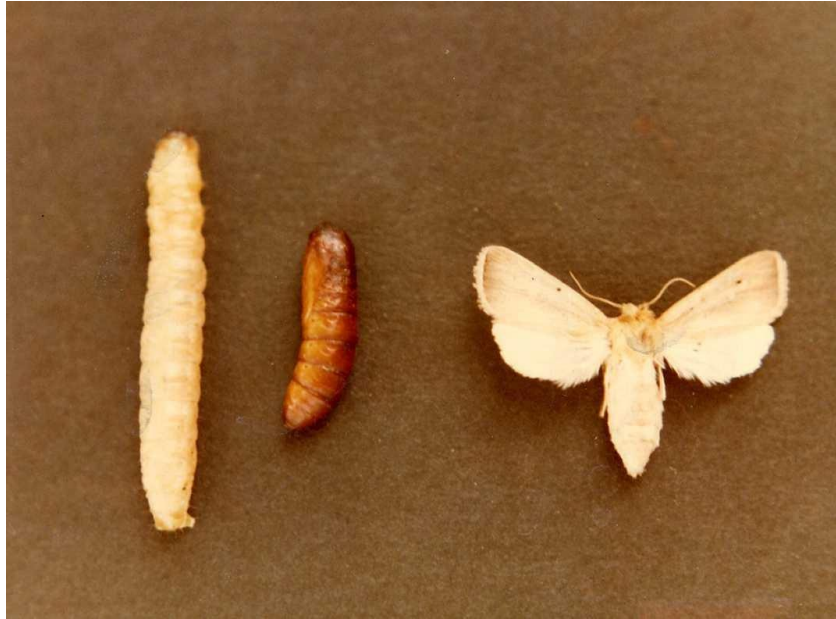
### 1.8 Ταξινόμηση του εντόμου *Sesamia nonagrioides*

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 διαφορών 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:

<b>Κλάση :</b>	Insecta
<b>Τάξη :</b>	Lepidoptera
<b>Υπόταξη :</b>	Heteroneura
<b>Οικογένεια :</b>	Noctuidae
<b>Γένος :</b>	<i>Sesamia</i>
<b>Είδος :</b>	<i>Sesamia nonagrioides</i> (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 21.** Προνύμφη, νύμφη και ακμαίο του εντόμου *S. nonagrioides*.



**Εικόνα 22.** Αυγά του εντόμου *S. nonagrioides* σε καλαμπόκι.

### **1.9 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 η δισφαινόλη (BPA) 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 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 επικινδυνότητας τους για το έντομο. Στην παρούσα μελέτη θα εκτιμηθούν οι

επιδράσεις της δυσφαινόλης στα αναπτυξιακά στάδια του εντόμου καθώς και στην αναπαραγωγή. Για την μοριακή μελέτη της δράσης της δυσφαινόλης θα χρησιμοποιήσουμε τα γονίδια των heat shock proteins (Hsps) 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.

Ευελπιστούμε ότι με την μελέτη της επίδρασης της BPA σε φωτοπερίοδο 16 ώρες φωτόφαση-8 ώρες σκοτόφαση και σε 10 ώρες φωτόφαση-14 ώρες σκοτόφαση (διάπαυση) στην *S. nonagrioides* θα καταλήξουμε σε χρήσιμα συμπεράσματα για τα όρια επικινδυνότητας 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  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , 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 φύλων 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 χαστροπικό παράγοντα που αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες, βοηθώντας έτσι την λύση των κυττάρων. Η αποδιατακτική του ικανότητα είναι χρήσιμη για την απομόνωση των RNAs αφού αναστέλλει την δράση των RNAsών (και των DNAsών) καταστρέφοντάς τες. Έτσι ολιγοπληθή και ευάλωτα RNA μόρια όπως είναι τα mRNAs προστατεύονται καλύτερα από την δράση των RNAsών 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 Φλωροφόρμιο:1000 µl TRIzol.
- Ακολουθεί έντονη ανακίνηση και το eppendorf τοποθεείται στον πάγο για 10 λεπτά.
- Στη συνέχεια το μίγμα φυγοκεντρείται στις 13.000 rpm στους 4oC για 20
- 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 TRIzol.
- 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 μηχανήμα 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 υπολειμάτων 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 MgCl<sub>2</sub> και 10mM CaCl<sub>2</sub>.

Για 25 µg RNA:

- Σε eppendorf 1.5 ml προστίθενται 5 µl 10X DNase buffer [400mM Tris- HCl (pH 8.0), 100mM MgSO<sub>4</sub> και 10mM CaCl<sub>2</sub>].

- Προσθήκη 5  $\mu\text{l}$  DNase (1U/ $\mu\text{l}$ ) (40units).
- 1  $\mu\text{l}$  RNase inhibitor (40U) (1 unit αναστέλλει το 50% της δραστηριότητας 5 ng RNase).
- ddH<sub>2</sub>O μέχρι τελικό όγκο τα 50  $\mu\text{l}$ .
- Ακολουθεί επώαση στους 37°C για 60 min.
- Αύξηση του όγκου στα 400  $\mu\text{l}$  με προσθήκη αντίστοιχης ποσότητας ddH<sub>2</sub>O (350  $\mu\text{l}$ ).
- Phenol/Chloroform treatment.

### 2.2.3 Phenol / Chloroform treatment

Για 400  $\mu\text{l}$  δείγματος:

- Προσθήκη 400  $\mu\text{l}$  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  $\mu\text{l}$  δείγματος: 200  $\mu\text{l}$  phenol:200  $\mu\text{l}$  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<sub>3</sub>COONa 3M pH=5.2, 2.5 όγκοι 100% v/v αιθανόλη και αν πρόκειται για RNA αφεύεται O/N στους -20°C και φυγοκεντρείται την επομένη στις 13.000 rpm για 30 min στους 4°C ενώ εάν πρόκειται για DNA φυγοκεντρείται άμεσα στις 13.000 rpm για 30 min στους 4°C.
- Τα ιζήματα αφού αφαιρεθεί η αιθανόλη και αφευθούν να στεγνώσουν επαναδιαλύονται σε 15-30  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O.



## 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  $\lambda_{max}=260$  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  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O φωτομετρώνται στα 260 nm και το φωτόμετρο μηδενίζεται.
- Ακολουθεί φωτομέτρηση στα 240 και 280 nm και καταγράφονται οι Abs.
- 5  $\mu$ l δείγματος διαλύεται σε 495  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O 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:

$$[RNA](\mu\text{g/ml}) = \text{ABS}_{260\text{nm}} \times 40\mu\text{g/ml} \times \text{dilution factor}$$

$$[DNA](\mu\text{g/ml}) = \text{ABS}_{260\text{nm}} \times 50\mu\text{g/ml} \times \text{dilution factor}$$

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  $\mu$ l δείγματος σε 495  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O δίνει dilution factor της τάξης του 100.

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

Το ένζυμο SuperScript™II Reverse Transcriptase είναι μία μεταγραφάση με μειωμένη RNaseH δραστηριότητα και υψηλή θερμική αντοχή. Είναι ένα ένζυμο που έχει απομονωθεί από μετασηματισμένα 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  $\mu$ l (500 $\mu$ g/ml) από 10 $\mu$ M OligodT12-18
- 1.5  $\mu$ g ολικό RNA
- 5  $\mu$ l dNTPs, 10mM
- ddH<sub>2</sub>O μέχρι τελικό όγκο τα 12  $\mu$ l

Το δείγμα θερμαίνεται στους 65 $^{\circ}$ C για 5 min και στην συνέχεια τοποθετείται αμέσως στον πάγο.

### **Παρασκευή cDNA:**

- Προστίθενται 4  $\mu$ l από 5x First Stand Buffer (250mM Tris-HCl, pH 8.3 σε θερμοκρασία δωματίου, 375mM KCl, 15mM MgCl<sub>2</sub>) και 2  $\mu$ l από 0,1M DTT.
- Για την παρεμπόδιση των RNασών προστίθεται 1  $\mu$ l από το ένζυμο RNase OUT [40 unit/ $\mu$ l, (Cat. No. 10777-019)].
- Τέλος προστίθεται 1  $\mu$ l (200 units) από το ένζυμο Superscript II RT και ddH<sub>2</sub>O μέχρι τελικό όγκο τα 20  $\mu$ l.

- Γίνεται επώαση σε συσκευή PCR για 60 min στους 42°C και για 15 min στους 70°C για την παύση της αντίδρασης.

Το προϊόν της RT για να χρησιμοποιηθεί περαιτέρω σε αντιδράσεις PCR πρέπει να διαλυθεί με ddH<sub>2</sub>O 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 37°C 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 ddH<sub>2</sub>O.

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 ddH<sub>2</sub>O.

### 2.2.7 Σχεδιασμός εκκινήτων

#### 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:  $Tm = 64.9^{\circ}\text{C} + 41^{\circ}\text{C} \times (\text{αριθμός G's και C's στον εκκινητή} - 16.4)/N$  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 Mg<sup>2+</sup> (τελική συγκέντρωση 1X, 1.5mM Mg<sup>2+</sup>)
- 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).
- ddH<sub>2</sub>O μέχρι τελικό όγκο τα 50 μl.

- Τα συστατικά αναμιγνύονται με Vortex και φυγοκεντρώνται για λίγα δευτερόλεπτα στις 13.000 rpm.
- Αναλύονται σε πηκτή αγαρόζης ή/και τοποθετούνται σε καταψύκτη - 20°C.

### 2.2.9 Παρασκευή διαλυμάτων ηλεκτροφόρησης

Για την ηλεκτροφόρηση νουκλεϊνικών οξέων σε πηκτή αγαρόζης είναι αναγκαία η παρασκευή κάποιων επιπρόσθετων βοηθητικών διαλυμάτων. Στα 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. Στα 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 CH<sub>3</sub>COOH και ddH<sub>2</sub>O 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 ddH<sub>2</sub>O.
- 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 ddH<sub>2</sub>O.

