



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών
—ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837—

ΕΘΝΙΚΟΝ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟΝ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΝ
ΑΘΗΝΩΝ

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΣΤΗΝ ΙΑΤΡΙΚΗ»

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΥΤΤΑΡΟΥ ΚΑΙ ΒΙΟΦΥΣΙΚΗΣ

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

«Διερεύνηση της ηλεκτροφυσιολογικής απόκρισης του οσφρητικού συστήματος του
δακού σε φερομόνες και πτητικά του ξενιστή»

Ελένη Β. Θάνου,
Βιολόγος

Επιβλέπων Καθηγητής: Δ. Στραβοπόδης,
Αναπληρωτής Καθηγητής Τμήματος Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Αθήνα 2021





ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών
— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 —

ΕΘΝΙΚΟΝ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟΝ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΝ ΑΘΗΝΩΝ

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΣΤΗΝ ΙΑΤΡΙΚΗ»

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΥΤΤΑΡΟΥ ΚΑΙ ΒΙΟΦΥΣΙΚΗΣ

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

«Διερεύνηση της ηλεκτροφυσιολογικής απόκρισης του οσφρητικού συστήματος του
δακού σε φερομόνες και πτητικά του ξενιστή»

Ελένη Β. Θάνου,
Βιολόγος



Επιβλέπων Καθηγητής: Δ. Στραβοπόδης,
Αναπληρωτής Καθηγητής Τμήματος Βιολογίας, ΕΚΠΑ Επιβλέπων

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Δ. Στραβοπόδης - Αναπληρωτής Καθηγητής Τμήματος Βιολογίας, ΕΚΠΑ
Ε. Σκουλάκης- Ερευνητής Α και Διευθυντής, ΕΚΕΒΕ «Αλέξανδρος Φλέμινγκ»
Ι. Παπασιδέρη - Καθηγήτρια Τμήματος Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Αθήνα 2021

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο δάκος της ελιάς, με επιστημονικό όνομα *Bactrocera oleae*, αποτελεί χρόνια τώρα το μεγαλύτερο εχθρό για τα άγρια και καλλιεργούμενα ελαιόδενδρα, με παγκόσμια κατανομή. Η προνύμφη τρέφεται εξ' ολοκλήρου από τον ίδιο τον καρπό της ελιάς με αποτέλεσμα την καταστροφή της παραγωγής και την υποβάθμιση των προϊόντων. Για το σκοπό αυτό, έχουν γίνει πολλές προσπάθειες ελέγχου των πληθυσμών με ποικίλους τρόπους όπως η χρήση παρασιτοκτόνων, η χρήση παγίδων-δολωμάτων, η εισαγωγή θηρευτών του εντόμου και άλλες πιο βιολογικές μεθόδους. Οι μέθοδοι αυτές, εμφανίστηκαν μη ικανοποιητικές σε πολλές περιπτώσεις, γεγονός που καθιστά αναγκαία την εύρεση μιας νέας τεχνικής ελέγχου πιο αποτελεσματικής αλλά και φιλικής προς το περιβάλλον. Τα έντομα *B. oleae*, χρησιμοποιούν για τις βασικές τους λειτουργίες, όπως η αναπαραγωγή και το ζευγάρωμα, το αισθητήριο και το οσφρητικό τους σύστημα. Μέσω αισθητηρίων οργάνων ανιχνεύουν εκτός των άλλων χημικών ουσιών, τις φερομόνες, που εκπέμπονται από το κάθε φύλο για την προσέλκυση του αντίθετου φύλου. Τα αισθητήρια όργανα διαθέτουν πλήθος οσφρητικών υποδοχέων που ανήκουν σε δυο μεγάλες οικογένειες, οι οποίοι κωδικοποιούν τα χημικά ερεθίσματα και στέλνουν την πληροφορία ως ηλεκτρικό σήμα στον εγκέφαλο. Με τη μέθοδο της ηλεκτροαντενογραφίας σε οσφρητικούς υποδοχείς, είναι εφικτό να προσδιοριστεί η ημιποσοτική απόκριση των εντόμων σε ποικίλες τέτοιες οσμές. Στην παρούσα εργασία, ελέγχθηκαν έντομα άγριου και εργαστηριακού πληθυσμού δάκων σχετικά με την απόκριση που είχαν στις κύριες φερομόνες που φαίνεται να συμμετέχουν στο ζευγάρωμα. Επιπλέον, έντομα που είχαν εκτεθεί αρκετή ώρα σε κάποια φερομόνη ελέγχθηκαν με τη μοριακή μέθοδο της Real Time PCR σχετικά με την έκφραση τριών ομόλογων υποδοχέων (317, 330, 520) με τη *Drosophila melanogaster*.

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: Δάκος, Φερομόνες, Ηλεκτροφυσιολογία, Ηλεκτροαντενογράφημα, Όσφρηση

ABSTRACT

The olive fruit fly, scientifically named as *Bactrocera oleae*, has been for years the biggest enemy of wild and cultivated olive trees, with a global distribution. The larva feeds entirely on the olive fruit itself, resulting in the destruction of production and the degradation of products. To this end, many attempts have been made to control populations in a variety of ways such as the use of pesticides, the use of bait traps, the introduction of insect predators and other biological methods. These methods have not been so effective in most cases, which makes it necessary to find a new control technique more effective and environmentally friendly. *B. oleae* insects use for their basic functions, such as reproduction and mating, their senses and olfactory system. Through sensory organs, they detect chemicals, known as sex pheromones, that are emitted by each sex to attract the opposite sex.

The sensory organs have a number of olfactory receptors belonging to two large families, which encode chemical stimuli and send information to the brain in the form of an electrical signal. With the method of electroantennography, it is possible to determine the semi-quantitative response of insects to a variety of such odors. In the present study, wild and laboratory insects were tested for their response to the major pheromones that appear to be involved in mating. In addition, insects that had been exposed to a pheromone for some time were tested with the molecular method of Real Time PCR for the expression of *Drosophila melanogaster* homologous olfactory receptors (317, 330, 520).

KEYWORDS: *Bactrocera oleae*, *pheromones*, *Electrophysiology*, *Electroantennogram*, *EAG*, *Olfaction*

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα εργασία με τίτλο *«Διερεύνηση της ηλεκτροφυσιολογικής απόκρισης του οσφρητικού συστήματος του δακού σε φερομόνες και πτητικά του ζενιστή»*, αποτελεί διπλωματική εργασία που εκπονήθηκε στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών «Εφαρμογές της Βιολογίας στην Ιατρική» του Τμήματος Βιολογίας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών κατά το Ακαδημαϊκό έτος 2019-2021. Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο του Τομέα Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής του Τμήματος Βιολογίας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών σε συνεργασία με το Εργαστήριο Νευροεπιστημών του Ερευνητικό Κέντρο Βιοϊατρικών Επιστημών "Αλέξανδρος Φλέμινγκ. Είναι αποτέλεσμα επιμελούς έρευνας και πολλών πειραμάτων και δε θα μπορούσε να είχε ολοκληρωθεί αν δεν υπήρχε η αμέριστη στήριξη και συμπαράσταση από ανθρώπους, τους οποίους και θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά.

Πρώτο από όλους ευχαριστώ τον Επιβλέποντα της εργασίας μου κύριο Σκουλάκη Ευθύμιο, Ερευνητή Α' και Αναπληρωτή Διευθυντή στο Ινστιτούτο Βασικής Βιοϊατρικής Έρευνας, Ερευνητικό Κέντρο Βιοϊατρικών Επιστημών, «Αλέξανδρος Φλέμινγκ στο για την έμπνευση, την καθοδήγηση και τη στήριξή του καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της εργασίας.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κύριο Στραβοπόδη Δημήτριο, συνεπιβλέποντα της διπλωματικής μου για τις εύστοχες παρατηρήσεις και τις πολύτιμες συμβουλές στο σύνολο της εργασίας μου.

Έπειτα, θα ήθελα να ευχαριστήσω το μεταδιδακτορικό ερευνητή Γαϊτανίδη Αλέξανδρο ο οποίος με κατάρτισε άριστα στο τεχνικό κομμάτι και με καθοδήγησε στο σχεδιασμό και την πραγματοποίηση όλων των πειραμάτων.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω βαθύτατα την οικογένειά μου για την αμέριστη ηθική και ψυχολογική υποστήριξή τους που με ενθάρρυνε να συνεχίσω και να ολοκληρώσω τις σπουδές μου.

Στην οικογένειά μου,

«Δηλώνω ρητά ότι το κείμενο της μεταπτυχιακής διπλωματικής εργασίας δεν αποτελεί προϊόν μερικής ή ολικής αντιγραφής, οι πηγές δε που χρησιμοποιήθηκαν περιορίζονται στις βιβλιογραφικές αναφορές και μόνον»

ΘΑΝΟΥ ΕΛΕΝΗ

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	3
ABSTRACT.....	4
ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	5
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ.....	10
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ.....	11
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ.....	12
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ.....	13
1. ΤΟ ΕΝΤΟΜΟ <i>BACTROCERA OLEAE</i>.....	15
1.1. ΚΥΚΛΟΣ ΖΩΗΣ.....	15
1.2. ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ.....	19
1.3. ΠΑΓΚΟΣΜΙΑ ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ.....	20
2. <i>B. OLEAE</i> ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ.....	21
2.1. ΕΛΙΑ (<i>OLEA EUROPEA</i>).....	21
2.2. ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΤΑΠΟΛΕΜΗΣΗΣ.....	22
2.3. ΠΡΟΚΑΛΟΥΜΕΝΗ ΖΗΜΙΑ.....	27
3. ΟΣΦΡΗΤΙΚΟ ΚΑΙ ΟΡΜΟΝΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ.....	28
3.1. ΟΣΦΡΗΣΗ.....	28
3.1.1. ΟΣΦΡΗΣΗ ΣΤΑ ΕΝΤΟΜΑ.....	29
3.1.1.1. ΟΣΦΡΗΤΙΚΟΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ (OLFACTORY RECEPTORS, ORs).....	29
3.1.1.2. ΙΟΝΤΡΟΠΙΚΟΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΓΛΟΥΤΑΜΙΚΟΥ (IONTROPIC GLUTAMATE RECEPTORS, IGLuRs).....	31
3.1.1.3. ΓΕΥΣΤΙΚΟΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ (GUSTATORY RECEPTORS, GRs).....	32
3.1.1.4. ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ ΟΣΜΩΝ (ODORANT-BINDING PROTEINS, OBPs).....	32
3.1.1.5. ΑΙΣΘΗΤΗΡΙΑ ΤΡΙΧΙΔΙΑ-ΤΡΙΧΟΕΙΔΗ (SENSILLA).....	33
3.1.1.6. ΣΥΝ-ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ ORCO.....	35
3.1.1.1. ΠΡΟΣΑΡΜΟΓΗ ΣΕ ΕΡΕΘΙΣΜΑ.....	36
3.2. ΣΗΜΕΙΟΧΗΜΙΚΑ - ΦΕΡΟΜΟΝΕΣ.....	37
3.2.1. ΣΗΜΕΙΟΧΗΜΙΚΑ.....	37
3.2.2. ΦΕΡΟΜΟΝΕΣ.....	37
3.2.2.1. ΦΕΡΟΜΟΝΕΣ ΣΤΟ ΕΙΔΟΣ <i>B. OLEAE</i>	38
3.2.3. ΠΤΗΤΙΚΑ ΤΟΥ ΞΕΝΙΣΤΗ.....	40
4. ΗΛΕΚΤΡΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ.....	41
5. ΣΚΟΠΟΣ.....	42

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	44
6. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	44
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	52
7. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ ΗΛΕΚΤΡΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ	52
7.1. ΒΕΛΤΙΣΤΕΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ ΟΣΜΩΝ	52
7.2. ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΠΑΡΘΕΝΩΝ ΚΑΙ ΖΕΥΓΑΡΩΜΕΝΩΝ ΕΝΤΟΜΩΝ.....	61
8. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΟΣΦΡΗΤΙΚΟΥ ΠΡΟΦΙΛ ΜΕ REAL TIME PCR.....	71
8.1. ΕΚΦΡΑΣΗ ΟΣΦΡΗΤΙΚΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ 317, 330, 520 ΣΤΗ SPIROKETAL.....	71
8.2. ΕΚΦΡΑΣΗ ΟΣΦΡΗΤΙΚΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ 317, 330, 520 ΣΤΗ MUSCALURE.....	72
8.3. ΕΚΦΡΑΣΗ ΟΣΦΡΗΤΙΚΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ 317, 330, 520 ΣΤΟ ΜΑΡΤΥΡΑ ΙΡΜ.....	73
9. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	74
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	76

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ

(EAG) : Electroantennogram

(GPCRs) : G Protein-Coupled Receptors

(GRs): Gustatory Receptors

(IRs) : Ionotropic Receptors

(OBPs) : Odorant binding Proteins

(ORco): OR coreceptor

(ORN) : Olfactory Receptor Neuron

(ORs) : Olfactory Receptors

(OSNs) : Olfactory Sensory Neurons

(PCR) : Polymerase Chain Reaction

(SIT) : Sterile Insect Technique

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

ΕΙΚΟΝΑ 1. ΈΝΤΟΜΟ Β. ΟΛΕΑΕ.	15
ΕΙΚΟΝΑ 2. ΛΑΒΥΡΙΝΘΟΣ ΠΟΥ ΣΧΗΜΑΤΙΖΕΤΑΙ ΑΠΟ ΤΗ ΛΑΡΒΑ.	17
ΕΙΚΟΝΑ 3. ΠΡΟΝΥΜΦΕΣ ΠΟΥ ΕΧΟΥΝ ΠΕΣΕΙ ΣΤΟ ΕΛΑΦΟΣ ΑΠΟ ΚΑΡΠΟΥΣ ΕΛΙΑΣ. (ΠΡΟΣΩΠΙΚΟ ΑΡΧΕΙΟ) ..	17
ΕΙΚΟΝΑ 4. ΈΝΤΟΜΟ ΠΑΝΩ ΣΕ ΚΑΡΠΟ 17	17
ΕΙΚΟΝΑ 5. ΚΥΚΛΟΣ ΖΩΗΣ ΕΝΤΟΜΟΥ Β. ΟΛΕΑΕ.	18
ΕΙΚΟΝΑ 6. ΕΝΗΛΙΚΟ ΘΗΛΥΚΟ Β. ΟΛΕΑΕ ΣΤΟ ΟΠΟΙΟ ΔΙΑΚΡΙΝΕΤΑΙ Ο ΩΛΠΟΘΕΤΗΣ.	19
ΕΙΚΟΝΑ 7. ΠΑΓΚΟΣΜΙΑ ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ Β. ΟΛΕΑΕ.	20
ΕΙΚΟΝΑ 8. ΨΕΚΑΣΜΟΣ ΣΕ ΕΛΑΙΩΝΑ.	23
ΕΙΚΟΝΑ 9. ΠΑΓΙΔΑ ΜCΡΗΑΙΛ 25	25
ΕΙΚΟΝΑ 10. ΚΟΛΛΩΔΗΣ ΠΑΓΙΔΑ.	26
ΕΙΚΟΝΑ 11. ΔΟΜΗ ORs. (WICHER & MIAZZI, 2021A).....	30
ΕΙΚΟΝΑ 12. ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΟΙ ΣΥΝΔΕΤΕΣ ΚΑΙ ΤΡΟΠΟΙ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ OR ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ, ΠΟΥ ΠΕΡΙΛΑΜΒΑΝΟΥΝ ΕΥΡΕΩΣ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΕΝΟΥΣ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΟΣΜΗΣ (Α) ΣΕ ΑΝΤΙΘΕΣΗ ΜΕ ΕΞΕΙΔΙΚΕΥΜΕΝΑ OR ΠΟΥ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΟΥΝΤΑΙ ΣΕ ΑΠΟΚΛΕΙΣΤΙΚΕΣ ΝΕΥΡΩΝΙΚΕΣ ΟΔΟΥΣ (B) (ANDERSSON ET AL., 2015).....	30
ΕΙΚΟΝΑ 13. ΔΟΜΗ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ IR. (WICHER & MIAZZI, 2021A).....	31
ΕΙΚΟΝΑ 14. ΔΟΜΗ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ GR (AGNIHOTRI ET AL., 2016).....	32
ΕΙΚΟΝΑ 15. ΕΝΔΕΙΚΤΙΚΟ ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ ΟΣΦΡΗΤΙΚΗΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΕΠΑΦΗ ΜΕ ΚΑΠΟΙΑ ΟΣΜΗ. ΟΙ OBPs ΚΑΤΕΥΘΕΙΑΝ ΕΝΩΝΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΗΝ ΟΥΣΙΑ ΚΑΙ ΠΕΡΝΟΥΝ ΑΠΟ ΤΟΥΣ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΩΣΠΟΥ ΤΟ ΣΗΜΑ ΦΤΑΝΕΙ ΣΤΟ ΚΕΝΤΡΙΚΟ ΝΕΥΡΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ (VENTHUR & ZHOU, 2018).....	33
ΕΙΚΟΝΑ 16. ΟΣΦΡΗΣΗ ΣΤΑ ΕΝΤΟΜΑ: ΓΝΑΘΟΙ ΚΑΙ ΚΕΡΑΙΕΣ.....	34
ΕΙΚΟΝΑ 17. ΟΣΦΡΗΣΗ ΣΤΑ ΕΝΤΟΜΑ: ΑΙΣΘΗΤΗΡΙΑ ΟΡΓΑΝΑ ΚΑΙ ΤΡΙΧΟΕΙΔΗ (KAUPP, 2010).....	34
ΕΙΚΟΝΑ 18. ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ PLOTTER ΠΟΥ ΔΕΙΧΝΕΙ ΤΗ ΔΕΥΤΕΡΟΤΑΓΗ ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ORCO ΣΤΑ ΕΝΤΟΜΑ Β. ΟΛΕΑΕ. Η ΔΙΑΜΕΜΒΡΑΝΙΚΗ ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΒO-ORCO ΠΡΟΒΛΕΦΘΗΚΕ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΩΝΤΑΣ ΤΜΗΜΜ. ΟΙ ΔΙΑΜΕΜΒΡΑΝΙΚΕΣ ΠΕΡΙΟΧΕΣ ΥΠΟΔΕΙΚΝΥΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΟΥΣ ΕΓΧΡΩΜΟΥΣ ΑΡΙΘΜΟΥΣ 1-7.	35
ΕΙΚΟΝΑ 19. ΧΗΜΙΚΗ ΔΟΜΗ SPIROKETAL.	39
ΕΙΚΟΝΑ 20. ΧΗΜΙΚΗ ΔΟΜΗ MUSCALURE 39	39
ΕΙΚΟΝΑ 21. ΚΟΥΤΙ ΦΥΛΑΞΗΣ PLEXIGLASS.	44
ΕΙΚΟΝΑ 22. ΕΙΚΟΝΕΣ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΕΝΤΟΜΩΝ ΣΤΟ ΑΚΡΟ ΠΛΑΣΤΙΚΟΥ ΤΙΠ ΚΑΤΩ ΑΠΟ ΤΟ ΣΤΕΡΕΟΣΚΟΠΙΟ.	46
ΕΙΚΟΝΑ 23. ΕΙΚΟΝΑ ΕΝΤΟΜΟΥ ΤΟΠΟΘΕΤΗΜΕΝΟ ΣΕ ΚΑΛΥΠΤΡΙΔΑ ΜΕ ΤΟ ΓΥΑΛΑΚΙ ΠΟΥ ΣΥΓΚΡΑΤΕΙ ΤΗΝ ΚΕΡΑΙΑ (ΠΗΓΗ: ODORANT RESPONSE OF INDIVIDUAL SENSILLA ON THE DROSOPHILA ANTENNA PETER CLYNE 1, ALAN GRANT 2, ROBERT O'CONNELL 2, AND JOHN R. CARLSON 1. 46	46
ΕΙΚΟΝΑ 24. ΒΑΣΙΚΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ (SETUP) ΗΛΕΚΤΡΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΕ ΓΙΑ ΤΙΣ ΚΑΤΑΓΡΑΦΕΣ: ΑΝΤΙΚΡΑΔΑΣΜΙΚΟ ΤΡΑΠΕΖΙ, ΚΛΩΒΟΣ FARADAY, ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ, ΜΙΚΡΟΧΕΙΡΙΣΤΕΣ, ΤΜΗΜΑ ΑΝΤΛΙΑΣ.	47
ΕΙΚΟΝΑ 25. ΑΝΤΛΙΑ (STIMULER) STIMULUS CONTROLLER CS-55, SYNTech.....	47
ΕΙΚΟΝΑ 26. ΕΝΔΕΙΚΤΙΚΗ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΥ ΓΙΑ ΠΕΙΡΑΜΑ ΗΛΕΚΤΡΟΑΝΤΕΝΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ.	48
ΕΙΚΟΝΑ 27. ΣΧΗΜΑΤΙΚΗ ΚΑΜΠΥΛΗ EAG ΣΤΗΝ ΟΠΟΙΑ ΔΙΑΚΡΙΝΕΤΑΙ ΤΟ ΠΛΑΤΟΣ ΑΠΟΚΡΙΣΗΣ-AMPLITUDE.	49

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 1. ΜΕΣΕΣ ΑΠΟΚΡΙΣΕΙΣ ΓΙΑ ΚΑΘΕ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ SPIROKETAL ΣΕ ΘΗΛΥΚΑ ΕΝΤΟΜΑ.....	53
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 2. ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΟ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΑΠΟΚΡΙΣΕΩΝ ΟΛΩΝ ΤΩΝ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΩΝ.....	54
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 3. ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΟ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΠΛΑΤΟΥΣ ΑΠΟΚΡΙΣΗΣ ΓΙΑ ΚΑΘΕ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ.....	54
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 4. ΜΕΣΕΣ ΑΠΟΚΡΙΣΕΙΣ ΓΙΑ ΚΑΘΕ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ SPIROKETAL ΣΕ ΑΡΣΕΝΙΚΑ ΕΝΤΟΜΑ.....	55
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 5.ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΟ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΑΠΟΚΡΙΣΕΩΝ ΟΛΩΝ ΤΩΝ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΩΝ.....	56
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 6. ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΟ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΠΛΑΤΟΥΣ ΑΠΟΚΡΙΣΗΣ ΓΙΑ ΚΑΘΕ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ.....	56
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 7.ΜΕΣΕΣ ΑΠΟΚΡΙΣΕΙΣ ΓΙΑ ΚΑΘΕ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ MUSCALURE ΣΕ ΘΗΛΥΚΑ ΕΝΤΟΜΑ.....	57
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 8.ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΟ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΑΠΟΚΡΙΣΕΩΝ ΟΛΩΝ ΤΩΝ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΩΝ.....	58
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 9.ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΟ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΠΛΑΤΟΥΣ ΑΠΟΚΡΙΣΗΣ ΓΙΑ ΚΑΘΕ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ.....	58
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 10.ΜΕΣΕΣ ΑΠΟΚΡΙΣΕΙΣ ΓΙΑ ΚΑΘΕ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ MUSCALURE ΣΕ ΑΡΣΕΝΙΚΑ ΕΝΤΟΜΑ.....	59
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 11.ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΟ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΑΠΟΚΡΙΣΕΩΝ ΟΛΩΝ ΤΩΝ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΩΝ.....	60
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 12.ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΟ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΠΛΑΤΟΥΣ ΑΠΟΚΡΙΣΗΣ ΓΙΑ ΚΑΘΕ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ.....	60
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 13.ΜΕΣΕΣ ΑΠΟΚΡΙΣΕΙΣ ΞΕΧΩΡΙΣΤΑ ΓΙΑ ΠΑΡΘΕΝΑ ΚΑΙ ΖΕΥΓΑΡΩΜΕΝΑ ΘΗΛΥΚΑ ΕΝΤΟΜΑ ΣΕ SPIROKETAL.....	61
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 14.ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΟ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΑΠΟΚΡΙΣΗΣ ΠΑΡΘΕΝΩΝ-ΖΕΥΓΑΡΩΜΕΝΩΝ ΘΗΛΥΚΩΝ ΣΕ SPIROKETAL.....	62
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 15.ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΠΛΑΤΟΥΣ ΑΠΟΚΡΙΣΕΩΝ ΠΑΡΘΕΝΩΝ ΖΕΥΓΑΡΩΜΕΝΩΝ ΘΗΛΥΚΩΝ ΣΕ SPIROKETAL.....	62
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 16.ΜΕΣΕΣ ΑΠΟΚΡΙΣΕΙΣ ΞΕΧΩΡΙΣΤΑ ΓΙΑ ΠΑΡΘΕΝΑ ΚΑΙ ΖΕΥΓΑΡΩΜΕΝΑ ΑΡΣΕΝΙΚΑ ΕΝΤΟΜΑ ΣΕ SPIROKETAL.....	63
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 17..ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΟ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΑΠΟΚΡΙΣΗΣ ΠΑΡΘΕΝΩΝ-ΖΕΥΓΑΡΩΜΕΝΩΝ ΑΡΣΕΝΙΚΩΝ ΣΕ SPIROKETAL.....	64
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 18.ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΠΛΑΤΟΥΣ ΑΠΟΚΡΙΣΕΩΝ ΠΑΡΘΕΝΩΝ ΖΕΥΓΑΡΩΜΕΝΩΝ ΑΡΣΕΝΙΚΩΝ ΣΕ SPIROKETAL.....	64
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 19.ΜΕΣΕΣ ΑΠΟΚΡΙΣΕΙΣ ΞΕΧΩΡΙΣΤΑ ΓΙΑ ΠΑΡΘΕΝΑ ΚΑΙ ΖΕΥΓΑΡΩΜΕΝΑ ΘΗΛΥΚΑ ΕΝΤΟΜΑ ΣΕ MUSCALURE.....	65
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 20.ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΟ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΑΠΟΚΡΙΣΗΣ ΠΑΡΘΕΝΩΝ-ΖΕΥΓΑΡΩΜΕΝΩΝ ΘΗΛΥΚΩΝ ΣΕ MUSCALURE.....	66
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 21.ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΠΛΑΤΟΥΣ ΑΠΟΚΡΙΣΕΩΝ ΠΑΡΘΕΝΩΝ ΖΕΥΓΑΡΩΜΕΝΩΝ ΘΗΛΥΚΩΝ ΣΕ MUSCALURE.....	66
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 22.ΜΕΣΕΣ ΑΠΟΚΡΙΣΕΙΣ ΞΕΧΩΡΙΣΤΑ ΓΙΑ ΠΑΡΘΕΝΑ ΚΑΙ ΖΕΥΓΑΡΩΜΕΝΑ ΑΡΣΕΝΙΚΑ ΕΝΤΟΜΑ ΣΕ MUSCALURE.....	67
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 23.ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΟ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΑΠΟΚΡΙΣΗΣ ΠΑΡΘΕΝΩΝ-ΖΕΥΓΑΡΩΜΕΝΩΝ ΑΡΣΕΝΙΚΩΝ ΣΕ MUSCALURE.....	68
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 24.ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΠΛΑΤΟΥΣ ΑΠΟΚΡΙΣΕΩΝ ΠΑΡΘΕΝΩΝ ΖΕΥΓΑΡΩΜΕΝΩΝ ΑΡΣΕΝΙΚΩΝ ΣΕ MUSCALURE.....	68
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 25. ΟΛΙΚΗ ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΩΝ ΜΕΣΩΝ ΠΛΑΤΩΝ ΑΠΟΚΡΙΣΗΣ ΣΤΙΣ ΔΥΟ ΦΕΡΟΜΟΝΕΣ ΚΑΙ ΑΠΟ ΤΑ ΔΥΟ ΦΥΛΑ.....	69
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 26. ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΟ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΑΠΟΚΡΙΣΗΣ ΤΩΝ ΔΥΟ ΕΙΔΩΝ ΣΤΗ SPIROKETAL.....	70
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 27.ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΟ ΓΡΑΦΗΜΑ ΓΙΑ ΤΟΥΣ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ 317, 330 ΚΑΙ 520 ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΕΚΘΕΣΗ ΣΤΗ SPIROKETAL.....	71
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 28.ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΟ ΓΡΑΦΗΜΑ ΓΙΑ ΤΟΥΣ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ 317, 330 ΚΑΙ 520 ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΕΚΘΕΣΗ ΣΤΗ MUSCALURE.....	72
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 29.ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΟ ΓΡΑΦΗΜΑ ΓΙΑ ΤΟΥΣ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ 317, 330 ΚΑΙ 520 ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΕΚΘΕΣΗ ΣΕ IPM.....	73

