



ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ, ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ, ΤΟΜΕΑΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ
ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΧΑΤΖΗΑΝΑΣΤΑΣΗ ΝΑΣΙΑ

«Ο ρόλος των CORL πρωτεϊνών στη συμπεριφορά ερωτοτροπίας της
Drosophila melanogaster»



ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ: ΚΛΕΟΝΙΚΗ ΛΑΜΝΗΣΟΥ

ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΡΙΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ, ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟΣ ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ: ΧΡΗΣΤΟΣ ΚΟΝΣΟΥΛΑΣ

ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ, ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΑΘΗΝΑ 2017

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	4
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	5
ABSTRACT.....	6
1^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ – ΕΙΣΑΓΩΓΗ	
1.1 Drosophila melanogaster, wild type – Ταξινόμηση.....	7
1.2 Εξωτερική μορφολογία δίπτερου εντόμου, Drosophila melanogaster...	9
1.3 Κύκλος ζωής του εντόμου.....	11
1.4 Μεταμόρφωση.....	12
1.5 Συμπεριφορά Ερωτοτροπίας.....	16
1.5.1 Εμπλεκόμενα Αισθητήρια Συστήματα στην ερωτοτροπία.....	19
1.5.2 Καταστολή της ερωτοτροπίας προς τα θηλυκά μετά από έκθεση σε ήδη ζευγαρωμένα θηλυκά: Συνειρμική μάθηση.....	22
1.5.3 Άμεση καταστολή της ερωτοτροπίας προς τα ζευγαρωμένα θηλυκά: Μη συνειρμική πλαστικότητα.....	27
1.5.4 Η καταστολή της ερωτοτροπίας μετά από έκθεση σε παρθένα θηλυκά: Συνειρμική Μάθηση	29
1.5.5 Καταστολή της ερωτοτροπίας από νεαρά αρσενικά: Εξοικείωση.....	30
1.5.6 Ενίσχυση της ερωτοτροπίας μετά από έκθεση σε θηλυκά: Ευαισθητοποίηση.....	31
1.6 Dcorl.....	33
1.7 Γονίδιο w (white).....	35

2^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ: ΜΕΘΟΔΟΙ – ΥΛΙΚΑ

2.1 Πειραματικό Υλικό	37
2.2 Καλλιέργεια και διατήρηση του πληθυσμού των εντόμων Drosophila melanogaster.....	38
2.3 Πειραματικά Πρωτόκολλα.....	40

3^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ – ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Σειρές dCORL.....	43
3.2 Σειρές Canton-S και Oregon-R	49
3.3 Σειρά w ¹¹¹⁸	51

4^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ..... 53

5^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ – ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ..... 55

6^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ – ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 59

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Αυτή η διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε κατά τη χρονική περίοδο Σεπτέμβριος 2016 – Ιούνιος 2017 στο Εργαστήριο Πειραματικής Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαιτέρως την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κα Κλεονίκη Λάμνησου, επιβλέποντα καθηγήτρια της εργασίας αυτής, που μου έδωσε την ευκαιρία να συμμετάσχω στην ερευνητική της ομάδα και να εκπονήσω τη Διπλωματική μου Εργασία.

Ευχαριστώ επίσης τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Χρήστο Κόνσουλα, ως επιστημονικό υπεύθυνο αυτής της εργασίας, για την υπομονή και την κατανόησή του, για τις συμβουλές τόσο σε επιστημονικό όσο και σε προσωπικό επίπεδο και τέλος για την πολύτιμη βοήθεια που μου παρείχε κατά τη διάρκεια της διπλωματικής μου εργασίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ακόμα, την υποψήφια διδάκτωρ κα Αγάπη Δημητριάδου και όλα τα υπόλοιπα μέλη του Εργαστηρίου Φυσιολογίας για την βοήθεια και την καθοδήγησή τους στην πραγματοποίηση των πειραμάτων στα πλαίσια αυτής της διπλωματικής εργασίας.

Τέλος, ευχαριστώ την διευθύντρια του τομέα Γενετικής και Βιοτεχνολογίας Καθηγήτρια κα Βασιλική Αλεπόρου – Μαρίνου, που μου έδωσε τη δυνατότητα να εκπονήσω τη διπλωματική μου εργασία στα εργαστήρια του τομέα Φυσιολογίας στην Ιατρική Σχολή Αθηνών.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η μελέτη των επιπέδων ερωτοτροπίας των μεταλλαγμένων αρσενικών Df(4)dCORL) (έλλειψη της πρωτεΐνης CORL) προς τα παρθένα θηλυκά. Προηγούμενες μελέτες έδειξαν αδυναμία του συγκεκριμένου ζώου για ολοκλήρωση της συμπεριφοράς φωτοτακτισμού και γεωτακτισμού, και υποθέσαμε ότι θα βρίσκαμε παρόμοιους φαινότυπους και κατά την συμπεριφορά της ερωτοτροπίας του αρσενικού προς το παρθένο θηλυκό. Η συμπεριφορά αυτή άρχεται ως απάντηση σε οσφρητικά σήματα (φερομόνες) ενώ οι άλλες δύο ως απάντηση σε μηχανικά και οπτικά ερεθίσματα. Δοκιμασίες ερωτοτροπίας αρσενικών ατόμων με παρθένα θηλυκά από τη γονική σειρά γw, τη σειρά dcorl και τις 6 σειρές μαρτύρων (controls), οι οποίες ανέδειξαν διαφορές στις παραμέτρους της ερωτοτροπίας. Για την κάθε σειρά έγιναν δύο κατηγορίες πειραμάτων, η μία με αρσενικά 5 ημερών απομονωμένα και η άλλη κατηγορία με αρσενικά ομαδοποιημένα 5 ημερών (ομάδα 20-30 άτομα). Όλες οι σειρές των απομονωμένων αρσενικών και κάποιες σειρές ομαδοποιημένων αρσενικών εμφάνισαν υψηλές τιμές ενώ μόνο κάποιες σειρές ομαδοποιημένων αρσενικών εμφάνισαν χαμηλές ΔΕ τιμές. Οπότε με βάση τα αποτελέσματα που πήραμε από τις παραπάνω δοκιμασίες ερωτοτροπίας καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι η διάσωση του φαινοτύπου (υψηλά επίπεδα ερωτοτροπίας των ομαδοποιημένων αρσενικών Df(4)dCORL) δεν μπορεί να αποδοθεί στην έλλειψη του γονιδίου dCORL, λόγω των επίσης υψηλών επιπέδων ερωτοτροπίας των ομαδοποιημένων αρσενικών των control σειρών Sphinx-720RW και Glu-RAM26-null. Αφού λοιπόν παρατηρήσαμε αυτές τις διαφορές στις παραμέτρους ανάμεσα στις δύο κατηγορίες πειραμάτων, συνεχίσαμε περεταίρω τα πειράματα πραγματοποιώντας δοκιμασίες με τις σειρές αγρίου τύπου (Oregon-R, Canton-S) και τη μεταλλαγμένη σειρά w¹¹¹⁸. Αποτελέσματα από αυτά τα πειράματα έδειξαν ότι τα αγρίου τύπου αρσενικά Oregon-R και Canton-S δεν εμφανίζουν προσαρμοστική ερωτοτροπία. Σε αντίθεση τα w¹¹¹⁸ επηρεάζονται σημαντικά από προηγούμενη εμπειρία και εμφανίζουν έντονη προσαρμοστική ερωτοτροπία. Οπότε καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι το γονίδιο *white* είναι απαραίτητο για τον καθορισμό κατάλληλων επιπέδων ευπλαστότητας και προσαρμοστικότητα στην ερωτοτροπία του αρσενικού και η έλλειψη του προκαλεί μείωση του οδού/ορίου ενεργοποίησης και παγίωσης μιας αρνητικής εμπειρίας που έχει ως συνέπεια την προσωρινή καταστολή της ερωτοτροπίας προς παρθένο θηλυκό. Η μελέτη μας εγκαθιδρύει μια νέα δοκιμασία ερωτοτροπίας βασισμένη σε συμπεριφορές αρσενικών. Εκτός από ενδιαφέρουσες ερωτήσεις που τίθενται σχετικά με την υποφαινίσιμη αιτία της συμπεριφοράς αυτής η δοκιμασία αυτή καθαυτή είναι χρήσιμη για συμπεριφορικές μελέτες που αφορούν διαγονιδιακές σειρές με w¹¹¹⁸ γενετικό υπόβαθρο.

ABSTRACT

The goal of the present study was to investigate courtship behaviour of males towards virgin females in Df(4)dCORL mutants. In previous studies, it was demonstrated that the mutant fly initiate but fails to continue and complete reflective motor behaviours such as climbing and phototaxis. We hypothesized that similar phenotypes would be uncovered in an innate behaviour, the male courtship behaviour. In contrast to geotaxis and phototaxis that are initiated by mechanical or light stimuli, male courtship is initiated mainly by olfactory cues. Courtship assays of the parental strain yw, the Df(4)dCORL mutant and 6 control strains revealed differences in male courtship parameters (courtship Index, first orientation and first singing) according to whether male flies were raised alone or in groups. Males previously in group (20-30 flies) court much less towards virgins than males singly isolated. Males of Df(4)dCORL, Sphinx-720RW and Glu-RAM26-null strains court equally well regardless being alone or in group. This suggests that these males cannot be conditioned (are not frustrated when in group) or they easily forget their previous, negative experience. Nevertheless, the phenotype cannot be attributed to *dCORL* gene. The same phenotype was uncovered in W¹¹¹⁸ mutants but not in wild-type strains Oregon-R and Canton-S. The white gene when over- or misexpressed causes male-male courtship and when *w* protein is missing from the CNS serotonin and dopamine drop to low levels. We suggest that *w* is required for productive courtship. It ameliorates levels of frustration of males by former unsuccessful courtship efforts occasionally towards wrong partners. Our study establishes a new courtship frustration assay based on male-to-male interactions. Apart from the interesting questions on the underlying cause of frustration when in groups, the assay by itself is a useful tool for shorting transgenic strains developed on w¹¹¹⁸ genetic background.

KEY WORDS: *Drosophila*, Behaviour, Courtship, Conditioning, Amines

1^ο Κεφάλαιο

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 *Drosophila melanogaster*, wild type - Ταξινόμηση

Η *Drosophila melanogaster* είναι ένα είδος μύγας της τάξης των Δίπτερων και ανήκει στην οικογένεια Drosophilidae. Το είδος είναι γνωστό ως η κοινή μύγα των φρούτων και έχει προταθεί, από τον Charles W. Woodworth, η χρήση αυτού του είδους ως μοντέλο οργανισμού (πειραματόζωο) στη Βιολογία καθώς παρουσιάζει πολλά πλεονεκτήματα έναντι άλλων, μερικά από αυτά παρουσιάζονται παρακάτω:

1. Έχει μικρό κύκλο ζωής και ο χρόνος γενεάς είναι επίσης μικρός.
2. Μικρό μέγεθος πειραματόζωου και εύκολη καλλιέργεια στο εργαστήριο με χαμηλό κόστος.
3. Μεγάλος αριθμός απογόνων λόγω υψηλής γονιμότητας των θηλυκών. Τα θηλυκά μπορούν να εναποθέσουν >800 αυγά κατά τη διάρκεια της ζωής τους, ενδεικτικά ένα αυγό ανά 30 λεπτά με αρκετή τροφή και ιδανικές συνθήκες.
4. Είναι γνωστή η νευροανατομία του εντόμου και γι' αυτό χρησιμεύει σε πειράματα συμπεριφοράς και γενετικές μελέτες σχετικά με το νευροεκφυλισμό (ασθένειες).
5. Οι ώριμες προνύμφες διαθέτουν γιγαντιαία χρωμοσώματα με σαλικυλικούς αδένες. Τα γιγαντιαία αυτά χρωμοσώματα ονομάζονται πολυταινικά χρωμοσώματα και δημιουργούν "puffs" φούσκες που είναι ενδεικτικές περιοχές μεταγραφής και γονιδιακής δραστηριότητας, οπότε ενδείκνυται για χρωμοσωμικές μελέτες.
6. Το γονιδίωμα οργανώνεται μόνο σε 4 ζεύγη χρωμοσωμάτων: 3 ζεύγη αυτοσωμικών και 1 ζεύγος φυλετικών.
7. Το γονιδίωμα αποκωδικοποιήθηκε πλήρως και δημοσιεύτηκε από το 2000.
8. Τα αρσενικά δεν παρουσιάζουν μειωτικό ανασυνδυασμό, έτσι διευκολύνονται οι γενετικές μελέτες.

Λόγω των τελευταίων τριών πλεονεκτημάτων η *Drosophila melanogaster* έχει καθιερωθεί ως το κατάλληλο πειραματόζωο για γενετικές και μοριακές μελέτες που έχουν συμβάλει στην ανάπτυξη της μοριακής βιολογίας. Οι πρώτες μελέτες με χρήση της *Drosophila* ως πειραματόζωο χρονολογούνται στις αρχές του 20ου

αιώνα (Carpenter 1905, Castle et al 1906, Lutz 1911), αν και υπάρχουν βιβλιογραφικές αναφορές για τα μέσα του 18ου (Muller 1876). Η έρευνα με την *Drosophila melanogaster* επεκτάθηκε ύστερα από την χρησιμοποίηση της το 1909 από τον T.H Morgan και τους συνεργάτες του A. Sturtevant, C. Bridges και H. Muller στο πανεπιστήμιο Columbia, (Sturtevant, 1965). Μελέτες που χρησιμοποίησαν τη *Drosophila melanogaster* θεμελίωσαν βασικές αρχές της γενετικής που περιλαμβάνουν: τη χρωμοσωμική θεωρία της κληρονομικότητας, πολλαπλά αλληλόμορφα, γονιδιακή χαρτογράφηση, την μεταλλαξογένεση από ιονίζουσα ακτινοβολία, την ανακάλυψη των χημικών μεταλλαξογόνων και τη γενετική συμπεριφορά των χρωμοσωμικών ανωμαλιών. Επίσης είναι διαθέσιμες από το 1987 και γενετικές τεχνικές μετασχηματισμού. Μέσα από τη μοριακή βιολογία κατάφεραν να πραγματοποιήσουν την κατευθυνόμενη ιστοειδική έκφραση των γονιδίων, δηλαδή την έκφρασή τους σε συγκεκριμένες επιθυμητές χρονικές στιγμές και σε επιθυμητούς ιστούς. Επίσης μέσα από διάφορα διαγονιδιακά συστήματα επιτεύχθηκε η διαφορική έκφραση των γονιδίων με κατευθυνόμενη υπερέκφραση διαγονιδίων όπως π.χ. το ευρέως διαδεδομένο διαγονίδιο UAS/GAL4. Γενικότερα είναι ευρέως διαδεδομένο ότι η *Drosophila melanogaster* συνέβαλε στην επίλυση βασικών βιολογικών προβλημάτων σε πολλούς κλάδους της έρευνας όπως π.χ. στην μοριακή κατασκευή χρωμοσωμάτων, στην αναπτυξιακή βιολογία, στην νευροβιολογία, στην συμπεριφορά, στη μνήμη και μάθηση και στην οικολογία.

Η ονομασία του εντόμου *Drosophila melanogaster* προέρχεται από την ελληνική γλώσσα λόγω της προτίμησης του ζώου στη δροσιά και λόγω της μαύρης κοιλιάς του. Όπως είπαμε το έντομο ανήκει στην τάξη Δίπτερα και παρακάτω φαίνεται πιο αναλυτικά η **ταξινόμική θέση** της *Drosophila melanogaster*:

- Φύλο: Αρθρόποδα
- Υπόφυλο: Μονοσκελή
- Ομοταξία: Έντομα
- Τάξη: Δίπτερα
- Οικογένεια: Drosophilidae
- Γένος: *Drosophila*
- Υπογένος: *Drosophila*
- Είδος : *D. Melanogaster*



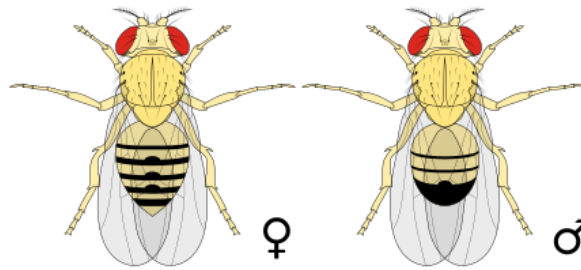
Σχηματική αναπαράσταση *Drosophila melanogaster*

1.2 Εξωτερική μορφολογία δίπτερου εντόμου, *Drosophila melanogaster*

Η *Drosophila melanogaster* αγρίου τύπου (wild type) έχει χρώμα σώματος κιτρινο-καφέ και χρώμα ματιών κεραμιδί (brick-red). Επίσης φέρει στην κοιλιά εγκάρσιους μαύρους δακτύλιους. Ενώ η μεταλλαγμένη σειρά w^{1118} , που χρησιμοποιήθηκε μεταξύ άλλων στα πειράματα της εργασίας αυτής, έχει σε ομοζυγωτία την υπολειπόμενη μεταλλαγή για το λευκό χρώμα ματιών.

Τα έντομα αυτά εμφανίζουν σεξουαλικό διμορφισμό, δηλαδή τα θηλυκά έχουν μήκος 2,5 χιλιοστά ενώ τα αρσενικά είναι ελαφρώς μικρότερα. Επίσης τα δύο φύλα ξεχωρίζουν και από άλλα χαρακτηριστικά όπως είναι το πίσω μέρος της κοιλιάς των αρσενικών που εμφανίζεται πιο σκουρόχρωμο και πιο στρογγυλό απ' ό,τι των θηλυκών (στα θηλυκά η κοιλιά είναι οξύληκτη λόγω του ωαποθέτη). Η διάκριση των 2 φύλων είναι εύκολη με βάση τις διαφορές τους στα χρώματα κυρίως αλλά και από άλλα βασικά χαρακτηριστικά. Τα αρσενικά για παράδειγμα φέρουν στο πρώτο ζευγάρι των ποδιών τους ένα σύνολο σμηρίγγων, που αποτελούν το φυλετικό χτένι. Ενώ τα θηλυκά δεν εμφανίζουν αυτό το

χαρακτηριστικό και έχουν επίσης διαφορές στη γενετική κοιλιακή χώρα. Επιπλέον τα αρσενικά έχουν ένα σύμπλεγμα από τρίχες στα αναπαραγωγικά τους όργανα που χρησιμοποιούνται για τη σύνδεση με τα θηλυκά κατά τη διάρκεια του ζευγαρώματος. Η αναγνώριση του φύλου στο στάδιο της νύμφης (pupa) γίνεται με χρήση στερεοσκοπίου αναγνωρίζοντας μέσα από το βομβύκιο τα φυλετικά χτένια του αρσενικού, στο στάδιο της προνύμφης (larva) η αναγνώριση είναι επίσης δυνατή γιατί τα θηλυκά φέρουν μια ευκρινή δομή, την σπερμοθήκη.



Η μύγα διαθέτει ένα μεμβρανώδες και στενό ζεύγος πτερύγων. Οι οπίσθιες πτέρυγες έχουν σμικρυνθεί σε πολύ μικρά όργανα ισορροπίας, τους ισορροπιστές (αλτήρες). Επίσης έχουν μυζητικά στοματικά εξαρτήματα που είναι προσαρμοσμένα για να γλείφουν ή να τρυπούν την τροφή. Τα ενήλικα άτομα εμφανίζουν ετερόνυμη μεταμερική οργάνωση γιατί τα μεταμερή τους έχουν την τάση να συντήκονται μεταξύ τους, έτσι σχηματίζονται διακριτές περιοχές. Το κεφάλι με 3 μεταμερή, ο θώρακας με 3 μεταμερή και η κοιλιά με 5-7 μεταμερή. Από τα μεταμερή του κεφαλιού προκύπτουν τα στοματικά εξαρτήματα, από αυτά του θώρακα προκύπτουν τα εξαρτήματα του θώρακα ενώ από της κοιλιάς τα αντίστοιχα κοιλιακά εξαρτήματα. Στη θωρακική περιοχή υπάρχουν 3 ζεύγη ποδιών που χρησιμοποιούνται για βάδιση και άλλου είδους κινήσεις όπως καθάρισμα του εξωσκελετού. Το ζώο στο στάδιο της προνύμφης δεν διαθέτει πόδια και απλά έρπει.

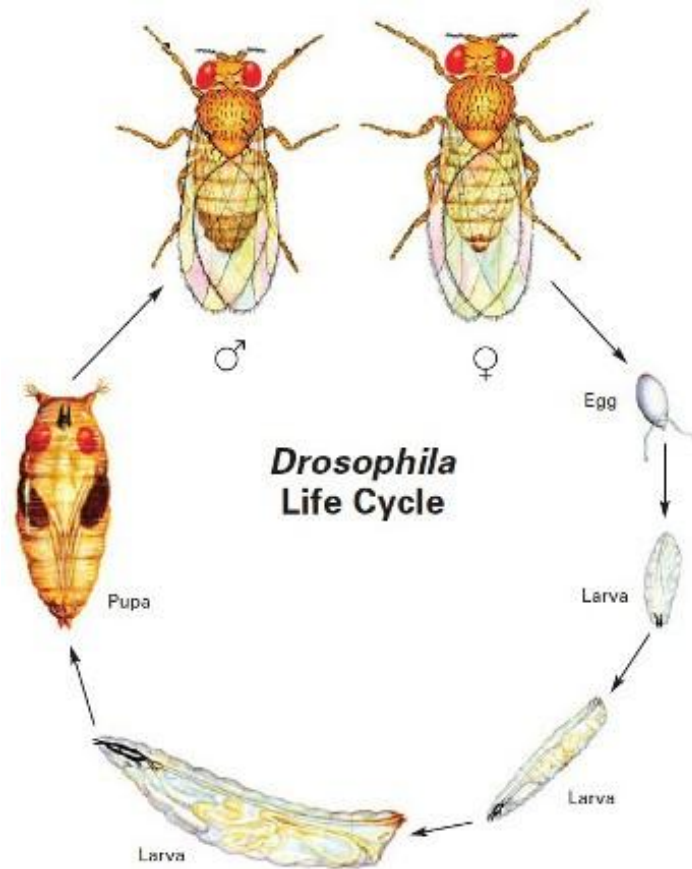
1.3 Κύκλος ζωής του εντόμου

Η διάρκεια ζωής της *Drosophila* ποικίλλει ανάλογα με το στέλεχος και τις περιβαλλοντικές συνθήκες, κυρίως την θερμοκρασία, όπως συμβαίνει σε πολλούς εξώθερμους οργανισμούς. Σε ιδανικές συνθήκες καλλιέργειας, η διάρκεια ζωής της του αγρίου τύπου Oregon-R είναι έως 80 ημέρες περίπου. Σε δυσμενείς συνθήκες η διάρκεια ζωής του εντόμου περιορίζεται σημαντικά.

Τα γονιμοποιημένα ωάρια κατευθύνονται από την ωοθήκη προς τον ωαποθέτη και αμέσως μετά τη γονιμοποίηση ξεκινά η εμβρυική ανάπτυξη. Εάν οι συνθήκες είναι άριστες τα αυγά αποτίθενται αμέσως μετά την γονιμοποίηση. Σε δυσμενείς συνθήκες, όπως χαμηλή θερμοκρασία και έλλειψη κατάλληλης θέσης για την εναπόθεση αυγών, το θηλυκό δεν γεννάει αμέσως τα γονιμοποιημένα ωάρια και τότε τα πρώτα στάδια της εμβρυικής ανάπτυξης γίνονται στο εσωτερικό του ατόμου. Η αναπτυξιακή περίοδος, δηλαδή η χρονική περίοδος που απαιτείται για την ανάπτυξη του ατόμου από το πρώτο εμβρυικό στάδιο μέχρι το στάδιο του ενήλικου, διαρκεί γύρω στις 8,5-9 μέρες στους 25°C και 7 μέρες στους 28°C. Σε περίπτωση υπέρ-πληθυσμού ο χρόνος ανάπτυξης αυξάνεται και οι μύγες που προκύπτουν είναι μικρότερες σε μέγεθος.