### **10x loading dye:**

- Σε πλαστικό falcon 10 ml προστίθενται 2.5% w/v μπλέ της βρωμοφαινόλης (BPB), 2.5% w/v κυανού του ξυλενίου (XC) και ddH<sub>2</sub>O μέχρι συμπλήρωσης του επιθυμητού όγκου. Για 10 ml 10X loading dye προστίθενται 0.25 g Bromophenol blue και 0.25 g Xylene cyanol σε 10 ml ddH<sub>2</sub>O.

### **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 ddH<sub>2</sub>O 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 μορίων.

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 ddH<sub>2</sub>O που περιέχει 50X TAE σε συγκέντρωση 1X.
- Το διάλυμα θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι πλήρους διάλυσης της αγαρόζης και ομογενοποίησής της.
- Προστίθεται βρωμιούχο αιθίδιο 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 αφεύεται 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 ddH<sub>2</sub>O).
- 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 επιπέδων φθορισμού της χρωστικής SYBR Green, η οποία έχει την ικανότητα να φθορίζει κατά την πρόσδεση της στα δίκλιωνα 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 προσδέεται 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 έναρξη 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 προσδέεται σε οποιοδήποτε δίκλινο μόριο DNA, όπως διμερή εκκινητών ή ανεπιθύμητα προϊόντα της αντίδρασης του PCR. Λόγω αυτού του φαινομένου 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  $\mu$ l
- cDNA (χρησιμοποιείται ως εκμαγείο): 1  $\mu$ l
- Μίγμα (Forward+Reverse) εξειδικευμένων εκκινητών (0.5  $\mu$ M): 4  $\mu$ l

### 2.2.12 Ενίσχυση και ποσοτικός προσδιορισμός ακολουθιών cDNA

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό της έκφρασης των γονιδίων *SnoHsp83*, *SnoHsc70*, *SnoHsp20.8*, *SnoEcrRT* και *SnoUspRT* 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*, *SnoHsp20.8*, *SnoEcrRT* και *SnoUspRT* χρησιμοποιώντας τους εκκινητές 3'F/3'R, ή τμήμα του γονιδίου της  $\beta$ -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*, *SnoHsp20.8*, *SnoEcrRT* και *SnoUspRT* κανονικοποιήθηκε με τα επίπεδα έκφρασης της  $\beta$ -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 και RH-5992**

### **2.3.1 Δισφαινόλη στην τροφή**

Μετά την εκκόλαψη, προνύμφες 2<sup>ου</sup> σταδίου της *S. nonagrioides* τοποθετούνται σε πλαστικά διαφανή κουτιά σε θρεπτικό τεχνητό υπόστρωμα, σε ομάδες 20-30 ατόμων. Για την πραγματοποίηση του πειράματος 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° C μέχρι την μοριακή τους ανάλυση. Η διαδικασία επαναλήφθηκε 3 φορές με προνύμφες ίδιου instar και ίδιο εύρος δειγματοληψιών.

### **2.3.2 Δισφαινόλη και RH-5992 στην τροφή**

Για την πραγματοποίηση του πειράματος μας, χρησιμοποιήσαμε 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις RH-5992 (0,1 μg/L, 1 μg/L και 10 μg/L) και συνδιασμό δισφαινόλης και RH-5992 αντίστοιχα (1μg/L - 0,1 μg/L, 10μg/L - 1 μg/L και 100μg/L - 10 μg/L).

Όπως και παραπάνω ακολουθήσαμε τον ίδιο χειρισμό με μετρήσεις του σωματικού βάρους να γίνονται κάθε 3 μέρες και η διάρκεια του πειράματος ήταν 20 μέρες και με το πέρας των παρατηρήσεων 3 άτομα από κάθε χειρισμό διατηρήθηκαν στο υγρό άζωτο και αποθηκεύτηκαν στους -80° C μέχρι την μοριακή τους ανάλυση.

### 2.3.3 Ενέσιμη δισφαινόλη

Προνύμφες του εντόμου που αναπτύσσονταν σε κανονικές συνθήκες εκτροφής, χρησιμοποιήθηκαν για ένεση με δισφαινόλη, σε δύο συγκεντρώσεις, 10μg και 100μg. Οι προνύμφες ήταν στο ίδιο αναπτυξιακό στάδιο, 5<sup>ο</sup> instar και 3<sup>η</sup> 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° 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 και 12 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 1mg, 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,  $\chi^2$  test και one-way ANOVA. Οι διαφορές θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές σε επίπεδο εμπιστοσύνης  $p \leq 0.05$ .

## 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

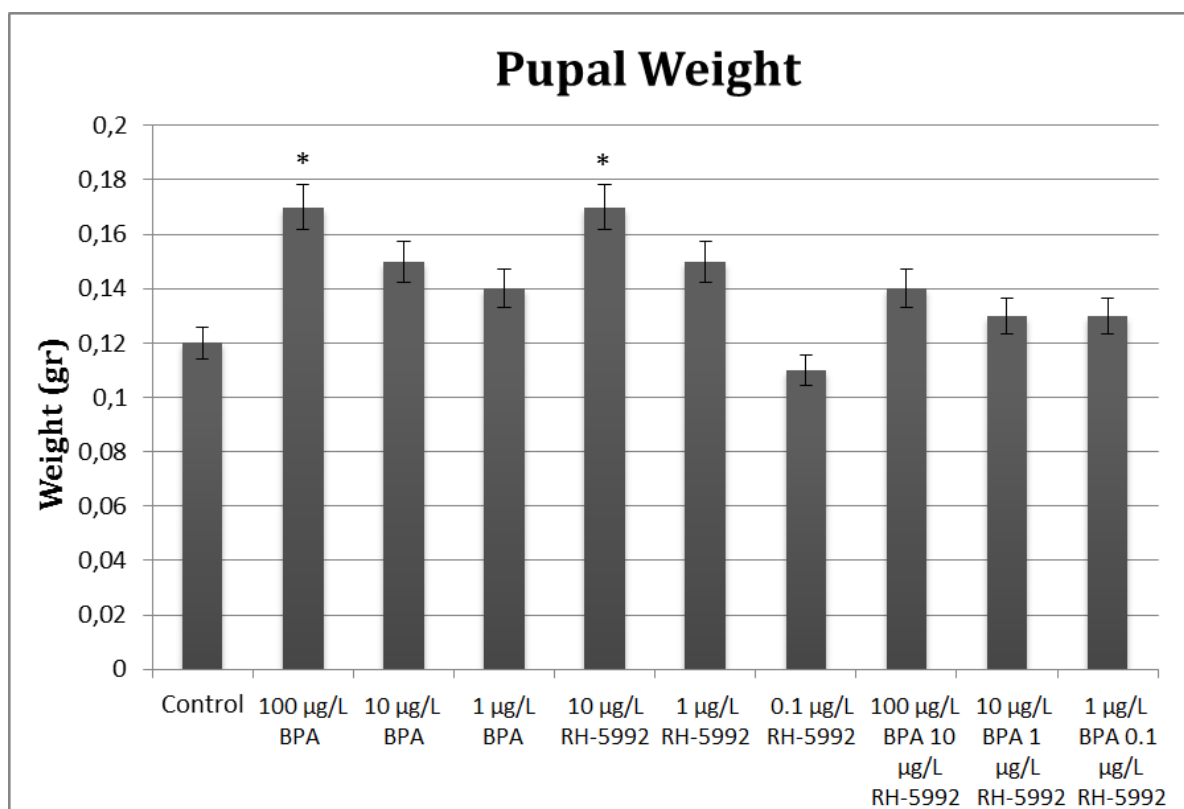
### 3.1 Επίδραση της δισφαινόλης και του RH-5992 στην φυσιολογία των εντόμων

#### 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, RH-5992 και συνδιασμό BPA – RH-5992 και προσδιορίσαμε τις επιπτώσεις της στην ανάπτυξη των προνυμφών, με την μέτρηση του σωματικού τους βάρους.

Μελετήσαμε της πιθανές αλλαγές που προκαλεί η δισφαινόλη και το RH-5992 στα αναπτυξιακά στάδια των προνυμφών και στα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων. Διενεργήθηκαν 3 ανεξάρτητα πειράματα, το καθένα με 100 νύμφες 1<sup>ου</sup> προνυμφικού σταδίου και οι μετρήσεις γινόντουσαν 0, 10, 20 και 30 ημέρες από την έναρξη κάθε πειράματος.

Ως παράμετρος της ανάπτυξης, μετρήθηκε το σωματικό βάρος και το μέγεθος της κεφαλής των προνυμφών *S. nonagrioides* σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στο μέγεθος κεφαλής των προνυμφών (τα δεδομένα δεν περιέχονται). Συγκριτικά με τα έντομα control, οι συγκεντρώσεις των 1  $\mu\text{g} / \text{L}$ , 10  $\mu\text{g} / \text{L}$  BPA εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στις προνύμφες, 32 ημέρες μετά την έναρξη του πειράματος. Είναι ενδιαφέρον ότι στην υψηλότερη δόση των 100  $\mu\text{g} / \text{L}$  BPA και στην συγκέντρωση 1  $\mu\text{g} / \text{L}$  RH-5992 το σωματικό βάρος των προνυμφών αυξήθηκε στατιστικά σημαντικά σε σχέση με τα έντομα control (Πίνακας 2).