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

ΠΙΝΑΚΑΣ 1. T-TEST ΓΙΑ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ SPIROKETAL ΣΕ ΘΗΛΥΚΑ	54
ΠΙΝΑΚΑΣ 2. T-TEST ΓΙΑ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ SPIROKETAL ΣΕ ΑΡΣΕΝΙΚΑ	56
ΠΙΝΑΚΑΣ 3. T-TEST ΓΙΑ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ MUSCALURE ΣΕ ΘΗΛΥΚΑ.....	58
ΠΙΝΑΚΑΣ 4. T-TEST ΓΙΑ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ MUSCALURE ΣΕ ΑΡΣΕΝΙΚΑ.	60

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. ΤΟ ΕΝΤΟΜΟ *Bactrocera Oleae*

1.1.ΚΥΚΛΟΣ ΖΩΗΣ

Η «μύγα» της ελιάς (olive fruit fly), γνωστός ως δάκος της ελιάς, είναι ένα ευρέως διαδεδομένο μονοφαγές έντομο που τρέφεται αποκλειστικά και μόνο με άγριες και καλλιεργούμενες ελιές κυρίως του γένους *Olea* spp (Registry-Migration.Gbif.Org, 2021). Το είδος με την επιστημονική ονομασία *Bactrocera Oleae* (Rossi 1970) αποτελεί την κυριότερη απειλή των ελαιοδένδρων παγκοσμίως. Ο δάκος ανήκει στη μεγάλη οικογένεια Tephritidae και η επιστημονική κατάταξή του φαίνεται παρακάτω (Rossi, R., Carpita, A., Vita, G, 1978b):

Φύλο: Arthropoda

Υποφύλο: Uniramia

Κλάση: Insecta

Τάξη: Diptera

Οικογένεια: Tephritidae

Υποοικογένεια: Dacinae

Φυλή(Tribe): Dacini

Γένος: *Bactrocera*

Είδος: *Bactrocera oleae*



Εικόνα 1. Έντομο *B. oleae*.

(Πηγή: <https://www.kalliergeia.com/dakos-tis-elias-bactrocera-oleae/>)

Ο κύκλος ζωής του εντόμου ξεκινά όταν το ενήλικο θηλυκό έντομο εναποθέτει τα αυγά του εντός του καρπού της ελιάς όπου και προστατεύονται από τους περισσότερους φυσικούς «εχθρούς» και θηρευτές. Ο ωοαποθέτης σχίζει την επιδερμίδα της ελιάς, και επομένως πάνω στους προσβεβλημένους καρπούς σχηματίζονται μικροσκοπικές καφέ τρύπες οι οποίες διακρίνονται με γυμνό οφθαλμό. Για ωοθεσία, προτιμώνται οι ακέραιοι αναπτυσσόμενοι καρποί που δεν έχουν τραυματιστεί. Συνήθως, κάθε θηλυκό εναποθέτει ένα αυγό ανά καρπό ελιάς και μπορεί να εναποθέσει από 12 έως 19 αυγά την ημέρα και περίπου 250 με 300 αυγά καθόλη τη διάρκεια της ζωής τους όταν βρίσκονται στη φύση. Σε συνθήκες εργαστηρίου, κάθε θηλυκό άτομο μπορεί να γεννήσει από 10 έως 40 αυγά την ημέρα και από 200 έως 500 αυγά μέχρι να πεθάνει. Το εύρος θερμοκρασιών για την επιτυχή εκκόλαψη των αυγών κυμαίνεται από περίπου 10 έως 32 °C. Η εκκόλαψη μπορεί να διαρκέσει από μία ημέρα υπό βέλτιστες συνθήκες έως και τέσσερις μέρες στις μη βέλτιστες. Τα αυγά που εναποτίθενται έχουν κρεμώδες άσπρο χρώμα και περίπου 0,74 mm μήκος και 0,21mm πλάτος (Genc, 2014) μέχρι να εκκολαφθούν.

Από την εκκόλαψη θα προκύψει η λάρβα (larvae) που είναι το επόμενο αναπτυξιακό στάδιο στον κύκλο ζωής και περιλαμβάνει τρία υποστάδια L1, L2, L3. Οι λάρβες αναδύονται από το πίσω μέρος του αυγού, είναι μικρές με μήκος περίπου 5 mm και επιμήκεις με λευκό χρώμα και ομοιάζουν με μικρά σκουλήκια. Κινούνται στην καρδιά του καρπού από τον οποίο τρέφονται, δημιουργώντας λαβύρινθους. Οι θερμοκρασίες που επιτρέπουν την ανάπτυξη της λάρβας, και έχουν χαμηλά επίπεδα θνησιμότητας, κυμαίνονται από 11 έως 30°C. Το στάδιο της λάρβας ολοκληρώνεται εντός το πολύ είκοσι ημερών ανάλογα με τις περιβαλλοντικές συνθήκες που επικρατούν.

Το στάδιο αυτό ακολουθεί ο σχηματισμός της προνύμφης (pupa) ο οποίος μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε εντός του καρπού είτε μέσα στο έδαφος, στο χώμα. Αυτό εξαρτάται από την περίοδο και την εποχή του χρόνου καθώς και τον αριθμό των γενεών. Κατά τους χειμερινούς μήνες, για παράδειγμα, λόγω των χαμηλών θερμοκρασιών οι συνθήκες στο χώμα δεν είναι βιώσιμες για την ανάπτυξη της προνύμφης. Αντίθετα, τους καλοκαιρινούς μήνες ευνοείται η ανάπτυξη εντός των καρπών. Επιπλέον, κατά τους τελευταίους μήνες του χρόνου, υπάρχει μεγαλύτερος αριθμός γενεών και άρα μεγαλύτερος συνωστισμός πληθυσμών στα δέντρα που αναγκάζει τις νέες γενιές να αναπτυχθούν στο έδαφος. Υπό βέλτιστες συνθήκες, η ανάπτυξη της προνύμφης διαρκεί περίπου εννιά ημέρες. Το χρώμα της προνύμφης

εξελίσσεται από ανοιχτό μπεζ, σε ελαφρώς κίτρινο και καταλήγει σε σκούρο κίτρινο όταν η προνύμφη είναι στο τελευταίο υποστάδιο.



Εικόνα 2. Λαβύρινθος που σχηματίζεται από τη λάρβα.

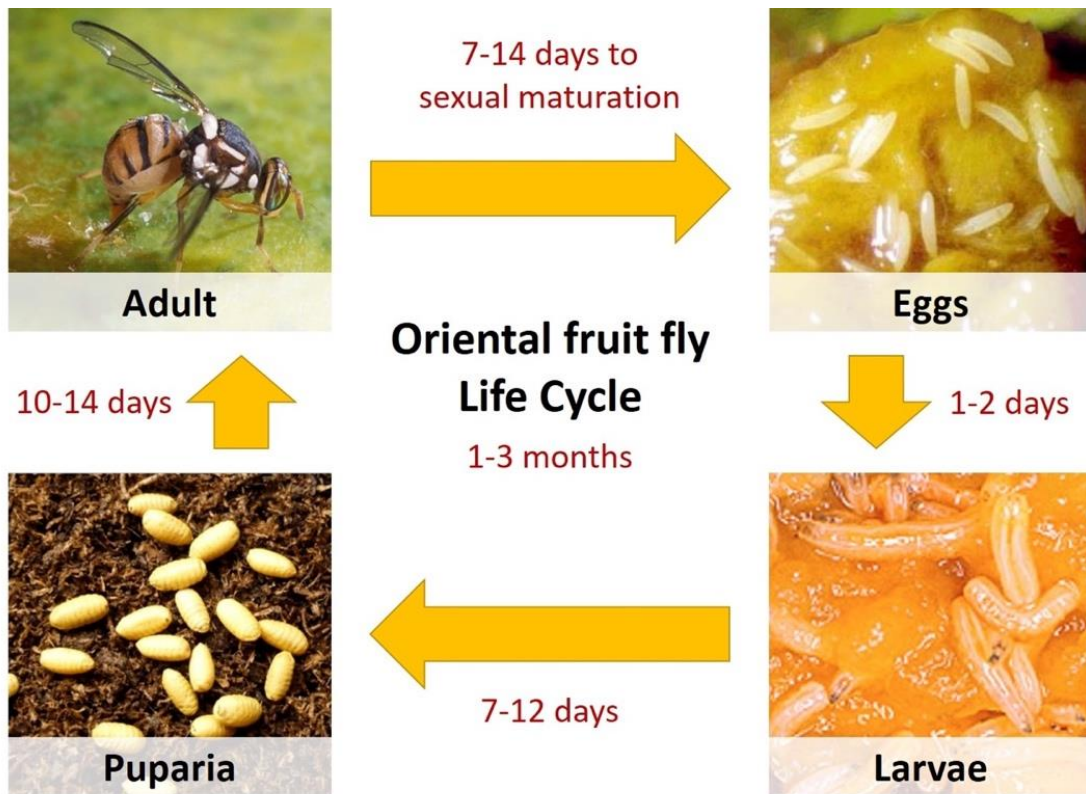


Εικόνα 3. Προνύμφες που έχουν πέσει στο έδαφος από καρπούς ελιάς. (Προσωπικό Αρχείο)



Εικόνα 4. Έντομο πάνω σε καρπό
(Πηγή: <https://www.ipmimages.org/browse/subthumb.cfm?sub=7955>)

Μετά την προνύμφη, ακολουθεί το τελευταίο αναπτυξιακό στάδιο του κύκλου ζωής, αυτό του ενήλικου ατόμου που αναδύεται από το «κουκούλι» της προνύμφης. Τα ενήλικα άτομα δεν είναι αναπαραγωγικά ώριμα όταν γεννιούνται. Στη φύση η ωρίμανση διαρκεί περίπου επτά με δέκα ημέρες. Όταν ωριμάσουν το αναπαραγωγικό σύστημα των εντόμων, είναι έτοιμα να ζευγαρώσουν και να αναπαραχθούν. Έρευνες έδειξαν ότι τα θηλυκά έντομα είναι μη δεκτικά σε άλλα αρσενικά μετά το ζευγάρισμα, ενώ τα αρσενικά είναι πολυγαμικά ζευγαρώνοντας με άλλα διαθέσιμα και δεκτικά θηλυκά. Τέλος, σε αντίθεση με τα υπόλοιπα στάδια, το ενήλικο άτομο τρέφεται και με άλλα πράγματα εκτός από το εσωτερικό του καρπού.



Εικόνα 5. Κύκλος ζωής εντόμου *B. oleae*.

1.2. ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ

Η περιγραφή των ενηλίκων που παρουσιάζεται παρακάτω προέρχεται από περιγραφή που δημιουργήθηκε από τους White και Hancock (White & Hancock, 2004).

Ο ενήλικος δάκος αποτελεί ένα μικρό έντομο μήκους 4-5 χιλιοστών με κιτρινοκόκκινη κεφαλή και σύνθετους ιριδίζοντες οφθαλμούς. Επίσης, στο κεφάλι βρίσκονται δύο κεραίες και οι γναθικές προσακτρίδες.

Ο θώρακας έχει καστανοκόκκινο χρώμα και η κοιλιά είναι εξίσου καστανού χρώματος με κόκκινες κηλίδες. Τα φτερά του έχουν μήκος περίπου 4-5 mm και είναι διάφανα και το χαρακτηριστικό τους είναι η ύπαρξη ενός μαύρου στίγματος-κηλίδας στην άκρη κάθε πτέρυγας του.

Επιπλέον, τα θηλυκά έντομα, διαθέτουν στην άκρη του σκελετού τους ένα σκουρόχρωμο κωνικό εξάρτημα, τον ωαποθέτη.



Εικόνα 6. Ενήλικο θηλυκό *B. Oleae* στο οποίο διακρίνεται ο ωαποθέτης.
(Πηγή: <https://www.insectimages.org/browse/detail.cfm?imgnum=5459380>).

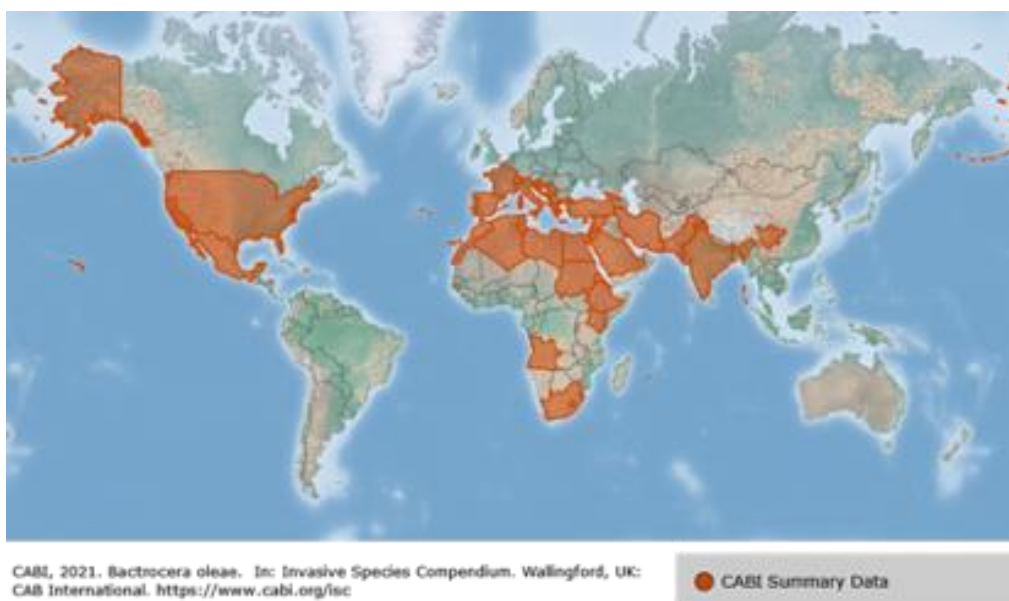
1.3.ΠΑΓΚΟΣΜΙΑ ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ

Το είδος *B.oleae* έχει παγκόσμια κατανομή σε όλες τις περιοχές ύπαρξης και καλλιέργειας ελαιοδένδρων με αισθητή παρουσία στις χώρες γύρω από τη Μεσόγειο. Η κατανομή όπως και η δυναμική των πληθυσμών επηρεάζονται από τη γεωγραφική περιοχή, τις κλιματικές και περιβαλλοντικές συνθήκες και την ποιότητα και μορφολογία των καρπών. Στην Ευρώπη, σημειώνεται ευρεία κατανομή στην Ελλάδα και την Κρήτη, την Κύπρο, την Ιταλία, τη Σικελία, τη Γαλλία, τη Σουηδία και κάποιες Βαλκανικές περιοχές όπως η Κροατία και η Σλοβενία(Nardi et al., 2005).

Η Ασία, επηρεάζεται περισσότερο στο πιο ανατολικό τμήμα της σε χώρες όπως η Ιορδανία, το Ισραήλ, ο Λίβανος και η Συρία. Επιπλέον, υπάρχει πληθυσμός σε Ινδία και Κίνα και ένα ενδημικό είδος *B. oleae* στο Πακιστάν(Bon et al., 2016).

Στην Αφρικανική ήπειρο εντοπίζεται έντονα η παρουσία του είδους στις βορειότερες περιοχές που είναι κοντά στη Μεσόγειο Θάλασσα, όπως η Αίγυπτος, η Αλγερία, το Μαρόκο και η Τυνησία. Μικρότερη παρουσία σημειώνεται στην Κεντρική και νότια Αφρική(Nardi et al., 2005).

Στην Αμερική, το είδος *B. oleae* εμφανίστηκε για πρώτη φορά στην Καλιφόρνια και από εκεί διαδόθηκε σε όλες σχεδόν τις πολιτείες μέχρι το Μεξικό. Την τελευταία δεκαετία έχει γίνει λόγος για ύπαρξη πληθυσμού και στη Νότια Αμερική, στο Περού, τη Χιλή και την Αργεντινή.



Εικόνα 7. Παγκόσμια κατανομή πληθυσμών *B.oleae*.

2. *B. oleae* ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ

2.1.ΕΛΙΑ (*Olea europaea*)

Η ελιά (*Olea europaea*, οικογένεια Oleaceae) αποτελεί το μοναδικό ξενιστή για το παρασιτικό έντομο *B. Oleae*. Είναι ένα πράσινο ξεροφυτικό δέντρο, οι καρποί του οποίου διατίθενται στο εμπόριο αλλά παράγουν και λάδι. Η ελιά φαίνεται να καλλιεργείται από τους προϊστορικούς χρόνους στην περιοχή της ανατολικής Μεσογείου και έχει συνδεθεί στενά με θρησκευτικές, κοινωνικές, πολιτισμικές, φαρμακευτικές και διατροφικές ανάγκες. Σήμερα, η καλλιέργεια της ελιάς έχει αποκτήσει καθεστώς εμπορικής καλλιέργειας σε κάθε χώρα με μεσογειακό κλίμα. Η Ισπανία, η Ιταλία και η Ελλάδα είναι οι κορυφαίοι παραγωγοί ελιών. Άλλες σημαντικές χώρες παραγωγής ελιάς είναι η Τουρκία, η Τυνησία, η Πορτογαλία, η Γαλλία, το Μαρόκο, η Αλγερία, η Συρία, η Γιουγκοσλαβία, η Ιορδανία, οι ΗΠΑ, η Κύπρος, το Ισραήλ, η Αργεντινή και η Λιβύη(Ponti et al., 2009).

Υπάρχουν πάνω από 800 εκατομμύρια ελαιόδεντρα στον κόσμο με την ετήσια παραγωγή καρπών ελιάς να είναι περίπου 13,7 εκατομμύρια τόνοι. Περίπου 720.000 τόνοι της παραγωγής καταναλώνονται ως ελιές, ενώ περίπου 8,6 εκατομμύρια τόνοι ελιών χρησιμοποιούνται για την παραγωγή λαδιού. Από αυτούς, παράγονται περίπου 2,3 εκατομμύρια τόνοι ελαιόλαδου παγκοσμίως.

2.2.ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΤΑΠΟΛΕΜΗΣΗΣ

Η καταπολέμηση του εντόμου μέχρι σήμερα, δε γίνεται με έναν τρόπο αποκλειστικά αλλά αποτελεί συνδυασμό αρκετών μεθόδων. Ενδεικτικά, αναφέρονται παρακάτω οι κυριότεροι τρόποι που χρησιμοποιούνται ή έχουν χρησιμοποιηθεί στο πεδίο.

- Βιολογικός Έλεγχος

Ο βιολογικός έλεγχος επιχειρήθηκε από τον P. Silvestri, ο οποίος εισήγαγε φυσικούς εχθρούς των εντόμων *B. oleae* στην Ιταλία από τη Νότια Αφρική το 1911 και την Ερυθραία το 1914. Τα έντομα αυτά, ανταγωνίζονται τους πληθυσμούς των δάκων όσον αφορά τους ξενιστές. Αυτό το έργο συνεχίστηκε μέχρι το τέλος της δεκαετίας του 1960 στην Ιταλία, και αργότερα στη Γαλλία, την Ελλάδα και την Ισπανία, οπότε και καθιερώθηκε. Περαιτέρω προσπάθειες εισαγωγής παραγόντων βιολογικού ελέγχου έγιναν στην Ελλάδα κατά τη διάρκεια ενός προγράμματος FAO τη δεκαετία του 1970. Ωστόσο, υπήρξαν και αποτυχημένες προσπάθειες σε πολλές περιοχές όπως η Αφρική και τα αποτελέσματα δεν ήταν ικανοποιητικά. Μια πιθανή εξήγηση για την κακή αυτή απόδοση αφορά το σχετικό μέγεθος των εμπορικών καρπών ελιάς σε σύγκριση με τους καρπούς της άγριας ελιάς. Τα άγρια φρούτα είναι μικρά, συνήθως 1 εκατοστό σε διάμετρο, ενώ οι καλλιεργούμενες ποικιλίες μπορεί να είναι παχύτερες και σημαντικά μεγαλύτερες, συνήθως 2-3 εκατοστά σε διάμετρο. Οι μεγάλες καλλιεργούμενες ελιές έχουν πάχος που υπερβαίνει κατά πολύ το μέγιστο μήκος ωοθήτη των θηλυκών (Pontikakos et al., 2012). Για το λόγο αυτό, η ικανότητα επιτυχούς ωοθεσίας περιορίζεται στους άγριους καρπούς. Τα είδη που παρασιτούν τα *B. oleae* σε φυσικά περιβάλλοντα, αν και είναι προφανώς καλά προσαρμοσμένα στην επίθεση σε μικρές άγριες ελιές, ενδέχεται να δυσκολεύονται να φτάσουν κοντά στην καρδιά του καρπού σε μεγαλύτερες καλλιεργούμενες ελιές.

- Χημικός έλεγχος

Αν και μερικές φορές χρησιμοποιούνται ψεκασμοί για κάλυψη ολόκληρων καλλιεργειών, η χρήση δολωματικών ψεκασμών είναι και πιο οικονομική και πιο περιβαλλοντικά αποδεκτή. Ένα «σπρέι δολώματος» αποτελείται από ένα κατάλληλο εντομοκτόνο αναμειγμένο με ένα δόλωμα πρωτεΐνης. Για ψεκασμό, δεν εφαρμόζονται περισσότερα από 300 ml διαλύματος ψεκασμού ανά δέντρο στο

φύλλωμα της ελιάς. Αντίθετα, οι ψεκασμοί κάλυψης αποτελούνται από εντομοκτόνο σε δόση δέκα φορές μικρότερη από εκείνη της συνιστώμενης δόσης για ψεκασμούς δολωμάτων.

Δολωματικοί ψεκασμοί που αποτελούνται από 2% δόλωμα (πρωτεΐνη) αναμειγμένα με καταχωρημένα εντομοκτόνα έχουν χρησιμοποιηθεί για πολλά χρόνια κατά του *B. Oleae* (Τζανακάκης & Κατσόγιαννος, 2003). Η πρωτεΐνη που χρησιμοποιείται ευρέως υδρολύεται, αλλά μερικές υδρολύονται με οξέα και είναι αρκετά φυτοτοξικές. Οι ψεκασμοί δολώματος έχουν το πλεονέκτημα έναντι των σπρέι κάλυψης στο ότι οι πρώτοι μπορούν να εφαρμοστούν ως επιτόπια θεραπεία και υπάρχει ελάχιστος αντίκτυπος στους φυσικούς εχθρούς. Οι ψεκασμοί δολωμάτων λειτουργούν κυρίως σε θηλυκές μύγες *Terphritidae*, οι οποίες έλκονται έντονα από την αμμωνία που παράγεται από πηγές πρωτεϊνών. Ωστόσο, οι Fabre et al. (2003) ανέφεραν ότι τα ελκυστικά μπορούν να προσελκύσουν και αρσενικά έντομα. Η αποτελεσματικότητα των σπρέι δολώματος μπορεί να εξαρτάται από τις χρησιμοποιούμενες πρωτεΐνες. Ο έλεγχος συνιστάται εάν προσβάλλεται πάνω από το 15% των καρπών που προορίζονται για παραγωγή λαδιού και για τις επιτραπέζιες ελιές εάν το 5% είναι μολυσμένο.