Το θηλυκό γεννά γύρω στα 400-800 αυγά στην διάρκεια της ζωής του και σχεδόν 5 αυγά σε κάθε γέννα τα οποία εναποθέτονται πάνω στην τροφή. Τα αυγά είναι περίπου 0,5mm σε διάμετρο και εκκολάπτονται μετά από 22-24 ώρες. Από το αυγό εκκολάπτεται η προνύμφη (larva) που μοιάζει με σκουλήκι, αυτό το στάδιο διαρκεί 4 ημέρες και μέσα σ' αυτό το διάστημα γίνονται 2 εκδύσεις (αποβολή του χιτίνωδους περιβλήματος της προνύμφης) οι οποίες χωρίζουν το προνυμφικό στάδιο σε 3 επιμέρους στάδια. Οι προνύμφες τρέφονται με την ίδια τροφή των ώριμων ατόμων, σκάβοντας στοές μέσα στην τροφή, οπότε η ύπαρξη στοών στην τροφή του φιαλιδίου δείχνει την επιτυχία μιας καλλιέργειας. Στη συνέχεια η προνύμφη βγαίνει από την τροφή, ακινητοποιείται στα τοιχώματα του φιαλιδίου, μικραίνει σε μέγεθος και μετατρέπεται σε νύμφη (pupa) σε διάρκεια περίπου μισής ημέρας. Συνολικά το στάδιο της νύμφης διαρκεί ~100 ώρες (4 ημέρες). Αφού ολοκληρωθεί η ανάπτυξη του ενήλικου ατόμου στο τέλος του σταδίου της νύμφης, τότε το έντομο εκκολάπτεται από το βομβύκιο ανοίγοντας οπή στο πρόσθιο τμήμα του. Η αρχική εμφάνιση του εντόμου μόλις βγει από το βομβύκιο έχει ως εξής, επιμηκυμένο σώμα με αναδιπλωμένα φτερά (pharate adult) και χρώμα ανοικτότερο του κανονικού. Το ενήλικο έντομο παίρνει την τελική του μορφή μια ώρα μετά την εκκόλαψη όπου γίνεται έκπτυξη των φτερών, ενώ μερικές ώρες μετά αποκτάται και το κανονικό χρώμα. Ωστόσο η σεξουαλική ωριμότητα αποκτάται 8-12 ώρες μετά την εκκόλαψη του εντόμου από το βομβύκιο. Ο αριθμός των αυγών που γεννά ένα θηλυκό άτομο φθίνει στην

διάρκεια του χρόνου ζωής του και ο μέγιστος αριθμός αυγών παρατηρείται 3-5 ημέρες μετά την εκκόλαψη του ενήλικου εντόμου.



Η εικόνα σείχνει τον κύκλο ζωής του εντόμου *D. Melanogaster*

1.4 Μεταμόρφωση

Το φαινόμενο της μεταμόρφωσης διαδραματίζεται κατά τη διάρκεια της μετεμβρυϊκής ανάπτυξης, περίπου 120 ώρες μετά την έναρξη της εμβρυϊκής ανάπτυξης, όπου το ζώο υφίσταται δραματικές αλλαγές. Πριν από αυτό γίνεται η εμβρυϊκή ανάπτυξη μέσα στο αυγό. Κατά τη διάρκεια της μεταμόρφωσης συμβαίνουν μία σειρά εκδύσεων για την αύξηση και ανάμεσα στις εκδύσεις αυτές υπάρχουν τα ενδιάμεσα στάδια.

Η μεταμόρφωση μπορεί να χωριστεί σε 2 στάδια: μία 12ωρη περίοδο πριν τη δημιουργία της νύμφης που χαρακτηρίζεται από κλιμάκωση (έναρξη μετάβασης από προνύμφη σε νύμφη) και μία επακόλουθη περίοδο προνύμφης που διαρκεί 84 ώρες. Όλη αυτή η διαδικασία στα έντομα ρυθμίζεται από διάφορες ορμόνες. Μελέτες με άλλα έντομα υποδεικνύουν ότι η απελευθέρωση της εκδυσόνης από το δακτυλιοειδή αδένια προκαλείται από την προθωρακοτρόπο ορμόνη (PTTH), που παράγεται από τέσσερις ομάδες νευροεκκριτικών κυττάρων του εγκεφάλου. Πιο συγκεκριμένα, το ενδοεγκεφαλικό τμήμα του εγκεφάλου και τα κοιλιακά γάγγλια περιέχουν αρκετές ομάδες νευροεκκριτικών κυττάρων που παράγουν την προθωρακοτρόπο ορμόνη (PTTH). Αυτά τα νευροεκκριτικά στέλνουν τους άξονες τους σε ένα ζεύγος οργάνων πίσω από τον εγκέφαλο, τα καρδιακά σωμάτια, τα οποία χρησιμεύουν ως αποθηκευτικά και απελευθερωτικά όργανα για την PTTH (και άλλες ορμόνες). Η PTTH μεταφέρεται από την αιμολέμφο στον προθωρακικό αδένια και έτσι διεγείρει την παραγωγή εκδυσόνης. Η εκδυσόνη με τη σειρά της ενεργοποιεί διαδικασίες που οδηγούν στην έκδυση, δηλαδή στην απόρριψη του παλιού επιδερμίδιου. Η απλή έκδυση συνεχίζεται όσο υπάρχει στην αιμολέμφο η νεανική ορμόνη που παράγεται από τα αλλαντοειδή σωμάτια σε ικανοποιητικές ποσότητες. Σε μεταγενέστερα ενδιάμεσα στάδια τα αλλαντοειδή σωμάτια απελευθερώνουν προοδευτικά λιγότερη νεανική ορμόνη μέχρι που φτάνει σε πολύ χαμηλά επίπεδα και τότε η προνύμφη εκδύεται για να γίνει νύμφη. Αντίστοιχα, η παύση της παραγωγής αυτής της ορμόνης στη νύμφη οδηγεί στην επόμενη έκδυση και έτσι έχουμε στο τελικό στάδιο το ενήλικο άτομο (μεταμόρφωση). Στη συνέχεια τα αλλαντοειδή σωμάτια ενεργοποιούνται πάλι στα ενήλικα άτομα για την παραγωγή αυγών, ενώ οι προθωρακικοί αδένες στα ενήλικα άτομα εκφυλίζονται καθώς πλέον δεν υπάρχει έκδυση. («Ολοκληρωμένες αρχές Ζωολογίας, 11η έκδοση», Hickman, 2001)

Το έντομο *D.melanogaster* όπως και το 88% των εντόμων είναι ολομετάβολο. Ολομετάβολη μεταμόρφωση είναι το είδος της μεταμόρφωσης που διαχωρίζει τις φυσιολογικές διεργασίες της αύξησης (προνύμφη) από αυτές της διαφοροποίησης (νύμφη) και της αναπαραγωγής (ενήλικο άτομο). Η σκωληκόμορφη προνύμφη, γνωστή ως κάμπια ή «σκουλήκι», έχει μασητικά στοματικά εξαρτήματα και τρέφεται συνεχώς γι'αυτό αυξάνει και σε μέγεθος. Η κινητική δραστηριότητα της προνύμφης περιορίζεται στη μάσηση, την έρπυση και κάποιες αντανάκλαστικές κινήσεις. Μέσα από τη διαδικασία της έκδυσης, η προνύμφη αποβάλλει το χιτινώδες περίβλημα της (cuticle) 2 φορές. Επίσης μετά από κάθε έκδυση η προνύμφη αλλάζει στάδιο, δηλαδή πριν από την 1η έκδυση, η προνύμφη είναι 1ου σταδίου, μετά την 1η έκδυση γίνεται 2ου σταδίου και μετά την 2η έκδυση είναι 3ου σταδίου προνύμφη. Αυτή η 3ου σταδίου προνύμφη κάποια στιγμή απομακρύνεται από την τροφή και ακινητοποιείται πάνω στα

τοιχώματα του φιαλιδίου (στάδιο λευκής προνύμφης-white prepupa), παράλληλα εκκρίνει ένα ανθεκτικό χιτινώδες περίβλημα, το βομβύκιο (pupaarium) και αυτή η φάση είναι η απαρχή του σταδίου της νύμφης (pupa).

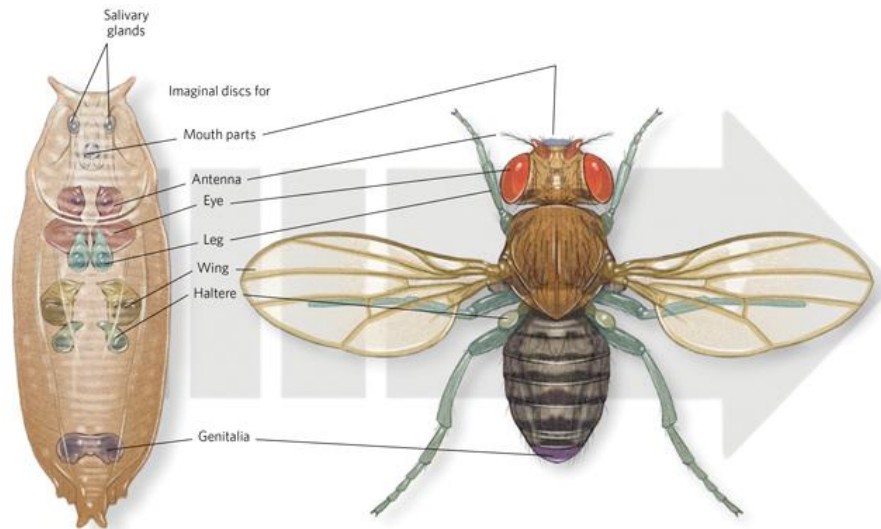
Όπως προαναφέρθηκε, το φαινόμενο της μεταμόρφωσης διαδραματίζεται στο στάδιο της νύμφης, κατά την διάρκεια της οποίας η σκωληκόμορφη προνύμφη μετατρέπεται σε ώριμο δίπτερο άτομο. Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας η προνύμφη διέρχεται από δραματικές φάσεις ιστόλυσης και ιστογένεσης. Τα περισσότερα λειτουργικά κύτταρα της προνύμφης καταστρέφονται μέσω της διαδικασίας της απόπτωσης ενώ άλλα αδιαφοροποίητα κύτταρα υφίστανται διαφοροποίηση. Πολλά από τα όργανα του ενήλικου ατόμου, όπως π.χ. τα φτερά και τα πόδια, δημιουργούνται από ανεξάρτητες ομάδες αδιαφοροποίητων κυττάρων, τους λεγόμενους δίσκους ενήλικου (imaginal discs), οι οποίοι απαντούν στο εσωτερικό του σώματος της προνύμφης. Ταυτόχρονα με την ανάπτυξη της προνύμφης, αυξάνεται ραγδαία ο αριθμός των κυττάρων των εμβρυικών δίσκων π.χ. ο δίσκος του φτερού αποτελείται από 60000 κύτταρα και οι δίσκοι των ποδιών από 10000 κύτταρα. Οπότε οι επόμενες μέρες της μεταμόρφωσης χαρακτηρίζονται από όλες τις αλλαγές κυττάρων και ιστών που πρέπει να πραγματοποιηθούν για την εμφάνιση ενήλικων δομών, όπως είναι οι τρίχες και οι υποδοχείς.

Όσον αφορά τους μυς, με την εξαίρεση λίγων προνυμφικών μυών οι οποίοι διαφοροποιούνται, όλοι οι υπόλοιποι μύες ιστολύονται και αντικαθίστανται από καινούργιους μύες που προέρχονται από μυοβλάστες.

Επίσης, το προνυμφικό νευρικό σύστημα δέχεται εκτεταμένη αναδιοργάνωση αλλά δεν ανακατασκευάζεται “de novo”. Πολλά νευρικά κύτταρα (όλων των τύπων) πεθαίνουν μέσω προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου. Ενώ νέοι νευρώνες (αισθητικοί και ενδονευρώνες) εμφανίζονται μέσω διαίρεσης νευροβλαστών οι οποίοι έχουν εμβρυονική προέλευση. Τέλος οι κινητικοί νευρώνες, είναι η μοναδική κατηγορία νευρώνων που διατηρούνται από το στάδιο της προνύμφης μέχρι τον ενήλικο οργανισμό και διέρχονται από δύο φάσεις. Κατά την πρώτη φάση χάνουν αξονικούς κλάδους και τελικά κομβία (αφού ο μυς-στόχος τους έχει ιστολυθεί). Επίσης οι δενδρίτες των νευρώνων αυτών συρρικνώνονται και οι περισσότερες συνάψεις χάνονται. Κατά τη διάρκεια του νυμφικού σταδίου ~20HAPF (20 ώρες από την έναρξη του σταδίου) οι κινητικοί νευρώνες επανακτούν δενδρίτες και νέες συνάψεις δημιουργούνται με τους ενδονευρώνες. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, το κεντρικό και περιφερικό νευρικό σύστημα να δέχονται εκτεταμένη αναδιοργάνωση. Στο τέλος το ενήλικο άτομο διαθέτει ένα νευρομυϊκό σύστημα που εξυπηρετεί τις συμπεριφορικές του ανάγκες, οι οποίες διαφέρουν δραματικά από αυτές της προνύμφης. Οι κινητικές συμπεριφορές του ενήλικου ατόμου αποτελούνται κυρίως από το άλμα, τη

βάδιση (τριποδικό σύστημα), τη συμπεριφορά ερωτοτροπίας, τη πτήση και την ωοαπόθεση.

Οι κινητικοί νευρώνες εκτός από τις δομικές και λειτουργικές αλλαγές, δέχονται και αλλαγές στις ηλεκτρικές τους ιδιότητες. Για παράδειγμα, ο κινητικός νευρώνας MN5, που νευρώνει τον ραχιαίο μυ του σωματικού τοιχώματος της pronύμφης, είναι σε αυτό το στάδιο ένας «αργός» νευρώνας και συμμετέχει στον ερπυσμό. Στη συνέχεια όμως, κατά την μεταμόρφωση, ο MN5 μετατρέπεται σε «γρήγορο» κινητικό νευρώνα, που νευρώνει τον DLM πτητικό μυ και συμμετέχει με αυτό τον τρόπο στην πτήση. Επίσης κατά την διάρκεια της μεταμόρφωσης, το μεμβρανικό δυναμικό ηρεμίας των κινητικών νευρώνων καθώς και η ροή ιόντων Ca^{2+} τροποποιούνται. Όλες αυτές οι αλλαγές πιθανόν αποτελούν σήματα για την έναρξη της δομικής αναδιαμόρφωσης των κινητικών νευρώνων σε συνδυασμό με σήματα που προέρχονται από εκφυλισμένους μυϊκούς στόχους, αυτόνομη δραστηριότητα του συστήματος, νευρορυθμιστές και άλλους ενδονευρώνες. Όμως η κύρια επιρροή στη δομική αναδιοργάνωση γίνεται από εκδυσσοστεροειδείς ορμόνες (Consoulas et al, 2000).



Η εικόνα δείχνει το στάδιο Μεταμόρφωσης στη D. Melanogaster

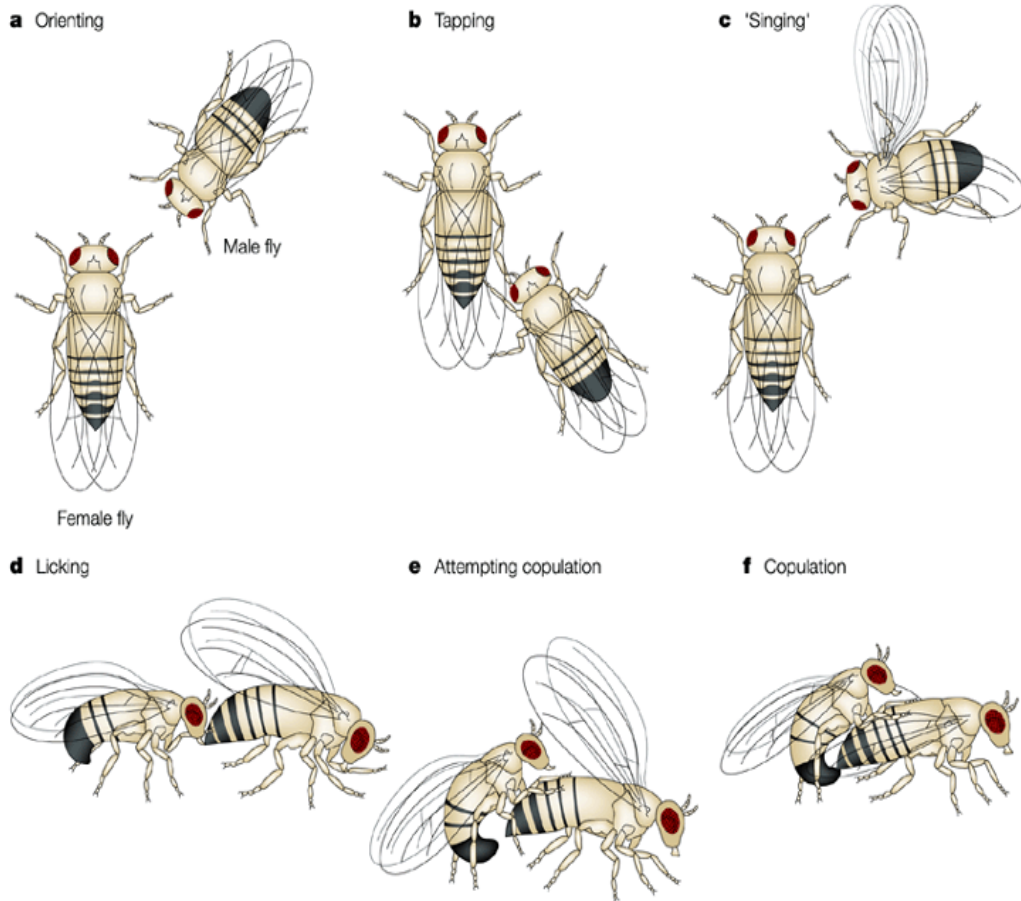
1.5 ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑ ΕΡΩΤΟΤΡΟΠΙΑΣ

Η ερωτοτροπία είναι η πιο καλά μελετημένη συμπεριφορά στη *Drosophila melanogaster*. Είναι μία γενετικά καθορισμένη διαδικασία συμπεριφοράς και επηρεάζεται από μία μεγάλη ποικιλία γονιδίων, δηλαδή πολλά διαφορετικά είδη πλειοτροπικών μεταλλάξεων οδηγούν σε ελαττωματική συμπεριφορά ερωτοτροπίας. Τα «γονίδια ερωτοτροπίας» που φαίνεται να παίζουν πιο συγκεκριμένο ρόλο αναγνωρίστηκαν ως αισθητηριακές, μαθησιακές ή ρυθμικές μεταλλάξεις. Οι αναπαραγωγικές ανωμαλίες μέσα από έρευνες δίνουν αρκετές πληροφορίες σχετικά με τις ενέργειες των αρσενικών και θηλυκών κατά τη διάρκεια της ερωτοτροπίας που διαφορετικά θα μπορούσαν να περάσουν απαρατήρητες. Για την έναρξη και τα μετέπειτα στάδια της συμπεριφοράς ερωτοτροπίας του αρσενικού μεσολαβεί φυσικά το ΚΝΣ (Broughton et al., 2004).

Η συμπεριφορά ερωτοτροπίας της *D.melanogaster* περιλαμβάνει μια τυποποιημένη σειρά από συγκεκριμένες ενέργειες. Όταν αρσενικό και θηλυκό τοποθετηθούν μαζί είτε σε χώρο με πηγή φαγητού, είτε σε πειραματικές συνθήκες στην κατάλληλη συσκευή παρατήρησης ερωτοτροπίας τότε αισθάνονται γρήγορα το ένα την παρουσία του άλλου. Πρωτίστως αυτό φαίνεται να γίνεται από το αρσενικό που ανιχνεύει το θηλυκό χρησιμοποιώντας μερικές από τις αισθήσεις του όπως είναι η όραση αλλά και η όσφρηση-ανίχνευση των φερομονών που εκκρίνει το θηλυκό από τις κεραίες του. Αρχικά το αρσενικό αποκαλύπτει ότι έχει αντιληφθεί το θηλυκό με τον προσανατολισμό του σώματος του προς αυτό (Orientation). Στη συνέχεια το αρσενικό ακολουθεί το θηλυκό που είτε παραμένει ακίνητο είτε κάνει κύκλους (Following) (M. Cobb et. al 1985) και αμέσως μετά βγάζει το ένα από τα δύο φτερά του (δεν γίνεται ερωτοτροπία σε πτήση αντίθετα με άλλα δίπτερα) (C. Wehrhahn, 1979). Αυτή η προέκταση συνοδεύεται με δόνηση (Singing), η οποία παράγει ένα ήχο, το λεγόμενο «τραγούδι της αγάπης» που μπορεί να καταγραφεί με εξειδικευμένα μικρόφωνα (D. A. Wheeler et. al. 1988; C. P. Kyriacou et. al. 1990). Το θηλυκό μπορεί να επιλέξει το αρσενικό αν είναι κατάλληλο για ζευγάρωμα με κριτήριο τα χαρακτηριστικά αυτού του ήχου από το φτερό του αρσενικού. Αρκετά δευτερόλεπτα έως λίγα λεπτά μετά την έναρξη της αλληλεπίδρασης μεταξύ των 2 μυγών, το αρσενικό επεκτείνει την προβοσκίδα του και λειχεί τα γεννητικά όργανα του θηλυκού (Licking). Το licking ακολουθείται αμέσως από την πρώτη



προσπάθεια του αρσενικού για συνουσία, που περιλαμβάνει κάμψη της κοιλιάς του (Attempting Copulation).