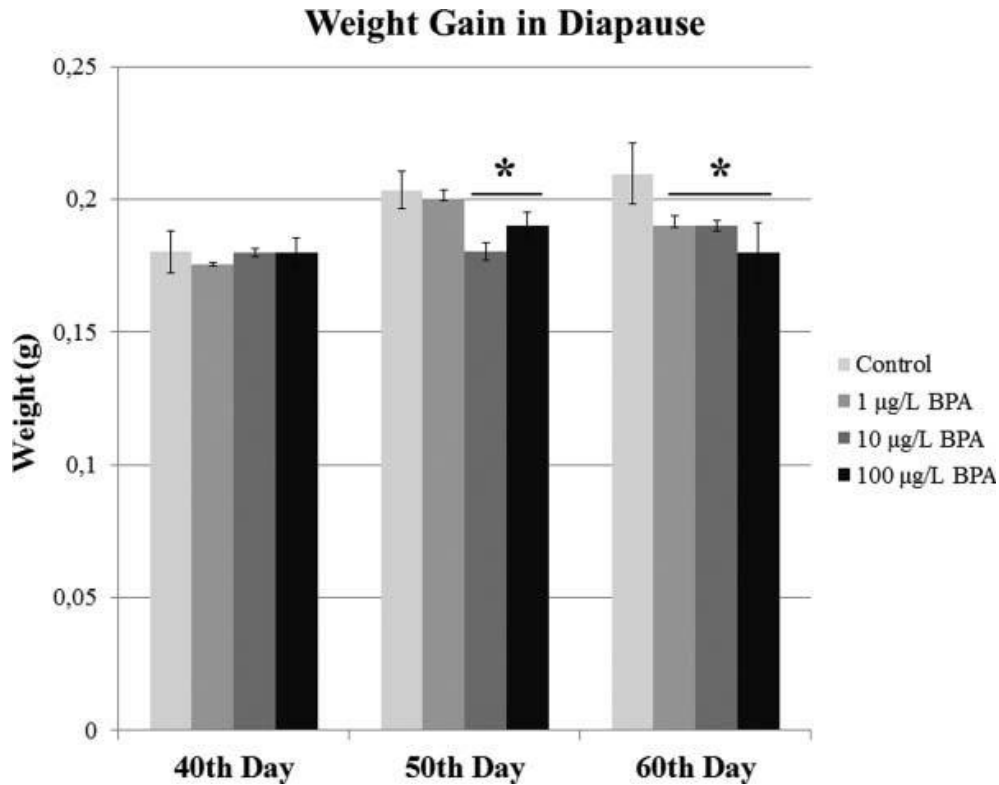


**Πίνακας 2.** Τα έντομα υποβλήθηκαν στους χειρισμούς με BPA και RH-5992 από τις νεοεκκολαφθέντες προνύμφες μέχρι την έναρξη του σταδίου των νυμφών. Τα δεδομένα αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο  $\pm$  τυπική απόκλιση των τριπλών πειραμάτων. \*  $p < 0,05$ , one way apovna δείχνει σημαντικές διαφορές μεταξύ του μάρτυρα και των 100  $\mu\text{g} / \text{L}$  BPA και 10  $\mu\text{g} / \text{L}$  RH-5992.

Αντίστοιχα στην διάπαυση (10L: 14D) μελετήσαμε την επίδραση της δισφαινόλης στο σωματικό βάρος των εντόμων. Το BPA δεν επηρέασε το βάρος των προνυμφών 7<sup>ου</sup> Instar αλλά επηρέασε σημαντικά το βάρος των προνυμφων βαθιάς διάπαυσης κατά το 8<sup>ο</sup> instar (50 ημέρες από την εκκόλαψη) και 9<sup>ο</sup> instar (60 ημέρες από την εκκόλαψη) (**Πίνακας 3**).

Ο μέσος όρος του βάρους ήταν  $204 \pm 7$  mg για τα control την 50<sup>η</sup> ημέρα και  $200 \pm 3$ ,  $180 \pm 3$  και  $190 \pm 5$  mg για τις ομάδες που έλαβαν 1, 10 και 100  $\mu\text{g} / \text{L}$  BPA αντίστοιχα. Την 60<sup>η</sup>

ημέρα, το μέσο βάρος ήταν  $210 \pm 11$  mg για τα control και  $190 \pm 4$ ,  $190 \pm 2$  και  $180 \pm 11$  mg για τις ομάδες που έλαβαν 1, 10 και 100  $\mu\text{g/L}$  BPA, αντίστοιχα (Πίνακας 3). Αυτές οι τιμές διαφέρουν σημαντικά ( $p < 0,05$ ) μεταξύ των control και των χειρισμών με BPA.



**Πίνακας 3.** Η επίδραση του BPA στο σωματικό βάρος των προνυμφών στην διάπαυση (10L: 14D). Τα έντομα τρέφονται συνεχώς με BPA για ολόκληρο τον αναπτυξιακό τους κύκλο. Τα δεδομένα αντιπροσωπεύουν τις μέσες τιμές  $\pm$  τυπική απόκλιση των τριπλών πειραμάτων.  $p < 0,05$ , Student's t-test μεταξύ control και BPA.

Οι προνύμφες που αναπτύχθηκαν από αυτές που εκτέθηκαν και αυτές που δεν εκτέθηκαν στα BPA, RH-5992 και BPA / RH-5992 μετρήθηκαν χωριστά και προσδιορίστηκαν τα ποσοστά μετάβασης τους (Πίνακας 4).

Οι αριθμοί των προνυμφών που έγιναν νύμφες στις ομάδες που έλαβαν BPA ήταν μικρότεροι από αυτούς της ομάδας του control. Τα ποσοστά μετάβασης σε νύμφες βρέθηκαν να είναι 95% στα control, 49% -73% στον χειρισμό με BPA, 58% -88% στον χειρισμό με RH-5992 και 55% -76% στον χειρισμό με BPA / RH-5992. Το αποτέλεσμα one way anova έδειξε ότι οι

χειρισμοί BPA, RH-5992 και BPA / RH-5992 έχουν επίδραση όσον αφορά τον αριθμό των

Groups	Number of larvae	Number of pupae	Rate $\pm$ S.E.	S.D.	p
Control	100	100	100 $\pm$ 1,20185	2,082	0,0001
100 $\mu$ g/L BPA	100	49	49 $\pm$ 0,33333	0,577	
10 $\mu$ g/L BPA	100	64	64 $\pm$ 0,33333	0,577	
1 $\mu$ g/L BPA	100	73	73 $\pm$ 0,33333	0,577	
10 $\mu$ g/L RH-5992	100	58	58 $\pm$ 0,33333	0,577	
1 $\mu$ g/L RH-5992	100	76	76 $\pm$ 0,66667	1,155	
0.1 $\mu$ g/L RH5992	100	88	88 $\pm$ 1,20185	2,082	
100 $\mu$ g/L BPA-10 $\mu$ g/L RH-5992	100	55	55 $\pm$ 0,0,8819	1,528	
10 $\mu$ g/L BPA-1 $\mu$ g/L RH-5992	100	61	61 $\pm$ 0,33333	0,577	
1 $\mu$ g/L BPA-0.1 $\mu$ g/L RH-5992	100	76	76 $\pm$ 0,33333	0,577	

προνυμφών που έγιναν νύμφες ( $p < 0,05$ ).

**Πίνακας 4.** Οι αλλαγές της μετάβασης από προνύμφες σε νύμφες ανάλογα με την έκθεση BPA, RH-5992 και BPA / RH-5992.

Χειρισμοί BPA, RH-5992, BPA/RH-5992, S.E.: Standard Error; S.D.: Standard Deviation

### 3.1.2 Μέσος χρόνος μετάβασης από προνύμφη σε νύμφη

Ο Πίνακας 5 δείχνει την επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων BPA, RH-5992 και BPA / RH-5992 στη διάρκεια από τις προνύμφες μέχρι να γίνουν νύμφες. Η μέση διάρκεια ήταν 32,3 ημέρες για την ομάδα των control και 35 ημέρες για την ομάδα 4. Ωστόσο, η μέση διάρκεια αυξήθηκε σε 36,6 και 37,7 ημέρες στην ομάδα χειρισμού 3 και 2, αντίστοιχα. Αυτό δείχνει ξεκάθαρα ότι ο μέσος χρόνος διάρκειας από προνύμφες μέχρι νύμφες επεκτάθηκε με τους χειρισμούς BPA σε σύγκριση με την ομάδα των control και αυτή η αύξηση ήταν σημαντική ( $p < 0,05$ ).

Με άλλα λόγια, οι χειρισμοί του BPA προκάλεσαν καθυστέρηση στην ανάπτυξη επεκτείνοντας τη μεταβατική περίοδο από τις προνύμφες 1<sup>ου</sup> instar σε νύμφες. Όμως δεν ήταν εμφανές το σχήμα απόκρισης δόσης (**Πίνακας 5**). Ο μέσος χρόνος από προνύμφες 1<sup>ου</sup> instar σε νύμφες ήταν 36,7, 34 και 33,3 ημέρες για τις ομάδες 5, 6 και 7 και 35, 34,3 και 33,3 ημέρες για τις ομάδες 8, 9 και 10, αντίστοιχα. Οι χειρισμοί RH-5992 και BPA / RH-5992 προκάλεσαν επίσης παράταση της περιόδου μετάβασης από προνύμφες 1<sup>ου</sup> instar σε νύμφες και σε σύγκριση με την ομάδα των

control αυτή η αύξηση ήταν σημαντική ( $p < 0,05$ ).

Group No.	Groups	Mean Pupation Time(days)	Significant Differences of the means
1	Control	32,3	1-2** 1-5*
2	100 µg/L BPA	37,7	2-7* 2-10*
3	10 µg/L BPA	36,3	
4	1 µg/L BPA	35	
5	10 µg/L RH-5992	36,7	
6	1 µg/L RH-5992	34	
7	0.1 µg/L RH-5992	33,3	
8	100 µg/L BPA-10 µg/L RH-5992	35	
9	10 µg/L BPA-1 µg/L RH-5992	34,3	
10	1 µg/L BPA-0.1 µg/L RH-5992	33,3	