Εικόνα 8. Ψεκασμός σε ελαιώνα.

- Τεχνική στείρων εντόμων (Sterile Insect Technique , SIT)

Η SIT είναι μια φιλική προς το περιβάλλον και ειδική μέθοδος ελέγχου παρασίτων που βασίζεται στην απελευθέρωση μεγάλου αριθμού αποστειρωμένων εντόμων. Ο ανταγωνισμός για ζευγάρισμα μεταξύ άγριων και στείρων αρσενικών οδηγεί σε μείωση

του αριθμού γόνιμων ζευγαρωμάτων και μείωση του συνολικού μεγέθους του πληθυσμού. Η SIT εφαρμόστηκε επιτυχώς ενάντια σε διάφορα είδη εντόμων παρασίτων, συμπεριλαμβανομένων αρκετών Terphritidae (Economopoulos et al., 1977; Economopoulos & Zervas, 1982). Ωστόσο, παρά τις δεκαετίες έρευνας που αποσκοπούσαν στην ανάπτυξη προγράμματος SIT για το δάκο χρησιμοποιώντας στειρωμένα με ακτινοβολία έντομα, τα σταθερά φτωχά αποτελέσματα οδήγησαν στην τελική εγκατάλειψη των δοκιμών. Τα βασικά ζητήματα περιλάμβαναν χαμηλή ποιότητα στα έντομα που είχαν στειρωθεί με ακτινοβολία, οικονομική παραγωγή επαρκούς αριθμού αποστειρωμένων εντόμων και ποικιλία ζευγαρώματος απελευθερωμένων και άγριων πληθυσμών λόγω διαφορετικών προτιμώμενων χρόνων ζευγαρώματος. Βρέθηκε ότι τα έντομα καλλιεργήθηκαν στο εργαστήριο, ζευγαρώνουν αρκετές ώρες νωρίτερα από τα έντομα στη φύση, πιθανότατα λόγω διαφορετικών επιλεκτικών πιέσεων στο τεχνητό περιβάλλον εκτροφής στο εργαστήριο (Mourikis & Fytizas, 1970).

- Μαζική παγίδευση

Η μαζική παγίδευση συνεπάγεται την προσέλκυση ενηλίκων *B. oleae* σε μια συσκευή παγίδευσης χρησιμοποιώντας κάποιο ελκυστικό τροφής, χρώματος ή ζευγαρώματος (Economopoulos, 1977). Το κύριο πλεονέκτημα της μαζικής παγίδευσης είναι ο αποκλεισμός χημικών ουσιών από ολόκληρο το φύλλωμα του δέντρου. Μια σεξουαλική φερομόνη, για παράδειγμα, που απελευθερώνεται από παρθένα θηλυκά και προσελκύει αρσενικά *B. oleae* αποτελεί ελκυστικό. Η μαζική παγίδευση και των δύο φύλων αναπτύχθηκε από τους Χανιωτάκη et al. (1991) χρησιμοποιώντας ένα συνδυασμό ενός ελκυστικού τροφής και μιας φερομόνης αρσενικού φύλου και μιας φερομόνης προσέλκυσης θηλυκών. Στην πράξη, η μαζική παγίδευση δεν μπορεί να ελέγξει πλήρως το *B. oleae* και συχνά είναι απαραίτητοι συμπληρωματικοί ψεκασμοί προκειμένου να μειωθούν οι πληθυσμοί των μυγών και να αποφευχθεί η μόλυνση (Mazomenos et al., 1983).

- Παρακολούθηση πεδίου

Η παρακολούθηση μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε με εγκατάσταση παγίδων McPhail με ελκυστικό διάλυμα για καταγραφή του ενήλικου πληθυσμού σε ελαιώνα, είτε με

ανατομία καρπών για αναζήτηση προνυμφών και εκτίμηση των επιπέδων μόλυνσης. Οι παγίδες McPhail περιέχουν διάλυμα θεικού αμμωνίου 2% ή υδρολυμένη πρωτεΐνη και έχουν χρησιμοποιηθεί για πάνω από 50 χρόνια σε διάφορες χώρες της Μεσογείου για την παρακολούθηση του *B. oleae* (Potamitis et al., 2015). Οι παγίδες McPhail είναι πλαστικά ή γυάλινα δοχεία με δεξαμενή με το υγρό δόλωμα. Τα έντομα εισέρχονται από τον πυθμένα της παγίδας μέσω ενός ανοίγματος και στη συνέχεια «πνίγονται» στο διάλυμα. Κάθε πέντε έως επτά ημέρες το διάλυμα αντικαθίσταται με φρέσκο διάλυμα και οι αιχμάλωτες ενήλικες μύγες υπολογίζονται και διακρίνεται το φύλο τους.



Εικόνα 9. Παγίδα McPhail

Μερικές φορές οι κίτρινες κολλώδεις παγίδες χρησιμοποιούνται για την παρακολούθηση ενός ενήλικου πληθυσμού, αν και δίνουν μια κακή αναπαράσταση της πυκνότητας του πληθυσμού *B. oleae* σε έναν ελαιώνα και μπορεί να υποδηλώνουν σημαντικά χαμηλότερο πληθυσμό *B. oleae* από ό, τι υποδεικνύουν οι παγίδες McPhail. Αν και θεωρούνται χαμηλής τεχνολογίας, οι παγίδες McPhail εξακολουθούν να χρησιμοποιούνται σήμερα και δίνουν χρήσιμες πληροφορίες, όσον αφορά τη δραστηριότητα θηλυκών *B. oleae* καθώς και τα επίπεδα γονιμότητάς τους, η οποία λαμβάνεται με την ανατομία των θηλυκών που έχουν εγκλωβιστεί σε αυτές τις παγίδες και την αξιολόγηση του σταδίου ανάπτυξης των ωοθηκών. Προκειμένου να εκτιμηθεί το ποσοστό προσβολής, τα δείγματα καρπών ελιάς πρέπει να λαμβάνονται τυχαία τουλάχιστον δύο φορές το μήνα στον ελαιώνα μέχρι την περίοδο συγκομιδής. Η χρήση τέτοιων πληροφοριών τόσο των παγίδων όσο και των δειγμάτων καρπών ελιάς μπορεί να συνδυαστεί με κλιματολογικά δεδομένα προκειμένου να γίνουν προβλέψεις και να εφαρμοστούν προληπτικά μέτρα.



Εικόνα 10. Κολλώδης παγίδα.

- Ρυθμιστικός έλεγχος

Πολλές χώρες, όπως οι ΗΠΑ, απαγορεύουν την εισαγωγή ευαίσθητων φρούτων χωρίς να έχει εφαρμοστεί από τον εξαγωγέα αυστηρή μετασυλλεκτική μεταχείριση. Αυτό μπορεί να περιλαμβάνει θερμική επεξεργασία (ζεστό ατμό ή ζεστό νερό), ψυχρές επεξεργασίες, βύθιση σε εντομοκτόνο ή ακτινοβολία. Η ακτινοβολία, ωστόσο, δεν είναι αποδεκτή στις περισσότερες χώρες. Η θερμική επεξεργασία τείνει να μειώσει τη διάρκεια ζωής των περισσότερων φρούτων. Η προτιμώμενη μέθοδος ρυθμιστικού ελέγχου είναι ο περιορισμός των εισαγωγών ενός δεδομένου φρούτου σε περιοχές απαλλαγμένες από προσβολή μύγας φρούτων.

- Πολιτιστικός έλεγχος και υγειονομικές μέθοδοι

Η περιτύλιξη φρούτων, η οποία εφαρμόζεται σε πολλά άλλα είδη, δεν ισχύει για το *B. oleae* λόγω του μικρού μεγέθους του φρούτου. Γενικά, η απομάκρυνση των πεσμένων καρπών στα χωράφια είναι μια συνήθης υγειονομική πρακτική που εμποδίζει πολλές προνύμφες να είναι σε θέση να αναδυθούν και να εκκολαφθούν. Ωστόσο, καθώς η συγκομιδή της ελιάς πραγματοποιείται με το «τίναγμα» των καρπών σε δίχτυα στο έδαφος, αυτό θα ήταν δύσκολο στην πράξη. Η ταχεία συλλογή των πεσμένων καρπών μπορεί να βοηθήσει στη μείωση του πληθυσμού των δάκων (Delfrio et al 1995). Επιπλέον, παρόλο που οι προνύμφες *B. oleae* εξαρτώνται από την παρουσία των καρπών ελιάς, τα ενήλικα τρέφονται με μια ποικιλία οργανικών πηγών, συμπεριλαμβανομένου του μελιτώματος εντόμων, του νέκταρ των φυτών και των σακχάρων. Είναι επομένως πολύ σημαντικό να ελέγχουμε τέτοια παράσιτα που διατηρούν ή προσελκύουν πληθυσμούς *B. oleae* εντός ενός οπωρώνα.

2.3. ΠΡΟΚΑΛΟΥΜΕΝΗ ΖΗΜΙΑ

Παρόλες τις προσπάθειες ελέγχου των πληθυσμών του δάκου, συνεχίζει να θεωρείται το πιο σημαντικό παράσιτο των καλλιεργούμενων ελιών, *Olea europaea*, βλάπτοντας την ποιότητα και την ποσότητα τόσο του ελαιολάδου όσο και των ελιών. Οι ελιές που περιέχουν προνύμφες *B. oleae* περιλαμβάνονται συχνά στη συγκομιδή και στην επακόλουθη παραγωγή λαδιού.

Η προσβολή του *B. oleae* από ελιές αυξάνει την οξειδωτική και υδρολυτική αποικοδόμηση του ελαίου και επηρεάζει αρνητικά τη γεύση, ως συνέπεια της δραστηριότητας μικροοργανισμών. Σε πολλές περιπτώσεις ο κύριος αντίκτυπος είναι η λεύκανση του παραγόμενου ελαιολάδου και όχι η πλήρης καταστροφή της καλλιέργειας. Οι Neuenschwander και Michelakis (1978) ανέφεραν ότι σε παρτίδες ελιών στις οποίες όλα τα φρούτα είχαν σημάδια από την ωσαπόθεση, το προκύπτον λάδι ήταν έως και 12 φορές πιο όξινο από τις μη μολυσμένες παρτίδες ελιών.

Επιπροσθέτως, το άνοιγμα του ωοθήτη στους καρπούς της ελιάς επιτρέπει τη είσοδο και ανάπτυξη διαφόρων μυκήτων, όπως ο μύκητας *Camarosporium dalamaticum* (Tzanakakēs, 2006).

Επιπροσθέτως, η εξάπλωση του δάκου και η υποβάθμιση των καρπών έχει ως άμεση συνέπεια τις μεγάλες οικονομικές απώλειες. Ειδικότερα, χώρες που εξειδικεύονται και εξαγουν το παραγόμενο λάδι και τις ελιές τους πλήττονται σε πολύ μεγάλο βαθμό. Το μέγεθος της ζημιάς που προκαλείται είναι διαφρετικό κάθε χρόνο της και ποικίλει και από περιοχή σε περιοχή. Ακόμη, μεγαλύτερη είναι η επιβάρυνση στις αναπτυσσόμενες χώρες, όπως για παράδειγμα αυτές της Β. Αφρικής, στις οποίες δεν εφαρμόζονται μέθοδοι μαζικής καταπολέμησης του εντόμου. Στην Ελλάδα, εφαρμόζονται τέτοια κρατικά προγράμματα, τα οποία καταφέρνουν να ελαχιστοποιήσουν τις ετήσιες απώλειες σε ποσοστό μικρότερο του 5%. Χωρίς εντομοκτόνες επεμβάσεις οι απώλειες μπορούν να φτάσουν το 30-40% της παραγωγής (Katsoyannos 1992).

3. ΟΣΦΡΗΤΙΚΟ ΚΑΙ ΟΡΜΟΝΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

3.1. ΟΣΦΡΗΣΗ

Η ταχεία, ειδική και ευέλικτη επικοινωνία μεταξύ κυττάρων και μεταξύ ατόμων βασίζεται κυρίως σε χημικά σήματα. Το οσφρητικό σύστημα είναι αφιερωμένο στην ανίχνευση και την κωδικοποίηση πληροφοριών από αυτά τα χημικά σήματα. Εξελικτικά, η χημειοαισθητοποίηση είναι μια αρχαία αλλά ταυτόχρονα αινιγματική αίσθηση. Όλοι οι οργανισμοί, από την απλούστερη μονοκύτταρη μορφή έως το πιο προηγμένο πολυκύτταρο πλάσμα διαθέτουν την ικανότητα να ανιχνεύουν χημικές ουσίες στο περιβάλλον. Αντιστρόφως, όλα τα έμβια όντα εκπέμπουν κάποιες μορφές οσμών, είτε ως σήματα επικοινωνίας είτε ως υποπροϊόντα του μεταβολισμού. Πολλά είδη βασίζονται στα οσφρητικά συστήματα που εκφράζουν μεγάλο αριθμό χημειοϋποδοχέων για τον εντοπισμό τροφής και συντρόφων και για την αποφυγή κινδύνου. Οι χημικές ουσίες του περιβάλλοντος λειτουργούν ως ερεθίσματα και προκαλούν φυσιολογικές και συμπεριφορικές αποκρίσεις μέσω της μεταφοράς οσφρητικού σήματος.

Στο δάκο όπως και σε όλα τα έντομα η επιβίωση, η αναπαραγωγή και μεγάλο κομμάτι της επικοινωνίας τους επιτυγχάνεται με χημικά σήματα. Τα εξωτερικά αυτά χημικά σήματα, αναγνωρίζονται συνήθως από ειδικές πρωτεΐνες-υποδοχείς κυτταρικής επιφάνειας και μπορούν να προκαλέσουν αλλαγές στην έκφραση γονιδίων, τη φυσιολογία ή τη συμπεριφορά τόσο των κυττάρων όσο και των οργανισμών. Αυτά τα σήματα μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σύμφωνα με τις πληροφορίες που μεταφέρουν. Για παράδειγμα, τα σημειοχημικά που εμπλέκονται στην κοινωνική επικοινωνία, μπορεί να φέρουν χρήσιμες πληροφορίες τόσο για τον πομπό όσο και για τον δέκτη (Hansson & Wicher, 2016).

Τα χημικά σήματα μετατρέπονται, στη συνέχεια, σε ηλεκτρικά σήματα και μπορούν να ερμηνευτούν από το οσφρητικό νευρικό σύστημα. Στα νευρικά συστήματα, η διακυτταρική επικοινωνία συμβαίνει μεταξύ των νευρώνων στις συνάψεις. Διάχυτοι νευροδιαβιβαστές απελευθερώνονται από τα προ-συναπτικά άκρα των κυττάρων σε απάντηση των δυναμικών δράσης και αναγνωρίζονται από τις πρωτεΐνες υποδοχέων στις μετα-συναπτικές κυτταρικές μεμβράνες για να προκαλέσουν νευρωνική αποπόλωση και συνεχή διάδοση αυτών των δυναμικών δράσης.

3.1.1. ΟΣΦΡΗΣΗ ΣΤΑ ENTOMA

Η όσφρηση είναι ζωτικής σημασίας για την επιβίωση και την αναπαραγωγή των εντόμων. Ο οργανισμός μοντέλο *Drosophila melanogaster* έχει συνεισφέρει τα μέγιστα της κατανόησης του οσφρητικού συστήματος των εντόμων αφού έχει μελετηθεί αρκετά (Thorne, 2005).

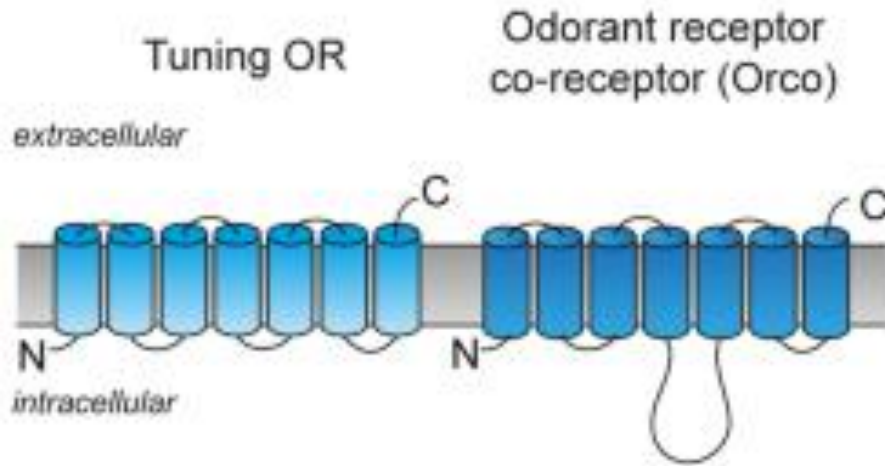
Το αρχικό βήμα στην ανίχνευση οσμής ξεκινά με τη σύνδεση των μορίων οσμής στους ειδικούς υποδοχείς οσμής που βρίσκονται στα πρωταρχικά αισθητήρια όργανα, τις κεραίες ή γνάθους. Οι υποδοχείς με τη σειρά τους, συνδέονται με δένδριτες των νευρώνων των οσφρητικών υποδοχέων (Olfactory Receptor Neuron, ORN) στις κεραίες (Andersson et al., 2015). Η όλη διαδικασία απαιτεί αρκετές οικογένειες χημειοαισθητήριων γονιδίων, συμπεριλαμβανομένων γονιδίων που κωδικοποιούν οσφρητικούς υποδοχείς (Olfactory Receptors, OR), ιονοτροπικούς υποδοχείς (IRs), γευστικούς υποδοχείς (GRs), μεμβρανικές πρωτεΐνες αισθητήριων νευρώνων, πρωτεΐνες που δεσμεύουν οσμές (OBPs) και χημειοαισθητήριες πρωτεΐνες. Οι περισσότεροι χημειοϋποδοχείς που εκφράζονται σε οσφρητικά όργανα είναι υποδοχείς συζευγμένοι με πρωτεΐνη G (G Protein-Coupled Receptors, GPCRs).

Οι τρεις οικογένειες υποδοχέων δείχνουν ξεχωριστή εξελικτική προέλευση και αρκετά ξεχωριστά δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά. Το πιο σημαντικό, από λειτουργική άποψη ωστόσο, είναι ότι εμφανίζουν διαφορετικά προφίλ εξειδίκευσης οσμών.

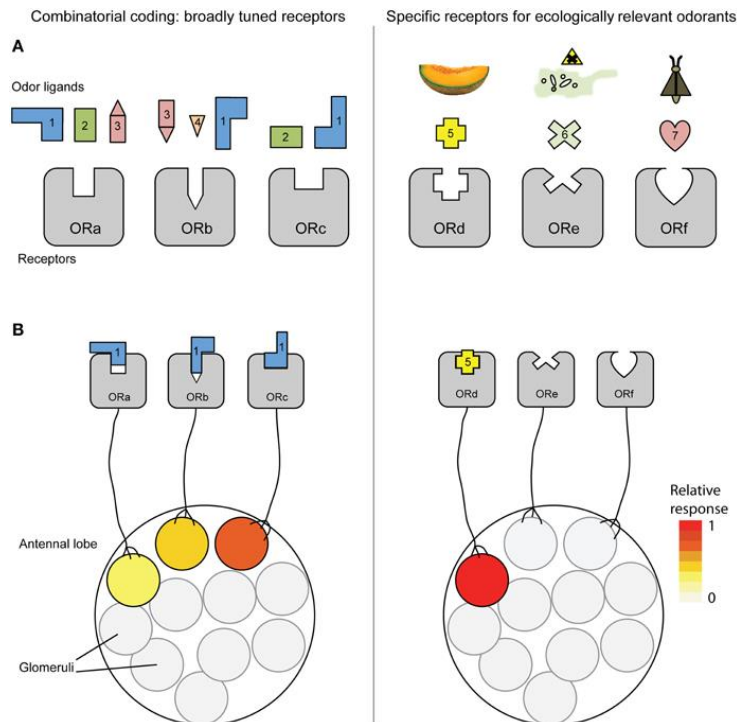
3.1.1.1. Οσφρητικοί Υποδοχείς (Olfactory Receptors, ORs)

Οι ORs των εντόμων είναι ετεροδιμερείς πρωτεΐνες υποδοχείς επτά διαμεμβρανικών τομέων που αποτελούνται από τουλάχιστον δύο πρωτεΐνες, έναν πολύ συντηρημένο συνυποδοχέα OR (OR coreceptor, ORco) που δρα ως κανάλι ιόντων και μια συγκεκριμένη υπομονάδα OR (ORx) που καθορίζει την εξειδίκευση του συνδέτη. Ένα σύμπλοκο ORx/ORco λειτουργεί ως κανάλι ιόντων με συνδέτες και ενεργοποιείται από ένα μόριο οσμής. Ένα χημικό σήμα στη συνέχεια μετατρέπεται σε ηλεκτρικό σήμα που μεταδίδεται σε νευρωνικό κέντρο υψηλότερης τάξης. Τα ORs εξελίχθηκαν παράλληλα με την έναρξη της πτήσης εντόμων (Missbach et al., 2014). Οι υποδοχείς ORs, σε αντίθεση με άλλους υποδοχείς όπως οι GPCRs, δείχνουν έναν ανεστραμμένο προσανατολισμό μέσα στην μεμβράνη του πλάσματος. Η ανάλυση της ποικιλίας των αμινοξέων των εντόμων ή της πρωτεΐνης κατά τη διάρκεια της εξέλιξης αποκάλυψε

ένα μοντέλο διάταξης διαμεμβρανικής περιοχής που δεν σχετίζεται με GPCRs. Τα πρώτα μέλη της οικογένειας OR ανακαλύφθηκαν πριν από δύο δεκαετίες. Ανιχνεύουν αποκλειστικά πτητικά χημειοσήματα, ανταποκρίνονται σε αδύναμα ερεθίσματα, και εμφανίζουν γρήγορη προσαρμογή στο αντίστοιχο ερέθισμα (Gomez-Diaz et al., 2018; Wicher, 2018).



Εικόνα 11. Δομή ORs. (Wicher & Miazzi, 2021a)



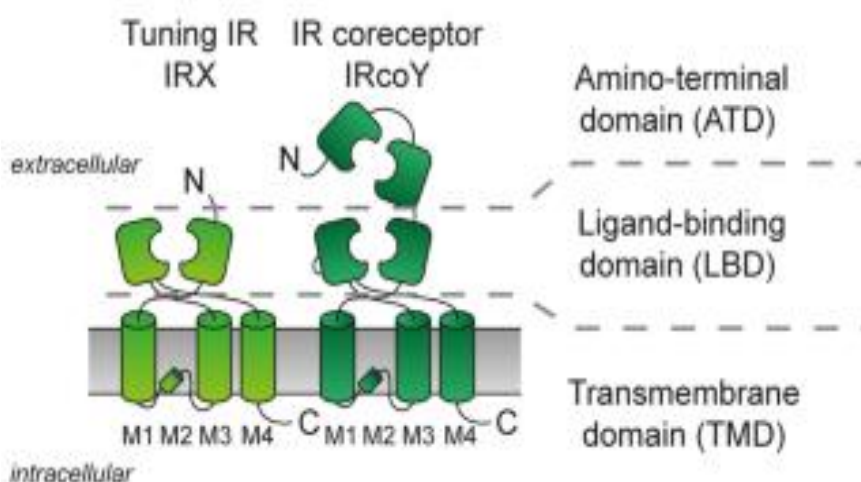
Εικόνα 12. Διαφορετικοί συνδέτες και τρόποι ενεργοποίησης OR υποδοχέων, που περιλαμβάνουν ευρέως συντονισμένους υποδοχείς οσμής (A) σε αντίθεση με εξειδικευμένα OR που ενεργοποιούνται σε αποκλειστικές νευρωνικές οδούς (B) (Andersson et al., 2015)

3.1.1.2. Ιονοτροπικοί υποδοχείς γλουταμικού (Ionotropic Glutamate Receptors, iGluRs)

Οι ιονοτροπικοί υποδοχείς γλουταμικού (iGluRs) μεσολαβούν στη χημική επικοινωνία μεταξύ των νευρώνων στις συνάψεις. Μια παραλλαγή υποοικογένειας iGluR, οι ιονοτροπικοί υποδοχείς (IRs), προτάθηκε πρόσφατα για την ανίχνευση πτητικών χημικών στο περιβάλλον σε οσφρητικούς νευρώνες (Abuin et al., 2011).

Τα IR είναι μια οικογένεια διαφόρων ιονοτροπικών υποδοχέων γλουταμικού. Τα IR υπάρχουν ως ετερομερή σύμπλοκα με ένα IR συν-υποδοχέα (όπως IR25a, IR8a ή IR76b) σε συνδυασμό με έναν ή περισσότερους εξειδικευμένους συνδέτες μέσα σε ένα ORN. Η υποοικογένεια «IR στις κεραίες» που εκφράζεται κυρίως ή συγκεκριμένα σε κεραίες, ορίστηκε αρχικά ως ένας άλλος οσφρητικός υποδοχέας. Ωστόσο, πρόσφατες λειτουργικές μελέτες δείχνουν ότι τα IR της κεραίας, εκτός από τον οσφρητικό τους ρόλο έχουν διαφορετικές λειτουργίες συμπεριλαμβανομένης της ανίχνευσης οσμών όπως αμμωνία και αμίνες, πολυαμίνες, οξέα, σεξουαλικές φερομόνες, καθώς και της γεύσης, θερμοευαισθησίας και υγροποίησης. Τα IR που σχετίζονται με ιονοτροπικούς υποδοχείς γλουταμικού αναφέρθηκαν για πρώτη φορά πριν περίπου δέκα χρόνια και είναι πολυτροπικές δεκτικές οντότητες.