Nature Reviews | Genetics

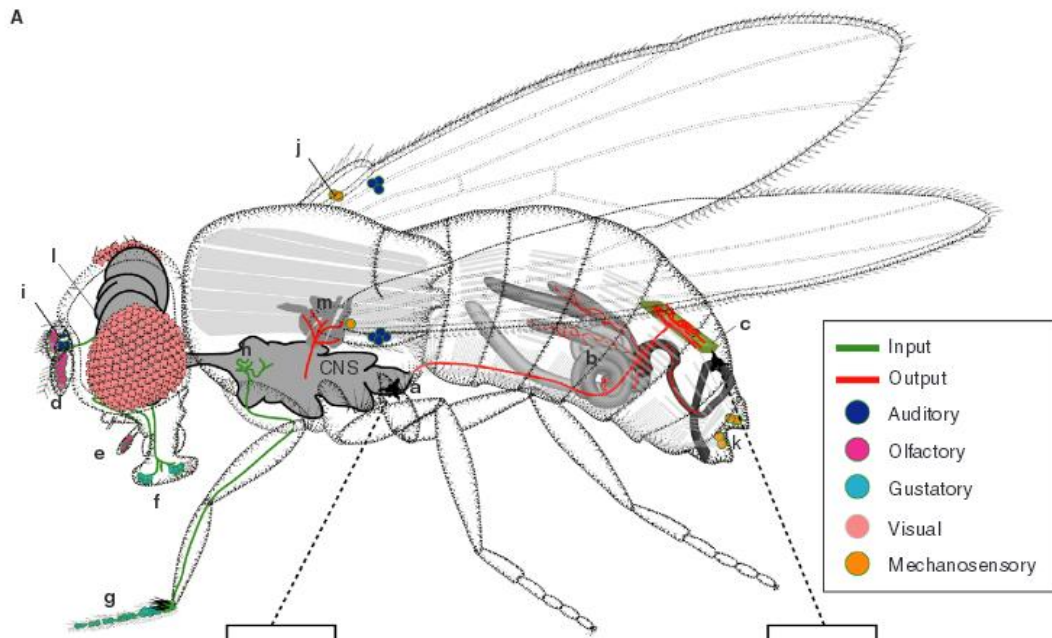
Αν το αρσενικό αποτύχει σε μια προσπάθεια συνουσίας, τότε μπορεί να σταματήσει να φλερτάρει για μερικές στιγμές και όταν συνεχίσει την ερωτοτροπία, σχεδόν πάντα επιστρέφει πρώτα στη φάση του προσανατολισμού, του κυνηγητού και του ερωτικού καλέσματος αντίστοιχα και ακολουθεί αυτή τη σταθερή σειρά ξανά. Αυτή η ακολουθία των ενεργειών και η αλληλεπίδραση μεταξύ των μυγών θεωρείται επιτυχής αν ο δείκτης μέτρησης ερωτοτροπίας (Courtship Index) (D. A. Wheeler et. al. 1988; C. P. Kyriacou et. al. 1990) της βραχυπρόθεσμης εργαστηριακής παρατήρησης ζευγαριών αγρίου τύπου είναι πάνω από 90%. «Επιτυχία» θεωρείται η συνουσία (Copulation), η οποία έχει συγκεκριμένη διάρκεια 20 λεπτών στο συγκεκριμένο είδος (G. L. Fowler 1973).

Οι δράσεις του θηλυκού στην ερωτοτροπία δεν είναι εμφανείς με μία απλή παρατήρηση με το ανθρώπινο μάτι. Ωστόσο, το θηλυκό δεν είναι απόλυτα παθητικό στη διαδικασία αυτής της συμπεριφοράς και συγκεκριμένα αυτό είναι που καθορίζει αν θα διεξαχθεί το τελευταίο στάδιο της συνουσίας ανάλογα με το γεγονός αν θα είναι δεκτικό προς το αρσενικό ή όχι (G. Streisinger 1948; J. C. Hall 1978). Εντούτοις, υπάρχουν περιπτώσεις που τα θηλυκά εκτελούν κάποιες ήπιες συμπεριφορές απόρριψης προς το αρσενικό (K. Connolly and R. Cook. 1973). Αυτό έχει αποδειχθεί ότι συμβαίνει σε περιπτώσεις όπου το θηλυκό είναι ήδη ζευγαρωμένο από πριν, δηλαδή δεν είναι παρθένο (Richard W. Siegel and Jeffrey C. Hall, 1979). Λόγω του προηγούμενου ζευγαρώματος γίνονται κάποιες αλλαγές στο θηλυκό, για παράδειγμα το χημικό προφίλ του ζευγαρωμένου θηλυκού μεταβάλλεται και αυτή η φερομονική αλλαγή επηρεάζει αρκετά την συμπεριφορά του αρσενικού. Επίσης το γονιμοποιημένο θηλυκό μπορεί να απορρίψει τη δράση του αρσενικού με λακτίσματα αλλά η πιο αποτελεσματική κίνηση για απόρριψη από το θηλυκό είναι η εξώθηση του ωαποθέτη του (ovipositor), ο οποίος είναι καλυμμένος με απωθητικά οσμογόνα (K. Connolly and R. Cook. 1973). Αυτές οι ενέργειες μπλοκάρουν συνήθως τη συμπεριφορά ερωτοτροπίας του αρσενικού το οποίο πολλές φορές παθαίνει και κατάθλιψη την οποία θυμάται (για μερικές ώρες) (L. Tompkins 1984; L. Tompkins et. al. 1983; D. Scott et. al 1988). Αυτό έχει αποδειχθεί από κάποιες έρευνες και πειράματα όπου αρσενικό τοποθετήθηκε αρχικά για ζευγάρωμα με ήδη ζευγαρωμένο θηλυκό από το οποίο βίωνε την απόρριψη και όταν στην συνέχεια τοποθετήθηκε με παρθένο θηλυκό ο δείκτης μέτρησης ερωτοτροπίας έδειχνε πολύ χαμηλά νούμερα. Οπότε το αρσενικό καθώς έχει μνήμη βραχυπρόθεσμη (STM), μακροπρόθεσμη (LTM) αλλά και ανθεκτική στην αναισθησία μνήμη (ARM), θυμόταν αυτή την απόρριψη που δέχθηκε από το προηγούμενο θηλυκό και στη συνέχεια δεν έκανε ερωτοτροπία με το παρθένο θηλυκό που του δόθηκε (reviewed in Berry et al., 2008; Griffith and Ejima, 2009).

Το θηλυκό είναι δεκτικό ως προς τη συμπεριφορά ερωτοτροπίας του αρσενικού εάν, κατά τη διάρκεια που το αρσενικό κάνει προσπάθεια συνουσίας με κάμψη της κοιλιάς, αυτό επιβραδύνει τη γενική κινητική δραστηριότητά του ούτως ώστε να γίνει ένας καλύτερος στόχος για τις προσπάθειες συνουσίας του αρσενικού. Για να πετύχει στο τέλος η συνουσία, το θηλυκό πρέπει να πάρει μια συγκεκριμένη στάση, να ανοίξει τα φτερά του και να χειριστεί τα εξωτερικά γεννητικά του όργανα (Hall 1994).

1.5.1 Στη συμπεριφορά ερωτοτροπίας εμπλέκονται πολλά αισθητήρια συστήματα:

Στη *Drosophila* η συμπεριφορά ερωτοτροπίας του αρσενικού προς το θηλυκό εύκολα αναγνωρίζεται και ποσοτικοποιείται σε υποσυμπεριφορές που εκτελούνται με συγκεκριμένη σειρά (Bastock and Manning 1955, Hall 1994). Κάθε μία από αυτές τις συμπεριφορές παρέχει στο αρσενικό τη δυνατότητα να αποκτήσει αισθητηριακές πληροφορίες σχετικά με το στόχο του. Το αρσενικό χρησιμοποιεί οπτικές, οσφρητικές και ακουστικές πληροφορίες για να προσεγγίσει την πιθανή του σύντροφο (Ejima et al. 2005, Ejima and Griffith 2008).



Η εικόνα δείχνει τη θέση των ακουστικών, οσφρητικών, γευστικών, οπτικών και μηχανοαισθητικών υποδοχέων και συστημάτων στο ενήλικο αρσενικό άτομο.

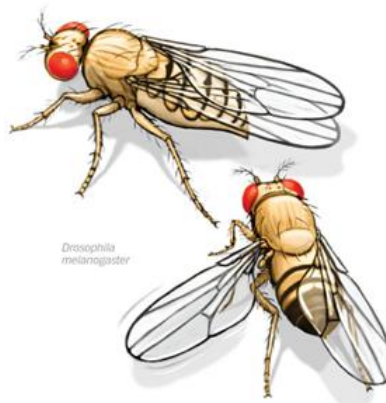
Η σταθερή αλληλουχία των επακόλουθων συμπεριφορών και μερικές μελέτες που απέκλεισαν συγκεκριμένες αισθητηριακές οδούς, προτείνουν το ακόλουθο μοντέλο για την αλληλεπίδραση του αρσενικού με το θηλυκό. Όταν το αρσενικό βρεθεί κοντά σε ένα θηλυκό, τότε η πρώτη του αντίδραση είναι ο προσανατολισμός του προς τον στόχο ερωτοτροπίας, δηλαδή προς αυτό. Ο προσανατολισμός και η παρακολούθηση σε κοντινή απόσταση επιτρέπουν στο αρσενικό να ανιχνεύσει πιθανές αερομεταφερόμενες φερομόνες χαμηλής πτητικότητας (Ferveur 2005). Το αρσενικό αφού εντοπίσει το θηλυκό, χτυπά ελαφρώς την κοιλιά αυτού με το μπροστινό του (προθωρακικό) πόδι (απτική πληροφορία). Αυτό θα μπορούσε να αποτελέσει ένα μηχανοαισθητικό ερέθισμα

για το θηλυκό, αλλά θα μπορούσε επίσης να επιτρέψει στο αρσενικό να ανιχνεύσει επιδερμικές μη πτητικές φερομόνες με τα χημειοευαίσθητα όργανα που έχει στα μπροστινά του άκρα (Bray and Amrein 2003). Το άγγιγμα στην κοιλιά ακολουθείται από επέκταση του ενός από τα δύο φτερά και δόνηση του με σκοπό να παραχθεί το τραγούδι της ερωτοτροπίας. Η δομή του τραγουδιού είναι ειδική για το είδος και επιτρέπει στο θηλυκό να ταυτοποιήσει το αρσενικό ως κατάλληλο για σύζευξη (για ανασκόπηση, βλ. Tauber and Eberl 2003), επιπλέον αυξάνει τη δεκτικότητα του. Το τραγούδι έχει επίσης διεγερτικές επιδράσεις στο ίδιο το αρσενικό, αφού αυξάνει τον ενθουσιασμό του για ερωτοτροπία προς άλλες μύγες (von Schilcher 1976b; Eberl et al. 1997). Μετά τον προσανατολισμό, την παρακολούθηση και το τραγούδι, που εκτελούνται συνήθως για μερικά λεπτά, το αρσενικό εφαρμόζει την προβοσκίδα του στα γεννητικά όργανα του θηλυκού και λαμβάνει δειγματοληψία από διαφορετικού τύπου μη πτητικές φερομόνες τις οποίες αναγνωρίζει με το γευστικό του αισθητήριο σύστημα. Το αρσενικό μπορεί να κάνει πολλές προσπάθειες πριν τελικά συνουσιαστεί επιτυχώς. Αυτά τα τελικά βήματα θα μπορούσαν επίσης να περιλαμβάνουν μηχανοαισθητικές διεγέρσεις και για τους δύο συμμετέχοντες καθώς τα γεννητικά τους όργανα είναι γεμάτα με μηχανοαισθητικές τρίχες (Ejima and Griffith 2008).

Τόσο οι αρσενικές όσο και οι θηλυκές μύγες συσσωρεύουν και ενδεχομένως ενσωματώνουν διάφορους τύπους αισθητηριακών πληροφοριών κατά τη διάρκεια μίας σεξουαλικής συνάντησης (Markow 1987, Krstic et al. 2009). Πολλές μελέτες είχαν ως στόχο να κατανοήσουμε ποιά αισθητήρια συστήματα χρησιμοποιούνται για την καθοδήγηση της ίδιας της διαδικασίας ερωτοτροπίας και των πλαστικών πτυχών αυτής της συμπεριφοράς. Όμως δεν συμφωνούν όλες οι μελέτες για τη σχετική σημασία συγκεκριμένων αισθητήριων συστημάτων. Ενώ σε μερικές περιπτώσεις οι διαφορές αφορούν στην πλειοτροπία των επιδράσεων από τις μεταλλάξεις και την έκφραση πρότυπων διαγονιδίων, συγκεκριμένες διαφορές μεταξύ των μελετών μπορούν να εξηγηθούν με τις διαφορές στις συνθήκες υπό τις οποίες παρατηρήθηκε η συμπεριφορά (Ejima and Griffith 2008, Krstic et al. 2009). Η ερωτοτροπία δεν εξαρτάται αποκλειστικά από μία συγκεκριμένη αισθητηριακή πληροφορία που εισέρχεται, αφού η απαλοιφή κάθε διαφορετικού αισθητήριου συστήματος μεμονωμένα δεν μειώνει την ερωτοτροπία (Ejima et al. 2005; Krstic et al. 2009). Μόνο η ολοκληρωτική στέρηση αισθητηρίων μπορεί να μειώσει την ερωτοτροπία κοντά στο μηδέν (Gailey et al. 1986), υποδηλώνοντας με αυτό ότι στη *Drosophila* η συμπεριφορά οδηγείται από πλεονάζοντα ερεθίσματα.

Δεδομένου ότι το αρσενικό χρησιμοποιεί πολλαπλές ενδείξεις για να ξεκινήσει και να διατηρήσει την ερωτοτροπία, παράγοντες όπως οι συνθήκες φωτισμού και το μέγεθος θαλάμου παρατήρησης μπορούν εύκολα να επηρεάσουν την εμφάνιση συγκεκριμένων ενδείξεων και την ιεραρχία των αισθητηρίων συστημάτων που εμπλέκονται. Ένα παράδειγμα είναι το μέγεθος του θαλάμου παρατήρησης, δηλαδή μικροί θάλαμοι μπορεί να ενισχύσουν το

ρόλο χημικών σημάτων που είναι χαμηλής πτητικότητας ή θα μπορούσαν να επηρεάσουν την κατάσταση διέγερσης ή το επίπεδο άγχους. Όσον αφορά την κινητική δραστηριότητα, ακόμα και εδώ το μέγεθος θαλάμου παρατήρησης μπορεί να έχει επιπτώσεις στην απόδοση του ζώου. Ωστόσο, το φως είναι εξίσου σημαντικό. Σε συνθήκες έλλειψης φωτός ή σε έντονο κόκκινο φως, το αρσενικό αναγκάζεται να στηριχθεί σε μη οπτικές ενδείξεις. Να τονισθεί ότι δεν υπάρχει «σωστό» μέγεθος θαλάμου παρατήρησης ή επιπέδου φωτός: Οι μύγες θα κάνουν ερωτοτροπία κάτω από ποικίλες συνθήκες, αλλά πώς το κάνουν και τι είναι αυτό που τους κινεί την προσοχή και μαθαίνουν από αυτό, είναι διαφορετικό. Αυτό αποτελεί πρόκληση για τους ερευνητές, στο να ερμηνεύσουν τα αποτελέσματά τους από την άποψη του τι έζησε πραγματικά η μύγα. Η αντιμετώπιση αυτής της πρόκλησης θα δώσει μια ολοκληρωμένη εικόνα αυτών των ισχυρών και έντονα πλαστικών συμπεριφορών.



1.5.2 Καταστολή της συμπεριφοράς ερωτοτροπίας προς τα θηλυκά μετά από έκθεση σε ήδη ζευγαρωμένα θηλυκά: Συνειρμική μάθηση

Η πρώτη αναφορά μάθησης που σχετίζεται με τη συμπεριφορά ερωτοτροπίας ήταν όταν διαπιστώθηκε ότι η έκθεση ώριμων αρσενικών σε ζευγαρωμένα θηλυκά για μία ώρα οδηγεί σε καταστολή της ερωτοτροπίας, προς το επακόλουθο παρθένο θηλυκό, που διαρκεί για 2-3 ώρες (Siegel and Hall 1979). Αυτή η συμπεριφορά πρότυπο, που συχνά ονομάζεται «Προσαρμοστική Ερωτοτροπία» ή «Προσαρμοστική Καταστολή Ερωτοτροπίας», έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως και οι μηχανισμοί σχηματισμού μνήμης για τα ζευγαρωμένα θηλυκά έχουν διερευνηθεί τόσο σε επίπεδο θεωρίας μάθησης όσο και σε κυτταρικό και μοριακό επίπεδο.

Είναι η προσαρμοστική ερωτοτροπία πραγματική μάθηση; Η πιο απλή εξήγηση στην παρατήρηση των Siegel και Hall είναι ότι τα ζευγαρωμένα θηλυκά παράγουν κάποιο είδος απωθητικής (αντι-αφροδισιακής-antiaphrodisiac) χημικής ένωσης που άμεσα απενεργοποιεί την ερωτοτροπία, ωστόσο πολλές ενδείξεις δείχνουν ότι αυτό δε συμβαίνει. Πρώτον, η παρουσία ενός ζευγαρωμένου θηλυκού από μόνη της δεν προκαλεί μεταβολή στην επακόλουθη συμπεριφορά ερωτοτροπίας (Tompkins et al. 1983, Ackerman and Siegel 1986, Ejima et al. 2007). Εάν το ζευγαρωμένο θηλυκό φέρει ένα αντιαφροδισιακό, αυτή η χημική ένωση από μόνη της θα έπρεπε να προκαλέσει πλήρη καταστολή της ερωτοτροπίας, κάτι που δεν συμβαίνει. Αυτό το εύρημα επίσης αναδεικνύει ένα πολύ σημαντικό χαρακτηριστικό των περισσότερων παραδειγμάτων μάθησης ερωτοτροπίας: για να μάθει, το αρσενικό πρέπει να εμπλέκεται σε συμπεριφορά ερωτοτροπίας προς κάποιο στόχο. Η «λειτουργική» πτυχή αυτών των παραδειγμάτων δεν έχει κατανοηθεί πλήρως, αλλά είναι σαφές ότι χωρίς την επαρκή συμμετοχή του ζευγαρωμένου θηλυκού κατά τη διάρκεια της εκπαιδευτικής φάσης δεν υπάρχει αλλαγή στη συμπεριφορά του αρσενικού (Siegel and Hall 1979). Δεύτερον, δεν επηρεάζονται όλες οι συμπεριφορές ερωτοτροπίας από τα ζευγαρωμένα θηλυκά κατά την εκπαίδευση. Τα αρσενικά θεωρούνται ώριμα τόσο συμπεριφορικά όσο και ορμονικά, 4-5 μέρες μετά την έκδυση (Spieth 1974; Jallon 1984). Τα ώριμα αρσενικά θα ερωτοτροπήσουν με αρκετά διαφορετικούς και φερομονικά διακριτούς τύπους στόχων (Tompkins et al. 1980, Wicker and Jallon 1995, Savarit et al. 1999, Ejima et al. 2005) : ανώριμα αρσενικά, ανώριμα θηλυκά, ώριμα παρθένα θηλυκά και ώριμα ζευγαρωμένα θηλυκά. Η προσαρμοστική ερωτοτροπία όμως, αφορά μόνο στην ερωτοτροπία για θηλυκούς στόχους (Gailey et al. 1984). Τρίτον, μεταλλαγμένες μύγες που έχουν απομονωθεί με βάση την αδυναμία τους να μάθουν να αποφεύγουν οσμές που σχετίζονται με ηλεκτρικό σοκ, είναι επίσης ελαττωματικές στο να μάθουν από ζευγαρωμένα θηλυκά, γεγονός που υποδηλώνει ότι για αυτόν τον τύπο συμπεριφορικής πλαστικότητας, την προσαρμοστική ερωτοτροπία, απαιτείται συμμετοχή ανώτερων εγκεφαλικών κέντρων (περιοχές μάθησης-μνήμης). Τέταρτον, επάλειψη (α) ενός αποστάγματος από

ζευγαρωμένο θηλυκό (Tompkins et al. 1983), είτε (β) μιας έντονα αποτρεπτικής ουσίας (κινίνη) (Ackerman and Siegel 1986), ή (γ) μιας αποτρεπτικής φερομόνης (cis-vaccenyl acetate, cVA) (Zawistowski and Richmond 1986, Ejima et al. 2007), σε ένα θηλυκό παρθένο μπορεί να προκαλέσει γενική καταστολή της ερωτοτροπίας του ενήλικου (όχι του ανώριμου) αρσενικού. Τα παραπάνω υποστηρίζουν ότι ένα χημικό σήμα από το θηλυκό είναι το αποτρεπτικό (εξαρτημένο) ερέθισμα, καθιστώντας αυτή την πλαστικότητα μια μορφή συνειρμικής μάθησης.

Η αλλαγή στην ερωτοτροπία του αρσενικού προς ένα παρθένο θηλυκό μετά από εμπειρία με ζευγαρωμένο θηλυκό θεωρείται ότι είναι ένας τύπος συνειρμικής μάθησης. Στους περισσότερους οργανισμούς, η σταθεροποίηση της μνήμης συμβαίνει μέσω πολλών μηχανισμών που μπορούν να διακριθούν από τις χρονικές, κυτταρικές και μοριακές τους παραμέτρους (McGaugh 2000; Margulies et al. 2005). Η Βραχυπρόθεσμη μνήμη (STM-short term memory), διάρκειας της τάξης των ωρών, παράγεται από μεμονωμένες δοκιμές εξάσκησης ή πολλαπλές δοκιμές εξάσκησης χωρίς κατάλληλο χρονικό διαχωρισμό μεταξύ τους. Η STM δεν απαιτεί μεταγραφικές ή μεταφραστικές αλλαγές στο κύτταρο. Η Μακροπρόθεσμη μνήμη (LTM-long term memory) παράγεται όταν πολλαπλές δοκιμές διαχωρίζονται από κάποια περίοδο ανάπαυσης. Η μνήμη αυτή απαιτεί την διαδικασία της μεταγραφής. Στην περιγραφή των Siegel και Hall για την προσαρμοστική ερωτοτροπία, η μνήμη που παγιώθηκε διήρκησε μόνο για μερικές ώρες, γεγονός που υποδηλώνει ότι εμπίπτει στη βραχυπρόθεσμη μνήμη. Η εξάσκηση σε αυτό το αρχικό στάδιο έγινε σε ένα μικρό (0,4 cm³) θάλαμο παρατήρησης όπου το αρσενικό ήταν σε συνεχή στενή επαφή με το ζευγαρωμένο θηλυκό. Η μεταβολή συνθηκών εξάσκησης όπως π.χ. αυξάνοντας το μέγεθος του θαλάμου παρατήρησης (το οποίο επιτρέπει στο αρσενικό περιστασιακά να «ξεφύγει» από το ζευγαρωμένο θηλυκό, δημιουργώντας μια περίοδο ανάπαυσης), ή με την περιοδική απομάκρυνση του ζευγαρωμένου θηλυκού, φαίνεται να παράγεται μνήμη η οποία μπορεί να διαρκέσει μέχρι και 8 ημέρες (McBride et al. 1999). Το ποσοστό του χρόνου που δαπανάται στην ερωτοτροπία είναι μικρότερο σε πιο μεγάλους θαλάμους παρατήρησης και συνεπώς η εξάσκηση χρειάζεται να γίνει για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα σε αυτά τα πειράματα σε σχέση με αυτά για τη βραχυπρόθεσμη μνήμη. Αυτό ενισχύει την ιδέα ότι πρέπει να υπάρχει κάποια ελάχιστη ποσότητα ερωτοτροπίας στο ζευγαρωμένο θηλυκό για να διευκολύνει τη μάθηση. Είναι ενδιαφέρον ότι η παραγωγή LTM φαίνεται επίσης να ενισχύεται από την παρουσία τροφής (McBride et al. 1999), υποδηλώνοντας ότι η τροφή μπορεί να μεταβάλει την εμφάνιση ενός ή περισσότερων από τα σήματα ερωτοτροπίας.