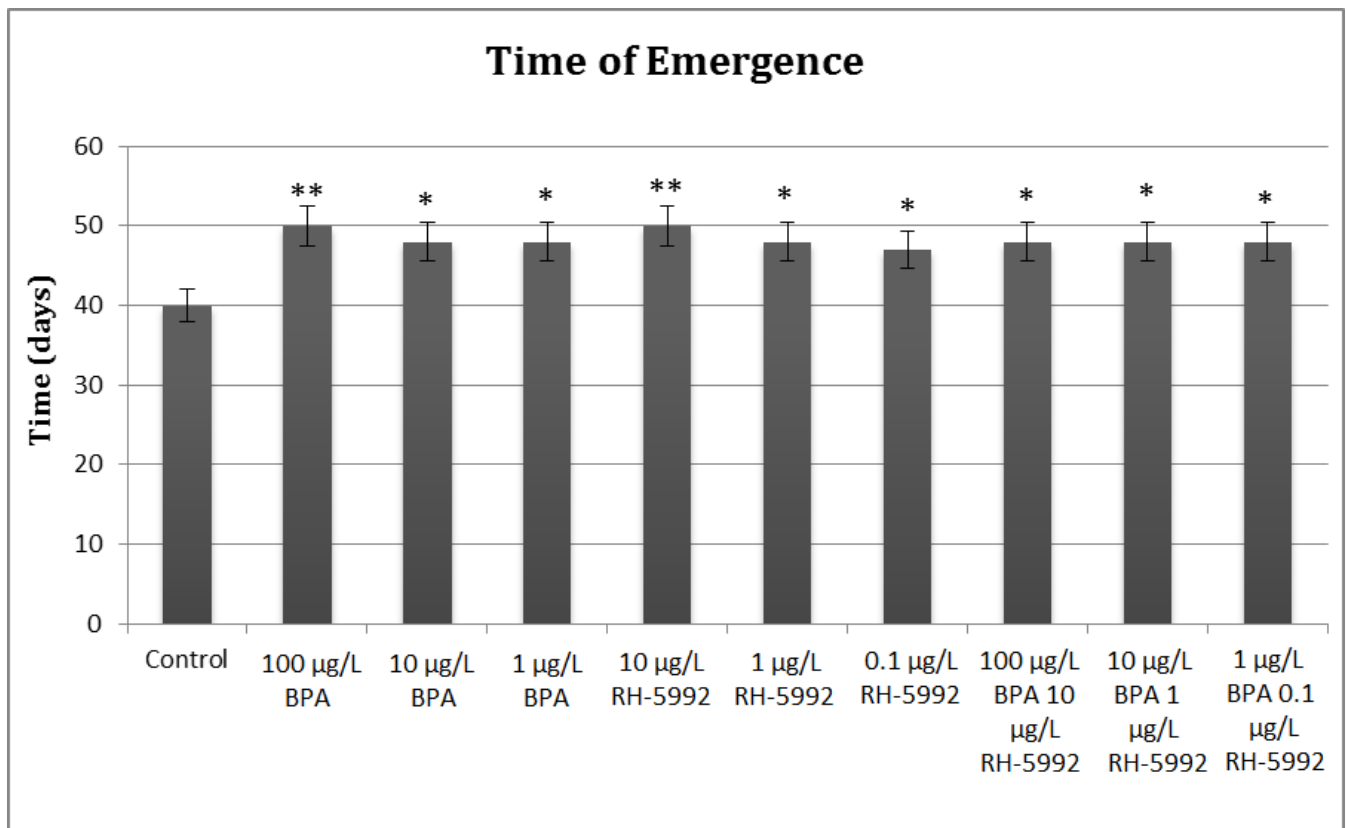
**Πίνακας 5.** Ο μέσος χρόνος από προνύμφες 1<sup>ου</sup> instar σε νύμφες.

Ομάδες χειρισμών \*:  $p < 0.05$

### 3.1.3 Μέσος χρόνος μετάβασης από νύμφη σε ακμαίο και η επι τοις % επιτυχή μετάβαση σε ακμαίο

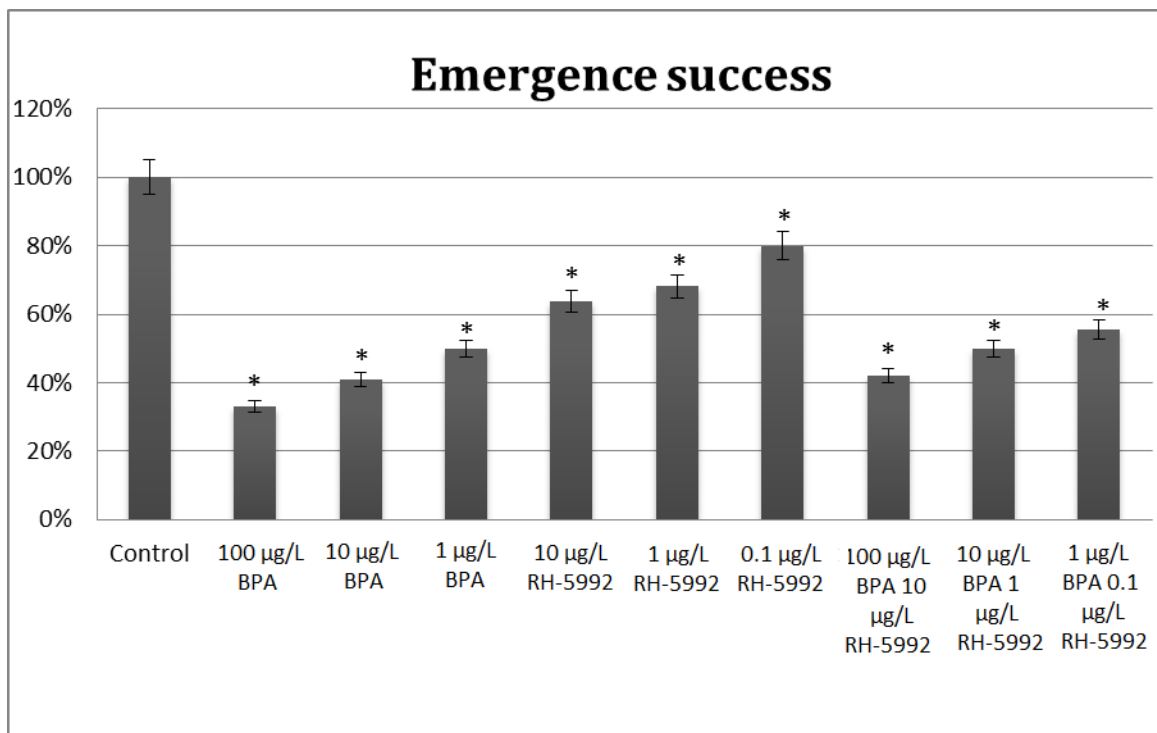
Οι επιδράσεις των BPA, RH-5992 και BPA / RH-5992 από προνύμφες 1<sup>ου</sup> instar σε ακμαίο φαίνονται στον Πίνακα 6. Ο χρόνος μετάβασης των εκτεθειμένων και των μη εκτεθειμένων προνυμφών σε BPA, RH-5992 και BPA / RH-5992 καθορίστηκαν και στη συνέχεια συγκρίθηκαν στατιστικά. Όπως φαίνεται από τον Πίνακα 6, η εμφάνιση του πρώτου ακμαίου έγινε στις 40 ημέρες στα control, στις 50 ημέρες στα 100 µg / L BPA και στις 48 ημέρες στα 10 και 1 µg / L BPA. Η ανάλυση διακύμανσης έδειξε ότι οι διαφορές μεταξύ των ομάδων ήταν στατιστικά σημαντικές. Ο χρόνος μετάβασης από προνύμφη σε ακμαίο βρέθηκε ότι ήταν 50, 48 και 47 ημέρες στις συγκεντρώσεις 100, 10 και 1 µg / L RH-5992, αντίστοιχα. Επιπλέον, ο χρόνος μετάβασης ήταν 48 ημέρες στα 1 / 0,1 µg, 10/1 µg και 100/10 µg / L BPA / RH-5992. Η ανάλυση διακύμανσης έδειξε ότι οι διαφορές μεταξύ των ομάδων ήταν στατιστικά σημαντικές.





**Πίνακας 6.** Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων των BPA, RH-5992 και BPA / RH-5992 στην μετάβαση από προνύμφες 1<sup>ου</sup> instar σε ακμαίο. Τα έντομα υποβλήθηκαν στους παραπάνω χειρισμούς από προνύμφες 1<sup>ου</sup> instar μέχρι την μετάβαση τους σε νύμφες. Τα δεδομένα αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο ± τυπική απόκλιση των τριπλών πειραμάτων. Υπήρξαν one way ανονα σημαντικές διαφορές μεταξύ της ομάδας control και διφαινόλης A και RH-5992.

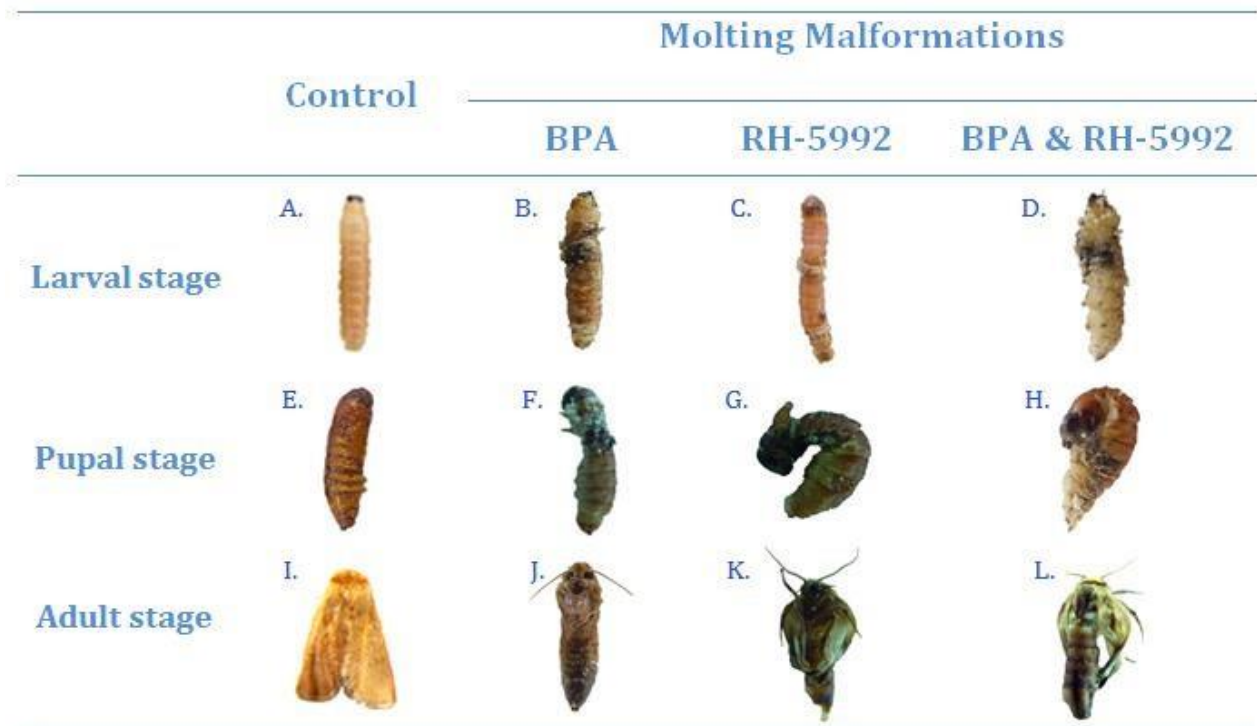
Η επίδραση των BPA, RH-5992 και BPA / RH-5992 στην επιτυχή μετάβαση από νύμφη σε ακμαίο φαίνεται στο **Πίνακας 7**. Η μέση συνολική επιτυχία μετάβασης σε ακμαίο ήταν 100% για τα control και 50%, 41% και 33% για τα 1  $\mu\text{g}$ , 10  $\mu\text{g}$  και 100  $\mu\text{g}$  / L BPA (Πίνακας 7). Αυτές οι τιμές διαφέρουν σημαντικά ( $p < 0,05$ ) σε σχέση με τα control έντομα και των χειρισμών με BPA. Η επιτυχία μετάβασης σε ακμαίο ήταν 63,6%, 68,2% και 80% για τους χειρισμούς των 10  $\mu\text{g}$ , 1  $\mu\text{g}$  και 0,1  $\mu\text{g}$  / L RH-5992 και 42%, 50% και 55,5% για τα 100/10  $\mu\text{g}$  / L και 10 / 1  $\mu\text{g}$  / L και 1 / 0,1  $\mu\text{g}$  / L BPA / RH-5992. Αυτές οι τιμές διαφέρουν σημαντικά ( $p < 0,05$ ) μεταξύ των control ατόμων και των RH-5992 ή των BPA / RH-5992 χειρισμών.