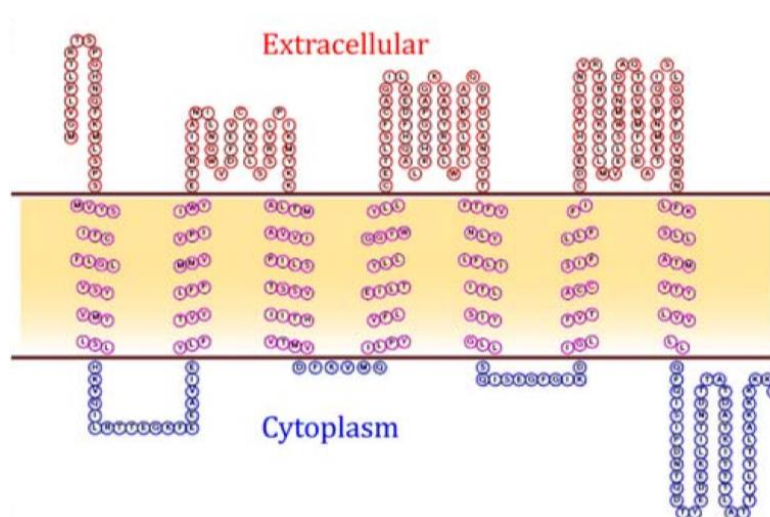
Οι IR χρειάζονται ισχυρότερα ερεθίσματα και εμφανίζουν λιγότερη προσαρμογή σε σύγκριση με τους ORs. Με αυτές τις ιδιότητες οι IRs είναι οσφρητικοί υποδοχείς κατάλληλοι για την ανίχνευση μηνυμάτων σημαντικής ισχύος ή κοντά στην πηγή τους (Ma, 2012). Τέλος, οι IRs αποτελούν μη επιλεκτικά κανάλια κατιόντων Na^+ και K^+ και Ca^{2+} .



Εικόνα 13. Δομή υποδοχέων IR. (Wicher & Miazzi, 2021a)

3.1.1.3. Γευστικοί υποδοχείς (Gustatory Receptors, GRs)

Οι GRs είναι μια άλλη οικογένεια υποδοχέων που συνδέονται με την G-πρωτεΐνη και σχετίζονται πολύ με ORs, και εκφράζονται ευρέως στις κεραίες, την προβοσκίδα, τα φτερά και τους ωοειδείς παράγοντες των εντόμων, τα οποία είναι γενικά συντονισμένα για γεύση και ανίχνευση διοξειδίου του άνθρακα (Agnihotri et al., 2016).



Εικόνα 14. Δομή υποδοχέων GR (Agnihotri et al., 2016).

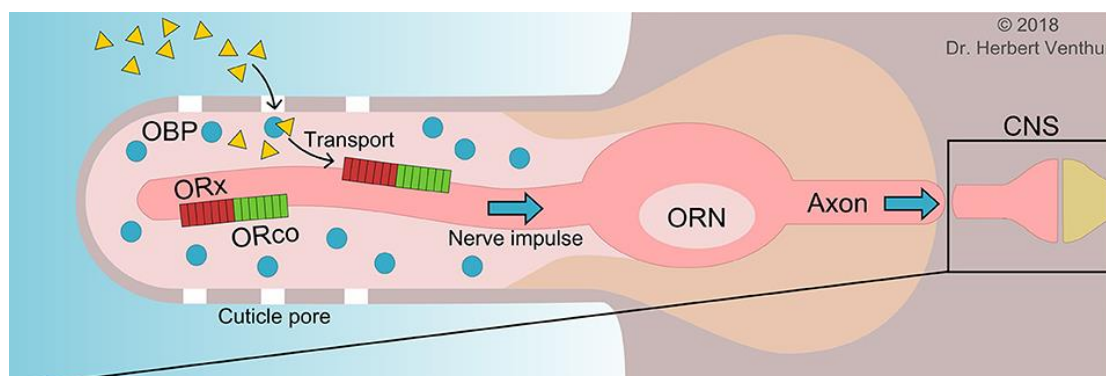
3.1.1.4. Πρωτεΐνες Δέσμησης Οσμών (Odorant-Binding Proteins, OBPs)

Οι πρωτεΐνες δέσμησης οσμών πιστεύεται ότι διευκολύνουν τη μεταφορά υδρόφοβων υποκαταστατών μέσω της υδατικής λέμφου (Hellmann, 2020). Οι OBP είναι μικρές, υδατοδιαλυτές, εξωκυτταρικές πρωτεΐνες που εμπλέκονται στο πρώτο βήμα της χημειοαισθητικής επεξεργασίας των εντόμων. Ένα μέλος της οικογένειας OBP αναφέρθηκε για πρώτη φορά ως πρωτεΐνη δέσμησης φερομόνης (Pheromone-Binding-Protein, PBP) στα Λεπιδοπτερα.

Οι OBPs είναι υπεύθυνοι για τη μεταφορά εξωτερικών οσμών που περνούν μέσα από τους αισθητικούς πόρους σε ORs στους νευρώνες των οσμών, πραγματοποιώντας έτσι τη μεταφορά οσφρητικού σήματος (Venthur & Zhou, 2018).

Παρ' όλα αυτά, υπάρχει διαμάχη σχετικά με το εάν τα ORs ενεργοποιούνται από ένα σύμπλεγμα οσμής-OBP ή από ένα μόριο οσμών (Zheng et al., 2013). Επί του παρόντος, υπάρχουν δύο υποθέσεις σχετικά με τον τρόπο δράσης των OBP : 1) Οι OBP

δεσμεύονται με οσμές και στη συνέχεια σχηματίζουν ένα σύμπλεγμα στο οποίο το ενεργοποιεί τον υποδοχέα, 2) Οι OBP δεσμεύονται με τα πτητικά για να καθυστερήσουν την απελευθέρωση οσμών στα αισθητήρια. Επιπρόσθετα, έχει αναφερθεί ότι πολλές OBPs ότι έχουν ισχυρή συγγένεια για αρκετά κοινά πτητικά των φυτών ξενιστών(Yao et al., 2021).

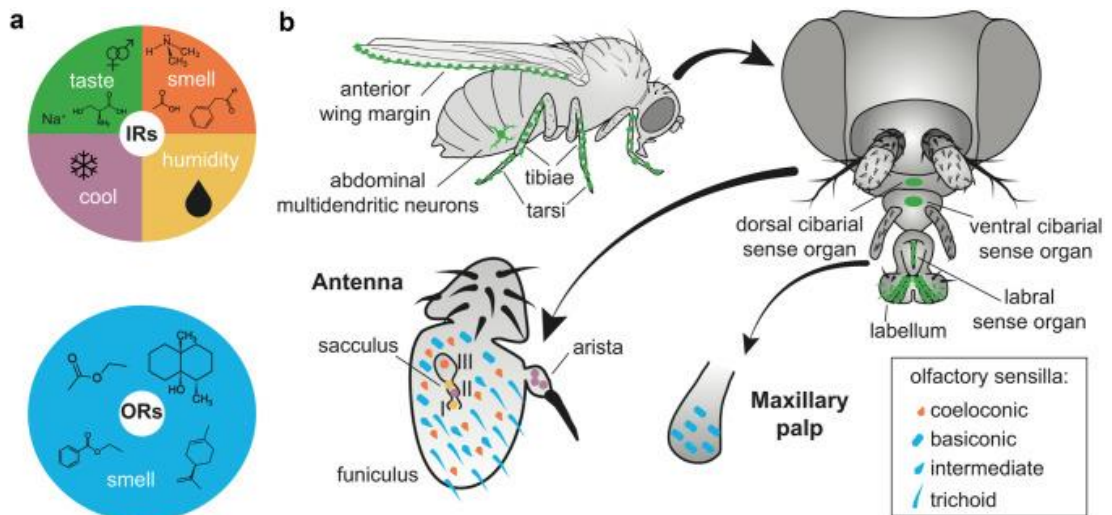


Εικόνα 15. Ενδεικτικό παράδειγμα όσφρητικής λειτουργίας μετά την επαφή με κάποια οσμή. Οι OBPs κατευθύνονται με την οσμία και περνούν από τους υποδοχείς όπου το σήμα φτάνει στο κεντρικό νευρικό σύστημα(Venthur & Zhou, 2018).

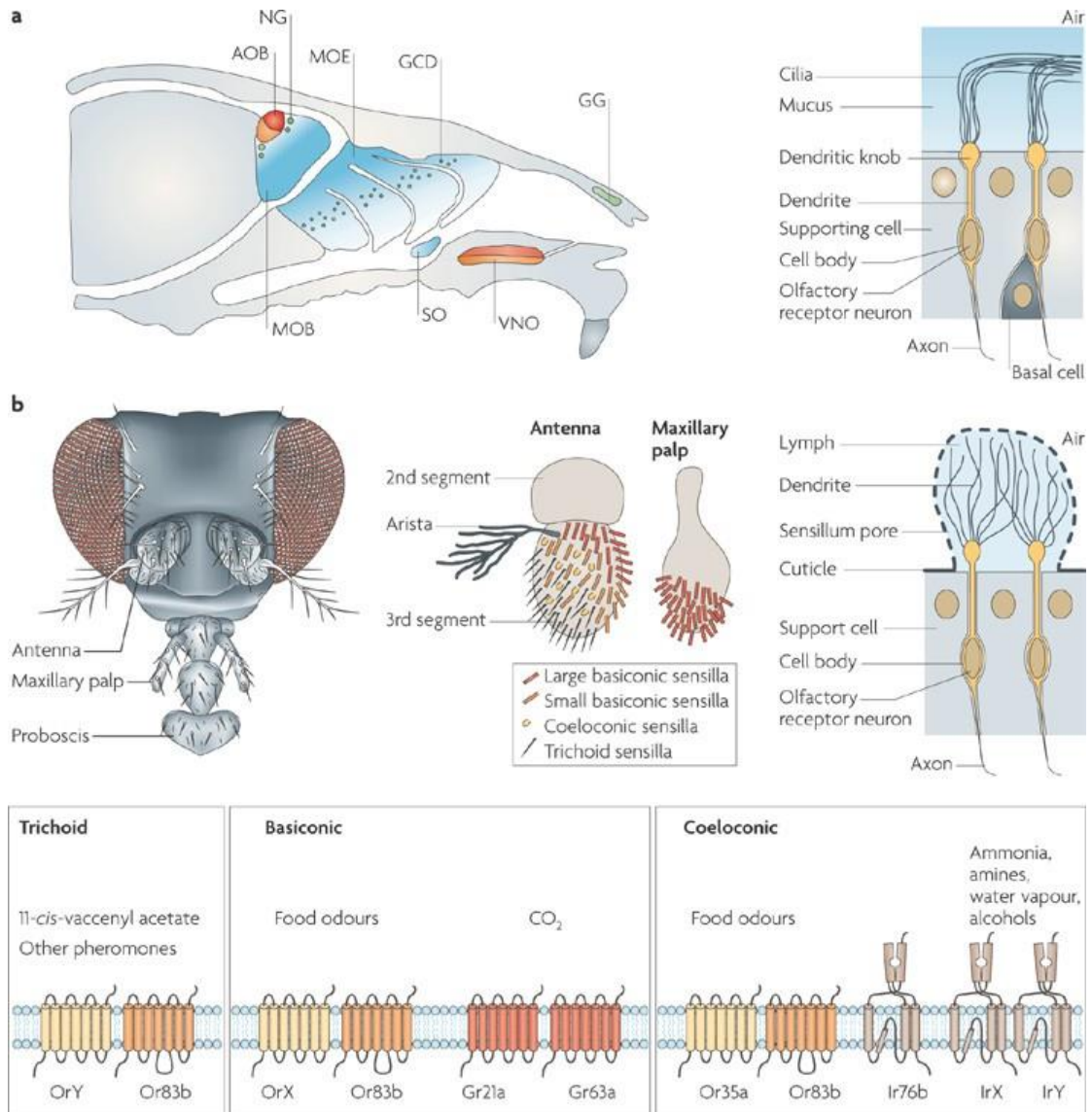
3.1.1.5. Αισθητήρια τριχίδια-τριχοειδή (Sensilla)

Οι όσφρητικοί υποδοχείς εντοπίζονται στα όσφρητικά αισθητήρια όργανα, τις κεραίες και τις γναθικές προσακτρίδες (maxillary palps). Αυτά τα όργανα είναι καλυμμένα με τριχοειδή, δηλαδή, δομές που μοιάζουν με τρίχες και στεγάζουν τον υποδοχέα που εκφράζει δένδριτες των όσφρητικών αισθητήριων νευρώνων (Olfactory Sensory Neurons, OSNs)(Kaupp, 2010). Κάθε αισθητήριο περιέχει από ένα έως τέσσερα OSN που εκφράζουν διαφορετικούς υποδοχείς. Τα μόρια της οσμής περνούν στα τριχοειδή μέσω πόρων και διαχέονται στους δένδριτες, διευκολυνόμενα από τις πρωτεΐνες που δεσμεύουν την οσμή (OBP), ειδικές για υδρόφοβα μόρια οσμής.

Τα sensilla ταξινομούνται ανάλογα με το σχήμα τους σε κολεοκωνικά (coeloconic), βασεονικά (baseonic), ενδιάμεσα (intermediate) και τριχοειδή (trichoid). Αυτοί οι τύποι διαφέρουν ως προς τον εντοπισμό και στους τύπους OSN που περιέχουν. Τα κύτταρα που εκφράζουν IR για παράδειγμα, εμφανίζονται στα coeloconic, ενώ τα OSN που εκφράζουν OR εμφανίζονται στα baseonic, τα ενδιάμεσα και τα τριχοειδή sensilla.

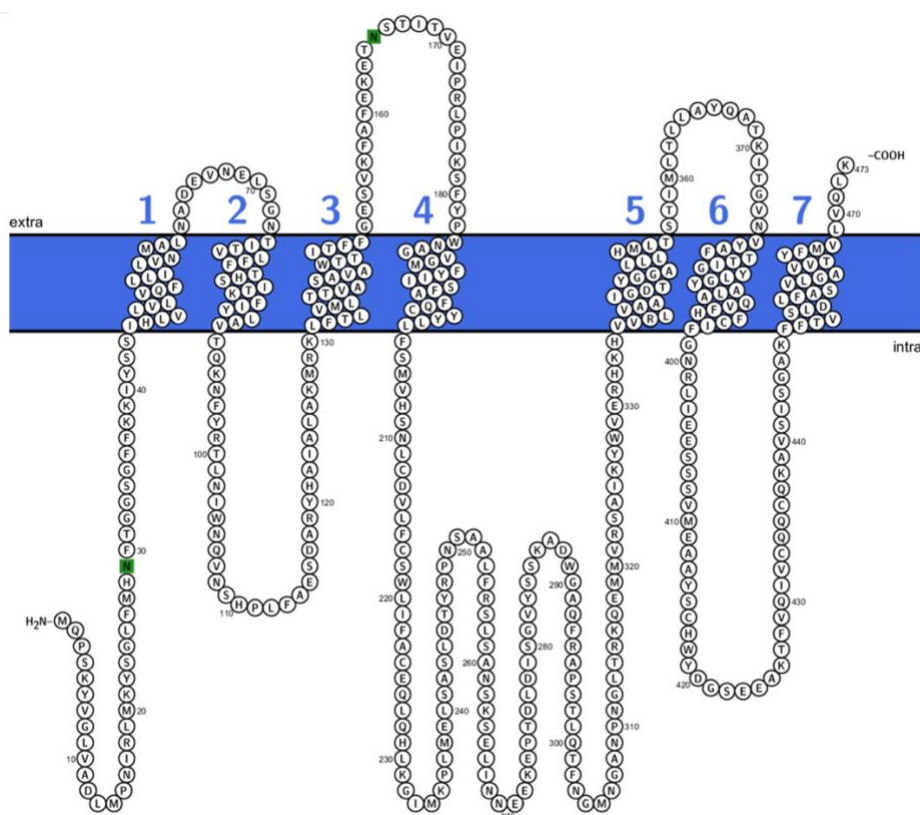


Εικόνα 16. Όσφρηση στα έντομα: γνάθοι και κεραίες.



3.1.1.6. Συν-υποδοχέας Orco

Ο συν-υποδοχέας Orco αρχικά αναγνωρίστηκε ως μέλος της οικογένειας OR στη *Drosophila*. Ωστόσο, σε αντίθεση με άλλα OR, το Orco εκφράζεται ευρέως σε οσφρητικούς νευρώνες και εμφανίζει συντηρημένη αμινοξική αλληλουχία σε μακρινές σειρές εντόμων, υπογραμμίζοντας τον ουσιαστικό του ρόλο στη μεταφορά οσφρητικού σήματος (Butterwick et al., 2018). Πιο συγκεκριμένα, το καρβοξυτελικό άκρο (-COOH) είναι περισσότερο συντηρημένο από τους διαμεμβρανικούς τομείς. Οι ORs δεν μπορούν να λειτουργήσουν απουσία του Orco εφόσον αποτελεί υποχρεωτικό συν-υποδοχέα στο ετερομερές σύμπλοκο ORx/ORco που σχηματίζει κανάλι ιόντων. Επίσης, ένας μόνο Orco μπορεί να αλληλεπιδράσει και να λειτουργήσει με μια σειρά από διαφορετικές υπομονάδες OR (Tsoumani et al., 2020). Τέλος, ο Orco εκφράζεται σε όλους τους Οσφρητικούς νευρώνες και παίζει σημαντικό ρόλο στο οσφρητικό σύστημα. Πρόσφατα ο Butterwick και οι συνεργάτες του, παρείχαν σημαντικές πληροφορίες για την πραγματική δομή του Orco με κρυοηλεκτρονική μικροσκοπία, επιδεικνύοντας τη νέα ομοτετραμερή αρχιτεκτονική του και αποκαλύπτοντας με περισσότερες λεπτομέρειες πιθανή σχέση δομής-λειτουργίας.



Εικόνα 18. Διάγραμμα plotter που δείχνει τη δευτεροταγή δομή του υποδοχέα Orco στα έντομα *B. oleae*. Η διαμεμβρανική τοπολογία του *Bo*-Orco προβλέφθηκε χρησιμοποιώντας ΤΜΗΜΜ. Οι διαμεμβρανικές περιοχές υποδεικνύονται με τους έγχρωμους αριθμούς 1–7.

3.1.1.1. Προσαρμογή σε ερέθισμα

Οι οσφρητικοί υποδοχείς είναι ο πρώτος σταθμός για την ανίχνευση και την επεξεργασία ενός χημειοσήματος. Ωστόσο, λειτουργούν ως αλυσιδωτός κρίκος μέσα σε ένα ευρύτερο σύστημα που αποτελείται από πρωτεϊνικά δίκτυα, οργανίδια και κυτταρικές αλληλεπιδράσεις που επηρεάζουν τον τρόπο με τον οποίο γίνονται αντιληπτές οι οσμές (Wicher & Miazzi, 2021b). Η εσωτερική αναπαράσταση του εξωτερικού περιβάλλοντος που παρέχεται από τα αισθητήρια όργανα και η επακόλουθη επεξεργασία από το νευρικό σύστημα αποτελεί τη βάση για κάθε συμπεριφορική απόκριση. Η επιτυχία των συμπεριφορικών απαντήσεων βασίζεται στην ποιότητα αυτής της αναπαράστασης. Η λειτουργική κατάσταση των υποδοχέων ρυθμίζεται ανάλογα με τη δύναμη και τη διάρκεια της ενεργοποίησής τους. Για παράδειγμα, μακροχρόνια ή επαναλαμβανόμενα ερεθίσματα προκαλούν προσαρμογή της απόκρισης των OR όπως περιγράφεται από τον νόμο Weber-Fechner με λογαριθμική σχέση μεταξύ ερεθίσματος και απόκρισης. Οι Guo et al. (2017) απέδειξαν ότι η φωσφορυλίωση ενός συγκεκριμένου υπολείμματος (S289) στο Orco μειώνει τις οσφρητικές αποκρίσεις κατά την παρατεταμένη έκθεση σε οσμές. Το Orco διατηρείται εξελικτικά σε όλα τα είδη εντόμων. Η τροποποίηση των οσφρητικών αποκρίσεων από την κατάσταση φωσφορυλίωσης του Orco S289 θα μπορούσε να οδηγήσει στην ανακάλυψη νέων γενεών εντομοαπωθητικών κατά των εντόμων και των γεωργικών παρασίτων. Μελλοντικές προσπάθειες για τον εντοπισμό μικρών μορίων που μπλοκάρουν τις εξαρτώμενες από τη φωσφορυλίωση αλληλεπιδράσεις του Orco μπορεί να ενισχύσουν την απωθητικότητα των εντόμων μειώνοντας την προσαρμογή σε απωθητικά. Μια σημαντική παράμετρος σε μια προσαρμογή είναι το επίπεδο του κυτταροπλασματικού ασβεστίου Ca^{2+} το οποίο αυξάνεται όταν ανοίγουν τα κανάλια των ORs. Παρατεταμένα ερεθίσματα οσμής οδηγούν σε απευαισθητοποίηση των ORs. Αυτό μειώνει την ευαισθησία του ενεργού OR στη μόνιμα εμφανιζόμενη οσμή (Clark & Chen, 2018; Guo et al., 2017). Υπεύθυνη για την αποφωσφορυλίωση του Orco είναι πιθανώς μια φωσφατάση ενεργοποιημένη με Ca^{2+} .

3.2. ΣΗΜΕΙΟΧΗΜΙΚΑ - ΦΕΡΟΜΟΝΕΣ

3.2.1. Σημειοχημικά

Οι σημειοχημικές ουσίες (σημειοχημικά=semiochemicals) είναι φυσικά προϊόντα, που παράγονται για συγκεκριμένο λόγο από ζωντανούς φυτικούς ή ζωικούς οργανισμούς και καλύπτουν ανάγκες ζωτικής σημασίας όπως αυτή της επικοινωνίας και της επιβίωσης και της αναπαραγωγής. Απαντούν στο φυσικό περιβάλλον και είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικές σε πολύ χαμηλές ποσότητες και μη τοξικές. (OECD Report of the 5TH Biopesticides Steering Group Seminar on application techniques for microbial pest control products and semiochemicals: use scenarios and associated risks (Series on Pesticides No. 80, 2014)

Οι σημειοχημικές ουσίες διακρίνονται σε φερομόνες, αλλομόνες και καιρομόνες, ανάλογα με τη λειτουργία τους στον οργανισμό. Οι φερομόνες είναι χημικές ουσίες που χρησιμοποιούνται για τη μεταφορά χημικών μηνυμάτων μεταξύ ατόμων του ίδιου είδους. Διακρίνονται σε φερομόνες άμεσης ανταπόκρισης και φυσιολογικής δράσης. Η πρώτη κατηγορία περιλαμβάνει φερομόνες φύλου, συναθροίσεως, ιγνηθέτες, συναγεμμού ή άμυνας, εδαφικής κυριότητας, ενώ η δεύτερη χαρακτηρίζεται από φερομόνες που προκαλούν λειτουργικές και ορμονικές αλλαγές.

Οι αλλομόνες και καιρομόνες χαρακτηρίζονται ως αλληλοχημικές ουσίες, και χρησιμοποιούνται για μεταφορά μηνυμάτων μεταξύ ατόμων διαφορετικών ειδών. Οι αλλομόνες έχουν θετική επίδραση στον οργανισμό που τις παράγει και ο ρόλος τους είναι κυρίως αμυντικός. Οι καιρομόνες έχουν θετική επίδραση στον οργανισμό που τις δέχεται και περιλαμβάνουν ουσίες ελκυστικών τροφής που βοηθούν, για παράδειγμα, φυλλοφάγα έντομα να βρίσκουν την τροφή τους, τα αρπακτικά ζώα να εντοπίζουν τα θύματά τους και τα παράσιτα τους ξενιστές τους.

3.2.2. Φερομόνες

Η λέξη "φερομόνη" επινοήθηκε από τον Peter Karlson και τον Martin Lüscher το 1959, βασισμένη στην ελληνική γλώσσα. Τα δύο συνθετικά της είναι «φερω» (μεταφέρω) και «όρμων» (ορμόνη), δηλαδή μεταφέρω ορμόνη, κάτι που θα προκαλέσει αντίδραση. Οι φερομόνες έχουν ταξινομηθεί ως μόρια που απελευθερώνονται από άτομα και είναι υπεύθυνα για την πρόκληση συγκεκριμένων συμπεριφορικών εκφράσεων σε μέλη του ίδιου είδους. Αυτά τα μόρια σηματοδότησης, περιέχονται σε εξειδικευμένους εξωκρινείς αδένες καθώς και σε βλεννώδεις εκκρίσεις των οργάνων αναπαραγωγής. Οι

φερομόνες, αποτελούν βιολογικά σημαντικό κομμάτι στα συστήματα ζευγαρώματος των εντόμων, και έχουν επίσης πιθανές εφαρμογές ως προσελκυστικά ή απωθητικά ζευγαρώματος για τη διαχείριση επιβλαβών οργανισμών. Τα τελευταία χρόνια, έχει επιτευχθεί σημαντική πρόοδος στην κατανόηση των βαθιών επιδράσεων των φερομονών στη φυσιολογία και τη συμπεριφορά της αναπαραγωγής (Tirindelli et al., 2009).