Ακόμα ένα χαρακτηριστικό αυτής της συμπεριφοράς είναι ότι το προσαρμοστικό ερέθισμα, δηλαδή το ερέθισμα που το αρσενικό μαθαίνει να αγνοεί μετά την αρνητική του εμπειρία με ένα ζευγαρωμένο θηλυκό, είναι κοινό για όλα τα θηλυκά. Στη δοκιμασία για τη βραχυπρόθεσμη μνήμη, το αρσενικό

μπορεί να μάθει να αποφεύγει ώριμα, ανώριμα και ζευγαρωμένα θηλυκά (Ejima et al. 2005), στη δοκιμασία για τη μακροπρόθεσμη μνήμη, το αρσενικό μπορεί να μάθει να αποφεύγει και παρθένα θηλυκά (McBride et al. 1999, Sakai and Kidokoro 2002, Presente et al. 2004, Ishimoto et al. 2009) αλλά και ζευγαρωμένα (Keleman et al. 2007) θηλυκά. Το σήμα ή τα σήματα αυτά δεν περιλαμβάνουν οπτικά ερεθίσματα δεδομένου ότι ο σχηματισμός της μνήμης στο αρσενικό δεν απαιτεί την παρουσία φωτός ή ακέραιων οπτικών οδών (Joiner and Griffith 2000). Η συμπεριφορά του θηλυκού είναι επίσης περιττή, δεδομένου ότι οι δοκιμασίες μπορούν να γίνουν και με αποκεφαλισμένους ή ακινητοποιημένους στόχους τόσο για την βραχυπρόθεσμη (Siegel and Hall 1979, Ejima et al. 2005) όσο και για τη μακροπρόθεσμη μνήμη (Sakai et al. 2004; Ishimoto et al. 2009). Αυτά τα ευρήματα υποστηρίζουν ότι τα χημικά ερεθίσματα είναι το κυριότερο προσαρμοστικό (εξαρτημένο) ερέθισμα.

Αλλά καθώς τα αρσενικά μαθαίνουν να καταστέλλουν την ερωτοτροπία προς όλα τα θηλυκά, η επιλογή του τύπου του θηλυκού που θα χρησιμοποιηθεί για τη δοκιμή είναι πολύ σημαντική καθώς μπορεί να επηρεάσει τη φαινομενική δύναμη της μνήμης που αποκαλύπτεται από τη δοκιμή. Χρησιμοποιώντας ένα ζευγαρωμένο θηλυκό για τη δοκιμασία παρέχεται το προσαρμοστικό ερέθισμα, αλλά επίσης παρέχεται και το μη προσαρμοστικό ερέθισμα. Το αυξημένο μέγεθος της καταστολής που παρατηρείται με το ζευγαρωμένο θηλυκό είναι πιθανώς το αποτέλεσμα της «επανεκπαίδευσης» (Gailey et al. 1991; Kamyshev et al. 1999). Από ψυχολογικής άποψης, το αρσενικό παρουσιάζει ένα φαινόμενο γνωστό ως «εξοικονόμηση» από το πρώτο κομμάτι της εκπαίδευσης, το οποίο του επιτρέπει να εκφράσει καταστολή σε ένα πιο έντονο και σταθερό επίπεδο.

Η φύση του γενικού θηλυκού προσαρμοστικού χημικού ερεθίσματος διερευνήθηκε από τον Siwicki και τους συνεργάτες του το 2005 χρησιμοποιώντας στόχους ερωτοτροπίας με τροποποιημένο προφίλ επιδερμικών υδρογονανθράκων. Έτσι εντόπισαν το 9-πεντακοσένιο ως μία ένωση που σχετίζεται με τη μάθηση και είναι επαρκές για να δράσει ως προσαρμοστικό ερέθισμα (Siwicki et al. 2005). Βρήκαν ότι το 7-τρικοσένιο και το 5-επτακοσένιο επίσης σχετίζονται με τη μάθηση αλλά σε μικρότερο βαθμό. Αυτοί οι υδρογονάνθρακες υπάρχουν τόσο στα ώριμα όσο και στα ανώριμα παρθένα, αν και τα ώριμα παρθένα θηλυκά παρουσιάζουν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα από τα ανώριμα (Ejima et al. 2005). Αυτοί οι συσχετισμοί υποδηλώνουν ότι τα αρσενικά είναι ικανά να χρησιμοποιήσουν μία ποικιλία από χημικά ερεθίσματα ως προσαρμοστικό ερέθισμα, αν και ίσως μεμονωμένες ενώσεις μπορεί να έχουν διαφορετική αποτελεσματικότητα σε ιδιαίτερα περιβάλλοντα.

Η φύση του ενδογενώς αποτρεπτικού μηνύματος, ή μη προσαρμοστικού ερεθίσματος, έχει επίσης διερευνηθεί και έχει αμφισβητηθεί. Τα ζευγαρωμένα θηλυκά μπορούν να αποκτήσουν επιδερμικούς υδρογονάνθρακες, παθητικά από τους συντρόφους σύζευξης, οι οποίοι μπορούν να αναστείλουν την ερωτοτροπία

(Scott et al. 1988). Ένα τέτοιο αντιαφροδισιακό είναι το 7-τρικοσένιο (Lacaille et al. 2007), το οποίο μπορεί να μεταφερθεί και σε παρθένα θηλυκά τα οποία έχουν υποστεί ερωτοτροπία αλλά όχι σύζευξη (Ejima et al. 2007). Αυτοί οι επιδερμικοί υδρογονάνθρακες, ωστόσο, έχουν περιορισμένη διάρκεια ζωής στα ζευγαρωμένα θηλυκά, ίσως επειδή τους καθαρίζουν με τα πόδια. Θηλυκά που απομονώθηκαν για 24 ώρες μετά τη σύζευξη ώστε να μην έχουν πια στην επιδερμίδα τους 7-τρικοσένιο, μπορούν ακόμη να εκπαιδεύσουν τα αρσενικά στην καταστολή της ερωτοτροπίας (Ejima et al. 2007). Ο πιθανός λόγος για αυτό είναι ότι και τα ζευγαρωμένα θηλυκά λαμβάνουν μια ποικιλία ουσιών από τα αρσενικά κατά την εκσπερμάτιση που διατηρούνται στα αναπαραγωγικά τους συστήματα για μεγαλύτερες χρονικές περιόδους. Μία τέτοια ένωση είναι το cVA. Αυτό το λιπίδιο σχηματίζεται κυρίως στα αρσενικά (Butterworth 1969), και όταν επαλείφεται σε παρθένα θηλυκά μπορεί να προκαλέσει γενικευμένη καταστολή της ερωτοτροπίας (Ejima et al. 2007). Μέχρι σήμερα, το cVA χαρακτηρίζεται ως η ένωση που αποδεδειγμένα είναι ικανή να δράσει ως μη προσαρμοστικό (ανεξάρτητο) ερέθισμα, αλλά υπάρχουν και άλλα χημικά μόρια μακράς διάρκειας που μεταφέρονται από τα αρσενικά και μπορούν επίσης να παίξουν αυτό το ρόλο (Yew et al. 2009).

Οι γενετικοί και κυτταρικοί μηχανισμοί που ενέχονται σε άλλες μορφές μάθησης στη *Drosophila* διερευνήθηκαν για την συμμετοχή τους στην προσαρμοστική ερωτοτροπία. Ελάττωση στη σταθερότητα της μνήμης παρατηρήθηκε σε μεταλλαγμένα αρσενικά στελέχη «*amnesiac*» (Siegel and Hall 1979). Οι μύγες αυτές εμφανίζουν μετάλλαξη στο γονίδιο *amnesiac* που έχει ομολογίες με το γονίδιο που κωδικεύει το ενεργό πεπτιδίο της αδενυλικής κυκλάσης (PACAP, pituitary adenylyl cyclase-activating peptide). Τα αρσενικά εμφανίζουν αυξημένα επίπεδα ερωτοτροπίας με παρθένα θηλυκά άτομα, που σημαίνει ότι ξέχασαν το οδυνηρό μάθημα από την πρότερη ερωτοτροπία τους με τα γονιμοποιημένα θηλυκά (Siegel and Hall 1979). Η προσαρμοστική ερωτοτροπία είναι μηχανιστικά παρόμοια με τη συνδυαστική μάθηση οσμών/σοκ και πιθανόν να εμπλέκεται η οδός μεταγωγής σήματος του κυκλικού-AMP (cAMP; Tully et al. 1994). Ο σχηματισμός βραχυπρόθεσμης μνήμης είναι επίσης μειωμένος και σε άλλες μεταλλάξεις (*dunce*, *rutabaga*, *cabbage* και *turnip*) που είχαν απομονωθεί με βάση την έκπτωση στην, εξαρτημένη από σοκ, οσφρητική μάθηση (Gailey et al. 1984). Η διάρκεια μνήμης επηρεάζεται από μεταλλάξεις στο PKA-RI, τη ρυθμιστική υπομονάδα για τη cAMP-εξαρτώμενη πρωτεϊνική κινάση (PKA) (O'Dell et al. 1999). Ακολουθώντας, μια ποικιλία από μεταλλαγμένα στελέχη που σχετίζονται είτε με τη διαδικασία της μάθησης, είτε με ένα κανάλι ιόντων είτε τέλος με αλλαγές στη μορφολογία του εγκεφάλου, εξετάσθηκαν σε συμπεριφορικές δοκιμασίες μνήμης και βρέθηκαν ελλειμματικά για βραχυπρόθεσμη μνήμη. Στη βραχυπρόθεσμη μνήμη εμπλέκονται η πρωτεϊνική κινάση C (Kane et al. 1997) και Ca^{2+} /καλμοδουλίνη- εξαρτώμενη πρωτεϊνική κινάση II (CaMKII) (Griffith et al. 1993). Η μακροπρόθεσμη μνήμη έχει αποδειχθεί

ότι απαιτεί εκδυσόνη (Ishimoto et al. 2009) και Notch (Presente et al. 2004) σηματοδότηση, όπως και τη CPEB πρωτεΐνη Orb2 (Keleman et al. 2007).

Τα κυκλώματα που ευθύνονται για την αρσενική συμπεριφορά ερωτοτροπίας είναι στενά συνδεδεμένα με την έκφραση του *fruitless*, ενός παράγοντα μεταγραφής (Manoli et al. 2005; Stockinger et al. 2005). Τα ανατομικά υποστρώματα της μάθησης ερωτοτροπίας έχουν ερευνηθεί χρησιμοποιώντας στοχευμένους χειρισμούς για συγκεκριμένες οδούς μεταγωγής σήματος και στοχευμένες σιωπήσεις πληθυσμών νευρώνων. Οι Joiner και Griffith το 1999 χρησιμοποίησαν το σύστημα GAL4/UAS (περιγράφηκε από τον Duffy το 2002) για να οδηγήσουν την έκφραση ενός αναστολέα του CaMKII και να χαρτογραφήσουν τους νευρώνες αλλά και το ρόλο της κινάσης στη βραχυπρόθεσμη μνήμη για καταστολή ερωτοτροπίας. Αυτή η πρωτεϊνική κινάση είναι ένας σημαντικός παράγοντας σε πολλές πτυχές της νευρωνικής λειτουργίας και έχει κυρίαρχο ρόλο στο σχηματισμό μνήμης λόγω της ικανότητας της να γίνεται ανεξάρτητη μετά από σύντομη ενεργοποίηση (Griffith 2004).

Οι Joiner και Griffith (1999) διαπίστωσαν ότι τα μανιταροειδή σωμάτια του εγκεφάλου, ο πλευρικός πρωτεγκεφάλος (*protocerebrum*), και μέρη του κεντρικού συμπλέγματος (*central complex*) έχουν όλα ρόλους στον CaMKII-εξαρτώμενο σχηματισμό μνήμης σε συνθήκες κόκκινου φωτισμού (σκότος για τη μύγα, αφού οι φωτουποδοχείς δεν διεγείρονται από το συγκεκριμένο μήκος κύματος). Κάτω από αυτές τις συνθήκες, η συμπεριφορά κατευθύνεται κυρίως από χημειοαισθητικά ερεθίσματα. GAL4 σειρές που εκφράστηκαν στο γ-λοβό των μανιταροειδών σωμάτων ανέδειξαν σοβαρά ελλείμματα στη μνήμη (Joiner and Griffith 2000). Αυτά τα ελλείμματα εξαλείφτηκαν όταν επιτράπηκε στο αρσενικό να έχει οπτική επαφή κατά τη διάρκεια της περιόδου εκπαίδευσης (Joiner and Griffith 1997). Αυτά τα δεδομένα υποδεικνύουν ότι τα αρσενικά είναι ικανά να χρησιμοποιούν ξεχωριστά μοριακά και πιθανώς ανατομικά κυκλώματα για το σχηματισμό μνήμης, ανάλογα με τη διαθέσιμη εισερχόμενη αισθητηριακή πληροφορία.

Τα μανιταροειδή σωμάτια συνδέονται με την μάθηση οσμών μέσω ηλεκτροσόκ (Davis 2005). Ο McBride (1999) διερεύνησε τη σχέση μανιταροειδών σωμάτων με τη βραχυπρόθεσμη μνήμη μέσω χημική εκτομής νευρώνων από αυτή την νευροπύλη. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης έδειξαν ότι χημική εκτομή μέσω υδροξουρίας δεν είχε επίδραση στον άμεσο σχηματισμό μνήμης αλλά στην ανάκληση μνήμης 30- και 60- λεπτών. Η επίδραση της υδροξουρίας μπορεί επίσης να μειώσει περιστασιακά τους λοβούς της κεραίας του εγκεφάλου, με αποτέλεσμα τη μείωση των 30-λεπτών μνήμης αλλά όχι της μνήμης των 60 λεπτών. Η μακροπρόθεσμη μνήμη (1-8 ημέρες μετά την εξάσκηση) επαλείφθηκε μέσω εκτομής των μανιταροειδών σωμάτων. Συνολικά, αυτά τα αποτελέσματα πρότειναν ότι η επεξεργασία της

μνήμης γίνεται κατά κύματα, καθορισμένα χρονικά, με τα μανιταροειδή σωμάτια να είναι η τελική περιοχή αποθήκευσης της μακροπρόθεσμης μνήμης.

1.5.3 Άμεση καταστολή της ερωτοτροπίας προς τα ζευγαρωμένα θηλυκά: Μη συνειρμική πλαστικότητα.

Η κλασική εξαρτημένη μάθηση (classical conditioning) συνίσταται στην εκμάθηση της σχέσης μεταξύ δύο ερεθισμάτων. Η συντελεστική εξαρτημένη μάθηση (operant conditioning) συνίσταται στην εκμάθηση μιας σχέσης μεταξύ του ερεθίσματος και της συμπεριφοράς του οργανισμού. Στη συντελεστική εξαρτημένη μάθηση ερωτοτροπίας (προσαρμοστική ερωτοτροπία), το ερέθισμα συνδέεται με την απόκριση.

Η δοκιμασία της προσαρμοστικής ερωτοτροπίας συνίσταται από δύο μέρη: μια αρχική έκθεση του αρσενικού σε ένα ήδη ζευγαρωμένο θηλυκό που αποτελεί τόσο το εξαρτημένο (η ύπαρξη του θηλυκού) όσο και το μη εξαρτημένο (η αποστροφή του θηλυκού για ερωτοτροπία) ερέθισμα. Κατά τη διάρκεια της έκθεσης αυτής, το αρσενικό μαθαίνει να συσχετίζει τα δύο αυτά σήματα (ερεθίσματα). Η διαδικασία της μάθησης ακολουθείται από μία δοκιμασία μνήμης με ένα θηλυκό που παρουσιάζει μόνο το εξαρτημένο ερέθισμα. Παρατηρήσεις της δραστηριότητας της ερωτοτροπίας κατά τη διάρκεια της εκπαιδευτικής περιόδου έδειξαν ότι, ενώ τα αρσενικά ερωτοτροπούν προς τα ζευγαρωμένα θηλυκά με λιγότερο σθένος από ότι με τα παρθένα (Gailey et al. 1984), μια σύγκριση των επιπέδων ερωτοτροπίας στην αρχή και στο τέλος της εκπαίδευσης αποκαλύπτει μια χρονο-εξαρτώμενη μείωση του μέσου επιπέδου ερωτοτροπίας (Siegel and Hall 1979). Η άμεση καταστολή της ερωτοτροπίας κατά τη διάρκεια της εκπαίδευσης εξαρτάται από το CaMKII (Griffith et al. 1993), έναν δίαυλο καλίου (Griffith et al. 1994), και την πρωτεϊνική κινάση C (Kane et al. 1997).

Η πιο απλή μηχανιστική εξήγηση για την καταστολή της ερωτοτροπίας κατά τη διάρκεια της εκπαίδευσης είναι ότι η μείωση της ερωτοτροπίας οφείλεται στη μάθηση. Το αρσενικό μαθαίνει ότι το να συνεχίζει να ερωτοτροπεί με ένα μη-δεκτικό, προηγούμενως ζευγαρωμένο θηλυκό δεν είναι προς όφελος του. Λογική επέκταση αυτής της ιδέας είναι ότι ο σχηματισμός μνήμης πρέπει να εξαρτάται από τη μείωση της ερωτοτροπίας κατά τη διάρκεια της εκπαίδευσης. Αυτή η υπόθεση αποδείχθηκε αναληθής σε δύο μελέτες για τη μοριακή βάση της μάθησης από ζευγαρωμένα θηλυκά (Joiner and Griffith 1997; Kane et al. 1997). Σ' αυτές τις μελέτες, ο χειρισμός των οδών μεταγωγής σήματος είχε ως αποτέλεσμα να εξαλείψει εντελώς τη μείωση της ερωτοτροπίας κατά τη διάρκεια της εξάσκησης, αλλά ο σχηματισμός μνήμης να μείνει άθικτος. Μια λύση σε αυτό

το αίνιγμα προτάθηκε από πειράματα χαρτογράφησης κυκλώματος χρησιμοποιώντας τον πεπτιδικό αναστολέα της CaMKII. Σε αυτές τις μελέτες, οι ερευνητές διαπίστωσαν ότι η συμπεριφορά κατά τη διάρκεια της εκπαίδευσης ήταν ανατομικά διαχωρισμένη από τη μνήμη. Για παράδειγμα, σειρές GAL4 που επάγουν την έκφραση του αναστολέα της CaMKII σε συγκεκριμένες ομάδες νευρώνων, διακόπτουν την συμπεριφορά κατά τη διάρκεια της εκπαίδευσης αλλά όχι τη μνήμη (Joiner και Griffith 1999). Αυτά τα δεδομένα έδειξαν ότι η αλλαγή της συμπεριφοράς κατά τη διάρκεια της εκπαίδευσης ήταν ανεξάρτητη του σχηματισμού μνήμης.

Στην περίπτωση ταχείας καταστολής της ερωτοτροπίας, η περιοχή του εγκεφάλου που απαιτεί εντονότερα τη δράση της CaMKII, είναι ο λοβός της κεραίας. Η καταστολή κατά τη διάρκεια της εκπαίδευσης μειώνεται όταν ανασταλεί η δράση της CaMKII στα νευρικά κύτταρα των λοβών της κεραίας (Joiner and Griffith 1999), και ενισχύεται μετά από την έκφραση της ενδογενούς CaMKII στους χολινεργικούς νευρώνες των λοβών της κεραίας (Mehren and Griffith 2004, 2006). Αυτά τα κύτταρα είναι οι προβλητικοί νευρώνες (που συνδέουν το λοβό της κεραίας του εγκεφάλου με τα μανιταροειδή σωματίδια και τον πλευρικό πρωτεγέφαλο) και οι διεγερτικοί τοπικοί νευρώνες. Και στις δύο περιπτώσεις οι νευρώνες είναι χολινεργικοί και ενεργοποιούνται από οσφρητικούς υποδοχείς των αισθητηρίων νευρώνων των κεραιών. Η πλαστικότητα αυτών των νευρώνων, που είναι συνδεδεμένοι με το βασικό κύκλωμα της ερωτοτροπίας, πιθανώς να αντικατοπτρίζει την επεξεργασία των οσφρητικών ερεθισμάτων. Τα αποτελέσματα αυτών των ερευνών συμφωνούν με την γενική αρχή ότι για όλους τους τύπους οσφρητικής μνήμης υπάρχει μια αρχική πλαστικότητα του λοβού της κεραίας που στη συνέχεια παγιώνεται ως μνήμη στα μανιταροειδή σωματίδια (Berry et al. 2008), αλλά επίσης προτείνεται ότι μπορεί να υπάρχουν πολλαπλές ανεξάρτητες μορφές πρώιμης πλαστικότητας.

Οι οσφρητικοί νευρώνες πιθανό να είναι ευαίσθητοι στις ενδογενείς οσμές της μύγας, γνωστές ως φερομόνες. Μόνο 4 γονίδια Or (olfactory receptor) ανταποκρίνονται σε φερομόνες: τα Or47b και Or88a, τα οποία απαντούν τόσο στις αρσενικές όσο και θηλυκές φερομόνες, και τα Or65a και Or67d που ανταποκρίνονται στο cVA (van der Goes van Naters and Carlson 2007). Η απόκριση του αρσενικού στο ζευγαρωμένο θηλυκό μπορεί να προκληθεί μέσω επάλειψης του cVA σε παρθένο θηλυκό. Τόσο ο Or65a (Ejima et al. 2007) όσο και ο Or67d (Kurtovic et al. 2007) έχουν αποδειχθεί ότι είναι σημαντικοί για τη μεσολάβηση των ανασταλτικών επιδράσεων του cVA στην ερωτοτροπία.

1.5.4 Η καταστολή της συμπεριφοράς ερωτοτροπίας μετά από έκθεση σε παρθένα θηλυκά: Συνειρμική Μάθηση

Για πολλά χρόνια υπήρχε η αντίληψη ότι η καταστολή της ερωτοτροπίας του αρσενικού για μια θηλυκή *Drosophila* μπορούσε να παραχθεί μόνο μετά από έκθεση σε ήδη ζευγαρωμένα θηλυκά. Στην αρχική περιγραφή που έδωσαν οι Siegel και Hall (1979) για την συμπεριφορά αυτή, πραγματοποίησαν ένα πείραμα εκμάθησης με ώριμα παρθένα θηλυκά και είδαν ότι δεν υπάρχει μάθηση. Σε αυτό το πείραμα, ωστόσο, τα 20 από τα 24 αρσενικά κατέληξαν σε συνουσία με τα παρθένα θηλυκά που τους προσφέρθηκαν. Επακόλουθα πειράματα έδειξαν ότι η συνουσία εμποδίζει την ικανότητα των αρσενικών να μάθουν να καταστέλλουν την ερωτοτροπία (Ejima et al. 2005). Τα ανώριμα παρθένα θηλυκά είναι πολύ ελκυστικά αλλά, όπως και τα ζευγαρωμένα θηλυκά, απορρίπτουν ενεργά τα αρσενικά. Η εκπαίδευση με ανώριμα παρθένα θηλυκά δεν παρήγαγε καμία μνήμη όταν τα αρσενικά εξετάστηκαν με ακινητοποιημένα (αναισθητοποιημένα) ώριμα θηλυκά ως στόχους ερωτοτροπίας (Tompkins et al. 1983). Αυτή η διαδικασία ακολουθήθηκε και από πολλούς άλλους ερευνητές και το συμπέρασμα που προέκυψε ήταν ότι η έκθεση σε «παρθένο θηλυκό» δεν επηρεάζει την επακόλουθη ερωτοτροπία.

Όπως αποδείχτηκε, η ανωτέρω εξήγηση ήταν λάθος. Η έκθεση των αρσενικών σε παρθένα θηλυκά (οποιασδήποτε ηλικίας) όντως προκαλεί γενικευμένη καταστολή της ερωτοτροπίας προς το θηλυκό, όπως συμβαίνει και με τα ζευγαρωμένα θηλυκά. Αυτό που δεν εκτιμήθηκε τότε, ωστόσο, ήταν ότι τα αρσενικά μπορούσαν να χρησιμοποιήσουν ηλικιακά εξαρτώμενες διαφορές στο φερομονικό προφίλ της μύγας για να μάθουν να αποφεύγουν θηλυκά συγκεκριμένης ηλικίας. Η Ejima (2005) βρήκε ότι η εξάσκηση των αρσενικών είτε με ώριμα είτε με ανώριμα παρθένα μπορούσε στην πραγματικότητα να προκαλέσει την τροποποίηση της συμπεριφοράς ερωτοτροπίας του αρσενικού: τα αρσενικά θα απέφευγαν την ερωτοτροπία με θηλυκά της συγκεκριμένης ηλικιακής τάξης αλλά θα ήταν πρόθυμα να φλερτάρουν με άλλα θηλυκά, ηλικιακά μικρότερα ή μεγαλύτερα.