**Πίνακας 7.** Η επίδραση των διαφορετικών συγκεντρώσεων των BPA, RH-5992 και BPA / RH-5992 στην επιτυχή μετάβαση από νύμφη σε ακμαίο. Τα έντομα υποβλήθηκαν στους παραπάνω χειρισμούς από προνύμφες 1<sup>ου</sup> instar μέχρι την μετάβαση τους σε νύμφες. Τα δεδομένα αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο  $\pm$  τυπική απόκλιση των τριπλών πειραμάτων. \*  $p < 0,05$ , one way anova δείχνει σημαντικές διαφορές μεταξύ των control και των χειρισμών διφαινόλης A και RH-5992.

### 3.1.4 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<sup>ου</sup> αναπτυξιακού σταδίου τοποθετήθηκαν για 5 εβδομάδες σε τεχνητή τροφή με διαφορετικές συγκεντρώσεις BPA, RH-5992 και συνδιασμό των δύο. Οι μορφολογικές μεταβολές που παρατηρήθηκαν υπό τις διαφορετικές συγκεντρώσεις εμφανίζεται στην Εικόνα 23 και στον Πίνακα 8. Στην Εικόνα 23 παρουσιάζονται εικόνες εντόμων με φυσιολογικό φαινότυπο και εικόνες εντόμων με μη φυσιολογικούς φαινοτύπους μετά την επίδραση της δισφαινόλης και του RH-5992. Στις υψηλότερες συγκεντρώσεις δισφαινόλης και RH-5992 τα ποσοστά των μη φυσιολογικών φαινοτύπων αυξήθηκαν (Πίνακας 8). Στην συγκέντρωση των 100μg / L BPA, 10μg / L RH και 100μg / L BPA – 10μg / L RH το 51%, το 42% και το 45% των ατόμων εμφάνισαν μη φυσιολογικούς φαινοτύπους (Πίνακας 8). Λαμβάνοντας υπόψιν τα παρακάτω δεδομένα, η επίδραση της δισφαινόλης και του RH-5992 φαίνεται να επηρεάζει σημαντικά ( $p \leq 0.05$ ) τα μορφολογικά στάδια των εντόμων *S. nonagrioides*.



**Εικόνα 23.** Επίδραση της δισφαινόλης και του RH-5992 στα αναπτυξιακά στάδια του εντόμου *S. nonagrioides*. A, φυσιολογική προνύμφη, B, C, D, προνύμφες με διάφορες αναπτυξιακές ανωμαλίες. E, φυσιολογική νύμφη, F, G, H, παραδείγματα ενδιάμεσων προνυμφών-νυμφών. I, φυσιολογικό ενήλικο άτομο, J, K, L ακμαία με σγουρά φτερά.

Control	Trial	Number of insects	Number of Malformations
	<b>1</b>	31	6
	<b>2</b>	34	5
	<b>3</b>	35	7
<b>Total</b>		<b>100</b>	<b>0</b>

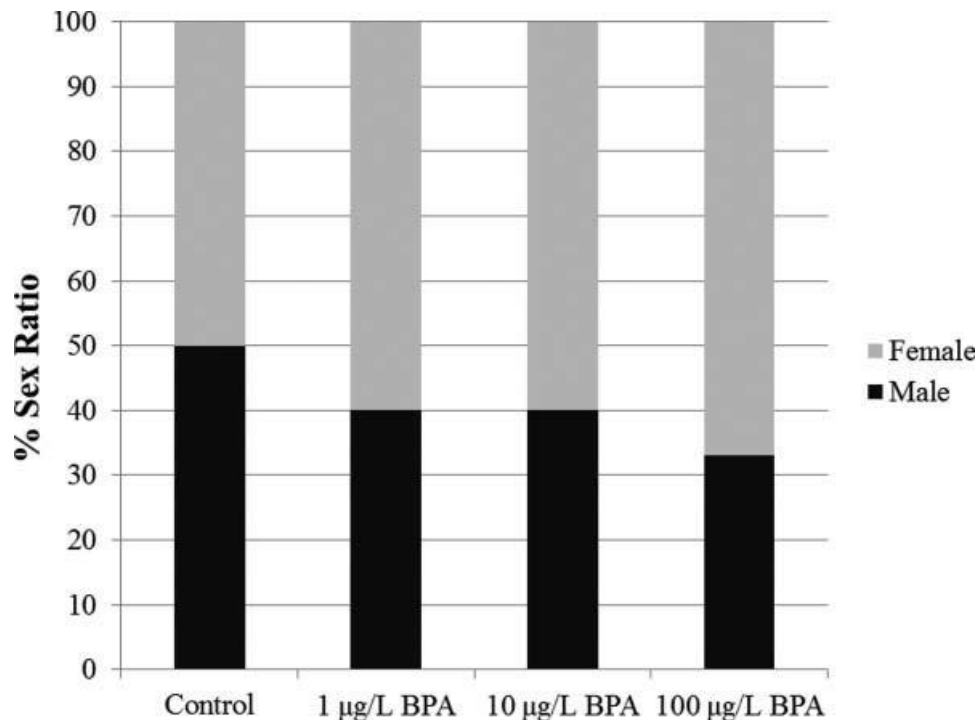
**Πίνακας 8.** Η επί τοις % μέσες δυσπλασίες των προνυμφών των χειρισμών με BPA *Sesamia nonagrioides* (1<sup>ο</sup> – 6<sup>ο</sup> instar), καθ' όλη τη διάρκεια του βιολογικού τους κύκλου.

### 3.1.5 Επίδραση στην αναλογία του φύλου των εντόμων

BPA Treatment	Trial	1 µg/L BPA Number of insects	Number of Malformations	10 µg/L BPA Number of insects	Number of Malformations	100 µg/L BPA Number of insects	Number of Malformations
	<b>1</b>	32	8	30	9	33	17
	<b>2</b>	31	7	36	14	32	16
	<b>3</b>	37	12	34	13	35	18
<b>Total</b>		<b>100</b>	<b>27</b>	<b>100</b>	<b>36</b>	<b>100</b>	<b>51</b>
<b>Mean Malform. %</b>			<b>27%</b>		<b>36%</b>		<b>51%</b>
RH Treatment	Trial	0.1 µg/L RH-5992 Number of insects	Number of Malformations	1 µg/L RH-5992 Number of insects	Number of Malformations	10 µg/L RH-5992 Number of insects	Number of Malformations
	<b>1</b>	34	4	36	10	35	16
	<b>2</b>	30	3	32	6	31	12
	<b>3</b>	36	5	32	8	34	14
<b>Total</b>		<b>100</b>	<b>12</b>	<b>100</b>	<b>24</b>	<b>100</b>	<b>42</b>
<b>Mean Malform. %</b>			<b>12%</b>		<b>24%</b>		<b>42%</b>
BPA & RH Treatment	Trial	1 µg/L BPA 0.1 µg/L RH-5992 Number of insects	Number of Malformations	10 µg/L BPA 1 µg/L RH-5992 Number of insects	Number of Malformations	100 µg/L BPA 10 µg/L RH-5992 Number of insects	Number of Malformations
	<b>1</b>	30	5	32	12	31	14
	<b>2</b>	35	10	35	14	31	13
	<b>3</b>	35	9	33	13	38	18
<b>Total</b>		<b>100</b>	<b>24</b>	<b>100</b>	<b>39</b>	<b>100</b>	<b>45</b>
<b>Mean Malform. %</b>			<b>24%</b>		<b>39%</b>		<b>45%</b>

Για τη μελέτη της επίδρασης της δισφαινόλης στο αναλογία του φύλου των ενήλικων ατόμων, 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.

Στο στάδιο της νύμφης αξιολογήθηκε η αναλογία φύλου στα έντομα που εκτέθηκαν στις διαφορετικές συγκεντρώσεις δισφαινόλης. Συγκριτικά με τα control άτομα, στα έντομα που υποβλήθηκαν σε χειρισμούς BPA επηρεάστηκε η αναλογία φύλου. Η αναλογία των θηλυκών ατόμων αυξήθηκε από 50% σε 60% και 66%, αντίστοιχα στις συγκεντρώσεις 1, 10 και 100  $\mu\text{g/L}$  BPA. Δεν υπήρξε σημαντική διαφορά ( $p < 0.05$ , t-test) μεταξύ των διαφορετικών συγκεντρώσεων του BPA. (Πίνακας 9).