Η πραγματικότητα των φερομονών, μεταξύ μελών του ίδιου είδους αναγνωρίστηκε πολύ πριν μπορέσουν να ταυτοποιηθούν. Ο Κάρολος Δαρβίνος πρότεινε ότι η «σεξουαλική οσμή» της περιόδου αναπαραγωγής αρσενικών θηλαστικών θα μπορούσε επίσης να έχει εξελιχθεί με τη σεξουαλική επιλογή των πιο ευωδιαστών αρσενικών μέσω γυναικείας επιλογής. Δεν είναι όμως μόνο το ζευγάρι. Γνωρίζουμε τώρα ότι οι φερομόνες χρησιμοποιούνται από είδη σε όλο το ζωικό βασίλειο, σε κάθε βιότοπο και σε ένα ευρύ φάσμα, από φερομόνες ανίχνευσης και συναγεμίου στα κοινωνικά έντομα έως τις φερομόνες του μαστού που παράγονται από μητέρες κουνέλια. Οι φερομόνες έχουν παράσχει συναρπαστικά παραδείγματα εξέλιξης σήματος. Σε ορισμένα μοντέλα οργανισμών, όπως η *Drosophila*, ο *Caenorhabditis elegans* και το *Mus musculus*, ένα πλήρες σύστημα σηματοδότησης μπορεί να διαχωριστεί γενετικά, από τα ένζυμα που παράγουν φερομόνες, την αντίληψη από τους χημειοαισθητικούς υποδοχείς, μέχρι τα νευρικά κυκλώματα που επεξεργάζονται τα σήματα (Wyatt, 2017).

3.2.2.1. Φερομόνες στο είδος *B.oleae*

Σε αντίθεση με την παραγωγή σεξουαλικών φερομονών από αρσενικά έντομα, τα θηλυκά απελευθερώνουν σεξουαλικές φερομόνες για να προσελκύσουν αρσενικά στο είδος *B. Oleae* (Mazomenos & Haniotakis, 1981; Mazomenos & Haniotakis, 1985). Ένα κύριο συστατικό των σεξουαλικών φερομονών έχει ταυτοποιηθεί ως το 1,7-dioxaspiro[5.5]undecane, πιο γνωστό ως ωλείνη. Υπάρχουν τα (R)- και (S) - εναντιομερή στο ωκεανό και οι θηλυκές μύγες το απελευθερώνουν ως ρακεμικό μίγμα. Αξιοσημείωτο είναι ότι, τα αρσενικά ανταποκρίθηκαν μόνο στο (R) -olean, το οποίο λειτουργεί ως φερομόνη προσέλκυσης. Αντίθετα, τα θηλυκά ανταποκρίθηκαν μόνο στο (S) - olean σε μικρό εύρος, πιθανώς λόγω της αφροδισιακής του δράσης.

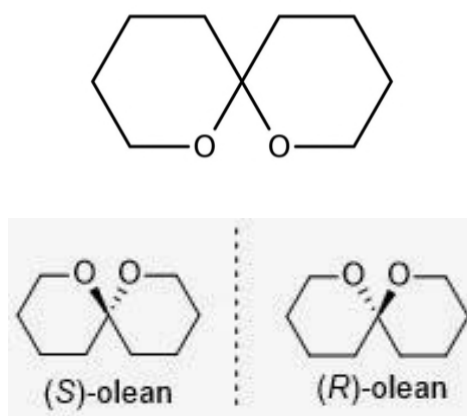
Η ανίχνευση αρσενικών ελκυστικών στις μύγες *Dacini* είναι ένα σημαντικό ζήτημα για την κατανόηση των χημειοαισθητικών μηχανισμών τους. Οι μύγες είναι εξοπλισμένες με δύο περιφερειακά οσφρητικά όργανα: τις κεραίες και τα γναθικές προσακτιρίδες. Σε

γενικές γραμμές, οι κεραίες ανιχνεύουν κυρίως φερομόνες και διάφορα σημειοχημικά ως κύρια οσφρητικά όργανα. Αντίθετα, ο ρόλος των γνάθων δεν έχει χαρακτηριστεί καλά σε πολλά έντομα.

Η αναγνώριση του οργάνου που εμπλέκεται στην ανίχνευση οσμών έχει μεγάλο ενδιαφέρον. Είναι πιθανό ότι γευστικά όργανα, όπως η προβοσκίδα, εμπλέκονται στην ανίχνευση ελκυστικών οσμών (Ono et al., 2021). Οι ορθικοί αδένες εμπλέκονται στην πιθανή παραγωγή φερομόνης φύλου σε είδη *Bactrocera* (Wu et al., 2019).

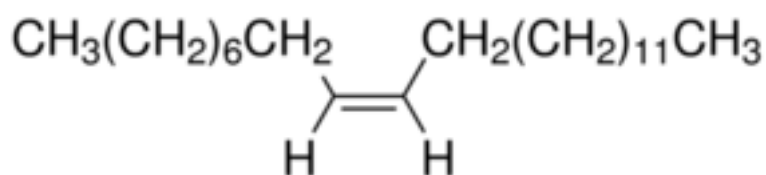
Η χημική δομή των δύο ενώσεων φαίνεται παρακάτω:

- 1,7-dioxaspiro[5.5]undecane (spiroketal)



Εικόνα 19. Χημική δομή Spiroketal.

- *cis*-9-Tricosene (Muscalure)



Εικόνα 20. Χημική Δομή Muscalure

3.2.3. Πτητικά του ξενιστή

Οι φερομόνες που βοηθούν στην προσέλκυση των ερωτικών συντρόφων και το ζευγάρι εκπέμπονται και από τα ίδια τα έντομα. Υπάρχει όμως και μια πληθώρα άλλων χημικών ουσιών που βοηθούν σε άλλες λειτουργίες των εντόμων και εκπέμπονται από τον ξενιστή γνωστές ως πτητικά. Στις πτητικές ουσίες των φυτών έχουν αποδοθεί σημαντικές λειτουργίες, αντιπροσωπεύοντας τους τρόπους με τους οποίους τα φυτά επικοινωνούν και αλληλεπιδρούν με το ευρύτερο περιβάλλον αλλά και με τα ίδια τα έντομα. Τα πτητικά που εμπλέκονται με τις πολύπλοκες σχέσεις φυτών και εντόμων είναι κατά βάση δευτερογενείς μεταβολίτες, με μικρό μοριακό βάρος και μεγάλη πτητικότητα (Harborne, 2014). Οι περιβαλλοντικές συνθήκες, η διαθεσιμότητα τροφής και οι θέσεις ωοτοκίας είναι ζωτικής σημασίας για την επιβίωση του εντόμου. Για τον επιτυχή εντοπισμό και επιλογή θέσεων ωοτοκίας, τα ενήλικα θηλυκά *B. oleae* βασίζονται κυρίως σε οσφρητικές ενδείξεις από τις πτητικές οργανικές ενώσεις που παράγονται από το δέντρο και κινούνται χημειοταξικά (Scarpati et al., 1996). Είτε βιοτικοί είτε αβιοτικοί παράγοντες μπορούν να τροποποιήσουν τις εκπομπές πτητικών από τις ελιές και μπορούν να αλλάξουν την ελκυστικότητά τους προς το δάκο και τους φυσικούς της εχθρούς (Giunti et al., 2020). Για παράδειγμα, μια προϋπάρχουσα προσβολή του καρπού, μπορεί να μεταβάλει την πτητική εκπομπή και μπορεί να μειώσει την ελκυστικότητα των καρπών για ταυτόχρονη ωοτοκία, μειώνοντας τον ανταγωνισμό των απογόνων κατά την ανάπτυξη της προνύμφης. Έχει τεκμηριωθεί ότι τα θηλυκά *B. oleae*, αμέσως μετά την ωοτοκία, ανασύρουν μικρά σταγονίδια χυμού ελιάς γύρω από τη θέση ωοτοκίας, αποτρέποντας άλλες θηλυκές μύγες να ωοτοκήσουν στον ίδιο καρπό.

Μια σειρά χημικών ουσιών όπως η (Z)-3-εξεν-1-όλη και η οξική (Z)-3-εξεν-1-όλη, το τολουόλιο, η αμμωνία, το στυρένιο, το αιθυλοβενζόλιο και το α-πινένιο, έχουν αποδειχθεί ως ελκυστικά του δάκου της ελιάς. Από την άλλη, υπάρχουν ουσίες όπως το (E)-2-hexenal αποτελεί ισχυρό απωθητικό του εντόμου (de Alfonso et al., 2014; Malheiro et al., 2016; Scalzo et al., 1994).

4. ΗΛΕΚΤΡΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ

Η ηλεκτροφυσιολογία είναι μια βασική μέθοδος για την γρήγορη και ημιποσοτική εκτίμηση της απόκρισης του οσφρητικού συστήματος σε εξωτερικά ερεθίσματα. Στα εξωτερικά ερεθίσματα, ανήκουν οι φερομόνες και τα διάφορα πτητικά που λαμβάνονται από τα πρωταρχικά αισθητήρια όργανα των εντόμων που είναι οι κεραίες και οι γναθικές προσακτρίδες. Στις βασικές τεχνικές, για τη μέτρηση της απόκρισης στις κεραίες εντόμων, ανήκει η ηλεκτροαντενογραφία. Η Ηλεκτροαντενογραφία είναι μια εξαιρετική τεχνική για την γρήγορη εκτίμηση της δεκτικής περιοχής της κεραίας ενός εντόμου. Το ηλεκτροαντενογράφημα (Electroantennogram, EAG) πραγματοποιείται μετρώντας την αλλαγή του ηλεκτρικού δυναμικού, μεταξύ περιφερικών και εγγύς περιοχών της κεραίας, που προκαλείται από οσφρητική διέγερση. Γενικά πιστεύεται ότι τα EAG μετρούν το άθροισμα των ηλεκτρικών δυναμικών που δημιουργούνται από ενεργοποιημένους οσφρητικούς αισθητήριους νευρώνες (olfactory sensory neurons, OSN) στην κεραία εντόμων. Οι άξονες αυτών των πρωταρχικών αισθητήριων κυττάρων εκτείνονται κατευθείαν στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα. Πιθανώς, το EAG είναι το συνολικό δυναμικό πολλών OSN που βρίσκονται σε σειρά (Kaissling, 2019; Schneider, 1962). Ο Nagai υπέθεσε περαιτέρω ότι το σήμα EAG είναι αποτέλεσμα της αρχικής γρήγορης αρνητικής πτώσης του δυναμικού που προκαλείται από τα OSN που βρίσκονται μεταξύ των ηλεκτροδίων καταγραφής και γείωσης σε συνδυασμό με το πιο αργό ηλεκτρικό δυναμικό που εξαπλώνεται από τις γειτονικές περιοχές του ηλεκτροδίου καταγραφής (Nagai, 1981). Με άλλα λόγια το δυναμικό στο EAG είναι μια σχετική μέτρηση του αριθμού των χημειοϋποδοχέων που διεγείρονται από την παρουσία μορίων οσμής. Επιπλέον, το πλάτος EAG υπόκειται σε αλλαγές ανάλογα με τη δύναμη σύνδεσης, τη ζωτικότητα των εντόμων και ακόμη και τη θέση του ηλεκτροδίου.

Παρόλο που τα EAG δείχνουν σχέση συγκέντρωσης-απόκρισης με συγκέντρωση ερεθίσματος, θα πρέπει γενικά να αντιμετωπιστεί ως ποιοτικός και όχι ποσοτικός δείκτης της οσφρητικής λήψης (Der Pers et al., 2017).

5. ΣΚΟΠΟΣ

Ο δάκος της ελιάς, όπως αναφέρθηκε εκτενώς στην εισαγωγή, αποτελεί το μεγαλύτερο εχθρό των δέντρων του είδους και επιφέρει μεγάλες απώλειες και οικονομική καταστροφή. Οι τρόποι αντιμετώπισης που έχουν δοκιμαστεί ή χρησιμοποιηθεί μέχρι σήμερα δεν είναι ικανοποιητικά αποτελεσματικοί και στην πλειονότητά τους δεν είναι φιλικό προς το περιβάλλον και τα φυτά. Κρίνεται λοιπόν αναγκαίο να δημιουργηθεί και να εφαρμοστεί στην πράξη ένας νέος τρόπος αντιμετώπισης που δε θα βλάπτει το περιβάλλον και θα επιτυγχάνει ικανοποιητικό έλεγχο του πληθυσμού των εντόμων και της διασποράς του.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία ο σκοπός ήταν να μελετηθεί αρχικά η οσφρητική απόκριση των εντόμων στις φερομόνες τους. Στη συνέχεια, να προσδιοριστεί ο τύπος της ομάδας των οσφρητικών υποδοχέων που ενεργοποιούνται κατά την όσφρηση χρησιμοποιώντας μεταλλαγμένα στελέχη για διάφορες ομάδες υποδοχέων. Επιπλέον, να αναδειχθούν τυχόν διαφορές έκφρασης μεταξύ φύλων και σταδίων ωριμότητας των εντόμων. Επιπρόσθετα, να ελεγχθεί η απόκριση μετά την πιθανότητα προσαρμογής των εντόμων στις δοσμένες οσμές έπειτα από από μακρά προέκθεση σε αυτές. Τέλος, ο απώτερος στόχος ήταν να αναδειχθεί το προφίλ των οσφρητικών υποδοχέων και η οσφρητική τους λειτουργία. Με όλα αυτά τα πειράματα θα μπορούσαμε να αποκτήσουμε μια πληρέστερη εικόνα σχετικά με το θέμα της όσφρησης στο δάκο αλλά και να καταδείξουμε ουσίες που είναι περισσότερο ελκυστικές για αυτόν και θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν στη βιολογική καταπολέμησή του.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

6. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

6.1. ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ENTOMΩN

Η καλλιέργεια και η συντήρηση πληθυσμών δάκου μέσα στο εργαστήριο είναι μια αρκετά δύσκολη και απαιτητική διαδικασία καθώς το έντομο απαιτεί ιδιαίτερο χειρισμό και συνθήκες ανάπτυξης. Στο δικό μας εργαστήριο, δεν ήταν εφικτή η υποστήριξη πληθυσμού και δεχόμασταν τα έντομα από εξωτερικούς συνεργάτες ή από τη φύση. Επομένως, τα έντομα που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα ανήκαν σε άγριους πληθυσμούς αλλά και στο εργαστηριακό στέλεχος “Democritus”. Οι άγριοι πληθυσμοί ελήφθησαν από αποικία που διατηρήθηκε στο Εργαστήριο Εντομολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, αποικίες από την Κρήτη αλλά και πληθυσμούς που συλλέχθηκαν από εμάς από ελαιοτριβεία σε Βάρη, Παλλήνη και Σαλαμίνα.

Στο εργαστήριο, οι πληθυσμοί συντηρούνταν μέχρι τη διεξαγωγή των πειραμάτων σε σταθερές συνθήκες 23 ± 2 °C, 40-60 % σχετικής υγρασίας και σταθερή φωτοπερίοδο 12 ώρες περίπου ημέρα και 12 ώρες σκοτάδι. Οι δάκοι τοποθετούνταν σε τετράγωνα διαφανή πλαστικά κλουβιά (plexiglass) διαστάσεων 20 x 20 x 20 cm, που διέθεταν τη μία πλευρά με σίτα προκειμένου να αερίζονται τα έντομα. Εντός των κλουβιών, υπήρχε συνεχής τροφοδοσία με ζαχαρόνερο σε μικρά πλαστικά μπουκαλάκια με εμποτισμένο ύφασμα (τύπου vetex), που ανανεωνόταν αρκετά συχνά.



Εικόνα 21. Κουτί φύλαξης plexiglass.

6.2. ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΟΣΜΩΝ

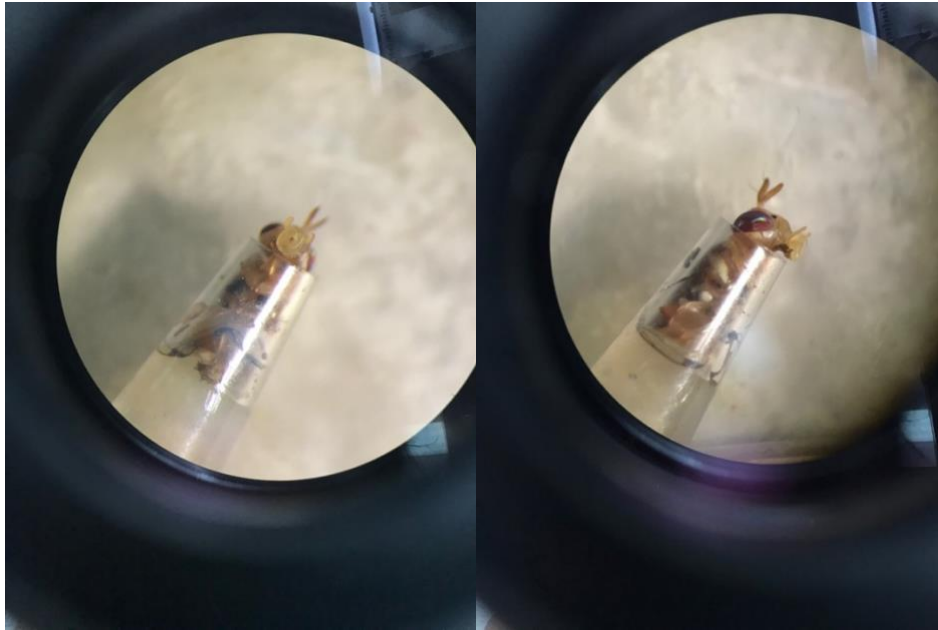
Οι οσμές που χρησιμοποιήθηκαν σε όλα τα πειράματα προμηθεύτηκαν από την Ελληνική Χημική και Γεωργική Βιομηχανία ΒΙΟΡΥΛ Α.Ε. και ήταν σε ποσοστό 99 % καθαρές.

6.3. ΗΛΕΚΤΡΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ

Η ηλεκτροφυσιολογική τεχνική καταγραφής που χρησιμοποιήθηκε είναι το Ηλεκτροαντενογράφημα (Electroantennogram, EAG). Στην τεχνική αυτή, χρησιμοποιούνται γυάλινα μικροηλεκτρόδια διατομής 0,75 mm, τα οποία κόβονται με puller P-1000 (Sutter Instruments) προκειμένου να έχουν το επιθυμητό μέγεθος μυτερής άκρης για τις καταγραφές. Κάθε γυάλινο ηλεκτρόδιο περιέχει τριχοειδή προκειμένου να διαποτιστεί με διάλυμα χλωριούχου Νατρίου (NaCl) για τη μέτρηση του δυναμικού του αντίστοιχου σήματος.

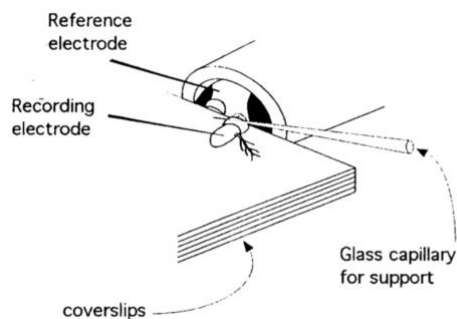
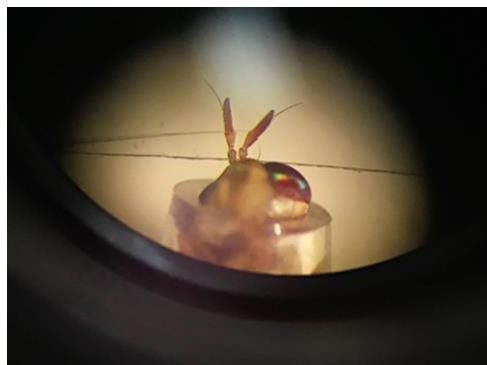
Εξοκυτάρειες ηλεκτροφυσιολογικές καταγραφές

Το έντομο τοποθετήθηκε μέσα στο άκρο ενός πλαστικού τιπ πιπέτας 20-200 μl μέσω ενός αναρροφητήρα στόματος με το κεφάλι προς το μικρό άκρο. Το άκρο του τιπ κόπηκε στη συνέχεια στο μπροστινό μυτερό άκρο, προκειμένου να εκτεθεί η πρόσθια όψη του κεφαλιού του εντόμου εκτός τιπ, εκθέτοντας έτσι τις κεραίες του. Στη συνέχεια έγινε μια δεύτερη τομή στην άλλη άκρη του τιπ, σχετικά 1-2 mm από την κοιλιά του ζώου, ενώ του ασκείται μικρή πίεση με τον αναρροφητήρα. Προκειμένου να μείνει το έντομο στερεωμένο μέσα στο τιπ και να μην βγει οπισθοχωρώντας από το τιπ τοποθετήθηκε μικρή ποσότητα κεριού στην κάτω κομμένη άκρη του τιπ. Το άκρο του τιπ στη συνέχεια στερεώθηκε οριζόντια σε μια αντικειμενοφόρο πλάκα μικροσκοπίου με κερί, έτσι ώστε το κεφάλι του ακινητοποιημένου εντόμου να κοιτάζει προς τα πάνω. Το κεφάλι ακουμπά πάνω σε ανυψωμένη με κερί καλυπτρίδα και η μία κεραία σταθεροποιήθηκε με έναν γυάλινο τριχοειδές σωληνάκι. Η αντικειμενοφόρος πλάκα τοποθετείται σε μικροσκόπιο ανατομής Olympus SZX16 που βρίσκεται σε ένα τραπέζι-κλωβό απορρόφησης κραδασμών.

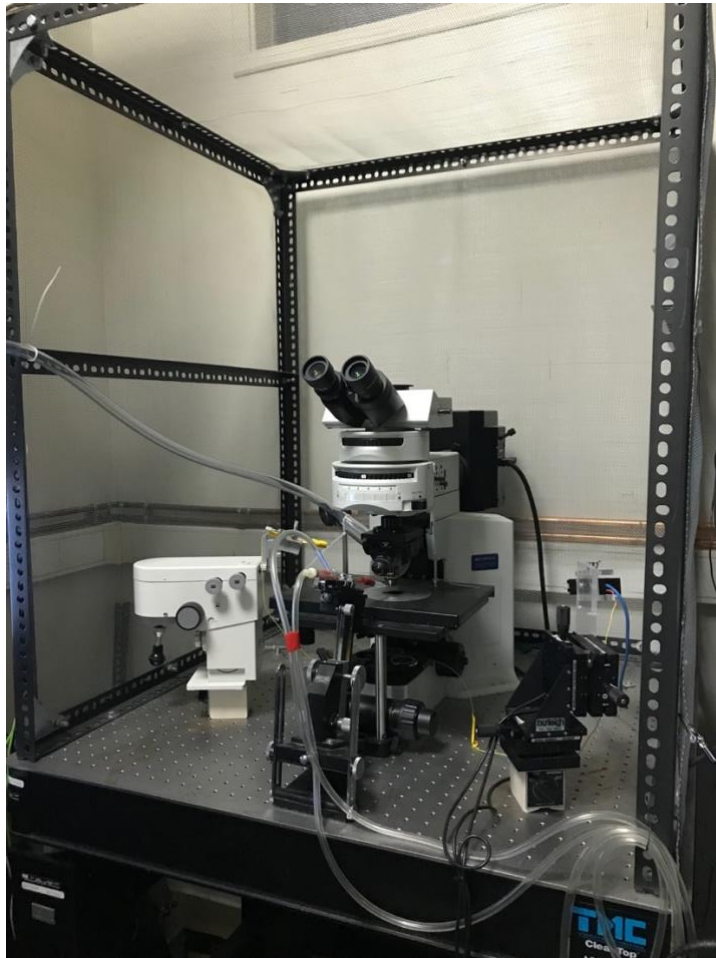


Εικόνα 22. Εικόνες ακινητοποιημένων εντόμων στο άκρο πλαστικού τιπ κάτω από το στερεοσκόπιο.

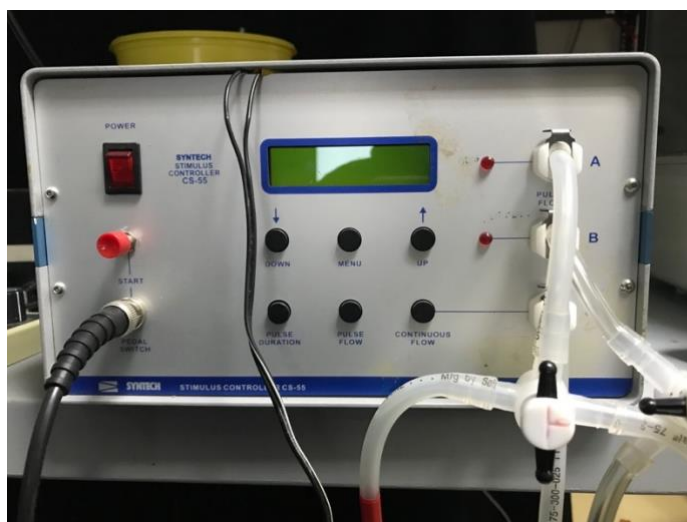
Χρησιμοποιήθηκαν γυάλινα ηλεκτρόδια καταγραφής και γείωσης με νήμα τα οποία εμποτίζονταν με 0,17M NaCl. Το ηλεκτρόδιο καταγραφής τοποθετούνταν σε επαφή με το τρίτο τμήμα της κεραίας (το τμήμα οσφρητικών νευρώνων) και η γείωση στο μάτι του εντόμου.