Η μνήμη που σχηματίστηκε ήταν συνειρμική και οι πτητικές επιδερμικές ενώσεις συγκεκριμένης ηλικίας χρησίμευσαν ως εξαρτημένα ερεθίσματα. Συνδυάζοντας το εκχύλισμα εξανίου από τα παρθένα συγκεκριμένης ηλικίας με το αντικείμενο ερωτοτροπίας, είναι αρκετό για να σχηματιστεί μνήμη με την προϋπόθεση ότι το αρσενικό δεν έχει συνουσία με το παρθένο θηλυκό. Η συνουσία απεδείχθη ότι παρεμποδίζει το σχηματισμό μνήμης. Αυτό δείχνει ότι η αποστροφική συμπεριφορά του θηλυκού και η εμπειρία της αποτυχημένης συνουσίας μετά την ερωτοτροπία λειτουργεί ως το μη εξαρτημένο ερέθισμα. Ο

σχηματισμός και η σταθερότητα της μνήμης σε αυτό το παράδειγμα είναι, όπως και με τα ζευγαρωμένα θηλυκά, ευαίσθητος στις μεταλλάξεις *dunce* και *amnesiac* (Ejima et al. 2005). Τα αρχικά πειράματα που ανέδειξαν αυτό τον τύπο μνήμης, έγιναν με τρόπο που είχε ως αποτέλεσμα το σχηματισμό μόνο βραχυπρόθεσμης μνήμης (μικροί θάλαμοι παρατήρησης, μία δοκιμή εκπαίδευσης). Μακροπρόθεσμη μνήμη μπορεί επίσης να παρατηρηθεί μετά από 24 ώρες αν τα αρσενικά εκπαιδεύονται επαναλαμβανόμενα 3 φορές (με μεσοδιαστήματα) με αποκεφαλισμένο ώριμο παρθένο θηλυκό.

1.5.5 Καταστολή της ερωτοτροπίας από νεαρά αρσενικά: Εξοικείωση

Τα αδαή ώριμα αρσενικά θα ξεκινήσουν έντονη ερωτοτροπία ακόμα και προσπάθεια για συνουσία με ένα ανώριμο (με ηλικία κάτω της 1 ημέρας) αρσενικό (Cook και Cook 1975, Jallon και Hotta 1979, Tompkins et al. 1980). Η ένταση της ερωτοτροπίας ανάμεσα στα νεαρά αρσενικά χάνεται με την πάροδο του χρόνου, μειώνεται περίπου στα μισά του αρχικού επιπέδου μέσα σε 30 λεπτά (Gailey et al. 1982). Τα αρσενικά που εκτίθενται σε νεαρά αρσενικά καταυτό τον τρόπο θα έχουν μειώσει σημαντικά την ερωτοτροπία τους προς το επόμενο ανώριμο αρσενικό. Αυτή η μετέπειτα επίδραση διαρκεί για μερικές ώρες και είναι ειδική, αφού η ερωτοτροπία για τα θηλυκά μένει ανεπηρέαστη (Gailey et al. 1982). Αντίθετα, η έκθεση σε ζευγαρωμένα θηλυκά, που προκαλεί γενική καταστολή της ερωτοτροπίας για όλα τα είδη θηλυκών, δεν επηρεάζει την ερωτοτροπία νεαρών αρσενικών (Gailey et al. 1984). Καθώς η ερωτοτροπία μεταξύ αρσενικών είναι ξεκάθαρα «μη παραγωγική» όσον αφορά την αναπαραγωγή, η πλαστικότητα αυτής της συμπεριφοράς δίνει πλεονέκτημα σε αρσενικά στο μετέπειτα ζευγάρωμα με θηλυκά υπό την παρουσία νεαρών αρσενικών (Zawistowski and Richmond 1985; Gailey et al. 1985).

Η καταστολή της ερωτοτροπίας μετά από έκθεση σε νεαρά αρσενικά, πιστεύεται ότι είναι μια μορφή εξοικείωσης (*habituation*), αφού μπορεί να παραχθεί απλά με την έκθεση ενός ώριμου αρσενικού σε ουσίες που προέρχονται από ανώριμα αρσενικά. Ο θάλαμος που είχε φιλοξενήσει προηγουμένως νεαρά αρσενικά (Gailey et al. 1982), κομμάτια χαρτιού εμποτισμένα με συνθετικούς υδρογονάνθρακες νεαρών αρσενικών (Vaías et al. 1993), ή εκχύλισμα εξανίου από την επιδερμίδα νεαρού αρσενικού (Ejima et al. 2005) μπορούν όλα να προκαλέσουν μείωση στην ερωτοτροπία ενός αρσενικού. Ακόμα ένα αποδεικτικό στοιχείο ότι αυτός ο τύπος μάθησης είναι εξοικείωση είναι το γεγονός ότι μπορεί να αντιστραφεί από ένα ισχυρό και άσχετο ερέθισμα όπως είναι ο έντονος στροβιλισμός (*vortexing*) των αρσενικών μετά την εξάσκηση. Σε αντίθεση, αλλαγές στη συνειρμική συμπεριφορά, όπως το να μάθει το αρσενικό

να αποφεύγει παρθένα θηλυκά συγκεκριμένης ηλικίας, δεν διαταράσσονται (Ejima et al. 2005).

Το νευρικό κύκλωμα που υποστηρίζει αυτή την πλαστικότητα δεν έχει εξεταστεί εκτενώς. Η εξοικείωση συχνά συμβαίνει σε πολύ περιφερειακά μέρη ενός αισθητηριακού κυκλώματος, αλλά η καταστολή της ερωτοτροπίας σε νεαρά αρσενικά μπορεί να εμποδιστεί με χειρισμούς πιο κεντρικών δομών, π.χ. με χημική αφαίρεση των μανιταροειδή σωματίων ή με μείωση των νευροδιαβιβαστών ντοπαμίνης (Neckameyer 1998) και οκταπαμίνης (O'Dell 1994). Η μετάλλαξη του amnesiac γονιδίου, το οποίο κωδικοποιεί ένα υποτιθέμενο νευροπεπτίδιο που εκφράζεται σε ένα υποσύνολο νευρώνων που νευρώνουν τα μανιταροειδή σωματίδια, προκαλεί γρηγορότερη αποσύνθεση της μνήμης με ένα νεαρό αρσενικό (Gailey et al. 1982), εμπλέκοντας περαιτέρω τα μανιταροειδή σωματίδια στη συμπεριφορά. Μεταλλάξεις σε άλλα γονίδια, κυρίως dunce και rutabaga (Gailey et al. 1982) και η φυσιολογική γήρανση (Neckameyer et al. 2000) επίσης εμποδίζουν την εξοικείωση. Αυτές οι μελέτες υποδηλώνουν ότι παρόλο που η ανταπόκριση σε νεαρά αρσενικά είναι μεταβλητή, αυτό δεν οφείλεται ξεκάθαρα στην αναστολή ευαισθητοποίησης των περιφερειακών αισθητηριακών νευρώνων.

1.5.6 Ενίσχυση της συμπεριφοράς ερωτοτροπίας μετά από έκθεση σε θηλυκά: Ευαισθητοποίηση

Η πλαστικότητα που μελετήθηκε περισσότερο σε σχέση με τη συμπεριφορά ερωτοτροπίας έχει συμπεριλάβει καταστάσεις που επιβάλλουν στο αρσενικό να μειώσει την δραστηριότητα της ερωτοτροπίας του. Αντίθετα, για τα θηλυκά έχει δειχθεί ενίσχυση της σεξουαλικής δεκτικότητας τους. Η αύξηση αυτή προκαλείται από μια διαδικασία ευαισθητοποίησης που ονομάζεται «ακουστική προετοιμασία αντίδρασης» (Kyriacou και Hall 1984, Griffith et al. 1993). Είναι ενδιαφέρον ότι και τα αρσενικά δείχνουν μια μορφή προετοιμασίας αντίδρασης βασισμένη περισσότερο σε οσφρητικές παρά σε ακουστικές πληροφορίες. Σε μία έρευνα του Dukas (2005), η έκθεση ενός αρσενικού είτε σε ζευγαρωμένο θηλυκό είτε σε ανώριμο παρθένο, αύξησε την ερωτοτροπία του για το επακόλουθο ώριμο παρθένο θηλυκό. Αυτή η μελέτη με πρώτη ματιά δείχνει ότι τα αρσενικά δεν μαθαίνουν να καταστέλλουν την ερωτοτροπία μετά από εμπειρία με ζευγαρωμένα θηλυκά, αλλά μία εξέταση των πειραματικών συνθηκών δίνει μια διαφορετική και πιο ενδιαφέρουσα εξήγηση. Ο Dukas χρησιμοποίησε και για την εκπαίδευση αλλά και για τη δοκιμασία ένα φιαλίδιο με 40 mL τροφής. Παρόλο που ένας τόσο μεγάλος θάλαμος συνεύρεσης είναι μια «πιο φυσική» αρένα, εντούτοις μειώνει τα επίπεδα ερωτοτροπίας, ιδιαίτερα των ζευγαρωμένων θηλυκών. Ο Dukas αναφέρθηκε σε δείκτες ερωτοτροπίας (ποσοστό χρόνου που

δαπανάται στην ερωτοτροπία) με ζευγαρωμένα θηλυκά περίπου στο 7% για αδαή αρσενικά. Σε πολλά πειράματα μάθησης βρέθηκε ότι δείκτης ερωτοτροπίας κάτω του 10% κατά τη διάρκεια εκπαίδευσης δεν παράγει μνήμη Siegel and Hall (1979). Αυτό το χαμηλό ποσοστό ερωτοτροπίας εξηγείται από το γεγονός ότι το cVA, το μη εξαρτημένο ερέθισμα, έχει σχετικά χαμηλή πτητικότητα και το αρσενικό χρειάζεται είτε να ευρίσκεται σε κοντινή απόσταση από το θηλυκό (μικρός θάλαμος) είτε να ξοδεύει περισσότερο χρόνο κοντά στο ζευγαρωμένο θηλυκό για να είναι απόλυτα εκτεθειμένο.

Γιατί λοιπόν το να είναι το αρσενικό σε ένα μεγάλο φιαλίδιο με θηλυκά προκαλεί αύξηση στην επακόλουθη ερωτοτροπία; Μία πιθανή απάντηση είναι ότι υπάρχουν και άλλες χημικές ενώσεις στα θηλυκά (ώριμα-ζευγαρωμένα και ανώριμα) που προκαλούν την ευαισθητοποίηση της απόκρισης στις διεγερτικές φερομόνες. Μέσα σε μεγάλο θάλαμο αυτές οι ενώσεις πρέπει να εντοπιστούν από απόσταση, και με δεδομένο ότι τα επίπεδα ερωτοτροπίας για το ζευγαρωμένο θηλυκό είναι χαμηλά. Αυτό μπορεί να συμβεί είτε με ενώσεις που έχουν εναποθέσει τα θηλυκά στο φιαλίδιο και τα αρσενικά τις ανιχνεύουν χρησιμοποιώντας γευστικούς υποδοχείς, είτε με ενώσεις που έχουν υψηλότερη πτητικότητα από το cVA και μπορούν να εντοπιστούν από απόσταση.

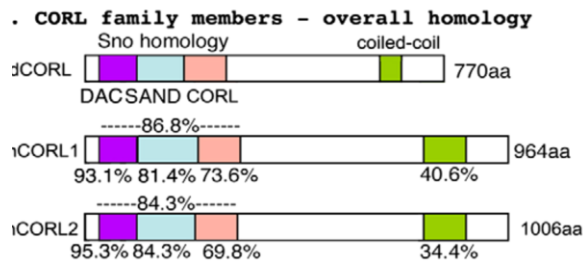
Κλείνοντας, πρέπει να αναφέρουμε ότι η μελέτη της αναπαραγωγικής συμπεριφοράς είναι συναρπαστική. Οι παράξενες ποικιλίες στρατηγικών που τα είδη υιοθετούν για να αναπαραχθούν έχουν εξαιρετικό ερευνητικό ενδιαφέρον. Για ένα ζώο αποτελεί σημαντικό πλεονέκτημα η ικανότητα του να προσαρμόζεται σε συγκεκριμένες περιβαλλοντικές συνθήκες ή αισθητικά σήματα για να βελτιώνει την αναπαραγωγική του επιτυχία.

Στη *Drosophila melanogaster* έχουμε κατανοήσει αρκετά μερικά από τα βασικά μοριακά στοιχεία που ρυθμίζουν τη λειτουργία του κυκλώματος της ερωτοτροπίας. Σε επίπεδο συμπεριφοράς, ωστόσο, η απλότητα καταρρέει. Τα αρσενικά μπορούν να μάθουν να τροποποιούν τη συμπεριφορά τους χρησιμοποιώντας ερεθίσματα από όλα τα αισθητήρια συστήματά τους και μπορούν να μάθουν από τις δικές τους επιδόσεις: δηλαδή μπορούν να σχηματίσουν συνειρμικές μνήμες, να εξοικειωθούν και να ευαισθητοποιηθούν. Όλες αυτές οι διαδικασίες μπορούν να διαδραματίζονται ταυτόχρονα, κάνοντας την μηχανιστική κατανόηση ενός συγκεκριμένου γεγονότος μια μεγάλη πρόκληση.

1.6 dCORL (η πρωτεΐνη CORL στη *D.melanogaster*)

Η TGFβ-σηματοδοτική οδός (Transforming Growth Factor β-signaling) ενέχεται στην εμβρυονική ανάπτυξη, ενώ στον ενήλικο οργανισμό, μεταλλάξεις που την διακόπτουν οδηγούν σε όγκους. Οι ογκογονικές πρωτεΐνες Sno/Ski συνδέονται με τους μεταγραφικούς παράγοντες Smad κατωφερώς της TGFβ/Activin και είναι από τους ρυθμιστές της TGFβ-σηματοδοτικής οδού. Κατ' αρχήν, gain-of-function μελέτες σε κύτταρα θηλαστικών έδειξαν ότι οι πρωτεΐνες Sno/Ski είναι ανταγωνιστές της TGFβ (Jahchan and Luo, 2010). Κατόπιν, δεδομένα από *Drosophila*, *C. elegans* και RNAi-(σιώπηση RNA) σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές έδειξαν ότι οι Sno είναι σηματοδοτικοί διακόπτες: Οι Sno σε φυσιολογικές συνθήκες ενεργοποιούν την οδό TGFβ/Activin και σε συνθήκες υπερ-έκφρασης την αναστέλλουν (da Graca et al., 2003; Sarker et al., 2005; Sarker et al., 2008; Ο διπτός ρόλος των Sno δείχτηκε στην καρκινογένεση. Το ανθρώπινο Sno μπορεί να λειτουργήσει τόσο ως ογκογονίδιο όσο και ως ογκο-κατασταλτικό γονίδιο (Jahchan and Luo, 2010).

Οι πρωτεΐνες που συσχετίζονται με τις Sno/Ski αποτελούν 3 υπο-οικογένειες (Sno/Ski, Dachshund, και CORL) με χαρακτηριστική ομόλογη περιοχή Sno που αλληλεπιδρά με τις Smad (Εικ. 1; Takaesu et al., 2006). Η υπο-οικογένεια CORL στο ποντίκι περιέχει δύο πρωτεΐνες, τις Corl1 και Corl2, που εκφράζονται σε κύτταρα Purkinje της παρεγκεφαλίδας (Minaki et al., 2008).



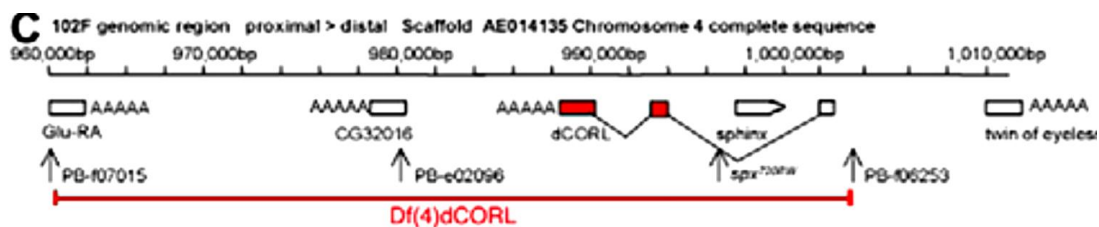
Εικόνα 1. Ομολογία στη SNO περιοχή μεταξύ των CORL στη μύγα και το ποντίκι (dCORL/mCORL1,2)

Οι ανθρώπινες πρωτεΐνες CORL: FUSSEL15 (SKOR1 στον άνθρωπο, Corl1 στον ποντικό) και FUSSEL18 (SKOR2 στον άνθρωπο, Corl2 στον ποντικό), εμφανίζουν διατηρημένη έκφραση σε πρόδρομα και ενήλικα κύτταρα Purkinje. Επιπλέον, μεταλλάξεις στη χρωμοσωμική περιοχή που περιέχει τη SKOR1 συνδέονται με μια αταξία γνωστή ως σύνδρομο ανήσυχων ποδιών (Kemlink et al., 2009). Να τονιστεί ότι η παρεγκεφαλίδα είναι το τμήμα του εγκεφάλου που είναι υπεύθυνο για τον συντονισμό των κινήσεων, ενώ

παρεγκεφαλιδικές βλάβες συσχετίζονται με κινητικές δυσλειτουργίες όπως οι αταξίες (ataxias - Orr, 2010).

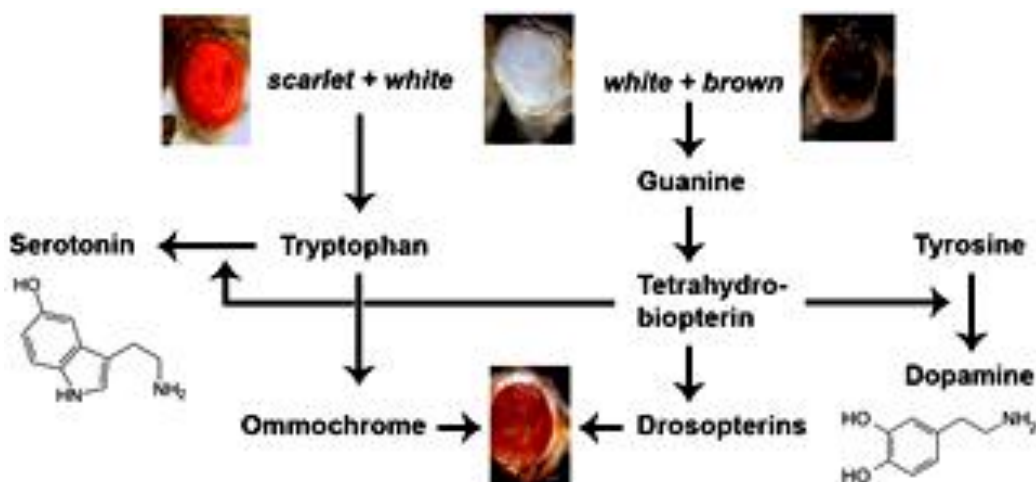
Οι Takaesu et al. το 2012 κλωνοποίησαν και μόχλευσαν γενετικά το γονίδιο *CORL* στη *Drosophila* (Εικόνα). Η πρωτεΐνη d-CORL εκφράζεται σε συγκεκριμένες ομάδες κυττάρων στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα και η απαλοιφή της σε ομόζυγα προκαλεί θάνατο κατά τη μεταμόρφωση, με συνέπεια πολύ λίγα άτομα να γίνονται ενήλικα. Τόσο τα ενήλικα όσο και οι προνύμφες εμφανίζουν βλάβες στα μανιταροειδή σωμάτια του εγκεφάλου. Η dCORL είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση του υποδοχέα της εκδυσόνης (EcR-B1), της ορμόνης υπεύθυνης για την έκδυση του ενήλικου εντόμου, γεγονός που εξηγεί τον αναπτυξιακό φαινότυπο (Takaesu et al., 2012).

Η απαλοιφή (deletion) *Df(4)dCORL* παρήχθη μέσω FLP-FRT ενδοχρωμοσωμικού ανασυνδυασμού. Οι θέσεις των δύο FRT-Piggy-bac παρεμβολών [insertions; *Pbac{WH}f07015* (956,754 bp), *Pbac{WH}f06253* (1,000,397 bp)], μιας Piggy-bac παρεμβολής στη CG32016 και μιας μεταλλαγής στο γονίδιο *sphinx* φαίνονται στην παρακάτω Εικόνα.



1.7 Γονίδιο *white*

Η πρωτεΐνη που κωδικοεύεται από το γονίδιο *white* (*w*) είναι διαμεμβρανικός ABC μεταφορέας που σε συνδυασμό με την πρωτεΐνη *scarlet* μεταφέρει τρυπτοφάνη, και σε συνδυασμό με τη πρωτεΐνη *brown* μεταφέρει γουανίνη, διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης στο κυτταρόπλασμα. Η τρυπτοφάνη είναι πρόδρομο μόριο της ομμοχρωμικής χρωστικής ουσίας ξανθοματίνης (καφέ) αλλά και του νευροδιαβιβαστή σεροτονίνη. Η γουανίνη είναι πρόδρομο μόριο της χρωστικής ουσίας τετραυδροπτερίνης (πρόδρομο των δροσοπτερινών-κόκκινο) αλλά και συνπαράγοντας της μετατροπής της τυροσίνης σε ντοπαμίνη (Εικ.).



Από Krstic et al., 2013. (Krstic D, Boll W, Noll M (2013) Influence of the White Locus on the Courtship Behavior of *Drosophila* Males. PLoS ONE 8(10).

Η έλλειψη της πρωτεΐνης *white* και φυσικά των χρωστικών στους οφθαλμούς της *Drosophila* έχει ως αποτέλεσμα έκπτωση στη όραση (οπτική οξύτητα; Kalmus H (1943) . Σε μεταλλαγμένα στελέχη για την πρωτεΐνη *w* τα επίπεδα των αμινών σεροτονίνης και ντοπαμίνης είναι μειωμένα (Borycz et al., 2008) Κατά συνέπεια μεταλλάξεις του γονιδίου *w* έχουν επίδραση στη συμπεριφορά. Αρσενικά άτομα που υπερεκφράζουν εκτοπικά το γονίδιο *w* εμφανίζουν έντονη ερωτοτροπία μεταξύ τους δημιουργώντας γραμμές ή αλυσίδες ερωτοτροπούντων αρσενικών (Hing and Carlson 1996; Anaka et al., 2008). Επίσης δείχτηκε ότι η υπερέκφραση του *w*

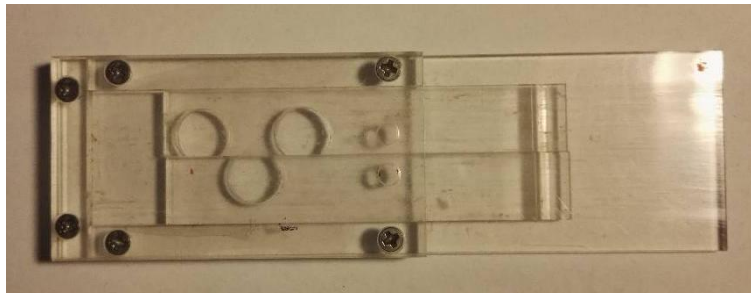
σε λάθος ενδοκυττάρια περιοχή κυττάρων που κανονικά εκφράζουν w αυξάνει την ερωτοτροπία για το αρσενικό φύλλο (Boll and Noll 2002) Σε αντίθεση μεταλλαγμένα στελέχη για το w δεν εμφανίζουν αυτή τη συμπεριφορά (Zhang and Odenwald 1995; Hing and Carlson 1996).