**Πίνακας 9.** Αναλογία φύλου σε άτομα control και σε άτομα που εκτέθηκαν από το 1<sup>ο</sup> προνυμφικό στάδιο σε συγκεντρώσεις δισφαινόλης των 1,10 και 100 $\mu\text{g/L}$ .

### 3.2 Μοριακή επίδραση της δισφαινόλης

Οι προνύμφες του εντόμου *Sesamia nonagrioides* τοποθετήθηκαν από το 1<sup>ο</sup> προνυμφικό στάδιο σε συγκεντρώσεις δισφαινόλης των 1 $\mu\text{g/L}$ , 10 $\mu\text{g/L}$  και 100 $\mu\text{g/L}$  μέσω της τεχνητής τους τροφής. Τα πειράματα επαναλήφθηκαν 3 φορές με προνύμφες του ίδιου προνυμφικού σταδίου. Οι προνύμφες παρέμειναν μέχρι το 6<sup>ο</sup> προνυμφικό στάδιο στην τεχνητή τους τροφή. Ταυτόχρονα, άτομα όμοιας ανάπτυξης τοποθετούνταν σε κανονική τροφή, για να χρησιμοποιηθούν σαν άτομα control.

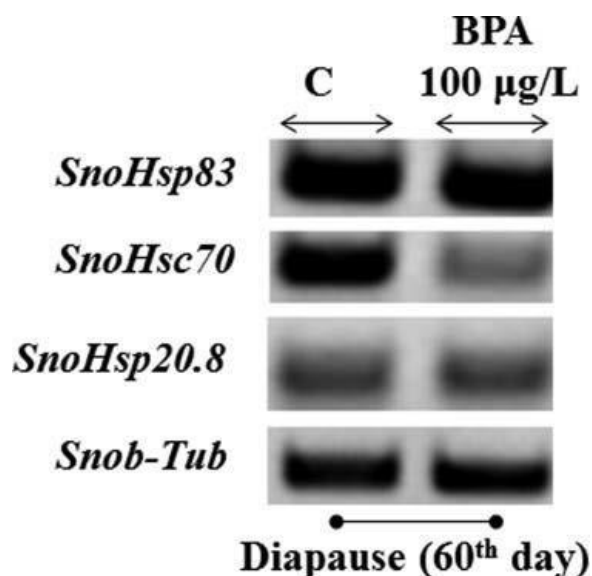
Τα επίπεδα μεταγραφής των γονιδίων που χρησιμοποιήσαμε στη μελέτη μας,

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 Hsc70, Hsp83 και Hsp20.8 στην διάπαυση

Προκειμένου να εκτιμηθεί η μοριακή επίδραση του BPA κατά τη διάρκεια συνθηκών διάπαυσης (10L: 14D), αναλύσαμε τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων Hsc70, Hsp83 και Hsp20.8 μετά από έκθεση στην υψηλότερη συγκέντρωση 100  $\mu\text{g} / \text{L}$  BPA. Σε αυτή τη συγκέντρωση, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση βάρους.

Είναι ενδιαφέρον, σε προηγούμενες μελέτες μας σε συνθήκες μη διάπαυσης (16L: 8D), οι προνύμφες της *S. nonagrioides*, εμφάνισαν σημαντική μείωση του βάρους μετά την έκθεση στο υψηλότερη συγκέντρωση 100  $\mu\text{g} / \text{L}$  BPA (Michail et al. 2012). Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων SnoHsp20.8 και SnoHsp83 δεν επηρεάστηκαν από το BPA κατά τη διάρκεια συνθήκες διάπαυσης, ενώ τα επίπεδα mRNA SnoHsc70 μειώθηκαν (Εικόνα 24).



**Εικόνα 24.** Ημιποσοτική ανάλυση RT-PCR των SnoHsp20.8, SnoHsc70 και SnoHsp83 γονιδίων στους χειρισμούς με BPA σε προνύμφες βαθιάς διάπαυσης *S. nonagrioides* (9<sup>o</sup> instar, 60 ημερών από την εκκόλαψη). *S. nonagrioides* b-tubulin χρησιμοποιήθηκε ως το control γονίδιο. C: control χωρίς χειρισμό.

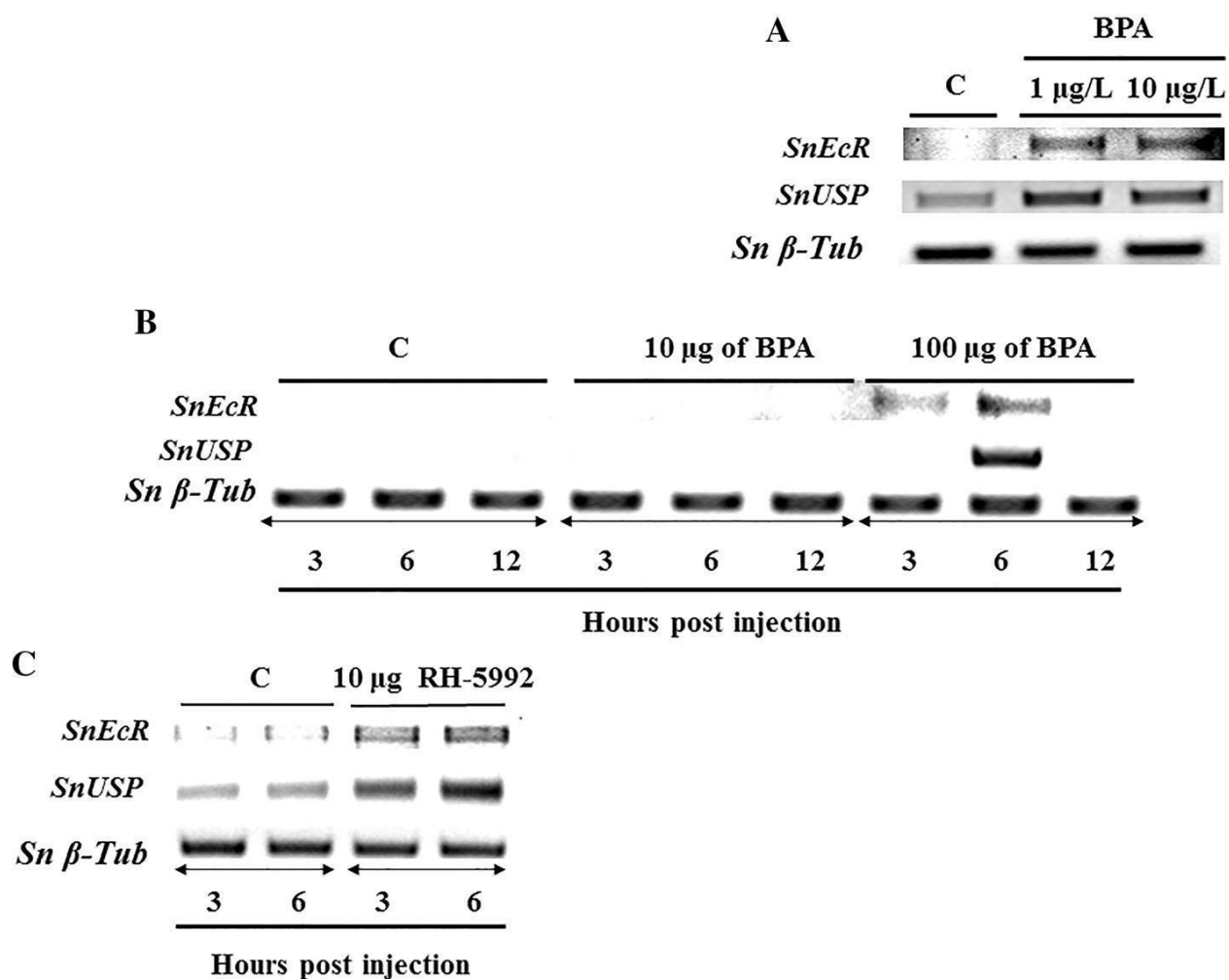
### 3.2.2 Επίδραση στον EcR και USP

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 με ημιποσοτικό RT-PCR. Σαν γονίδιο- μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε η β-τουμπουλίνη.

Προκειμένου να εκτιμηθεί εάν το BPA μεταβάλλει τη μεταγραφή στα επαγωγίμα γονίδια των εκδυστεροειδών, ημι-ποσοτικοποιήσαμε το επίπεδα έκφρασης του υποδοχέα της εκδυσόνης (EcR, Gene Bank accession number: JN572102) και USP (Gene Bank accession number: JN704569) γονίδια του *S. nonagrioides* στο 6<sup>ο</sup> προνυμφικό instar, μετά από χειρισμούς με BPA και RH-5992.

Τα γονίδια υποδοχέα της εκδυσόνης (*SnEcR*) και ultraspiracle (*SnUSP*) επιλέχθηκαν ως συγκεκριμένοι τύποι ενδοκρινικών ανταποκρινόμενων γονιδίων (Kontogiannatos et al. 2013). Ο υποδοχέας εκδυσόνης είναι ο πρώτος κυτταρικός στόχος των εκδυστεροειδών και ενεργεί ως μεσολαβητής για τη γονιδιωματική δράση. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 25. Α., ο χειρισμός με BPA στην τροφή των εντόμων προκαλεί τη σύνθεση *SnEcR* και *SnUSP* mRNAs, στα ίδια επίπεδα και στο 1 και στα 10 μg / L BPA που εφαρμόσαμε στην τεχνητή τροφή. Ομοίως, διαπιστώθηκε ότι στα 100 μg BPA προκαλείται αύξηση των επιπέδων mRNA του γονιδίου *SnEcR* στις 3 και 6 ώρες μετά την ένεση και στις 6 ώρες μετά την ένεση για το *SnUSP* γονίδιο (Εικόνα 25. Β.). Επιπλέον, στα 10 μg RH-5992 τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *SnEcR* και *SnUSP*, έδειξαν τα αναμενόμενα αποτελέσματα (Εικόνα 25. C.).