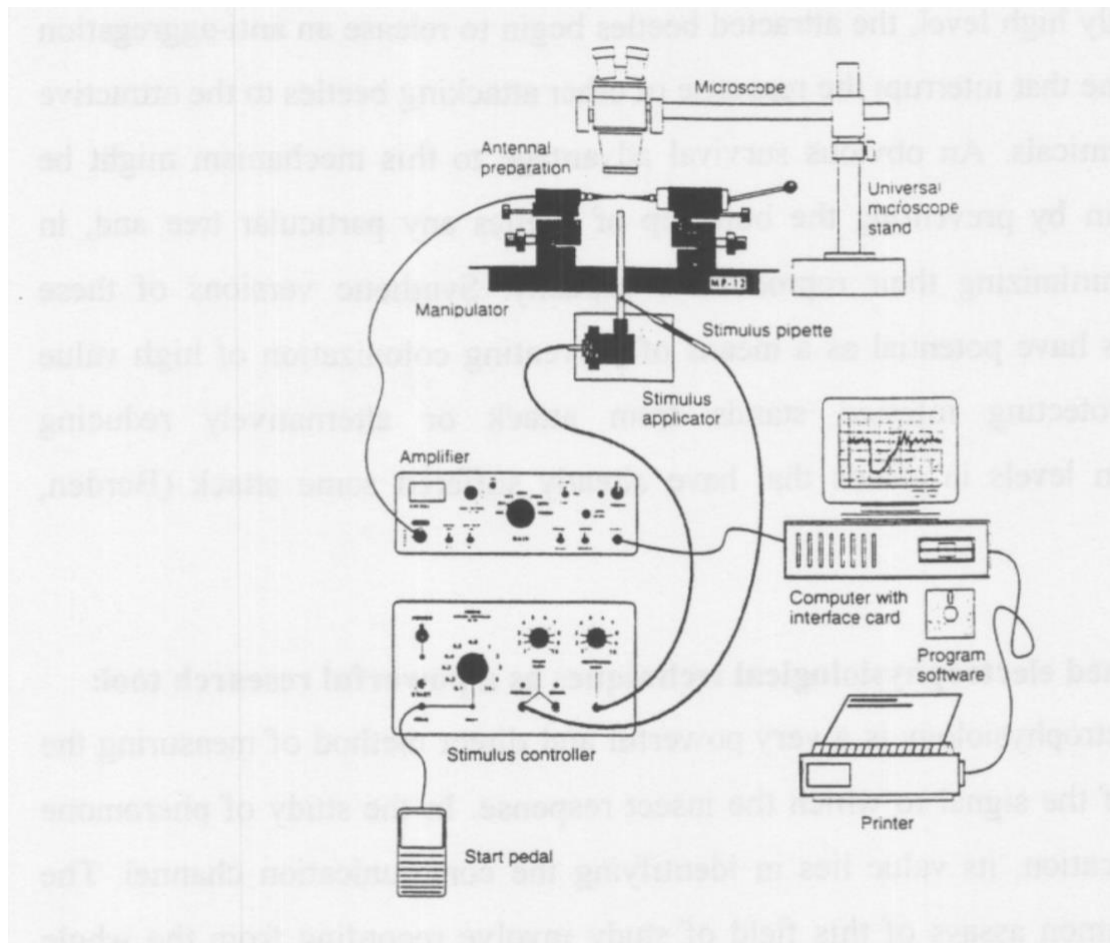
Εικόνα 23. Εικόνα εντόμου τοποθετημένο σε καλυπτρίδα με το γυαλάκι που συγκρατεί την κεραία (Πηγή: *Odorant response of individual sensilla on the Drosophila antenna* PETER CLYNE 1, ALAN GRANT 2, ROBERT O'CONNELL 2, and JOHN R. CARLSON 1



Εικόνα 24. Βασικός εξοπλισμός (setup) ηλεκτροφυσιολογίας που χρησιμοποιήθηκε για τις καταγραφές: αντικραδασμικό τραπέζι, κλωβός Faraday, μικροσκόπιο φθορισμού, μικροχειριστές, τμήμα αντλίας.



Εικόνα 25. Αντλία (stimuler) Stimulus Controller CS-55, Syntech

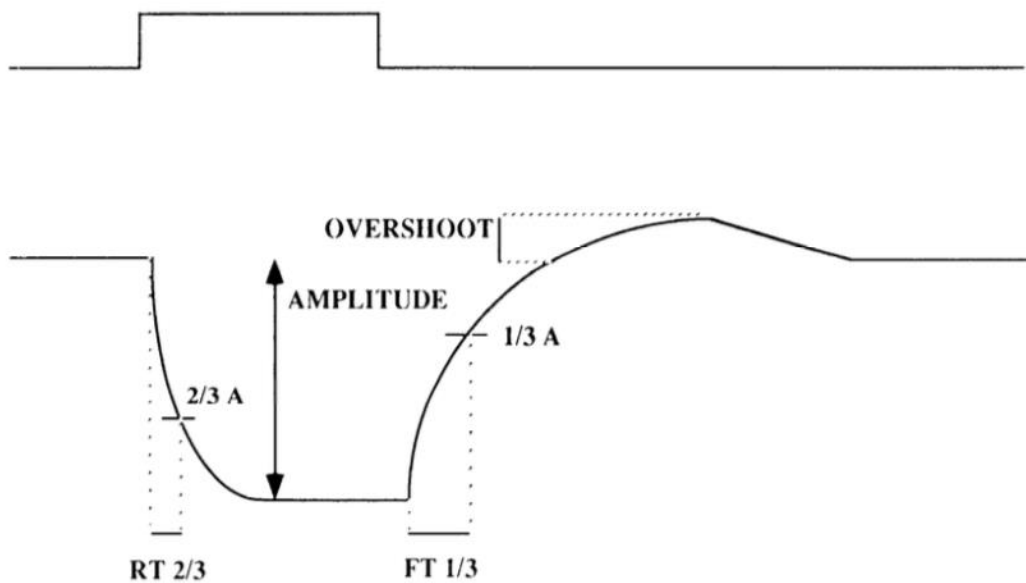


Εικόνα 26. Ενδεικτική απεικόνιση εξοπλισμού για πείραμα ηλεκτροαντενογράμματος.
 (Πηγή: *Electroantennogram technique for rapid and convenient screening procedure as a new approach for the red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus*, semiochemicals* By Mohamed Atif Daoud Dept. of Plant Protection, Fac. Agric., Ain Shams Univ., Cairo, Egypt)

Μόλις είχε επιτευχθεί μια σταθερή βασική γραμμή στο EAG που έδειχνε ότι έχουν σταθεροποιηθεί τα ηλεκτρόδια ξεκινούσε το πείραμα. Καθ' όλη τη διάρκεια της καταγραφής, το έντομο βρισκόταν σε συνεχή ροή αέρα. Το ρεύμα αέρα περιείχε αέρα φιλτραρισμένο με κάρβουνο και υγραμένο με φυσαλίδες μέσω απεσταγμένου νερού με ροή 1,0 L/min. Η συνεχής ροή αέρα καθώς και το οσφρητικό ερέθισμα (ρυθμό ροής 0,5 L/min) εφαρμόστηκαν χρησιμοποιώντας μια αντλία (stimuler: Stimulus Controller CS-55, Syntech). Το ερέθισμα μεταφέρθηκε σε συνεχή ροή αέρα και ανταλλάχθηκε με καθαρό αέρα αυτόματα για να αποφευχθεί η μηχανική διέγερση των κεραιών. Το ρεύμα αέρα κατευθύνθηκε κατά το έντομο μέσω ενός πλαστικού σωλήνα. Ο σωλήνας στερεώθηκε στη θέση του έτσι ώστε η έξοδος του να απέχει 1 εκατοστό από το έντομο κατά την καταγραφή.

Κάθε οσμή χρησιμοποιήθηκε σε διάλυμα Μυριστικού Ισοπροπυλίου (Isopropyl myristate, IPM, Sigma-Aldrich) σε τρεις αραιώσεις 10^{-3} , 10^{-2} , 10^{-1} . Από κάθε διάλυμα

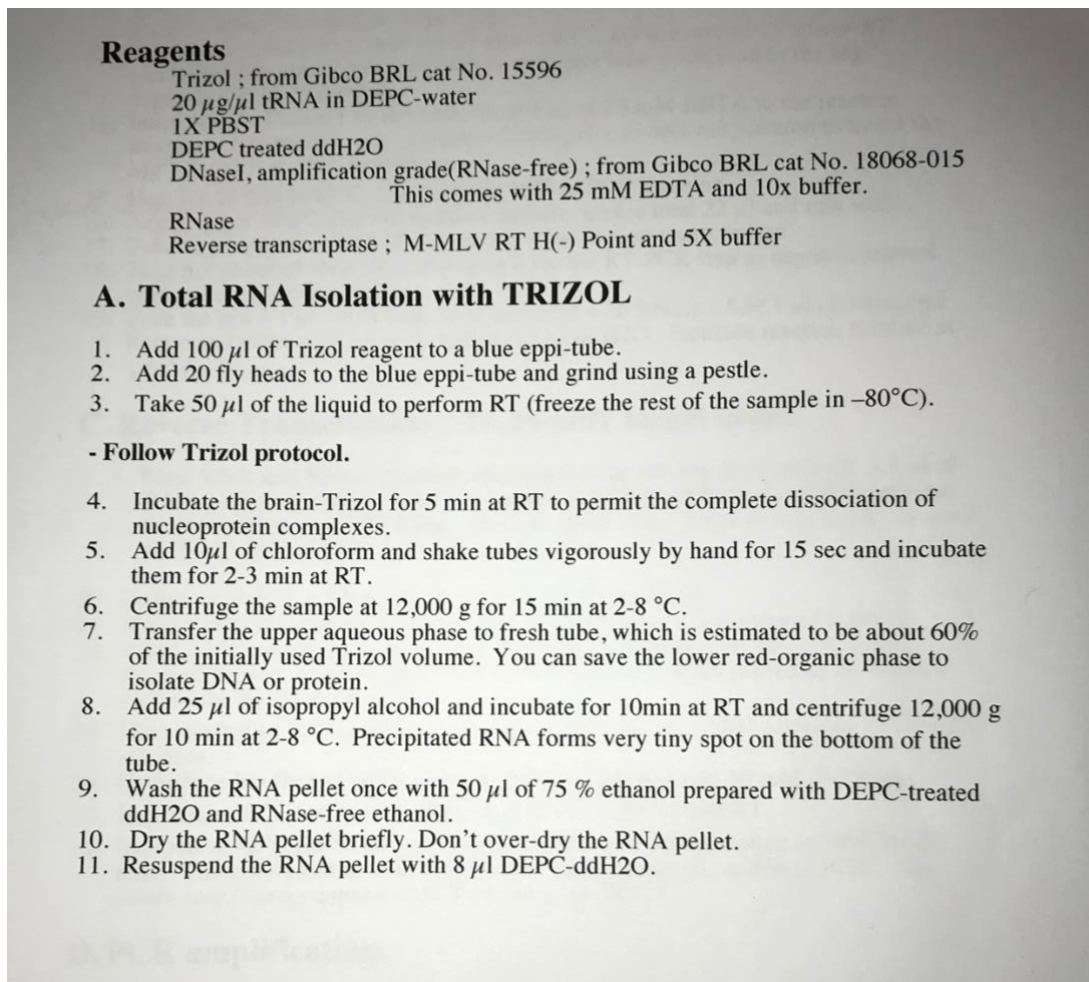
χρησιμοποιήθηκε ποσότητα 20 μL για να εμποτιστεί μικρό κομμάτι διηθητικού χαρτιού διαστάσεων 5 x 0,3 cm (Whatman, GE Healthcare). Το εμποτισμένο χαρτί τοποθετήθηκε στο μεγάλο άκρο μιας γυάλινης πιπέτας Pasteur, ενώ το μικρό άκρο της πιπέτας εισήχθη στην οπή του σωλήνα ροής αέρα. Το οσφρητικό ερέθισμα είχε διάρκεια 1 δευτερόλεπτο και τα ερεθίσματα είχαν μεταξύ τους χρονική απόσταση περίπου 20 δευτερόλεπτα. Το καταγεγραμμένο σήμα ενισχύθηκε μέσω ενός ενισχυτή DC (MultiClamp 700B, Molecular Devices) και μέσω ενός μετατροπέα 16-bit Analogue-to-Digital (Digidata 1440A, Molecular Devices). Τέλος, οι καταγραφές αποθηκεύτηκαν στον υπολογιστή και η ανάλυσή τους πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα PCLAMP 10.3.



Εικόνα 27. Σχηματική καμπύλη EAG στην οποία διακρίνεται το πλάτος απόκρισης-amplitude.
(Πηγή: Characterization of the electroantennogram in *Drosophila melanogaster* and its use for identifying olfactory capture and transduction mutants E. Alcorta *J Neurophysiol* 65:702-714, 1991.)

- Real Time PCR- Μοριακό προφίλ

Η διαδικασία περιελάμβανε 1 ώρα έκθεση των εντόμων σε 20μl κάθε οσμής. Κάθε έντομο τοποθετούνταν ατομικά σε ξεχωριστό μπουκαλάκι μαζί με ένα εμποτισμένο με οσμή μακρόστενο χαρτί (5 x 3mm). Στη συνέχεια, με το πέρας της μιας ώρας κάθε έντομο ελεγχόταν με EAG για να επιβεβαιωθεί ότι δίνει κάποια απόκριση στην οσμή. Με γρήγορους χειρισμούς συλλέγονταν οι κεραίες των εντόμων κατευθείαν σε διάλυμα TRIZOL που είχε διαμοιραστεί σε μικρά eppendorfs σε πάγο αυστηρά. Τα δείγματα τοποθετούνταν σε κατάψυξη στους -20 °C. Την ίδια βδομάδα γινόταν η περαιτέρω επεξεργασία των κατεψυγμένων δειγμάτων. Μετά το προσεκτικό ξεπάγωμα των eppendorfs πραγματοποιούνταν χειροκίνητη εξαγωγή (extraction) Rna από τις κεραίες των εντόμων. Το πρωτόκολλο φαίνεται αναλυτικά παρακάτω.



Reagents
Trizol ; from Gibco BRL cat No. 15596
20 μg/μl tRNA in DEPC-water
1X PBST
DEPC treated ddH2O
DNaseI, amplification grade(RNase-free) ; from Gibco BRL cat No. 18068-015
This comes with 25 mM EDTA and 10x buffer.
RNase
Reverse transcriptase ; M-MLV RT H(-) Point and 5X buffer

A. Total RNA Isolation with TRIZOL

1. Add 100 μl of Trizol reagent to a blue eppi-tube.
2. Add 20 fly heads to the blue eppi-tube and grind using a pestle.
3. Take 50 μl of the liquid to perform RT (freeze the rest of the sample in -80°C).

- Follow Trizol protocol.

4. Incubate the brain-Trizol for 5 min at RT to permit the complete dissociation of nucleoprotein complexes.
5. Add 10μl of chloroform and shake tubes vigorously by hand for 15 sec and incubate them for 2-3 min at RT.
6. Centrifuge the sample at 12,000 g for 15 min at 2-8 °C.
7. Transfer the upper aqueous phase to fresh tube, which is estimated to be about 60% of the initially used Trizol volume. You can save the lower red-organic phase to isolate DNA or protein.
8. Add 25 μl of isopropyl alcohol and incubate for 10min at RT and centrifuge 12,000 g for 10 min at 2-8 °C. Precipitated RNA forms very tiny spot on the bottom of the tube.
9. Wash the RNA pellet once with 50 μl of 75 % ethanol prepared with DEPC-treated ddH2O and RNase-free ethanol.
10. Dry the RNA pellet briefly. Don't over-dry the RNA pellet.
11. Resuspend the RNA pellet with 8 μl DEPC-ddH2O.

Μετά την εξαγωγή ακολουθούσε μια διαδικασία καθαρισμού του υλικού από περιττές προσμίξεις και το αποστέλλαμε στο συνεργαζόμενο εργαστήριο του κ. Μαθιόπουλου στο Τμήμα Βιοχημείας και βιοτεχνολογίας στη Λάρισα, προκειμένου να διεξαχθούν

εκεί τα πειράματα της Real Time PCR. Σκοπός ήταν η σύγκριση με 3 υποδοχείς ORs (317,330,520) του δάκου, ομόλογους με τον υποδοχέα OR67d της *Drosophila melanogaster*. Ο OR67d ανιχνεύει στη *D. mel* τη φερομόνη cVA, η οποία έχει παρόμοια δομή με τη Muscalure.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

7. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ ΗΛΕΚΤΡΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ

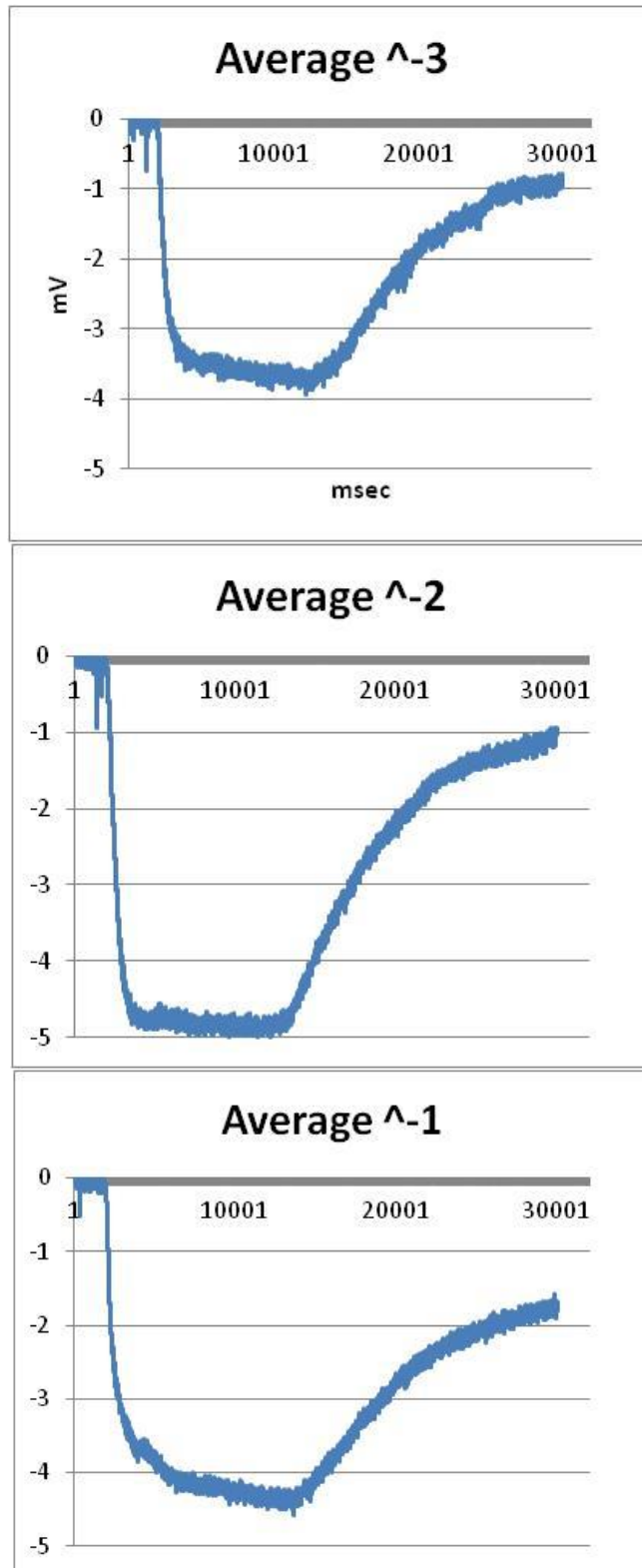
Σε όλα τα πειράματα έχουν χρησιμοποιηθεί αναπαραγωγικά ώριμα έντομα, δηλαδή μεγαλύτερα των 5 ημερών για το εργαστηριακό στέλεχος και μεγαλύτερα των 7 για τα έντομα αγρίου τύπου. Η επιλογή αυτή βασίστηκε σε δικά μας πειράματα που έδειχναν μεγαλύτερη απόκριση σε έντομα που είχαν ωριμάσει αναπαραγωγικά.

7.1. ΒΕΛΤΙΣΤΕΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ ΟΣΜΩΝ

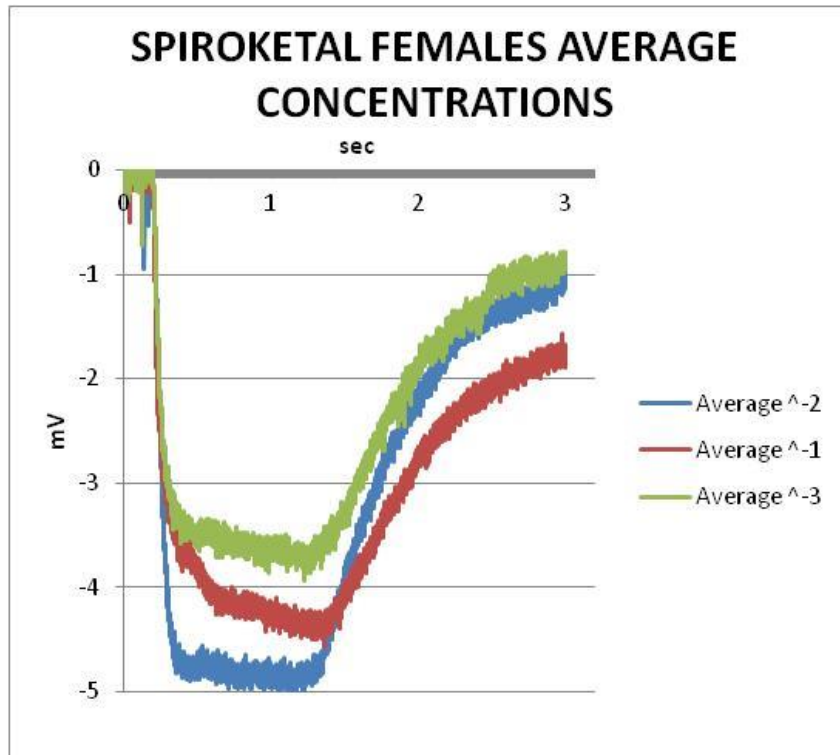
Οι οσμές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η 1,7-dioxaspiro[5.5]undecane (spiroketal) και η Z-(9)-tricosene (muscalure). Σε πρώτο στάδιο έγινε έλεγχος μεταξύ των συγκεντρώσεων κάθε οσμής προκειμένου να αναδειχθεί σε ποια από αυτές έχουν βέλτιστη απόκριση τα έντομα. Οι συγκεντρώσεις που δοκιμάστηκαν είναι 0.0001% [συγκέντρωση], 0.001% [συγκέντρωση 10^{-2}], 0.01% [συγκέντρωση 10^{-1}] κατ' όγκον (v/v %). Όλα τα δεδομένα ελέγχθηκαν με τη στατιστική μέθοδο του t-test. Σε κάθε μια από τις τέσσερις κατηγορίες χρησιμοποιήθηκαν από 10 έντομα και για τις τρεις συγκεντρώσεις. Επιπλέον, σε κάθε περίπτωση παρουσιάζεται ο μέσος όρος των αποκρίσεων των εντόμων (average trace). Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές επισημαίνονται με αστερίσκο (*).

Ξεκινώντας, παρουσιάζονται ξεχωριστά τα διαγράμματα των μέσων αποκρίσεων (average) για κάθε συγκέντρωση (10^{-3} , 10^{-2} , 10^{-1}) (Διάγραμμα 1.). Έπειτα παρουσιάζεται ένα συγκριτικό γράφημα για τις τρεις συγκεντρώσεις, στο οποίο κάθε συγκέντρωση αποτυπώνεται με διαφορετικό χρώμα (Διάγραμμα 2.). Τέλος, παρουσιάζεται ένα συγκριτικό γράφημα σχετικά με το πλάτος της απόκρισης στο οποίο έχει συνυπολογιστεί στατιστικό t-test για να ελεγχθεί αν οι διαφορές στην απόκριση είναι στατιστικά σημαντικές (Διάγραμμα 3., Πίνακας 1.).

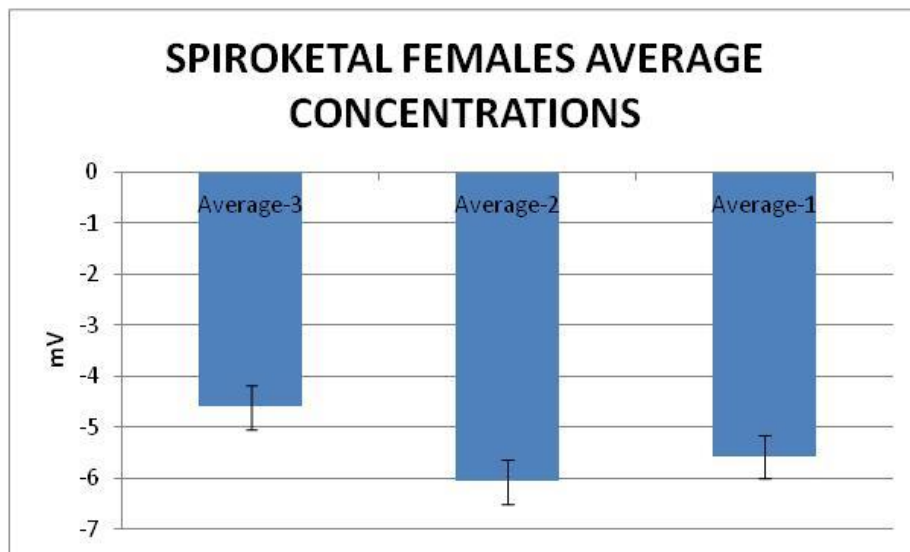
Παρατηρώντας όλα τα διαγράμματα παρακάτω, η Spiroketal φαίνεται να μην εμφανίζει στατιστικά σημαντική διαφορά στην απόκριση των θηλυκών στις 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις.