2^ο Κεφάλαιο

ΜΕΘΟΔΟΙ – ΥΛΙΚΑ

2.1 Πειραματικό υλικό:

- Πειραματόζωο: *Drosophila melanogaster*, διάφορες σειρές ελέγχου για την πρωτεΐνη CORL και αγρίου τύπου σειρές OR st., Canton-S st. και yw st.
- Όργανα και συσκευές: συσκευή παρατήρησης ερωτοτροπίας, ψηφιακή video camera SONY με φακό Carl Zeiss Vario-Sonnar T*, 2 video cameras CONARD και δουλέψαμε με το Software iSpy v6.5.3.0 με FPS περίπου 11.
- Τροφή για τις μύγες
- Για την στατιστική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε GraphPad Prism 6. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως M.O.+ Σταθερή απόκλιση. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).



2.2 Καλλιέργεια και διατήρηση του πληθυσμού των εντόμων *Drosophila melanogaster*

Οι μύγες φυλάσσονται σε ειδικό θάλαμο επώασης στον οποίο η θερμοκρασία είναι σταθερή στους 24°C και η υγρασία >60%.

Επίσης στο χώρο αυτό υπάρχει φως τις ώρες της ημέρας και σκοτάδι τη νύχτα για να είναι σταθερός ο κιρκαδικός ρυθμός των ζώων.

Οι μύγες αναπτύσσονται σε κυλινδρικά φιαλίδια (vials) διαμέτρου 3 cm και μήκους 8,35 cm, τα οποία περιέχουν ~12ml τροφής

Συστατικά Τροφής – Υλικά:

- Άγαρ (Scharlau/Serva)
- Ξηρή μαγιά (Γιώτης/Mac magic)
- Αλεύρι καλαμποκιού (Φυσιοθεραπευτική-προϊόν βιολογικής γεωργίας)
Ζάχαρη καγιένα (Φυσιοθεραπευτική-προϊόν βιολογικής γεωργίας) Γλυκόζη (D-glucose) (Gibco)
- Προπιονικό οξύ (Sigma)
- Methyl-4-hydroxybenzoate(nipagine) (Sigma)
- Αιθανόλη (absolute) (Scharlau)
- Αποσταγμένο H₂O

Δοσολογίες συστατικών για 1000ml H₂O – Κανονική Τροφή:

Agar	7,5g
Μαγιά	50g
Αλεύρι	35g
Ζάχαρη	35g
Γλυκόζη	20g
Προπιονικό	4ml
10% *Nipagine in EtOH	25ml

*Methyl-4-hydroxybenzoate (αντιμυκητοκτόνο)

Η τροφή διατηρείται στο ψυγείο (4°C) για περίπου μια βδομάδα.

2.3 Πειραματικό Πρωτόκολλο:

Νύμφες τελικού σταδίου από διάφορες σειρές διαχωρίστηκαν ως προς το φύλο τους και συλλέχθηκαν στη συνέχεια σε φιαλίδια με τροφή. Ο διαχωρισμός του φύλου έγινε στο στάδιο προνύμφης παρατηρώντας τα φυλετικά χτένια στο πρώτο ζεύγος ποδιών στο στερεοσκόπιο. Άλλοτε τα αρσενικά άτομα τοποθετούνταν σε ένα φιαλίδιο όλα μαζί ($n \approx 25$) και άλλοτε απομονωμένα, δηλαδή το καθένα σε ξεχωριστό φιαλίδιο. Ενώ τα θηλυκά τοποθετούνταν πάντοτε όλα μαζί σε ένα φιαλίδιο ($n \approx 25$).

Τα ζώα αφού παρέμειναν 5 ημέρες στα φιαλίδια στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν για πείραμα ερωτοτροπίας, όπου με αναρρόφηση των ζώων από τα φιαλίδια τους με ειδική συσκευή μεταφέρονταν στη συσκευή παρατήρησης ερωτοτροπίας (chamber) για βιντεοσκόπηση. Αρχικά το αρσενικό και το θηλυκό τοποθετήθηκαν σε ξεχωριστές θέσεις στο chamber, απομονωμένα και έμειναν εκεί για 5 λεπτά. Αυτό γίνεται για να προσαρμοστούν τα ζώα στον καινούριο χώρο, να συνηθίσουν το περιβάλλον και να ηρεμήσουν από τυχόν αναστατώσεις λόγω της μεταφοράς τους από το φιαλίδιο στο chamber. Αφού πέρασαν τα 5 λεπτά, στη συνέχεια τοποθετήθηκαν το αρσενικό και το θηλυκό στον ίδιο χώρο διαστάσεων περίπου $0,4\text{cm}^3$, και ξεκίνησε η βιντεοσκόπηση για 10 λεπτά με την ψηφιακή κάμερα του εργαστηρίου.

Όλα τα βίντεο αποθηκεύτηκαν και στη συνέχεια αναλύθηκαν για καταγραφή χρόνου των σταδίων ερωτοτροπίας της *Drosophila melanogaster* (Orientation, Singing, Copulation) και τέλος υπολογίστηκε το ποσοστό ερωτοτροπίας (Courtship Index).

Όλα τα πειράματα έγιναν σε χώρο με σταθερή θερμοκρασία περίπου 25°C και υγρασία $>60\%$.



Στάδια Ερωτοτροπίας

1. Προσανατολισμός (Orientation) → 2. Άγγιγμα κοιλιάς (Tapping) → 3. Κάλεσμα (Singing) → 4. Κυνηγητό (Following) → 5. Λειχία (Licking) → 6. Προσπάθεια συνουσίας (Attempting Copulation) → 7. Συνουσία (Copulation)

1)



2)



3)



4)



5)



6)



7)



3^ο Κεφάλαιο:

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Προηγούμενα πειραματικά δεδομένα (Dimitriadou, Consoulas, Newfeld, unpublished data) έδειξαν ότι η έλλειψη του dCORL προκαλεί ισχυρό φαινότυπο σε δοκιμασίες φωτοτακτισμού και αναρρίχησης. Η *Drosophila* όπως και πολλά άλλα είδη εντόμων χαρακτηρίζεται από έντονο θετικό φωτοτακτισμό και γεωτακτισμό (έμφυτες συμπεριφορές). Η αποτυχία του ζώου να κατευθυνθεί προς την πηγή του φωτός ή να ολοκληρώσει τη δοκιμασία αναρρίχησης δεν οφειλόταν σε αποτυχία ανίχνευσης του φωτεινού ή μηχανικού ερεθίσματος. Η αρχική αντίδραση του εντόμου ήταν κατάλληλη αλλά μετά από λίγα δευτερόλεπτα σταματούσε και επεδείκνυε αδιαφορία προς το ερέθισμα, σαν να “ξεχνούσε” τον λόγο για τον οποίο άρχισε να κινείται. Ο φαινότυπος αυτός και το γεγονός των βλαβών στα μανιταροειδή σωμάτια του εγκεφάλου (περιοχή υπεύθυνη για μνήμη και μάθηση) ήταν το έναυσμα για την πειραματική μας μελέτη. Η υπόθεση εργασίας ήταν η εξής: Αν ο φωτοτακτικός και γεωτακτικός φαινότυπος σχετίζεται με αδυναμία ολοκλήρωσης συμπεριφοράς τότε αυτή η συμπεριφορική βλάβη θα έπρεπε να αντικατοπτρίζεται και στην εγγενή συμπεριφορά της ερωτοτροπίας του αρσενικού προς το θηλυκό.

3.1 Σειρές dCORL

Το γονίδιο *dcorl* και η ερωτοτροπία του αρσενικού ατόμου.

Δοκιμασίες ερωτοτροπίας αρσενικών ατόμων με παρθένα θηλυκά από τη γονική σειρά *yw*, τη σειρά *dcorl* και τις 6 σειρές μαρτύρων (controls) ανέδειξαν διαφορές στις παραμέτρους της ερωτοτροπίας. Σύμφωνα με το πειραματικό πρωτόκολλο, τα πειραματόζωα συλλέχθηκαν στο στάδιο της νύμφης και διαχωρίστηκαν ως προς το φύλο τους. Αρχικά πειράματα με αρσενικά από μεικτό πληθυσμό ατόμων έδειξαν μεγάλες διαφορές σε παραμέτρους ερωτοτροπίας, οπότε επιλέξαμε δύο σειρές πειραμάτων με (α) απομονωμένα παρθένα αρσενικά και (β) με ομαδοποιημένα παρθένα αρσενικά.

A) Απομονωμένα παρθένα αρσενικά

Η πρώτη σειρά πειραμάτων αφορούσε τη μέτρηση επιπέδων ερωτοτροπίας απομονωμένων παρθένων αρσενικών ατόμων προς παρθένα

θηλυκά άτομα. Κάθε αρσενικό απομονώθηκε σε ξεχωριστό φιαλίδιο με τροφή μέχρι την ηλικία των 5 ημερών. Στη συνέχεια σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφεται στις Μεθόδους και Υλικά, μετρήθηκαν τα επίπεδα ερωτοτροπίας κάθε απομονωμένου αρσενικού ηλικίας 5 ημερών με ίδιας ηλικίας παρθένο θηλυκό. Εν συντομία, το αρσενικό και το θηλυκό τοποθετήθηκαν σε χωριστούς θαλάμους της συσκευής παρατήρησης ερωτοτροπίας για 5 λεπτά ούτως ώστε να προσαρμοστούν στο νέο περιβάλλον. Κατόπιν, τα ζώα οδηγήθηκαν στον ίδιο θάλαμο και η ερωτοτροπία βιντεοσκοπήθηκε για 10 λεπτά (Ejima and Griffith, 2011; Cold Spring Harb Protoc.). Στη συνέχεια αναλύθηκαν οι εξής παράμετροι: (1) Δείκτης ερωτοτροπίας (% - ΔΕ) που αντιστοιχεί στο συνολικό χρόνο ερωτοτροπίας του αρσενικού στα 10 λεπτά συνεύρεσης των ατόμων στον ίδιο θάλαμο εκφραζόμενο επί τοις εκατό. (2) Χρόνος (δευτερόλεπτα) ανίχνευσης του θηλυκού από το αρσενικό - (ο πρώτος προσανατολισμός - 1st orientation- του αρσενικού προς το θηλυκό). (3) Χρόνος (δευτερόλεπτα) μέχρι το πρώτο ερωτικό κάλεσμα του αρσενικού προς το θηλυκό με προέκταση και δόνηση του ενός μόνο φτερού (1st singing).

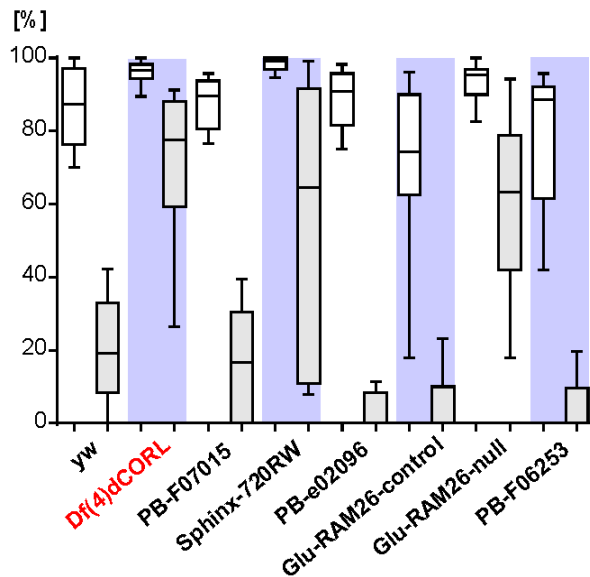
B) Ομαδοποιημένα παρθένα αρσενικά

Για τα πειράματα με ομαδοποιημένα αρσενικά έγινε ακριβώς η ίδια διαδικασία όπως και στα απομονωμένα με μόνη διαφορά ότι τα αρσενικά τοποθετήθηκαν από το στάδιο της νύμφης σε ένα φιαλίδιο, οπότε μεγάλωναν μέχρι την ηλικία των 5 ημερών μαζί με άλλα 25 αρσενικά στο ίδιο φιαλίδιο. Στη συνέχεια έγιναν τα πειράματα ερωτοτροπίας ακριβώς με τον ίδιο τρόπο που ανέφερα πιο πάνω. Τα αποτελέσματα για τις τρεις παραμέτρους που μετρήθηκαν παρουσιάζονται στις Εικόνες 1-9.

Δείκτης Ερωτοτροπίας (Courtship Index)

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων του δείκτη ερωτοτροπίας (ΔΕ) για όλα τα πειράματα (**Εικ. 1**) έδειξαν ένα συστηματικό πρότυπο. Όλες οι σειρές των απομονωμένων αρσενικών και κάποιες σειρές ομαδοποιημένων αρσενικών εμφάνισαν υψηλές τιμές ενώ μόνο κάποιες σειρές ομαδοποιημένων αρσενικών εμφάνισαν χαμηλές ΔΕ τιμές.

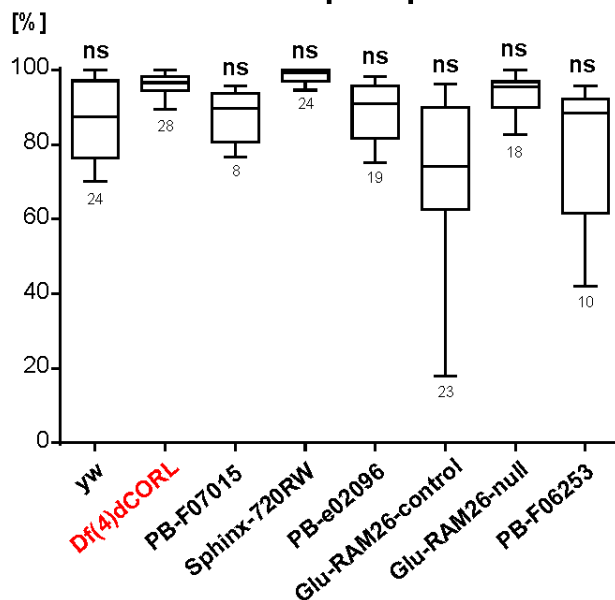
ΔΕ Απομονωμένα + Ομαδοποιημένα



Εικόνα 1.
Δείκτης Ερωτοτροπίας (ΔΕ) απομονωμένων και ομαδοποιημένων (γκρίζο) αρσενικών, δηλαδή αρσενικών που μεγάλωσαν μόνα τους ή σε ομάδα (20-30 άτομα), της γονικής σειράς yw, dcorl και των έξι control σειρών.

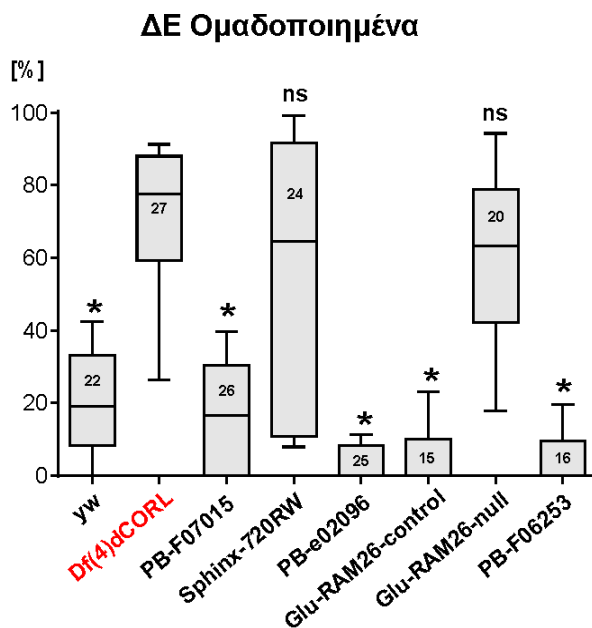
Πιο συγκεκριμένα, όταν οι δύο ομάδες αρσενικών διαχωρίστηκαν διαγραμματικά έγινε φανερό ότι τα απομονωμένα αρσενικά όλων των σειρών εμφάνισαν έντονη ερωτοτροπία προς τα παρθένα θηλυκά (Εικ. 2).

ΔΕ Απομονωμένα



Εικόνα 2.
Δείκτης ερωτοτροπίας μόνο των απομονωμένων αρσενικών της γονικής σειράς yw, dcorl και των έξι control σειρών. Δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ του dCORL και των άλλων σειρών. (Kruskal-Wallis non-parametric with Dunn's multiple comparisons tests.) ns=non significant, Αριθμοί πειραμάτων ανά σειρά αναγράφονται.

Σε αντίθεση, όταν τα αρσενικά ομαδοποιήθηκαν, τα επίπεδα ερωτοτροπίας των αρσενικών τριών σειρών (Df(4)dCORL, Sphinx-720RW και Glu-RAM26-null) προς τα παρθένα θηλυκά παρέμεινε υψηλό σε αντίθεση με τις υπόλοιπες σειρές των οποίων τα αρσενικά ερωτοτρόπησαν λίγο (<20% κατά μέσο όρο).

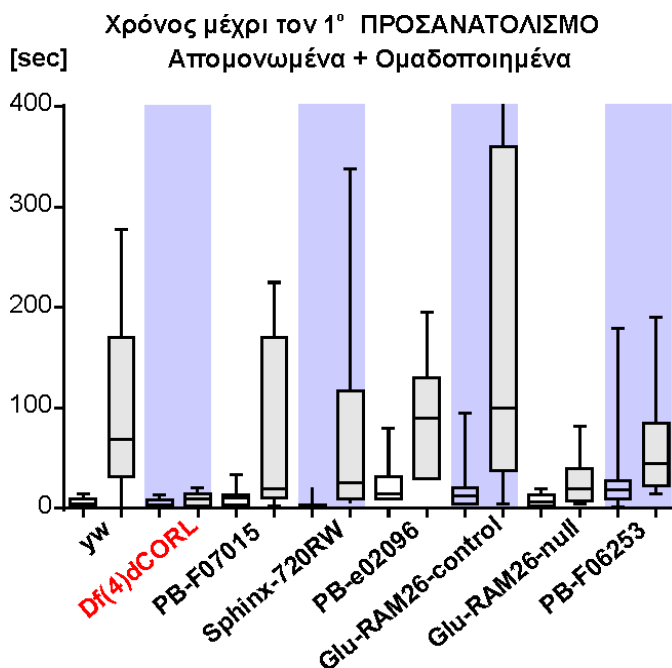


Εικόνα 3.

Δείκτης ερωτοτροπίας μόνο των ομαδοποιημένων αρσενικών (ομάδα 20-30 ατόμων) από τις σειρές yw, dcorl και των 6 control σειρών. Στατιστικά σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν μεταξύ του dCORL και της γονικής σειράς yw και 4 από τις 6 σειρών των control (Kruskal-Wallis non-parametric with Dunn's multiple comparisons tests.) ns=non significant, Αριθμοί πειραμάτων ανά σειρά αναγράφονται. Οι αστερίσκοι δείχνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ του dCORL και των άλλων σειρών.

Πρώτος προσανατολισμός (1st orientation)

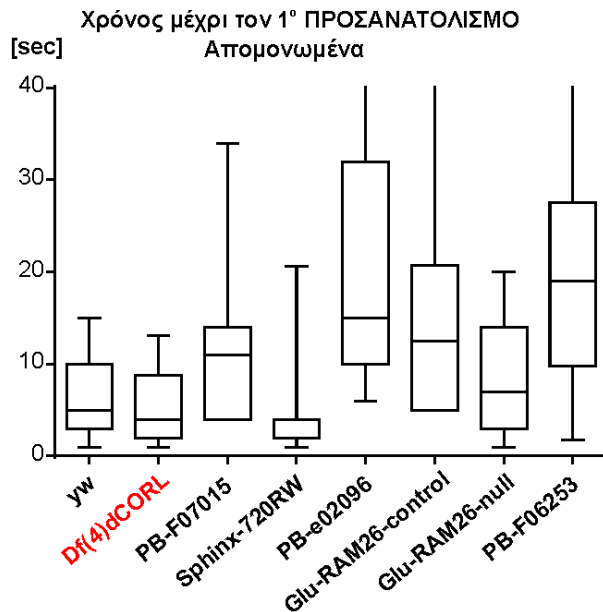
Τα αποτελέσματα όλων των μετρήσεων του χρόνου που χρειάστηκαν τα αρσενικά για να αντιληφθούν τα θηλυκά και να προσανατολίσουν κατάλληλα το σώμα τους παρουσιάζονται στην **Εικόνα 4**.



Εικόνα 4.

Πρώτος προσανατολισμός απομονωμένων και ομαδοποιημένων (γκρίζο) αρσενικών, δηλαδή αρσενικών που μεγάλωσαν μόνο τους ή σε ομάδα (20-30 άτομα), της γονικής σειράς yw, dcorl και των έξι control σειρών.

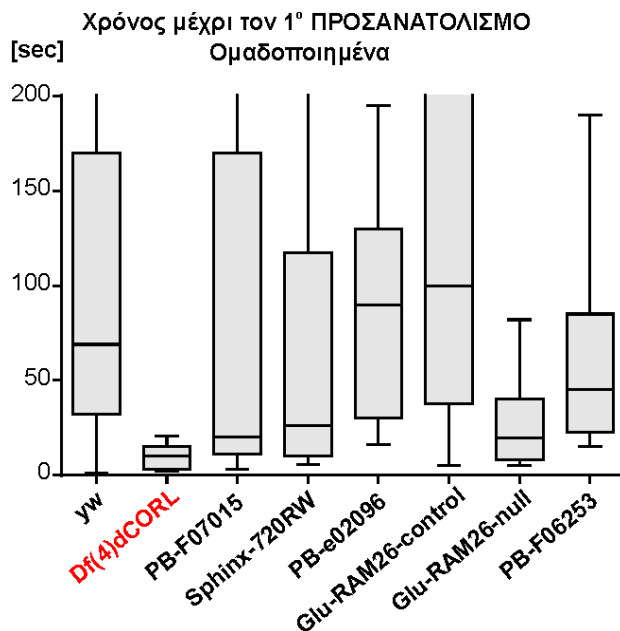
Τα απομονωμένα αρσενικά είχαν ταχεία απόκριση (<20 sec) όσον αφορά στην ανίχνευση των παρθένων θηλυκών (Εικ. 5).



Εικόνα 5.

Πρώτος προσανατολισμός απομονωμένων αρσενικών της γονικής σειράς yw, dcorl και των έξι control σειρών. Δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ του dCORL και των άλλων σειρών. (Kruskal-Wallis non-parametric with Dunn's multiple comparisons tests.)

Σε αντίθεση, τα αρσενικά που είχαν προηγουμένως ομαδοποιηθεί εμφάνισαν πολύ μεγαλύτερη καθυστέρηση στην αναγνώριση των θηλυκών (βλέπε κλίμακα χρόνου).