**Εικόνα 25.** Ημι-ποσοτική ανάλυση RT-PCR των γονιδίων *SnEcR* και *SnUSP* στους χειρισμούς με BPA και RH-5992 σε προνύμφες *Sesamia nonagrioides*. *S. nonagrioides* b-tubulin χρησιμοποιήθηκε ως control γονίδιο. A. Η έκφραση των *SnEcR* και *SnUSP* γονιδίων, σε συνεχώς εκτρεφόμενες προνύμφες (L1d0 → L6d2) με τεχνητή τροφή 1, 10 και 100µg / L BPA. B. Έκφραση των *SnEcR* και *SnUSP* γονιδίων σε προνύμφες L6d2 με ενέσιμη BPA 10 και 100 µg, 3, 6 και 12 ώρες μετά την ένεση. C. Έκφραση των *SnEcR* και *SnUSP* γονιδίων σε προνύμφες L6d2 με ένεση με 10 µg RH-5992, 3 και 6 ώρες μετά την ένεση. C: control χωρίς χειρισμό.



## 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, ως παράμετρος της ανάπτυξης, μετρήθηκε το σωματικό βάρος και το μέγεθος της κεφαλής των προνυμφών *S. nonagrioides* σε διαφορετικές συγκεντρώσεις BPA, RH-5992 αλλά και συνδιασμού των δύο. Το μέγεθος του μήκους της κεφαλής των προνυμφών δεν είχε καμία διαφορά σε καμία από τις συγκεντρώσεις δισφαινόλης και RH-5992 σε σύγκριση με τα έντομα control (τα δεδομένα δεν παρουσιάζονται). Συγκριτικά με τα έντομα control, οι συγκεντρώσεις των 100 µg / L BPA και 10 µg / L RH-5992 εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στις προνύμφες, 32 ημέρες μετά την έναρξη του πειράματος (Πίνακας 2).

Αντίστοιχα, στην διάπαυση (10L: 14D) μελετήσαμε την επίδραση της δισφαινόλης στο σωματικό βάρος των εντόμων. Το BPA δεν επηρέασε το βάρος των προνυμφών 7<sup>ov</sup> Instar αλλά επηρέασε σημαντικά το βάρος των προνυμφων βαθιάς διάπαυσης κατά το 8<sup>o</sup> instar (50 ημέρες από την εκκόλαψη) και 9<sup>o</sup> instar (60 ημέρες από την εκκόλαψη) (Πίνακας 3), όπου οι τιμές αυτές διαφέρουν σημαντικά μεταξύ των control και των χειρισμών με BPA (Kontogiannatos et al., 2015).

Επίσης, προνύμφες του εντόμου *Sesamia nonagrioides* τοποθετήθηκαν σε τεχνητή τροφή μέχρι το 6<sup>ο</sup> προνυμφικό στάδιο και μετρήθηκαν τα ποσοστά μετάβασης τους σε νύμφη (Πίνακας 4). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι χειρισμοί BPA, RH-5992 και BPA / RH-5992 έχουν επίδραση όσον αφορά τον αριθμό των προνυμφών που έγιναν νύμφες (Kontogiannatos et al., 2014).

Επιπρόσθετα, η μέση διάρκεια από προνύμφες μέχρι να γίνουν νύμφες αυξήθηκε σημαντικά στις συγκεντρώσεις 10 µg / L και 100 µg / L BPA, αντίστοιχα σε σχέση με τα control άτομα (Πίνακας 5). Αυτό δείχνει ξεκάθαρα ότι ο μέσος χρόνος διάρκειας από προνύμφες μέχρι νύμφες επεκτάθηκε με τους χειρισμούς BPA σε σύγκριση με την ομάδα των control.

Επιπλέον, παρατηρήσαμε ότι ο χρόνος μετάβασης από προνύμφες σε νύμφες στα εκτεθειμένα στους χειρισμούς έντομα και στα control είχαν σημαντικές διαφορές. Όπως φαίνεται από τον Πίνακα 6, η εμφάνιση του πρώτου ακμαίου στα control σε σχέση με αυτά των συγκεντρώσεων 100 µg / L, 10 µg / L και 1 µg / L BP, αλλά και των χειρισμών 100, 10 και 1 µg / L RH-5992 και του συνδιασμού αυτών έγινε με σημαντική καθυστέρηση. Οι διαφορές αυτές ήταν στατιστικά σημαντικές (Kontogiannatos et al., 2014).

Και αντίστοιχα, η μέση συνολική επιτυχία μετάβασης σε ακμαίο ήταν 100% για τα control ενώ για τους χειρισμούς μας τα ποσοστά ήταν σημαντικά χαμηλότερα ειδικά στην μεγαλύτερη συγκεντρωση 100 µg / L BPA (Πίνακας 7). Αυτές οι τιμές διαφέρουν σημαντικά σε σχέση με τα control έντομα και τα έντομα των χειρισμών με BPA, RH-5992 και BPA/RH-5992. (Kontogiannatos et al., 2014).

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 control.

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 έκδυσσης στην αιμολέμφο των εντόμων και στην παρουσία ή απουσία της ορμόνης νεότητας. Οποιαδήποτε αλλαγή στην ορμονική ομοίωση 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 για 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-έκδυσσης. 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 E7H σε ενήλικα έντομα επιταχύνουν την έναρξη της προ-έγκλησης (Park et al., 1999).

Στην παρούσα μελέτη, για την επίδραση της δισφαινόλης και του RH-5992 στα αναπτυξιακά στάδια του εντόμου, προνύμφες 1<sup>ου</sup> προνυμφικού σταδίου εκτέθηκαν στις συγκεντρώσεις δισφαινόλης και RH-5992 και συνδιασμού των δύο. Στις συγκεντρώσεις της δισφαινόλης, του RH-5992 και του συνδιασμού BPA/RH-5992 τα ποσοστά των μη φυσιολογικών φαινοτύπων αυξήθηκαν (Πίνακας 8, Εικόνα 23). Στην συγκέντρωση των 100μg / L BPA, ο μέσος όρος μη φυσιολογικών φαινοτύπων ήταν σε ποσοστό 51% με τους αντίστοιχους χειρισμούς των 10 και 1 μg / L BPA να εκδηλώνουν μη φυσιολογικούς φαινοτύπους σε ποσοστά 36% και 27% αντίστοιχα (Πίνακας 8). Επιπρόσθετα, τους χειρισμούς με RH-5992 10 μg / L, 1 μg / L και 0.1 μg / L οι δυσμορφίες ήταν 42%, 24% και 12% αντίστοιχα και στους συνδιασμούς 100 μg / L BPA – 10 μg / L RH-5992, 10 μg / L BPA – 1 μg / L RH-5992 και 1 μg / L BPA – 0.1 μg / L RH-5992 παρατηρήσαμε δυσμορφίες σε ποσοστά 42%, 39% και 24% αντίστοιχα (Πίνακας 8) (Kontogiannatos et al., 2014).

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 al., 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 και RH-5992 από το 1<sup>ο</sup> προνυμφικό στάδιο, εμφάνισαν κατσαρά φτερά, υποδηλώνοντας την ενδοκρινική επίδραση στο στάδιο της νύμφης. Τα αποτελέσματά μας υποδηλώνουν ότι η δισφαινόλη επιδρά σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια του εντόμου *S. nonagrioides*.

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 control.

Στην έρευνά μας, για την μελέτη της επίδρασης της δισφαινόλης στο αναπαραγωγικό σύστημα των εντόμων, προνύμφες 1<sup>ου</sup> 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 φύλων μεταξύ θηλυκών και αρσενικών εντόμων. Η έκθεση των εντόμων στη δισφαινόλη φαίνεται ότι επηρέασε την αναλογία ως προς το φύλο. Σε σύγκριση με τα έντομα control που η αναλογία ήταν 50% αρσενικά και 50% θηλυκά έντομα, τα έντομα που εκτέθηκαν στις συγκεντρώσεις δισφαινόλης 1μg/L και 10 μg/L εμφάνισαν 40% αρσενικά έντομα και 60% θηλυκά έντομα και στην συγκέντρωση 100μg/L BPA το ποσοστό των θηλυκών ατόμων αυξήθηκε στο 66% (Πίνακας 9) (Kontogiannatos et al., 2014).

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), διαταραχή της διάπαυσης (Eizaguirre et al 2007), επίδραση στα αναπαραγωγικά όργανα (Seth et al 2004, Smagghe et al 2004) και αλλαγές στην αναλογία του φύλλου (Biddinger et al 2006). Λαμβάνοντας υπόψιν τα μορφολογικά αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, παρέχονται ενδείξεις για την παρεμβολή της δυσφαινόλης 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 SnEcR και SnUSP.

Στην έρευνα μας μελετήσαμε τις αποκρίσεις των SnHsp83, SnHsp20.8 και SnHsc70 γονιδίων μετά από χειρισμό με δυσφαινόλη σε συνθήκες διάπαυσης. Μερικές θερμοεπαγόμενες πρωτεΐνες (Hsps), ιδιαίτερα τα Hsp90 και Hsc70, συνδέονται με το σύμπλεγμα ενεργοποιητών και καταστολέων, όταν αλληλεπιδρούν με τους πυρηνικούς υποδοχείς, συμβάλλουν στη σηματοδότηση των στεροειδών ορμονών μέσα στα κύτταρα (Gehring 1998). Αποτελέσματα άλλων ερευνών έχουν δείξει ότι σε *S. nonagrioides* που οι προνύμφες εκτρέφονται σε LD συνθήκες, τα γονίδια SnHsp83, SnHsc70, SnEcR και SnUSP ενεργοποιήθηκαν από το BPA (Michail et al. 2012; Kontogiannatos et al. 2015). Επιπλέον, μοριακές και βιοχημικές αναλύσεις έδειξαν ότι το BPA πιθανόν, θα ενεργούσε ως ένας πολύ αδύναμος αγωνιστής των εκδυστεροειδών (Kontogiannatos et al. 2015). Συνδυάζοντας τα προηγούμενα δεδομένα, θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι όταν παρέχεται BPA στο έντομο, ενεργοποιούνται τα γονίδια που ανταποκρίνονται στην εκδυσόνη, μέσω της δράσης της, ως πολύ αδύναμος αγωνιστής των εκδυστεροειδών. Όταν η ενεργοποίηση του τίτλου του εκδυστεροειδούς εμφανίζεται σε λάθος αναπτυξιακά στάδια καθώς και μετά από ενδοκρινική διαταραχή έχουμε επιδράσεις του BPA. Αυτό, προκαλεί ανωμαλίες στην τήξη και αναπτυξιακές ανεπάρκειες στα έντομα με τους χειρισμούς.