Διάγραμμα 1. Μέσες αποκρίσεις για κάθε συγκέντρωση spiroketal σε θηλυκά έντομα.



Διάγραμμα 2. Συγκριτικό Διάγραμμα αποκρίσεων όλων των συγκεντρώσεων.

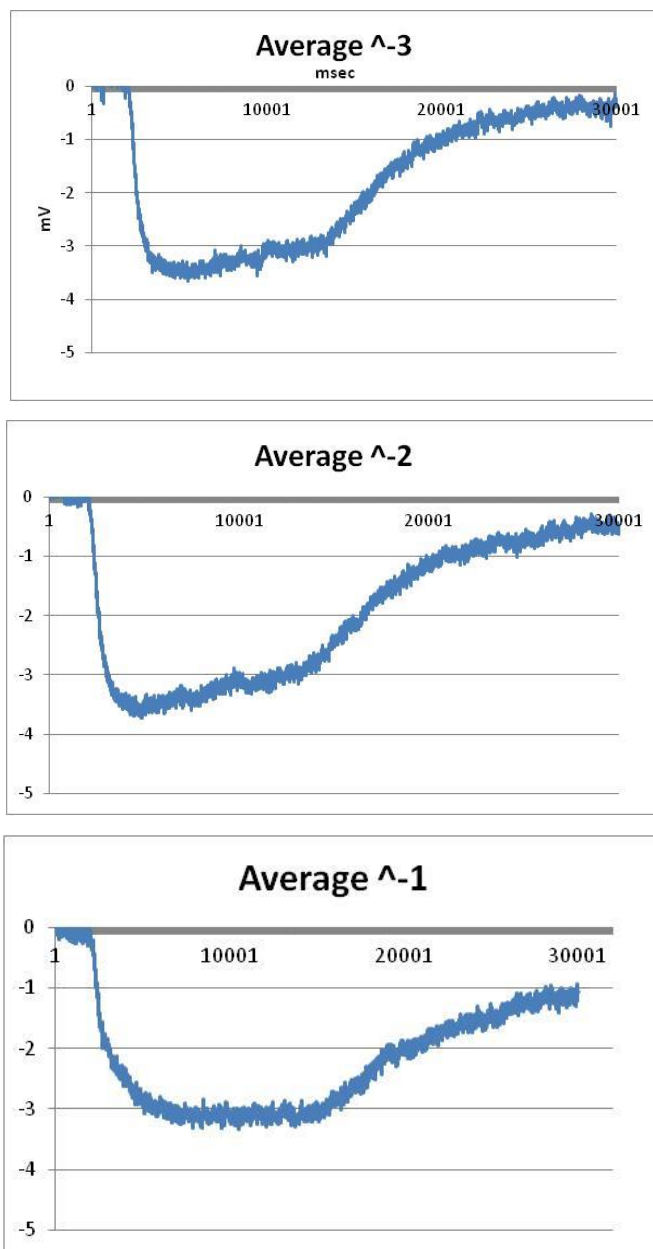


Διάγραμμα 3. Συγκριτικό διάγραμμα πλάτους απόκρισης για κάθε συγκέντρωση.

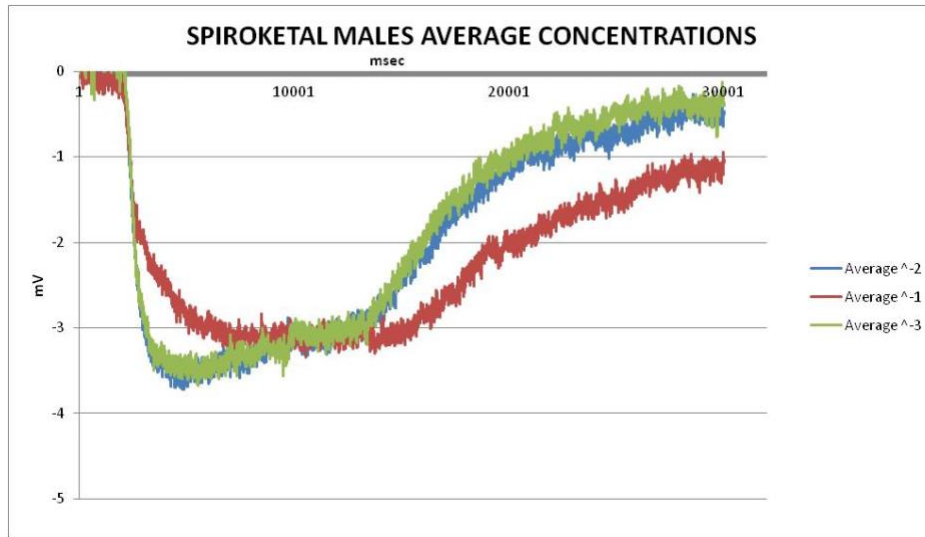
Πίνακας 1. T-TEST για συγκεντρώσεις Spiroketal σε θηλυκά

Συγκεντρώσεις	Τιμές (p value)
10^{-3} - 10^{-2}	0.113457828
10^{-3} - 10^{-1}	0.265586355
10^{-2} - 10^{-1}	0.470714417

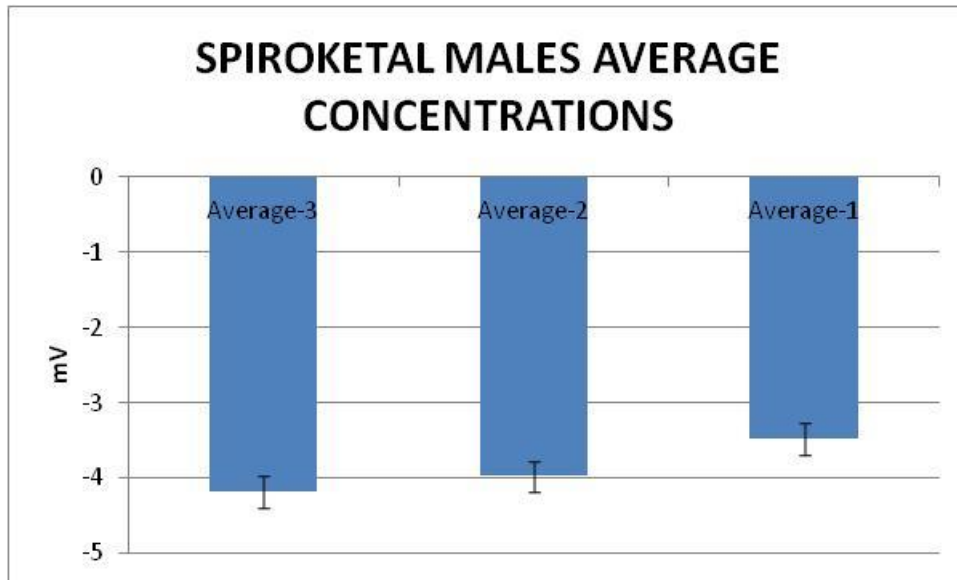
Αντίστοιχα με τα θηλυκά, έτσι και τα αρσενικά εμφανίζουν παρόμοια απόκριση στις διαφορετικές συγκεντρώσεις Spiroketal.



Διάγραμμα 4. Μέσες αποκρίσεις για κάθε συγκέντρωση spiroketal σε αρσενικά έντομα.



Διάγραμμα 5. Συγκριτικό Διάγραμμα αποκρίσεων όλων των συγκεντρώσεων.

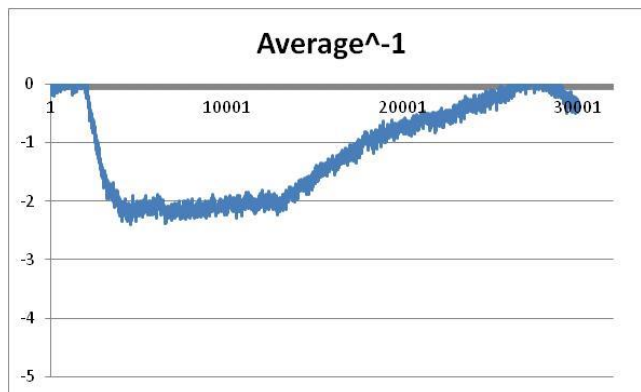
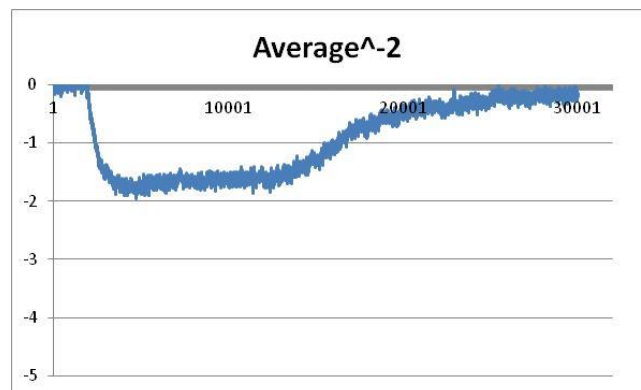
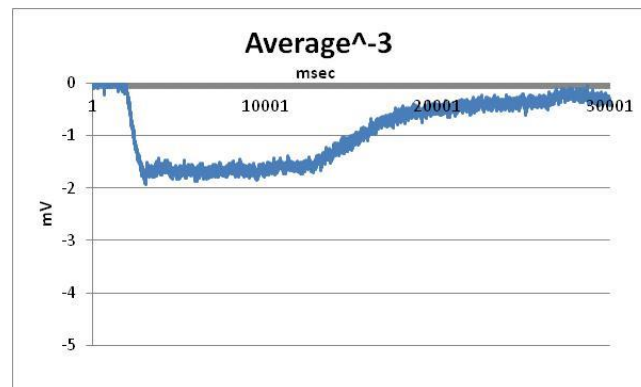


Διάγραμμα 6. Συγκριτικό διάγραμμα πλάτους απόκρισης για κάθε συγκέντρωση.

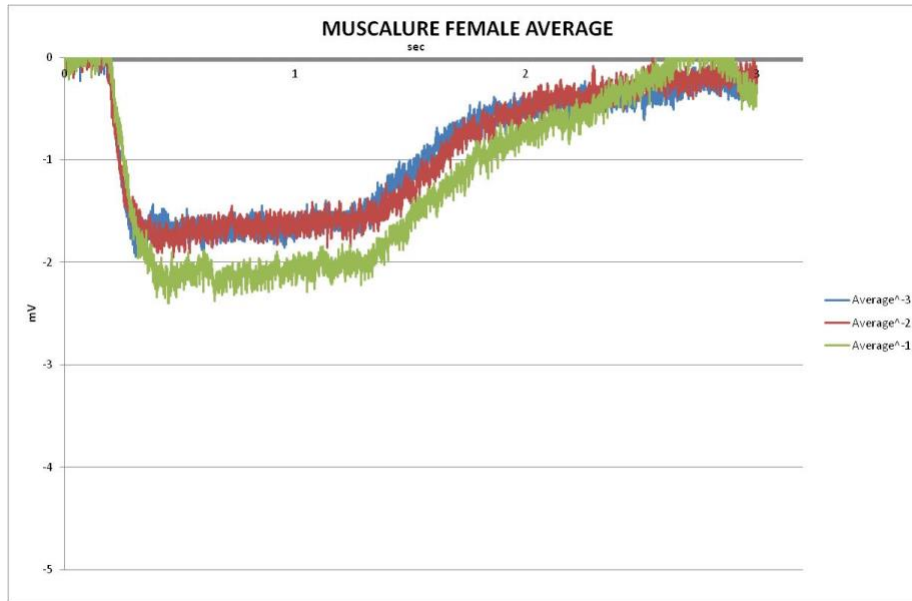
Πίνακας 2. T-TEST για συγκεντρώσεις Spiroketal σε αρσενικά

Συγκεντρώσεις	Τιμές (p value)
10^{-3} - 10^{-2}	0.4902
10^{-3} - 10^{-1}	0.369157
10^{-2} - 10^{-1}	0.586458

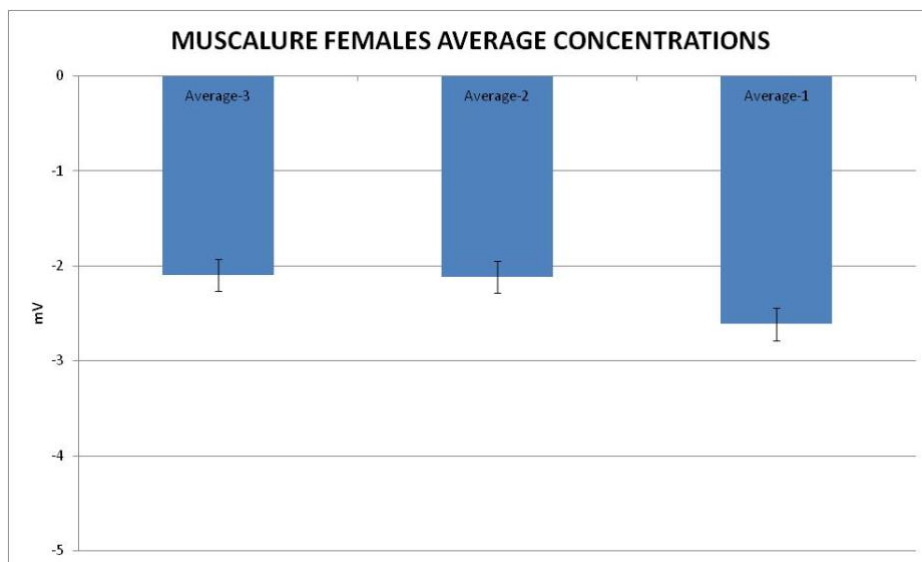
Στην περίπτωση της Muscalure, τα θηλυκά εμφανίζουν παρεμφερή απόκριση στις διαφορετικές συγκεντρώσεις.



Διάγραμμα 7. Μέσες αποκρίσεις για κάθε συγκέντρωση muscalure σε θηλυκά έντομα.



Διάγραμμα 8. Συγκριτικό Διάγραμμα αποκρίσεων όλων των συγκεντρώσεων.

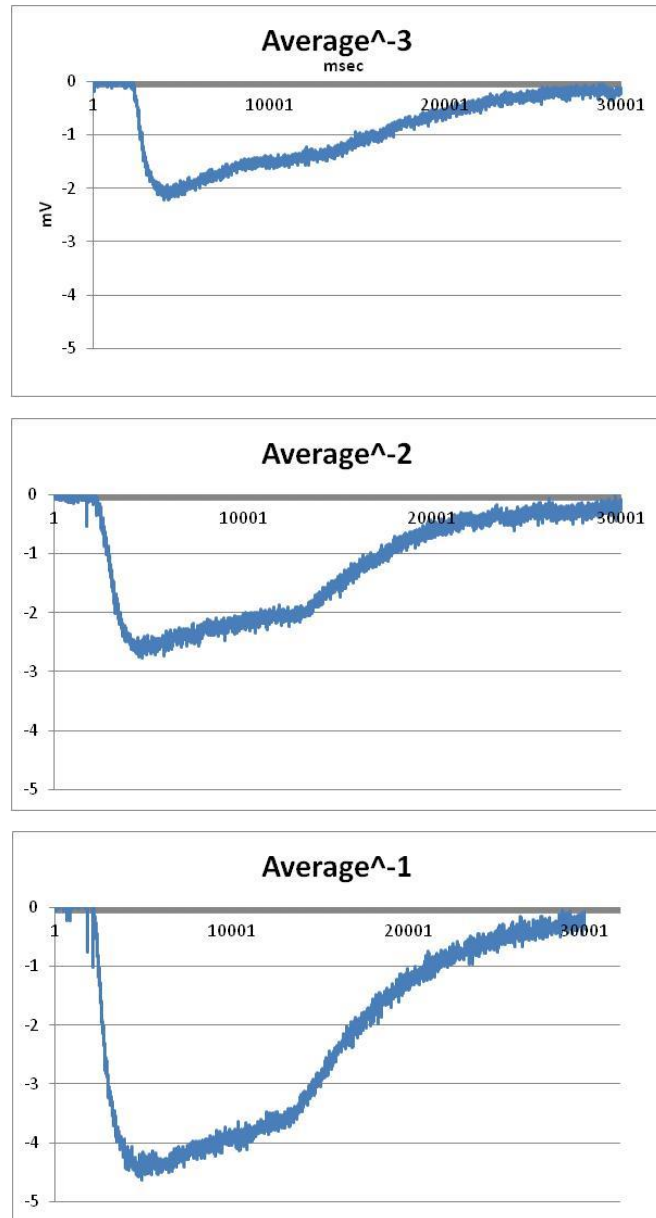


Διάγραμμα 9. Συγκριτικό διάγραμμα πλάτους απόκρισης για κάθε συγκέντρωση.

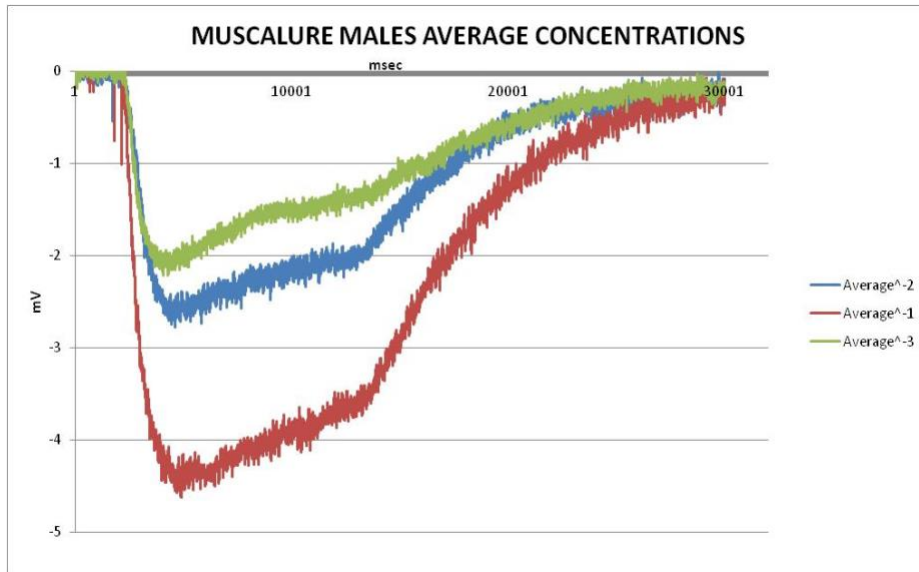
Πίνακας 3. T-TEST για συγκεντρώσεις Muscalure σε θηλυκά.

Συγκεντρώσεις	Τιμές (p value)
10^{-3} - 10^{-2}	0.95078
10^{-3} - 10^{-1}	0.5583
10^{-2} - 10^{-1}	0.5955

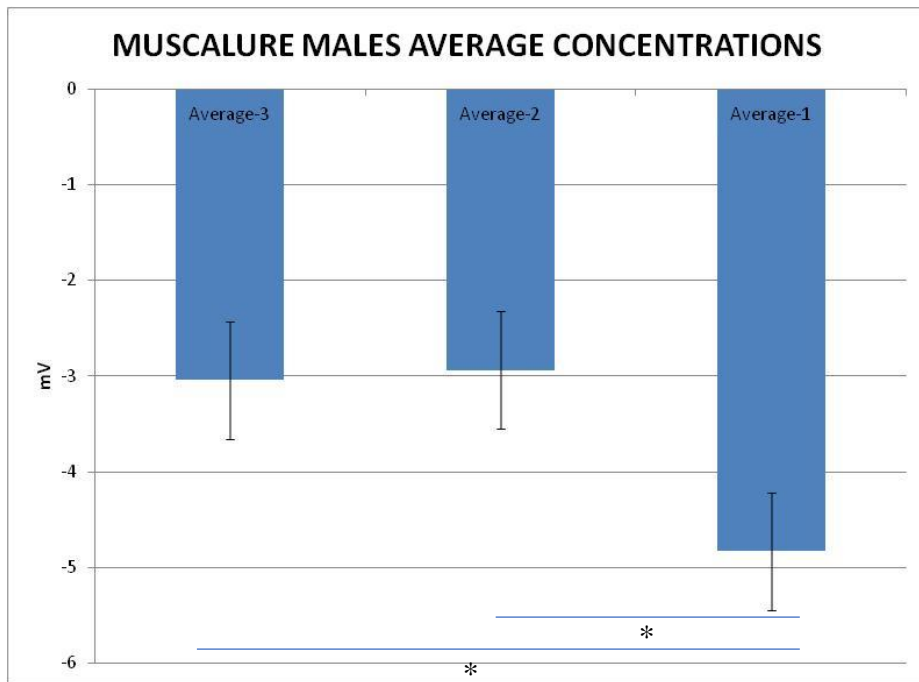
Σε αντίθεση με όλα τα υπόλοιπα δεδομένα, παρατηρείται ότι τα αρσενικά έντομα παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά στην απόκριση μεταξύ των συγκεντρώσεων Muscalure. Φαίνεται ότι η συγκέντρωση 10^{-1} Muscalure σε IPM δίνει πολύ μεγαλύτερη απόκριση πλάτους 4mV.



Διάγραμμα 10. Μέσες αποκρίσεις για κάθε συγκέντρωση muscalure σε αρσενικά έντομα.



Διάγραμμα 11. Συγκριτικό Διάγραμμα αποκρίσεων όλων των συγκεντρώσεων.



Διάγραμμα 12. Συγκριτικό διάγραμμα πλάτους απόκρισης για κάθε συγκέντρωση.

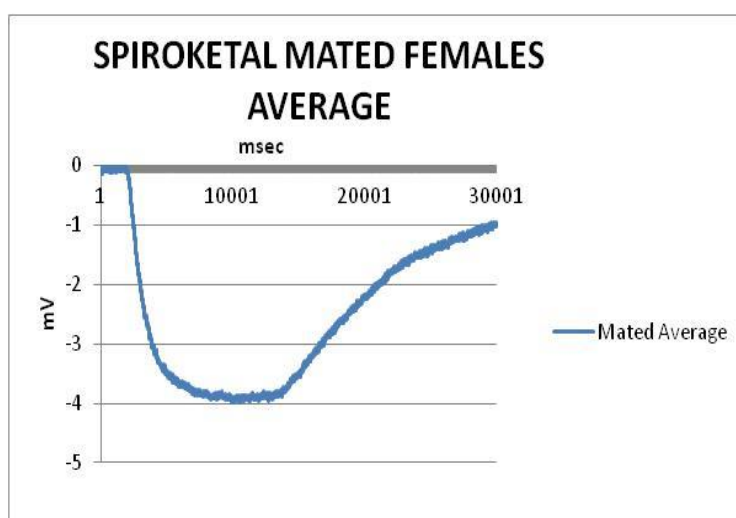
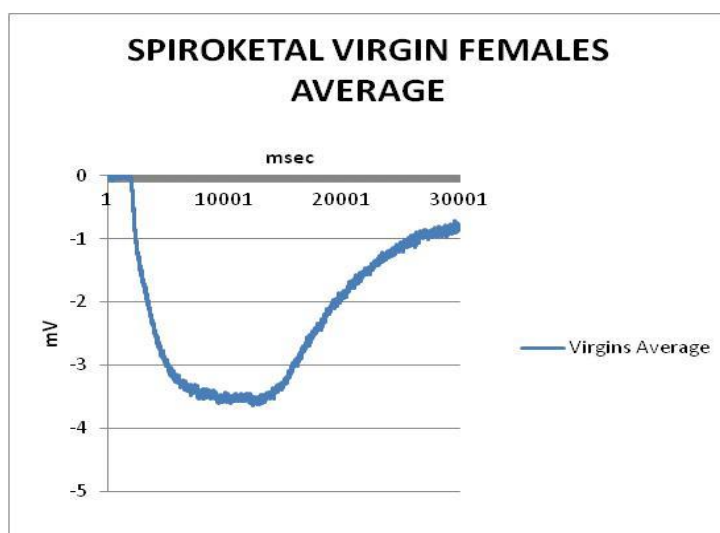
Πίνακας 4. T-TEST για συγκεντρώσεις Muscalure σε αρσενικά.