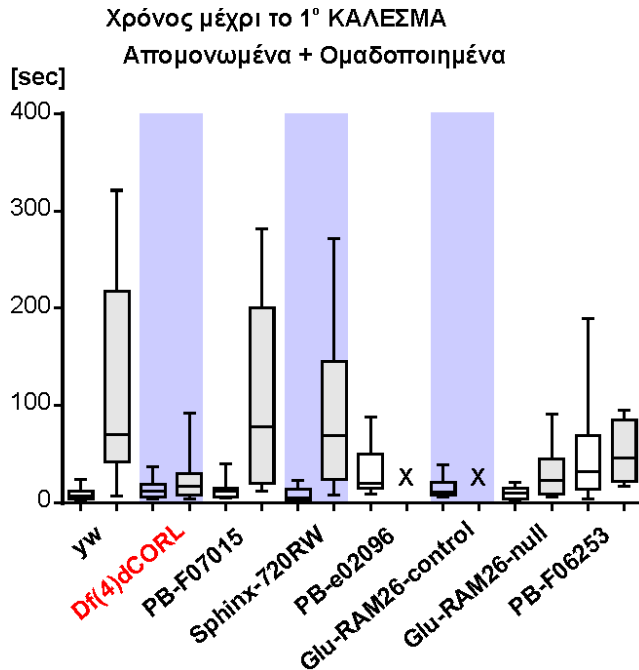


Εικόνα 6.

Πρώτος προσανατολισμός μόνο των ομαδοποιημένων αρσενικών (ομάδα 20-30 ατόμων) από τις σειρές yw, dcorl και των 6 control σειρών. Δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ του dCORL και των άλλων σειρών. (Kruskal-Wallis non-parametric with Dunn's multiple comparisons tests.)

Πρώτο κάλεσμα (1st singing)

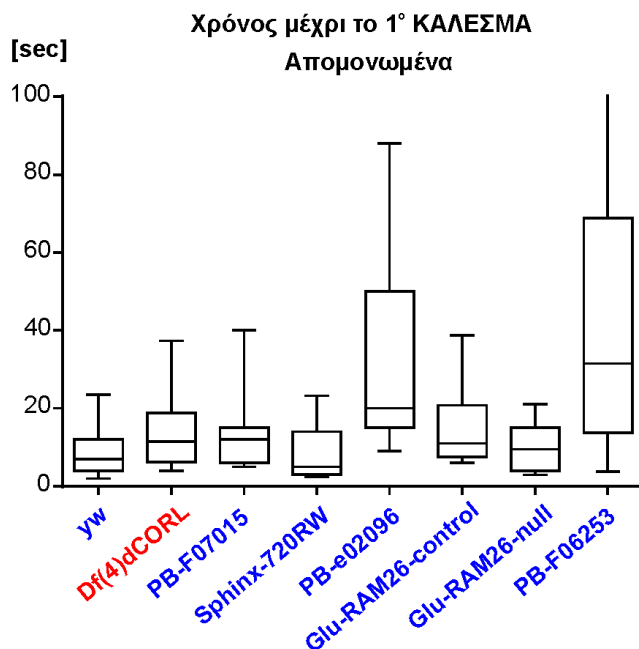
Τα αποτελέσματα όλων των μετρήσεων του χρόνου που μεσολάβησε μέχρις ότου τα αρσενικά να αρχίσουν το πρώτο τους ερωτικό τραγούδι παρουσιάζονται στην **Εικόνα 7**.



Εικόνα 7.

Πρώτο κάλεσμα απομονωμένων και ομαδοποιημένων (γκρίζο) αρσενικών, δηλαδή αρσενικών που μεγάλωσαν μόνο τους ή σε ομάδα (20-30 άτομα), της γονικής σειράς yw, dcorl και των έξι control σειρών. Να σημειωθεί ότι σε δύο σειρές δεν παρατηρήθηκε κάλεσμα (X).

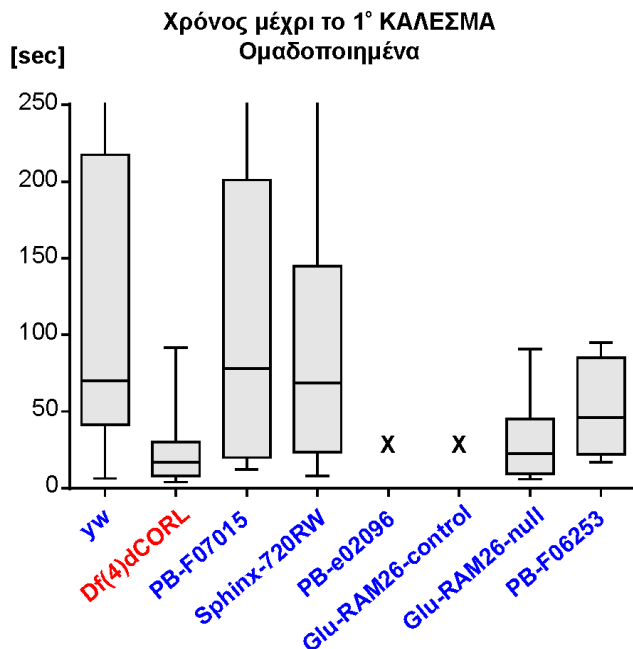
Τα απομονωμένα αρσενικά πραγματοποίησαν γρήγορα (<40 sec) το πρώτο τους κάλεσμα στα παρθένα θηλυκά (**Εικ. 8**).



Εικόνα 8..

Πρώτο κάλεσμα απομονωμένων αρσενικών της γονικής σειράς yw, dcorl και των έξι control σειρών. Δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ του dCORL και των άλλων σειρών. (Kruskal-Wallis non-parametric with Dunn's multiple comparisons tests)

Σε αντίθεση, τα αρσενικά που είχαν προηγουμένως ομαδοποιηθεί εμφάνισαν πολύ μεγαλύτερη καθυστέρηση στο πρώτο τους κάλεσμα (βλέπε κλίμακα χρόνου, **Εικ. 9**).



Εικόνα 9.

Πρώτο κάλεσμα μόνο των ομαδοποιημένων αρσενικών (ομάδα 20-30 ατόμων) από τις σειρές yw, dcorl και των 6 control σειρών. Δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ του dCORL και των άλλων σειρών. (Kruskal-Wallis non-parametric with Dunn's multiple comparisons tests.). Να σημειωθεί ότι σε δύο σειρές δεν παρατηρήθηκε κάλεσμα (X).

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ

Από τα ανωτέρω πειραματικά δεδομένα καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι η διάσωση του φαινοτύπου (υψηλά επίπεδα ερωτοτροπίας των ομαδοποιημένων αρσενικών Df(4)dCORL) δεν μπορεί να αποδοθεί στην έλλειψη του γονιδίου dCORL, λόγω των επίσης υψηλών επιπέδων ερωτοτροπίας των ομαδοποιημένων αρσενικών των control σειρών Sphinx-720RW και Glu-RAM26-null.

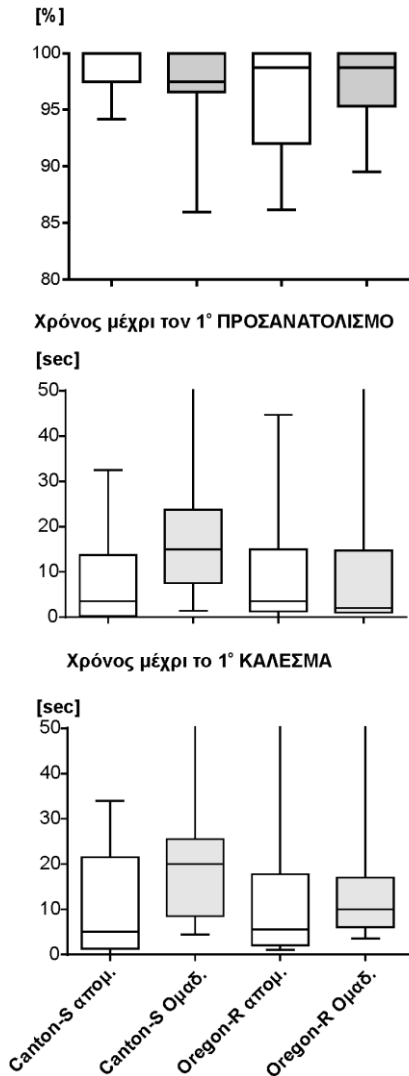
3.2 Σειρές Canton-S και Oregon-R

Τα αγρίου τύπου αρσενικά Oregon-R και Canton-S δεν εμφανίζουν προσαρμοστική ερωτοτροπία. Σε αντίθεση τα αρσενικά της σειράς w¹¹¹⁸ επηρεάζονται σημαντικά από προηγούμενη εμπειρία και εμφανίζουν έντονη προσαρμοστική ερωτοτροπία.

Τα πειράματα για τις αγρίου τύπου (wild type) σειρές (Canton-S και Oregon-R) πραγματοποιήθηκαν ακριβώς με τον ίδιο τρόπο που περιγράφηκε παραπάνω. Δηλαδή, για κάθε μία από αυτές τις σειρές έγινε ένα σύνολο

πειραμάτων με απομονωμένα αρσενικά 5 ημερών που ερωτοτροπούσαν με παρθένα θηλυκά 5 ημερών και ένα σύνολο πειραμάτων όπου ομαδοποιημένα για 5 ημέρες αρσενικά (5 ημερών) ερωτοτροπούσαν με παρθένα θηλυκά (5 ημερών). Επίσης, έγινε καταγραφή των ίδιων παραμέτρων ερωτοτροπίας και τα αποτελέσματα απεικονίζονται στα παρακάτω διαγράμματα (**Εικ. 10**).

ΔΕ Απομονωμένα + Ομαδοποιημένα



Εικόνα 10.

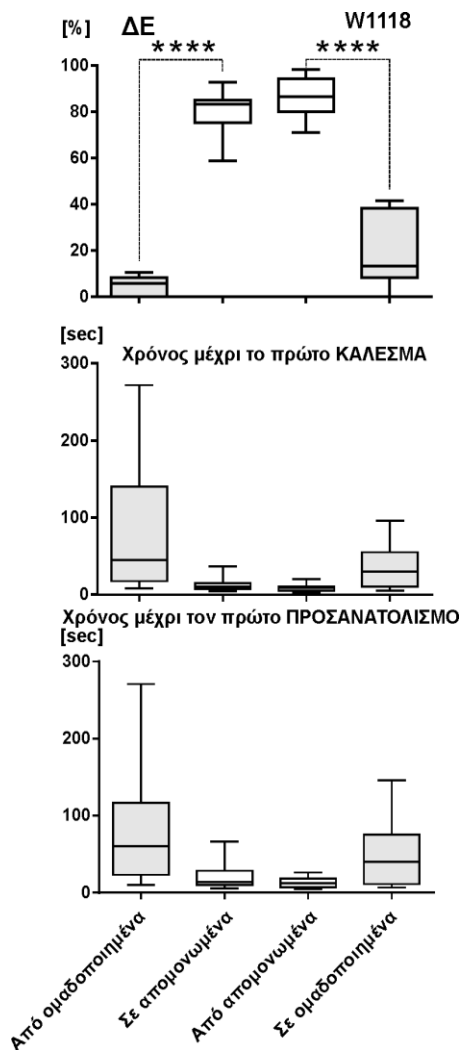
Δείκτης ερωτοτροπίας, πρώτος προσανατολισμός και πρώτο κάλεσμα απομονωμένων και ομαδοποιημένων (γκρίζο) αρσενικών, δηλαδή αρσενικών που μεγάλωσαν μόνο τους ή σε ομάδα (20-30 άτομα), των αγρίου τύπου σειρών Oregon-R και Canton-S. Δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των σειρών. (Kruskal-Wallis non-parametric with Dunn's multiple comparisons tests.).

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ

Τα δεδομένα δείχνουν ότι αρσενικά αγρίου τύπου δεν μεταβάλουν τα επίπεδα ερωτοτροπίας τους σε σχέση με την πρότερη εμπειρία τους ζώντας σε ομάδα.

3.3 Σειρά w^{1118}

Αντίθετα, η μετάλλαξη στο γονίδιο *white* είχε ως αποτέλεσμα την εμφάνιση του φαινοτύπου. Με τα ζώα αυτής της σειράς διεκπεραιώσαμε την ίδια σειρά πειραμάτων με μία σημαντική αλλαγή όμως στο αρχικό πρωτόκολλο. Η διαδικασία είχε ως εξής: Αφού εκτελέσαμε το πείραμα ερωτοτροπίας με ομαδοποιημένα αρσενικά 5 ημερών, στη συνέχεια αυτά τοποθετήθηκαν σε ξεχωριστά φιαλίδια το καθένα και έτσι αυτά τα ίδια ζώα μετατράπηκαν σε απομονωμένα. Σε αυτή την κατάσταση παρέμειναν για άλλες 5 μέρες και στη συνέχεια επαναλήφθηκαν τα πειράματα ερωτοτροπίας με τα αρσενικά αυτή τη φορά να είναι 10 ημερών και απομονωμένα. Επιπλέον η διαδικασία έγινε και ακριβώς αντίστροφα. Δηλαδή έγιναν πρώτα τα πειράματα ερωτοτροπίας με τα ομαδοποιημένα αρσενικά 5 ημερών και στη συνέχεια αυτά τοποθετήθηκαν όλα μαζί σε ένα φιαλίδιο για άλλες 5 ημέρες. Μετά από αυτό το διάστημα επαναλάβαμε τα πειράματα ερωτοτροπίας με αυτά τα αρσενικά ζώα που είναι πλέον απομονωμένα ζώα 10 ημερών. Ο δείκτης ερωτοτροπίας, ο χρόνος μέχρι τον πρώτο προσανατολισμό και ο χρόνος μέχρι το πρώτο κάλεσμα απεικονίζονται στα διαγράμματα της **Εικόνας 11**.



Εικόνα 11.

Δείκτης ερωτοτροπίας, χρόνος μέχρι τον πρώτο προσανατολισμό και χρόνος μέχρι το πρώτο κάλεσμα αρσενικών, της μεταλλαγμένης σειράς w^{1118} , τα οποία μετατράπηκαν από ομαδοποιημένα (25 άτομα) σε απομονωμένα και αντίστροφα. (Υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές για το ΔΕ. Mann-Whitney U-test, **** $p < 0.0001$).

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ

Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν την έντονη προσαρμοστικότητα στην ερωτοτροπία του αρσενικού (φαινότυπος) όταν αφαιρεθεί το γονίδιο *white* από τη γονική σειρά Canton-S.

4^ο Κεφάλαιο:

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Κάναμε την υπόθεση ότι ο φαινότυπος αδυναμίας ολοκλήρωσης μιας κινητικής συμπεριφοράς (φωτοτακτικός και γεωτακτισμός; (Dimitriadou, Consoulas, Newfeld, unpublished data) στο Df(4)dCORL θα πρέπει να αντικατοπτρίζεται και στην εγγενή συμπεριφορά της ερωτοτροπίας του αρσενικού προς το θηλυκό. Επίσης, το γεγονός των βλαβών στα μανιταροειδή σωμάτια του εγκεφάλου (περιοχή υπεύθυνη για μνήμη και μάθηση) επέτρεπε να υποθέσουμε ότι η μύγα ίσως να ξεχνά το λόγο για τον οποίο ξεκίνησε την κινητική συμπεριφορά.

Η εργασία αυτή εξέτασε την υπόθεση ότι το γονίδιο *CORL* είναι απαραίτητο για την επιτέλεση της εύπλαστης, εγγενούς συμπεριφοράς της ερωτοτροπίας του αρσενικού ατόμου προς το θηλυκό στη *Drosophila*. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι ενδιαφέροντες φαινότυποι, που αποκαλύφθηκαν μετά από σειρές πειραμάτων ερωτοτροπίας παρθένων αρσενικών με ίδιας ηλικίας παρθένα θηλυκά, δεν μπορούν να αποδοθούν στο γονίδιο *dCORL*. Η γονική σειρά *yw* και τέσσερις από τις έξι control σειρές εμφάνισαν έναν ιδιαίτερο φαινότυπο. Τα επίπεδα ερωτοτροπίας των παρθένων αρσενικών προς παρθένα θηλυκά συσχετίζονται με προηγούμενη εμπειρία λόγω συμβίωσης με άλλα παρθένα αρσενικά. Σε αυτές τις πέντε σειρές, υπήρχε μια δραματική έκπτωση στα επίπεδα ερωτοτροπίας όταν τα αρσενικά ζούσαν ομαδικά. Συγκριτικά κατά μέσο όρο ο δείκτης ερωτοτροπίας των απομονωμένων αρσενικών κυμαινόταν σε τιμές πάνω από 80% ενώ αυτός των ομαδοποιημένων αρσενικών κάτω από το 20% (Εικ. 1-3). Σε αντίθεση, οι σειρές Df(4)dCORL, *Sphinx*-720-RW, και *Glu-RAM26-null* εμφάνισαν υψηλούς δείκτες ερωτοτροπίας ανεξάρτητα από την πρότερη κατάσταση τους. Δεδομένου ότι για τη δημιουργία του μεταλλαγμένου στελέχους Df(4)dCORL έγινε εξάλειψη τμήματος της γενωμικής περιοχής 102D του 4^{ου} χρωμοσώματος που περιλαμβάνει εκτός του *dCORL*, τα *Glu-RA* (metabotropic glutamate receptor), *sphinx* (noncoding RNA) και CG32016 (Tacaesu et al., 2012), που σημαίνει ότι κάποιο ή όλα αυτά τα γονίδια θα μπορούσε να ευθύνονται για την διάσωση του φαινοτύπου της ερωτοτροπίας της γονικής σειράς *yw*. Το γονίδιο *Sphx* έχει δείχτει να παίζει ρόλο στην ερωτοτροπία αρσενικών προς αρσενικά (Dai et al., 2008).

Τα χαμηλά επίπεδα ερωτοτροπίας αρσενικών που τις πρώτες πέντε ημέρες της ζωής τους ζούσαν σε ομάδες των 20-30 ατόμων μπορούν να εξηγηθούν μόνο από τη παραδοχή ότι αρσενικά με αυτό το γενετικό υπόβαθρο είναι ευαίσθητα σε κοινωνικές εμπειρίες. Η γονική σειρά *yw* έχει μη λειτουργικό γονίδιο *white*. Μελέτες υπερέκφρασης του *w* εκτοπικά ή σε λάθος μέρη στα κύτταρα που κανονικά εκφράζεται έδειξαν μια εντυπωσιακή συμπεριφορά ερωτοτροπίας μεταξύ αρσενικών ατόμων (Zhang and Odenwald (1995); Hing and Carlson (1996). Αρσενικά άτομα δημιουργούσαν γραμμές ή αλυσίδες ερωτοτροπώντας. Μεταλλαγμένα αρσενικά για το *w* (*w*¹¹¹⁸) δεν επιδεικνύουν τέτοια συμπεριφορά.

Σε δικές μας παρατηρήσεις φιαλιδίων με ομάδες αρσενικών w^{1118} διαπιστώσαμε σημάδια στιγμιαίας ερωτοτροπίας από αρσενικό για άλλο αρσενικό (πετάρισμα του ή των φτερών), αλλά όχι γραμμές ή αλυσίδες. Τα αρσενικά w^{1118} εμφανίζουν πολύ υψηλό ΔΕ ως απομονωμένα και πολύ χαμηλό ΔΕ όταν διατηρηθούν σε ομάδα (Εικ. 11). Σε αντίθεση αρσενικά της γονικής σειράς του w^{1118} Canton-S και της αγρίου τύπου σειράς Oregon-R δεν εμφάνισαν αυτό τον φαινότυπο της προσαρμοστικής ερωτοτροπίας (Εικ. 10). Η ερωτοτροπία στη *Drosophila* υπόκειται σε συντελεστική εξαρτημένη μάθηση. Στο κλασσικό παράδειγμα καταπίεσης της ερωτοτροπίας του αρσενικού μετά από έκθεση του σε ζευγαρωμένο θηλυκό έχειδειχθεί ότι η αρνητική εμπειρία που βιώνει το αρσενικό μετατρέπεται σε μνήμη (όλων των τύπων ανάλογα με το πρωτόκολλο εκγύμνασης) που εκδηλώνεται μετέπειτα με έκπτωση στην ερωτοτροπία με το φυσικό του στόχο, το παρθένο θηλυκό (Tompkins et al. 1983; Ackerman and Siegel 1986; Ejima et al. 2007; Griffith and Ejima 2008). Τα αποτελέσματα των πειραμάτων μας μπορούν να εξηγηθούν κατά τον ίδιο τρόπο. Η εμπειρία των αρσενικών από την συμβίωση με άλλα αρσενικά ισοδυναμεί με εκμάθηση αποστροφής ερωτοτροπίας με ζευγαρωμένο θηλυκό. Αυτή η μνήμη δεν είναι μακροχρόνια αφού δείξαμε ότι απομονωμένα παρθένα αρσενικά 5 ημερών έχουν υψηλό ΔΕ που όμως μειώνεται δραματικά αν τα ίδια άτομα ζήσουν μαζί για τις επόμενες 5 ημέρες, όπως και ο αντίστροφος χειρισμός. Επομένως τα αρσενικά μαθαίνουν να προσαρμόζουν την ερωτοτροπία τους ανάλογα με πρόσφατες εμπειρίες από τη μοναστική ζωή ή την ομαδική συμβίωση τους.

Η πρωτεΐνη white είναι διαμεμβρανικός ABC μεταφορέας που σε συνδυασμό με την πρωτεΐνη scarlet μεταφέρει τρυπτοφάνη, πρόδρομο μόριο της ομοχρωμικής χρωστικής ουσίας ξανθοματίνης (καφέ) αλλά και του νευροδιαβιβαστή σεροτονίνη. Επίσης, η *w* σε συνδυασμό με τη *brown* μεταφέρει γουανίνη, πρόδρομο μόριο της χρωστικής ουσίας τετραυδροπτερίνης (πρόδρομο των δροσοπτερινών-κόκκινο) αλλά και συνπαράγοντας της μετατροπής της τυροσίνης σε ντοπαμίνη (Sullivan et al., 1974; Summers et al., 1982; Ewart and Howells (1998).

Κατά συνέπεια η έλλειψη ή υποέκφραση της *w* έχει ως αποτέλεσμα χαμηλότερα επίπεδα αμινών (σεροτονίνη, ντοπαμίνη αλλά και ισταμίνη; Borycz et al., 2008). Προτείνουμε την υπόθεση ότι τα χαμηλά επίπεδα αμινών στο ΚΝΣ του w^{1118} ευθύνονται για την μετατροπή της εμπειρίας συμβίωσης με άλλα αρσενικά σε μνήμη (τουλάχιστον βραχύχρονη) που έχει ως αποτέλεσμα μειωμένη ερωτοτροπία με παρθένα θηλυκά.

Η μελέτη αυτή προτείνει ένα νέο παράδειγμα-μοντέλο προσαρμοστικής ερωτοτροπίας σε μύγες με γενετικό υπόβαθρο w^{1118} , δηλαδή σε ένα μεγάλο αριθμό διαγονιδιακών σειρών, δεδομένου της ευρείας χρήσης του *w* και των λευκών ματιών ως δείκτη.

Εικόνες 2 & 3.