Σε αυτή τη μελέτη, μοριακές αναλύσεις των προνυμφών *S. Nonagrioides* που εκτράφηκαν κάτω από SD φωτοπερίοδο, έδειξαν αποκλίνοντα πρότυπα των επιπέδων έκφρασης Hsp κατά τη διάρκεια βαθιάς διάπαυσης. Κατά τη διάρκεια της βαθιάς διάπαυσης, το BPA είχε ως αποτέλεσμα μη ανιχνεύσιμη ρύθμιση του γονιδίου Hsp σε αντίθεση με άλλες μελέτες στις οποίες το BPA ρυθμίζει την έκφραση του γονιδίου Hsp στις προνύμφες *S.nonagrioides* που εκτρέφονται με LD (Michail et al. 2012). Υποθέτουμε ότι, κατά τη διάρκεια της διάπαυσης ένας άγνωστος ορμονικός παράγοντας θα μπορούσε να ενεργεί ανταγωνιστικά στη δράση του BPA

σε επίπεδο ιστού, σταματώντας τις πιθανές ενδοκρινικές επιδράσεις που θα μπορούσαν να προκληθούν από το BPA. Έχει αποδειχθεί ότι, η φυσιολογία της διάπαυσης περιλαμβάνει αύξηση του τίτλου JH και μείωση του τίτλου του εκδυστεροειδούς (Eizaguirre et al. 2005; Schafellner et al. 2008).

Η ημιποσοτική ανάλυση RT-PCR αποκάλυψε αύξηση στα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων SnEcR και SnUSP μετά από τους χειρισμούς με BPA και RH-5992 (Εικόνα 25). Έχει αποδειχθεί ότι, όπως το 20E, το RH-5992 θα μπορούσε να δράσει ρυθμίζοντας την έκφραση των EcR, USP και ρυθμιστές κυτταρικών κύκλων όπως οι κυκλίνες (Dhadialla et al. 1998; Nakagawa et al. 2000; Smagghe et al. 2002). Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, ο Planello et al. (2008) βρήκε επίσης ότι το BPA αυξάνει σημαντικά τα επίπεδα mRNA του υποδοχέα εκδυσόνης (EcR) και Hsp70 σε προνόμφες *Chironomus riparius*. Η επαγωγιμότητα του RH-5992 στα ECR και USP συμφωνούσε με τη διέγερση άλλων ανταποκρινόμενων εκδυστεροειδών γονιδίων (Palli et al. 1997; Sundaram et al. 1998; Debernard et al. 2001; Retnakaran et al. 2001). Από την άλλη πλευρά, ο χειρισμός με BPA αύξησε τα επίπεδα έκφρασης των SnHsp83 και SnHsc70 γονιδίων (Michail et al. 2012) και της εκδυστεροειδής επαγωγίμης καρβοξυλεστεράσης (Kontogiannatos et al. 2011) στο *S. nonagrioides*.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, το BPA δεν επηρεάζει μόνο την έκφραση των γονιδίων SnEcR και SnUSP, αλλά ρυθμίζει επίσης τη μεταγραφή των SnHsp83 και SnHsc70 (Michail et al. 2012). Θα μπορούσαμε λοιπόν να καταλήξουμε, ότι το BPA θα μπορούσε να λειτουργήσει ως (αντ)αγωνιστής εκδυσόνης στη *S. nonagrioides*.

Τα δεδομένα μας, φανερώνουν τις πιθανές επιπτώσεις του BPA στο οικοσύστημα των επίγειων εντόμων των λεπιδόπτερων. Το BPA φαίνεται να επηρεάζει άμεσα το ενδοκρινικό status quo των εντόμων που προκαλούν μορφολογικές, φυσιολογικές και αναπαραγωγικές ανωμαλίες κατά τη διάρκεια ολόκληρου του κύκλου ζωής τους (Michail et al. 2012; Kontogiannatos et al. 2015). Υποθέτουμε ότι το BPA θα μπορούσε να αλλάξει σημαντικά τις οικολογικές σχέσεις μεταξύ των επίγειων λεπιδόπτερων σε συγκεκριμένα περιβάλλοντα. Οι συνέπειες του BPA θα μπορούσαν να είναι τεράστιες όχι μόνο στα παρασιτικά έντομα των λεπιδόπτερων αλλά και σε ωφέλιμα έντομα, τα οποία διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη γονιμοποίηση καλλιεργειών και λαχανικών.

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. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Adams TS. 1999. Hematophagy and hormone release. *Ann Entomol Soc Am* 92:1–13.
- 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.
- Gkouvitass, 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.
- Gkouvitass, 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.
- Gkouvitass, 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.
- Beck, S. D. 1980. *Insect photoperiodism*. 2d ed. Academic Press, New York.
- Kostal, V., (2006). Eco-physiological phases of insect diapause. *Journal of Insect Physiology* 52, 113–127.
- Yamashita, O., (1996). Diapause hormone of the silkworm, *Bombyx mori*: structure, gene expression and function. *Journal of Insect Physiology* 42, 669–679.

- Saunders, D.S., Lewis, R.D., Warman, G.R., (2004). Photoperiodic induction of diapause: opening the black box. *Physiological Entomology* 29, 1–15.
- Nelson, R.J., Denlinger, D.L., Somers, D.E. (Eds.), (2010). Photoperiodism. *The Biological Calendar*. Oxford University Press, Oxford, p. 581.
- Gohar M, Souty C. 1984. Action temporelle d'ecdysteroides sur la synthese proteique ovarienne in vitro chez le Crustace isopode terrestre *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.
- 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.
- 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. Seagraves, 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.
- Michail X., Kontogiannatos D., Vassiliki Syriou and Kourti A., Bisphenol-A affects the developmental progression and expression of heat-shock protein genes in the moth *Sesamia nonagrioides* (2012)
- 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.
- D. Kontogiannatos, L. Swevers, Giannis Zakasi, A. Kourti, The molecular and physiological impact of bisphenol A in *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae) *Ecotoxicology*

DOI 10.1007/s10646-014-1384-6 (2014)

- 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.
- 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. Martinez-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 receptors 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-estradiol, nonylphenol, and bisphenol-A on developing *Xenopus laevis* embryos. *Gen Comp Endocrinol* 2004;138:228–36.
- Tauber, M.J., Tauber, C.A. and Masaki, S. (1986) *Seasonal Adaptations of Insects*. Oxford Universit PRESS, New York.
- 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.
- D. Kontogiannatos, Giannis Zakasi, A. Kourti, The physiological impact of bisphenol A on the developmental and reproductive processes of *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae) under LD and SD photoperiods, *Toxicological & Environmental Chemistry*, DOI: 10.1080/02772248.2015.1068316 (2015)

- Watts, M.M., Pascoe, D., Carroll, K., 2001. Chronic exposure to 17 $\alpha$ ethinylestradiol 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.
- Atlı E, Unlu H (2012) Developmental and reproductive effects of bisphenol A (Bpa) in *Drosophila Melanogaster*. *Hacettepe J Biol Chem* 40:61–68
- Kontogiannatos D, Swevers L, Maenaka K, Park EY, Iatrou K, Kourti A (2013) Functional characterization of a juvenile hormone esterase related gene in the moth *Sesamia nonagrioides* through RNA interference. *PLoS ONE* 8(9):e73834
- N'Tumba-Byn, T., D. Moison, M. Lacroix, C. Lecureuil, L. Lesage, S. Prud'homme, S. Pozzi-Gaudin, R. Frydman, A. Benachi, and G. Livera. 2012. "Differential Effects of Bisphenol A and Diethylstilbestrol on Human, Rat and Mouse Fetal Leydig Cell Function." *PLoS One* 7: e51579. doi: 10.1371/journal.pone.0051579.
- Flint, S., T. Markle, S. Thompson, and E. Wallace. 2012. "Bisphenol A Exposure, Effects, and Policy: A Wildlife Perspective." *Journal of Environmental Management* 104: 19-34.
- Kontogiannatos D, Swevers L, Maenaka K, Park EY, Iatrou K, Kourti A (2013) Functional characterization of a juvenile hormone esterase related gene in the moth *Sesamia nonagrioides* through RNA interference. *PLoS ONE* 8(9):e73834
- Eizaguirre, M., C. Schafellner, C. Lopez, and F. Sehnal. 2005. "Relationship between Increase of Juvenile Hormone Titer in Early Instars and Induction of Diapause in Fully Grown Larvae of *Sesamia Nonagrioides*." *Journal of Insect Physiology* 51: 1127-1134.
- Schafellner, C., M. Eizaguirre, C. Lopez, and F. Sehnal. 2008. "Juvenile Hormone Esterase Activity in the Pupating and Diapausing Larvae of *Sesamia Nonagrioides*." *Journal of Insect Physiology* 54: 916-921.
- Nakagawa Y, Minakuchi C, Ueno T (2000) Inhibition of [(3)H] ponasterone a binding by ecdysone agonists in the intact Sf-9 cell line. *Steroids* 65:537–542

- Smagghe G, Dhadialla TS, Lezzi M (2002) Comparative toxicity and ecdysone receptor affinity of non-steroidal ecdysone agonists and 20-hydroxyecdysone in *Chironomus tentans*. *Insect Biochem Mol Biol* 32:187–192
- Palli SR, Ladd TR, Ricci AR, Sohi SS, Retnakaran A (1997) Cloning and developmental expression of *Choristoneura* hormone receptor 75: a homologue of the *Drosophila* E75A gene. *Dev Genet* 20:36–46
- Debernard S, Bozzolan F, Duportets L, Porcheron P (2001) Periodic expression of an ecdysteroid-induced nuclear receptor in a lepidopteran cell