Singles / Kruskal-Wallis test				
Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
dCORL vs. F07015	60,31	No	ns	> 0,9999
dCORL vs.spx	-34,38	No	ns	> 0,9999
dCORL vs e02096	45,88	No	ns	> 0,9999
dCORL vs Glu-RA-2b control	91,58	Yes	****	< 0,0001
dCORL vs yw	48,75	No	ns	0,4241
dCORL vs Glu-RA-112b null	19,47	No	ns	> 0,9999
dCORL vs Canton	-42,13	No	ns	> 0,9999
dCORL vs F06253	76,15	No	ns	0,0922

Group / Kruskal-Wallis test				
Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
dCORL vs F07015	75,14	Yes	**	0,0029
dCORL vs spx	18,86	No	ns	> 0,9999
dCORL vs e02096	119,1	Yes	****	< 0,0001
d dCORL vs Glu-RA-2b control	118,2	Yes	****	< 0,0001
dCORL vs yw	65,82	Yes	*	0,0385
dCORL vs Glu-RA-112b null	12,33	No	ns	> 0,9999
dCORL vs F06253	118,2	Yes	****	< 0,0001

Εικόνες 5 & 6

Singles / Kruskal-Wallis test				
Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
dCORL vs. F07015	-50,89	No	ns	> 0,9999
dCORL singles vs. 5d spx singles	13,04	No	ns	> 0,9999
dCORL singles vs. e02096 single	-86,58	Yes	***	0,0004
dCORL singles vs. Glu-RA-2b single	-65,10	Yes	*	0,0254
5 d dCORL singles vs. yw singles	-13,81	No	ns	> 0,9999
5 d dCORL singles vs. Glu-RA-112B null singles	-25,48	No	ns	> 0,9999
5 d dCORL singles vs. F06253 singles	-81,64	Yes	*	0,0376

Group / Kruskal-Wallis test				
Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
5 d dCORL group vs. 5 d F07015 group	-51,01	No	ns	0,0716
5 d dCORL group vs. 5d spx group	-52,78	Yes	*	0,0211
5 d dCORL group vs. e02096 group	-78,52	Yes	**	0,0019
5 d dCORL group vs. Glu-RA-2b group	-80,70	No	ns	0,0964
5 d dCORL group vs. yw group	-68,56	Yes	***	0,0009
5 d dCORL group vs. Glu-RA-112B null group	-29,02	No	ns	> 0,9999
5 d dCORL group vs. fo6253 group	-65,21	No	ns	0,3503

Εικόνες 8 & 9

Singles / Kruskal-Wallis test				
Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
5 d dCORL singles vs. 5 d F07015 singles	1,875	No	ns	> 0,9999
5 d dCORL singles vs. 5d spx singles	40,06	No	ns	> 0,9999
5 d dCORL singles vs. e02096 single	-46,95	No	ns	0,8109
5 d dCORL singles vs. Glu-RA-2b single	-8,754	No	ns	> 0,9999
5 d dCORL singles vs. yw singles	30,57	No	ns	> 0,9999
5 d dCORL singles vs. Glu-RA-112B sinles	24,03	No	ns	> 0,9999
5 d dCORL singles vs. F06253 singles	-49,40	No	ns	> 0,9999

Group / Kruskal-Wallis test				
Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
5 d dCORL group vs. 5 d F07015 group	-44,37	No	ns	0,1094
5 d dCORL group vs. 5d spx group	-38,37	No	ns	0,3580
5 d dCORL group vs. e02096 group	-89,93	No	ns	0,0788
5 d dCORL group vs. Glu-RA-2b group	-34,68	No	ns	> 0,9999
5 d dCORL group vs. yw group	-46,04	No	ns	0,0734
5 d dCORL group vs. Glu-RA-112B group	-6,148	No	ns	> 0,9999
5 d dCORL group vs. fo6253 group	-33,68	No	ns	> 0,9999

Εικόνα 10

Column B	Canton group
vs.	vs,
Column A	Canton Singles
Mann Whitney test	
P value	0,0730
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	ns
Significantly different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column A,B	539,5 , 240,5
Mann-Whitney U	120,5
Difference between medians	
Median of column A	100,0
Median of column B	97,50
Difference: Actual	-2,500
Difference: Hodges-Lehmann	-1,700

Column D	Or group
vs.	vs,
Column C	Or Singles
Mann Whitney test	
P value	0,5085
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	ns
Significantly different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column C,D	732,5 , 752,5
Mann-Whitney U	326,5
Difference between medians	
Median of column C	98,75
Median of column D	98,75
Difference: Actual	0,0
Difference: Hodges-Lehmann	0,0

Εικόνα 11

Column B	W1118 to singles
vs.	vs,
Column A	W1118 group
Mann Whitney test	
P value	< 0,0001
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	****
Significantly different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column A,B	326,0 , 899,0
Mann-Whitney U	1,000
Difference between medians	
Median of column A	5,800
Median of column B	83,30
Difference: Actual	77,50
Difference: Hodges-Lehmann	76,60

Column D	W1118 to group
vs.	vs,
Column C	W1118 singles
Mann Whitney test	
P value	< 0,0001
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	****
Significantly different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column C,D	713,0 , 190,0
Mann-Whitney U	0,0
Difference between medians	
Median of column C	86,60
Median of column D	13,30
Difference: Actual	-73,30
Difference: Hodges-Lehmann	-68,40

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- **Ackerman SL, Siegel RW.** 1986. Chemically reinforced conditioned courtship in *Drosophila*: Responses to wild-type and the dunce, amnesiac and don giovanni mutants. *J Neurogenet* 3: 111–123.
- **Anaka M, MacDonald CD, Barkova E, Simon K, Rostom R, et al.** (2008). The white gene of *Drosophila melanogaster* encodes a protein with a role in courtship behavior. *J Neurogenet* 22: 243–276)
- **Bastock M, Manning A.** 1955. The courtship of *Drosophila melanogaster*. *Behaviour* 8: 85–111
- **Berry J, Krause WC, Davis RL.** 2008. Olfactory memory traces in *Drosophila*. *Prog Brain Res* 169: 293–304.
- **Boll W, Noll M** (2002) The *Drosophila* Pox neuro gene: control of male courtship behavior and fertility as revealed by a complete dissection of all enhancers. *Development* 129: 5667–5681).
- **Borycz J, Borycz JA, Kubo´w A, Lloyd V, Meinertzhagen IA** (2008). *Drosophila* ABC transporter mutants white, brown and scarlet have altered contents and distribution of biogenic amines in the brain. *J Exp Biol* 211: 3454–3466).
- **Bray S, Amrein H.** 2003. A putative *Drosophila* pheromone receptor expressed in male-specific taste neurons is required for efficient courtship. *Neuron* 39: 1019–1029.
- **Broughton Susan J., Toshihiro Kitamoto, and Ralph J. Greenspan.** (2004) Excitatory and Inhibitory Switches for Courtship in the Brain of *Drosophila melanogaster*
- **Butterworth FM.** 1969. Lipids of *Drosophila*: A newly detected lipid in the male. *Science* 163: 1356–1357.
- **Consoulas C, Duch C, Bayline RJ, Levine RB(2000).** Behavioral transformations during metamorphosis: Remodeling of neural and motor systems. Elsevier Science, Brain Research Bulletin, Vol. 53, No.5, pp. 571-583
- **Consoulas C, Restifo LL, Levine RB (2002).** Dendritic Remodeling and Growth of Motoneurons during Metamorphosis of *Drosophila melanogaster*. *The journal of Neuroscience*, 22 (12):4906-4917.
- **Cook R, Cook A.** 1975. The attractiveness to males of female *Drosophila melanogaster*: Effects of mating, age and diet. *Anim Behav* 23: 521–526.
- **C. P. Kyriacou, M. J. van den Berg, J. C. Hall,** *ibid.* 20, 617 (1990).
- **C. Wehrhahn,** *Biol. Cybernet.* 32, 239 (1979).
- **da Graca, L., Zimmerman, K., Mitchell, M., Kozhan-Gorodetska, M.,**

- Sekiewicz, K., Morales, Y. and Patterson, G.** (2003). Daf-5 is a Ski homolog that functions in a neuronal TGF- β pathway to regulate *C. elegans* dauer development. *Development* 131, 435-446
- **Davis RL.** 2005. Olfactory memory formation in *Drosophila*: From molecular to systems neuroscience. *Annu Rev Neurosci* 28: 275–302.
 - **D. A. Wheeler, W. A. Fields, J. C. Hall,** *Behav. Genet.* 18, 503 (1988).
 - **D. Scott and L. L. Jackson, J. Insect Physiol.** 34, 863 (1988); D. Scott, R. C. Richmond, D. A. Carlson, *Anim. Behav.* 36, 1164 (1988); D. Scott and L. L. Jackson, *ibid.* 40, 891 (1990).
 - **Duffy JB.** 2002. GAL4 system in *Drosophila*: A fly geneticist's Swiss army knife. *Genesis* 34: 1–15.
 - **Dukas R.** 2005. Experience improves courtship in male fruit flies. *Anim Behav* 69: 1203–1209.
 - **Eberl DF, Duyk GM, Perrimon N.** 1997. A genetic screen for mutations that disrupt an auditory response in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci* 94: 14837–14842.
 - **Ejima A, Griffith LC.** 2008. Courtship initiation is stimulated by acoustic signals in *Drosophila melanogaster*. *PLoS One* 3: e3246. doi: 10.1371/journal.pone.0003246.
 - **Ejima and Griffith LC.,** 2011; *Cold Spring Harb Protoc.*
 - **Ejima A, Smith BP, Lucas C, Levine JD, Griffith LC.** 2005. Sequential learning of pheromonal cues modulates memory consolidation in trainer-specific associative courtship conditioning. *Curr Biol* 15: 194–206.
 - **Ejima A, Smith BP, Lucas C, van der Goes van Naters W, Miller CJ, Carlson JR, Levine JD, Griffith LC.** 2007. Generalization of courtship learning in *Drosophila* is mediated by cis-vaccenyl acetate. *Curr Biol* 17: 599–605.
 - **Ewart GD, Howells AJ** (1998) ABC transporters involved in transport of eye pigment precursors in *Drosophila melanogaster*. *Meth Enzymol* 292: 213–224].
 - **Ferveur JF.** 2005. Cuticular hydrocarbons: Their evolution and roles in *Drosophila* pheromonal communication. *Behav Genet* 35: 279–295.
 - **Gailey DA, Jackson FR, Siegel RW.** 1982. Male courtship in *Drosophila*: The conditioned response to immature males and its genetic control. *Genetics* 102: 771–782.
 - **Gailey DA, Jackson FR, Siegel RW.** 1984. Conditioning mutations in *Drosophila melanogaster* affect an experience-dependent behavioral modification in courting males. *Genetics* 106: 613–623.
 - **Gailey DA, Hall JC, Siegel RW.** 1985. Reduced reproductive success for a conditioning mutant in experimental populations of *Drosophila*

- melanogaster. *Genetics* 111: 795–804.
- **Gailey DA, Lacaille RC, Hall JC.** 1986. Chemosensory elements of courtship in normal and mutant, olfaction-deficient *Drosophila melanogaster*. *Behav Genet* 16: 375–405.
 - **Gailey DA, Vilella A, Tully T.** 1991. Reassessment of the effect of biological rhythm mutations on learning in *Drosophila melanogaster*. *J Comp Physiol [A]* 169: 685–697.
 - **G. L. Fowler,** *Adv. Genet.* 17, 293 (1973).
 - **Griffith LC.** 2004. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II: An unforgettable kinase. *J Neurosci* 24: 8391–8393.
 - **Griffith, L.C., and Ejima, A.** (2009). Courtship learning in *Drosophila melanogaster*: diverse plasticity of a reproductive behavior. *Learn. Mem.* 16, 743–750.
 - **Griffith LC, Verselis LM, Aitken KM, Kyriacou CP, Greenspan RJ.** 1993. Inhibition of calcium/calmodulin-dependent protein kinase in *Drosophila* disrupts behavioral plasticity. *Neuron* 10: 501–509.
 - **Griffith LC, Wang J, Zhong Y, Wu CF, Greenspan RJ.** 1994. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II and potassium channel subunit eag similarly affect plasticity in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci* 91: 10044–10048.
 - **G. Streisinger,** *Evolution* 2, 187 (1948).
 - **Hall, J.C.** (1994). The mating of a fly. *Science* 264, 1702–1714
 - **Hing ALY, Carlson JR** (1996). Male-male courtship behavior induced by ectopic expression of the *Drosophila* white gene: role of sensory function and age. *J Neurobiol* 30: 454–464.
 - **Ishimoto H, Sakai T, Kitamoto T.** 2009. Ecdysone signaling regulates the formation of long-term courtship memory in adult *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci* 106: 6381–6386.
 - **Jahchan, N. S. and Luo, K.** (2010). SnoN in mammalian development, function and diseases. *Curr. Opin. Pharmacol.* 10, 670-675.
 - **Jallon JM.** 1984. A few chemical words exchanged by *Drosophila* during courtship and mating. *Behav Genet* 14: 441–478.
 - **Jallon JM, Hotta Y.** 1979. Genetic and behavioral studies of female sex appeal in *Drosophila*. *Behav Genet* 9: 257–275.
 - **J. C. Hall,** *Behav. Genet.* 8, 125 (1978).
 - **Joiner MA, Griffith LC.** 1997. CaM kinase II and visual input modulate memory formation in the neuronal circuit controlling courtship conditioning. *J Neurosci* 17: 9384–9391.
 - **Joiner MA, Griffith LC.** 1999. Mapping of the anatomical circuit of CaM kinase-dependent courtship conditioning in *Drosophila*. *Learn Mem* 6: 177–192.

- **Joiner MA, Griffith LC.** 2000. Visual input regulates circuit configuration in courtship conditioning of *Drosophila melanogaster*. *Learn Mem* 7: 32–42.
- **Kalmus H** (1943) The optomotor responses of some eye mutants of *Drosophila*. *J Genet* 45: 206–213.)
- **Kamyshev NG, Iliadi KG, Bragina JV.** 1999. *Drosophila* conditioned courtship: Two ways of testing memory. *Learn Mem* 6: 1–20.
- **Kane NS, Robichon A, Dickinson JA, Greenspan RJ.** 1997. Learning without performance in PKC-deficient *Drosophila*. *Neuron* 18: 307–314.
- **K. Connolly and R. Cook,** *Behaviour* 52, 155 (1973).
- **Keleman K, Kruttner S, Alenius M, Dickson BJ.** 2007. Function of the *Drosophila* CPEB protein Orb2 in long-term courtship memory. *Nat Neurosci* 10: 1587–1593.
- **Kemlink, D., Polo, O., Frauscher, B., Gschliesser, V., Högl, B., Poewe, W., Vodicka, P., Vavrova, J., Sonka, K., Nevsimalova, S. et al.** (2009). Replication of restless legs syndrome loci in three European populations. *J. Med. Genet.* 46, 315-318.
- **Krstic D, Boll W, Noll M.** 2009. Sensory integration regulating male courtship behavior in *Drosophila*. *PLoS One* 4: e4457. doi: 10.1371/journal.pone.0004457.
- **Kurtovic A, Widmer A, Dickson BJ.** 2007. A single class of olfactory neurons mediates behavioural responses to a *Drosophila* sex pheromone. *Nature* 446: 542–546.
- **Kyriacou CP, Hall JC.** 1984. Learning and memory mutations impair acoustic priming of mating behaviour in *Drosophila*. *Nature* 308: 62–65.
- **Lacaille F, Hiroi M, Twele R, Inoshita T, Umemoto D, Maniere G, Marion- Poll F, Ozaki M, Francke W, Cobb M, et al.** 2007. An inhibitory sex pheromone tastes bitter for *Drosophila* males. *PLoS One* 2: e661. doi: 10.1371/journal.pone.000061.
- **L. Tompkins, R. W. Siegel, D. A. Gailey, J. C. Hall,** *Behav. Genet.* 13, 565 (1983).
- **L. Tompkins,** *ibid.* 14, 411 (1984).
- **Manoli DS, Foss M, Vilella A, Taylor BJ, Hall JC, Baker BS.** 2005. Malespecific fruitless specifies the neural substrates of *Drosophila* courtship behaviour. *Nature* 436: 395–400.
- **Markow TA.** 1987. Behavioral and sensory basis of courtship success in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci* 84: 6200–6204.
- **Margulies C, Tully T, Dubnau J.** 2005. Deconstructing memory in *Drosophila*. *Curr Biol* 15: R700–R713. doi: 10.1016/j.cub.2005.08.024.
- **McBride SM, Giuliani G, Choi C, Krause P, Correale D, Watson K, Baker G, Siwicki KK.** 1999. Mushroom body ablation impairs short-term

- memory and long-term memory of courtship conditioning in *Drosophila melanogaster*. *Neuron* 24: 967–977.
- **McGaugh JL.** 2000. Memory—a century of consolidation. *Science* 287: 248-251.
 - **M. Cobb, B. Burnet, K. Connolly,** *Behaviour* 97, 182 (1985).
 - **Mehren JE, Griffith LC.** 2004. Calcium-independent calcium/calmodulindependent protein kinase II in the adult *Drosophila* CNS enhances the training of pheromonal cues. *J Neurosci* 24: 10584–10593.
 - **Mehren JE, Griffith LC.** 2006. Cholinergic neurons mediate CaMKIIdependent enhancement of courtship suppression. *Learn Mem* 13: 686– 689.
 - **Minaki, Y., Nakatani, T., Mizuhara, E., Inoue, T. and Ono, Y.** (2008). Identification of a novel transcriptional corepressor, Corl2, as a cerebellar Purkinje cell-selective marker. *Gene Exp. Pat.* 8, 418-423.
 - **Neckameyer WS.** 1998. Dopamine and mushroom bodies in *Drosophila*: Experience-dependent and -independent aspects of sexual behavior. *Learn Mem* 5: 157–165.
 - **Neckameyer WS, Woodrome S, Holt B, Mayer A.** 2000. Dopamine and senescence in *Drosophila melanogaster*. *Neurobiol Aging* 21: 145–152.
 - **Norma T. Takaesu, Michael J. Stinchfield, Kazumichi Shimizu, Mayu Arase, Janine C. Quijano, Tetsuro Watabe, Kohei Miyazono and Stuart J. Newfeld** 2012 *Drosophila* CORL is required for Smad2-mediated activation of Ecdysone Receptor expression in the mushroom body.
 - **O'Dell KM.** 1994. The inactive mutation leads to abnormal experiencedependent courtship modification in male *Drosophila melanogaster*. *Behav Genet* 24: 381–388.
 - **O'Dell KM, Jamieson D, Goodwin SF, Kaiser K.** 1999. Abnormal courtship conditioning in males mutant for the RI regulatory subunit of *Drosophila* protein kinase A. *J Neurogenet* 13: 105–118.
 - **Orr, H. T.** (2010). Nuclear ataxias. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2, a000786.
 - **Presente A, Boyles RS, Serway CN, de Belle JS, Andres AJ.** 2004. Notch is required for long-term memory in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci* 101: 1764–1768.
 - **Sakai T, Kidokoro Y.** 2002. Overexpression of a CREB repressor isoform enhances the female sexual receptivity in *Drosophila*. *Behav Genet* 32: 413–422.
 - **Sakai T, Tamura T, Kitamoto T, Kidokoro Y.** 2004. A clock gene, period, plays a key role in long-term memory formation in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci* 101: 16058–16063.

- **Sarker, K., Wilson, S. and Bonni, S.** (2005). SnoN is a cell type-specific mediator of transforming growth factor-beta responses. *J. Biol. Chem.* 280, 13037- 13046.
- **Sarker, K. P., Kataoka, H., Chan, A., Netherton, S. J., Pot, I., Huynh, M. A., Feng, X., Bonni, A., Riabowol, K. and Bonni, S.** (2008). ING2 as a novel mediator of transforming growth factor-beta-dependent responses in epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 283, 13269-1327.
- **Savarit F, Sureau G, Cobb M, Ferveur JF.** 1999. Genetic elimination of known pheromones reveals the fundamental chemical bases of mating and isolation in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci* 96: 9015–9020.
- **Scott D, Richmond RC, Carlson DA.** 1988. Pheromones exchanged during mating: A mechanism for mate assessment in *Drosophila*. *Anim Behav* 36: 1164–1173.
- **Siegel RW, Hall JC.** 1979. Conditioned responses in courtship behavior of normal and mutant *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci* 76: 565–578.
- **Siwicki KK, Riccio P, Ladewski L, Marcillac F, Dartevelle L, Cross SA, Ferveur JF.** 2005. The role of cuticular pheromones in courtship conditioning of *Drosophila* males. *Learn Mem* 12: 636–645.
- **Spieth HT.** 1974. Courtship behavior in *Drosophila*. *Annu Rev Entomol* 19: 383–406.
- **Stockinger P, Kvitsiani D, Rotkopf S, Tirian L, Dickson BJ.** 2005. Neural circuitry that governs *Drosophila* male courtship behavior. *Cell* 121: 795–807.
- **Sturtevant, A.H.** (1965). *A history of genetics.* : viii + 165pp
- **Sullivan DT, Grillo SL, Kitos RJ** (1974) Subcellular localization of the first three enzymes of the ommochrome synthetic pathway in *Drosophila melanogaster*. *J Exp Zool* 188: 225–233;
- **Summers KM, Howells AJ, Pyliotis NA** (1982) Biology of eye pigmentation in insects. *Adv Insect Physiol* 16: 119–166;
- **Takaesu, N. T., Herbig, E., Zhitomersky, D., O'Connor, M. B. and Newfeld, S. J.** (2005). DNA-binding domain mutations in SMAD genes yield dominant negative proteins or a neomorphic protein that can activate WG target genes in *Drosophila*. *Development* 132, 4883-4894.
- **Takaesu, N. T., Hyman-Walsh, C., Ye, Y., Wisotzkey, R. G., Stinchfield, M. J., O'connor, M. B., Wotton, D. and Newfeld, S. J.** (2006). dSno facilitates baboon signaling in the *Drosophila* brain by switching the affinity of Medea away from Mad and toward dSmad2. *Genetics* 174, 1299-1313.
- **Tauber E, Eberl DF.** 2003. Acoustic communication in *Drosophila*. *Behav Processes* 64: 197–210.
- **Tompkins L, Hall JC, Hall LM.** 1980. Courtship-stimulating volatile

- compounds from normal and mutant *Drosophila*. *J Insect Physiol* 26: 689–697.
- **Tompkins L, Siegel RW, Gailey DA, Hall JC.** 1983. Conditioned courtship in *Drosophila* and its mediation by association of chemical cues. *Behav Genet* 13: 565–578.
 - **Tully T, Preat T, Boynton SC, Del Vecchio M.** 1994. Genetic dissection of consolidated memory in *Drosophila*. *Cell* 79: 35–47.
 - **Vaias LJ, Napolitano LM, Tompkins L.** 1993. Identification of stimuli that mediate experience-dependent modification of homosexual courtship in *Drosophila melanogaster*. *Behav Genet* 23: 91–97.
 - **van der Goes van Naters W, Carlson JR.** 2007. Receptors and neurons for fly odors in *Drosophila*. *Curr Biol* 17: 606–612.
 - **von Schilcher F.** 1976b. The role of auditory stimuli in the courtship of *Drosophila melanogaster*. *Anim Behav* 24: 18–26.
 - **Wicker C, Jallon J-M.** 1995. Hormonal control of sex pheromone biosynthesis in *Drosophila melanogaster*. *J Insect Physiol* 41: 65–70
 - **Yew JY, Dreisewerd K, Luftmann H, Muthing J, Pohlentz G, Kravitz EA.** 2009. A new male sex pheromone and novel cuticular cues for chemical communication in *Drosophila*. *Curr Biol* 19: 1245–1254
 - **Zawistowski S, Richmond RC.** 1985. Experience-mediated courtship reduction and competition for mates by male *Drosophila melanogaster*. *Behav Genet* 15: 561–569.
 - **Zawistowski S, Richmond RC.** 1986. Inhibition of courtship and mating of *Drosophila melanogaster* by the male-produced lipid, cis-vaccenyl acetate. *J Insect Physiol* 32: 189–192.
 - **Zhang SD, Odenwald WF** (1995) Misexpression of the white (w) gene triggers male-male courtship in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 5525–5529.