Συγκεντρώσεις	Τιμές (p value)
10^{-3} - 10^{-2}	0.89328
10^{-3} - 10^{-1}	0.02099*
10^{-2} - 10^{-1}	0.02424*

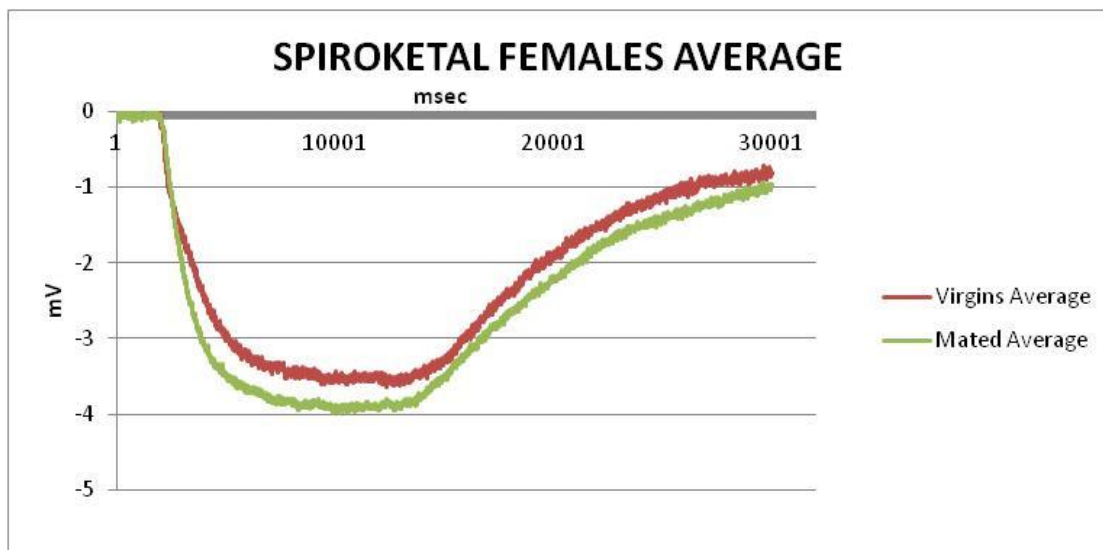
7.2. ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΠΑΡΘΕΝΩΝ ΚΑΙ ΖΕΥΓΑΡΩΜΕΝΩΝ ΕΝΤΟΜΩΝ

Σε επόμενο στάδιο, και αφού ελέγχθηκαν οι βέλτιστες συγκεντρώσεις πραγματοποιήθηκαν πειράματα απόκρισης στις οσμές ανάμεσα σε παρθένα (virgin) και ζευγαρωμένα (mated) ώριμα έντομα.

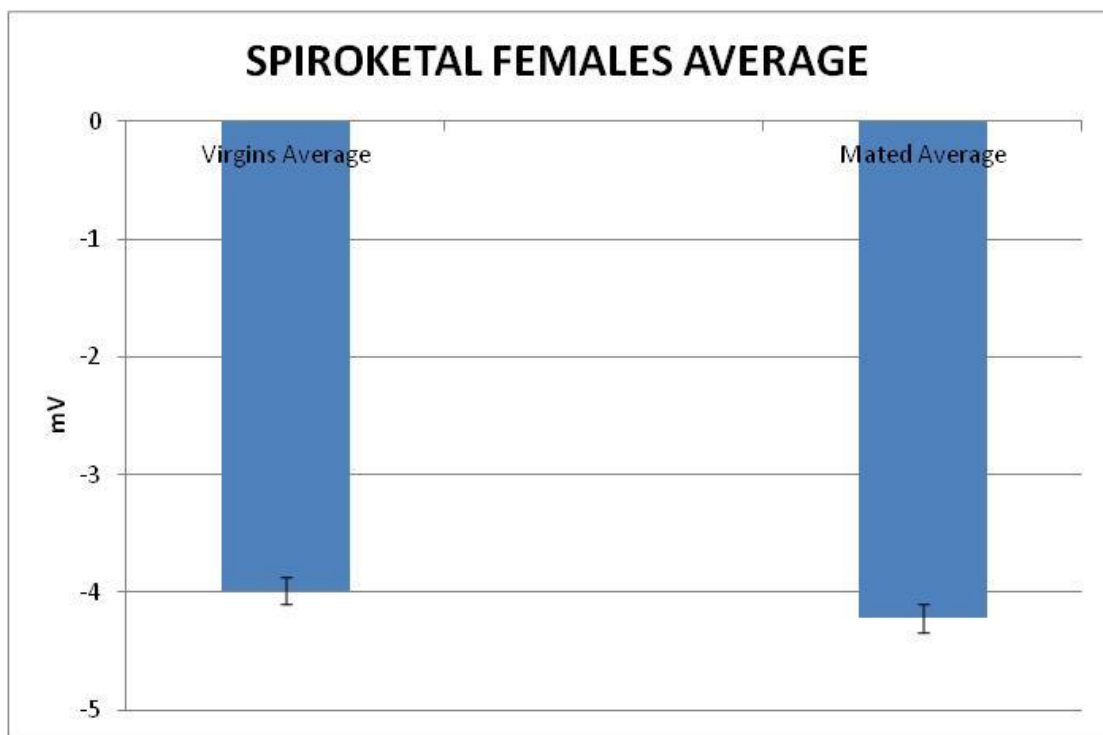
Αρχικά, η έκθεση ώριμων, παρθένων και ζευγαρωμένων θηλυκών εντόμων στη Spiroketal δεν έδειξε καμία σημαντική διαφορά στην απόκριση. Τα δεδομένα συλλέχθηκαν από πειράματα 53 εντόμων. Ο έλεγχος t-test για αυτή τη δοκιμασία ήταν 0.37199, δηλαδή, μη στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα.



Διάγραμμα 13. Μέσες αποκρίσεις ξεχωριστά για παρθένα και ζευγαρωμένα θηλυκά έντομα σε spiroketal.

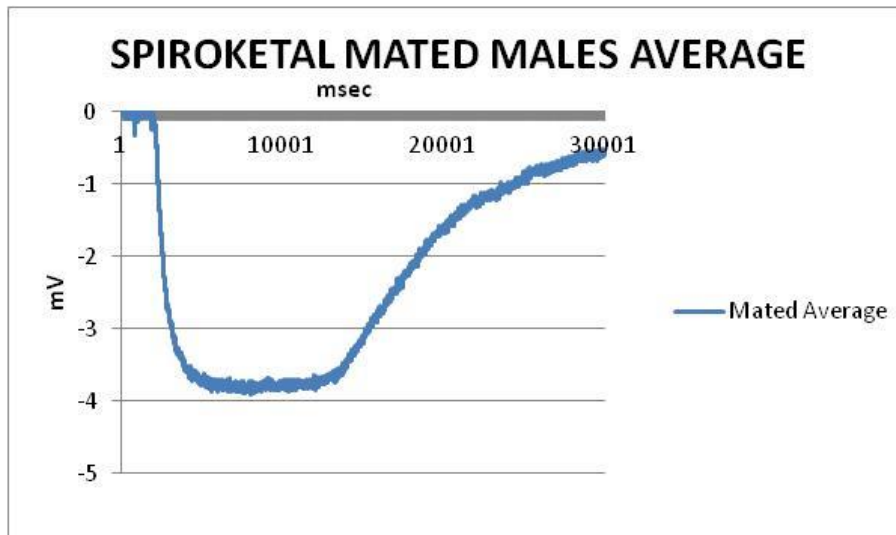
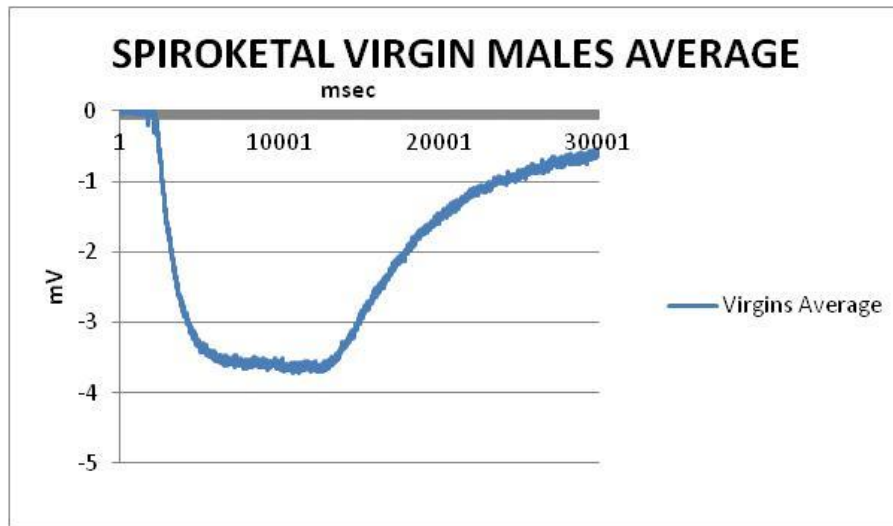


Διάγραμμα 14. Συγκριτικό διάγραμμα απόκρισης παρθένων-ζευγαρωμένων θηλυκών σε *spiroketal*.

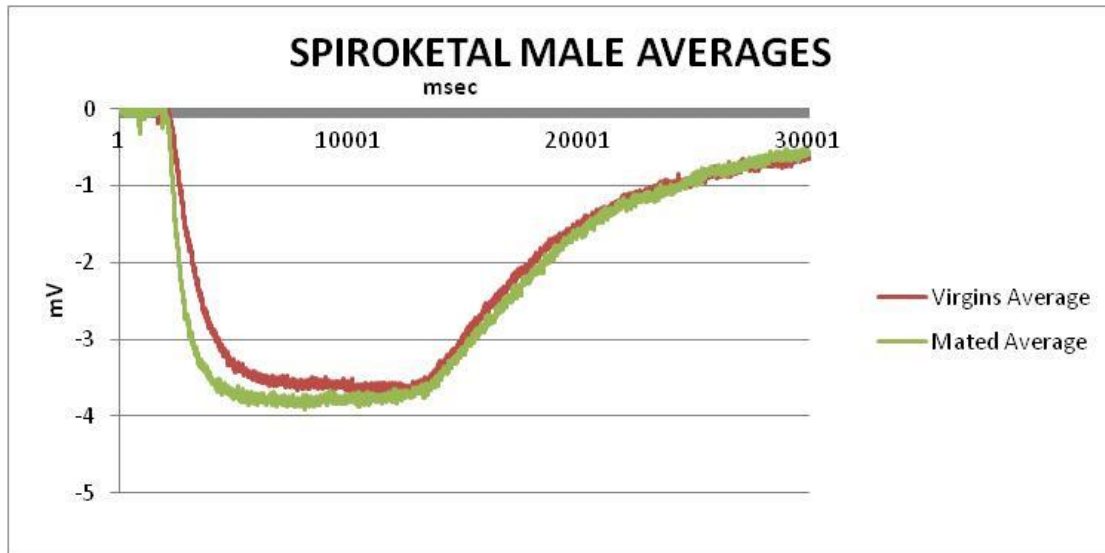


Διάγραμμα 15. Σύγκριση πλάτους αποκρίσεων παρθένων ζευγαρωμένων θηλυκών σε *spiroketal*.

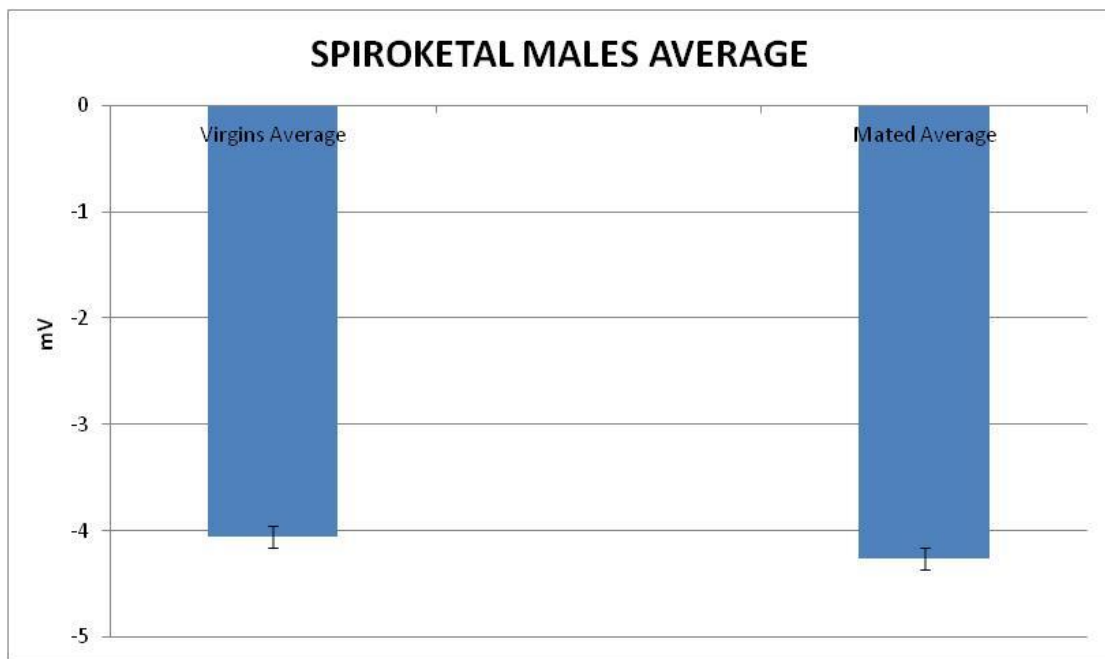
Στη συνέχεια, τα αρσενικά και των δυο κατηγοριών παρθένων και ζευγαρωμένων δεν έδειξαν στατιστικά σημαντική διαφορά στην απόκριση σε spiroketal, ομοίως με τα θηλυκά. Ο αριθμός εντόμων σε αυτά τα πειράματα ανέρχεται σε 46. Ο έλεγχος t-test για αυτή τη δοκιμασία ήταν 0.693604, δηλαδή, μη στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα.



Διάγραμμα 16. Μέσες αποκρίσεις ξεχωριστά για παρθένα και ζευγαρωμένα αρσενικά έντομα σε spiroketal.

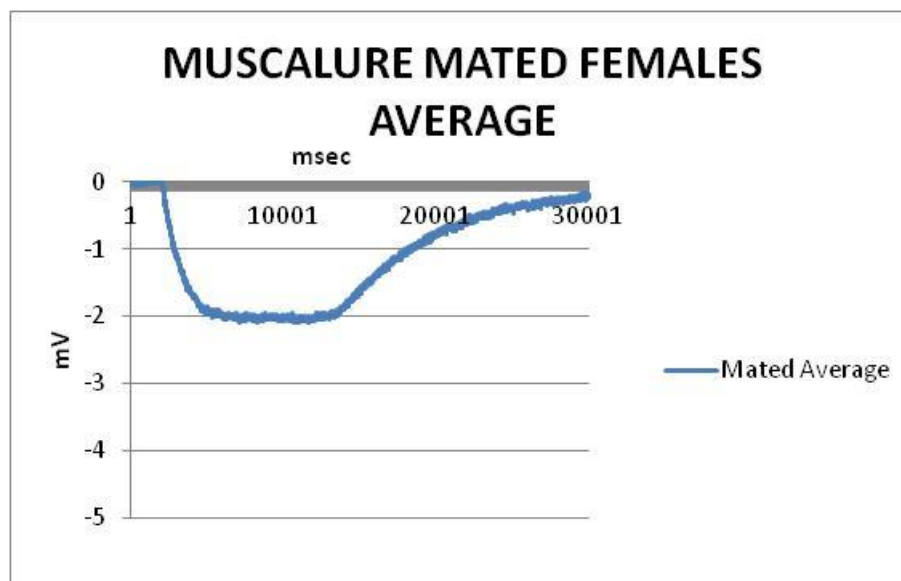
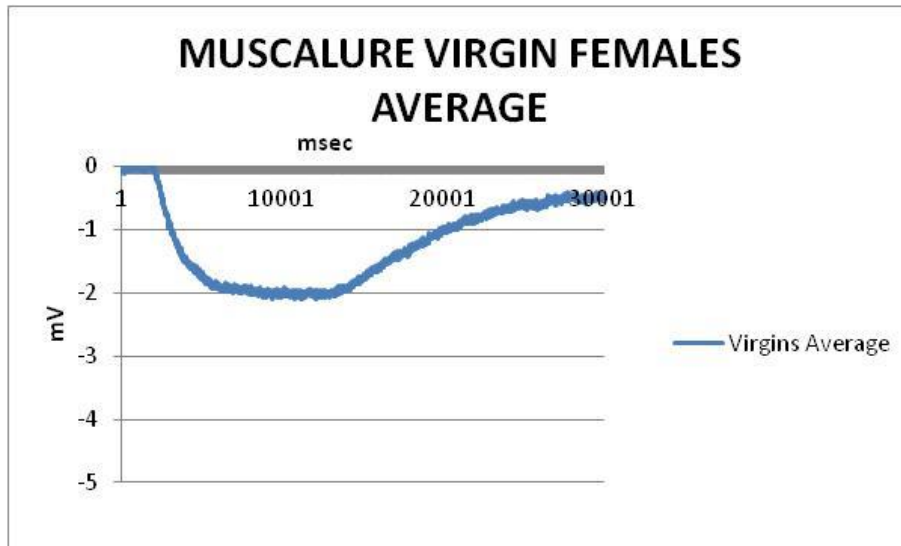


Διάγραμμα 17..Συγκριτικό διάγραμμα απόκρισης παρθένων-ζευγαρωμένων αρσενικών σε *spiroketal*.

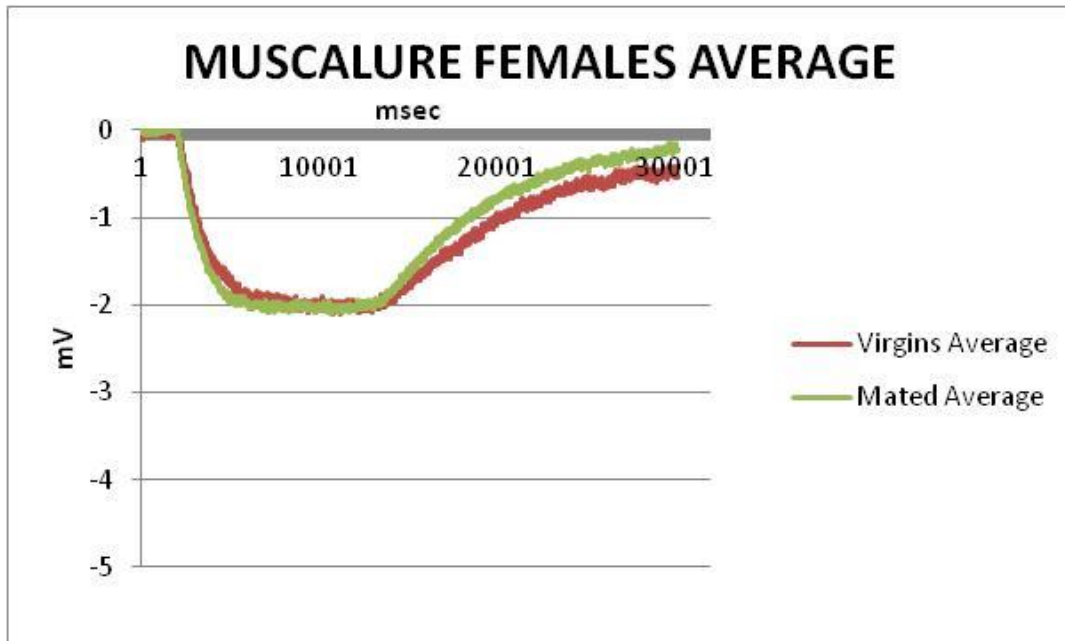


Διάγραμμα 18.Σύγκριση πλάτους αποκρίσεων παρθένων ζευγαρωμένων αρσενικών σε *spiroketal*.

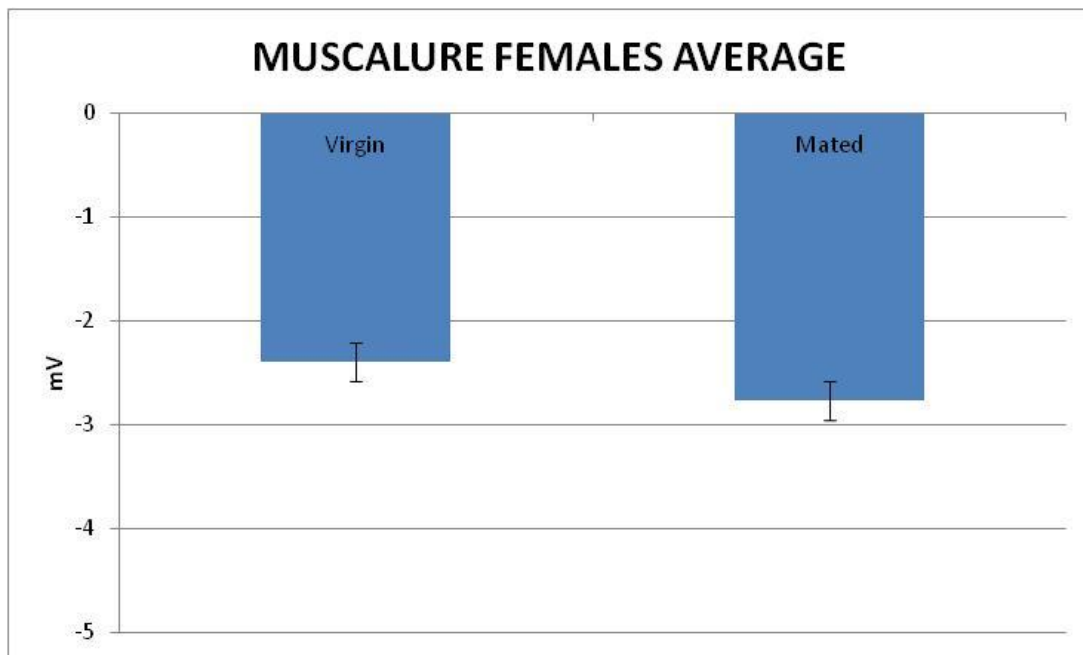
Ακολουθώντας με τη *muscalure*, τα παρθένα και ζευγαρωμένα θηλυκά έντομα δεν εμφάνισαν στατιστικά σημαντική διαφορά στην απόκρισή τους. Αυτά τα πειράματα βασίζονται σε δεδομένα για 47 έντομα και ο έλεγχος t-test είναι 0.18361.



Διάγραμμα 19. Μέσες αποκρίσεις ξεχωριστά για παρθένα και ζευγαρωμένα θηλυκά έντομα σε *muscalure*.

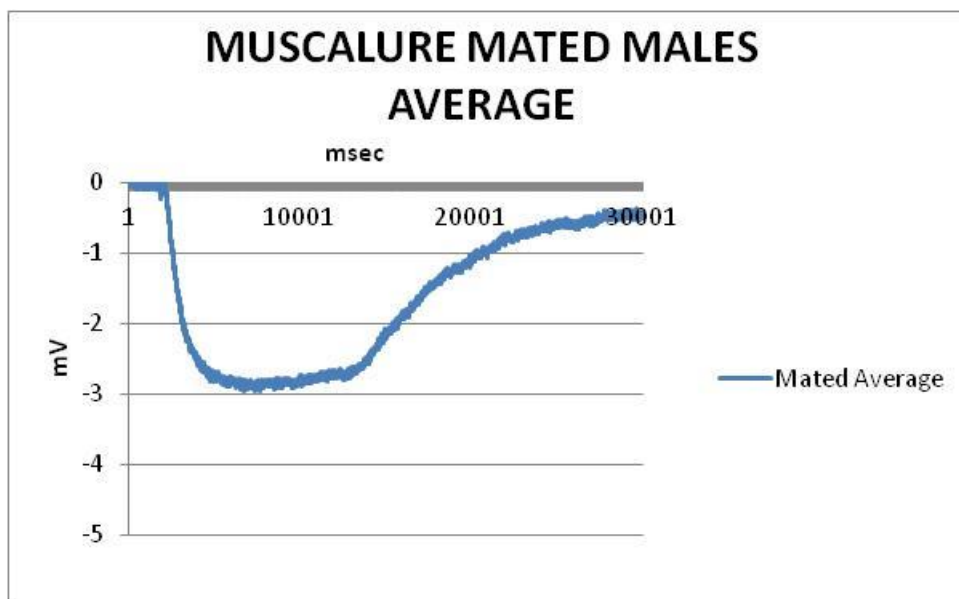
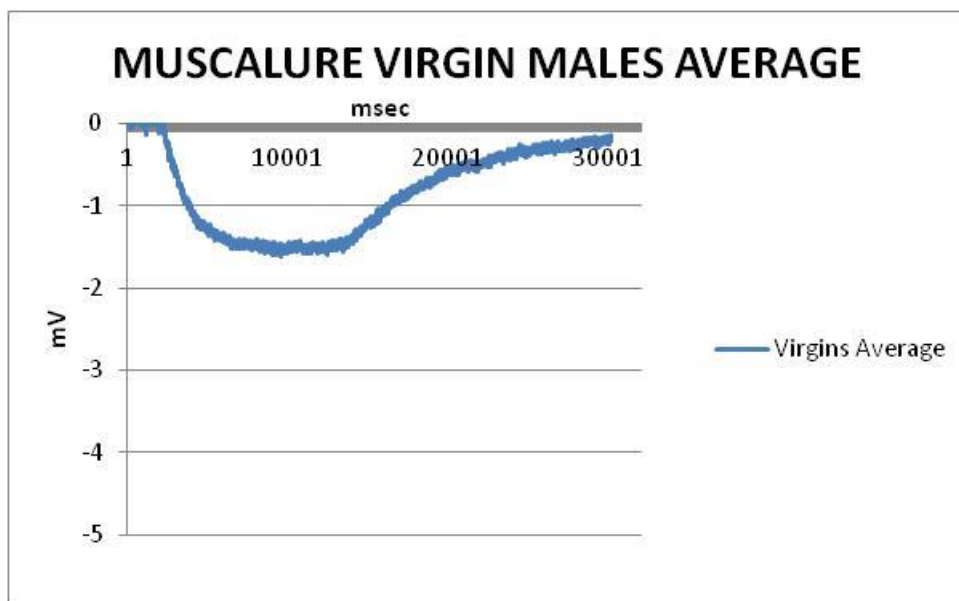


Διάγραμμα 20. Συγκριτικό διάγραμμα απόκρισης παρθένων-ζεγαρωμένων θηλυκών σε *muscalure*..

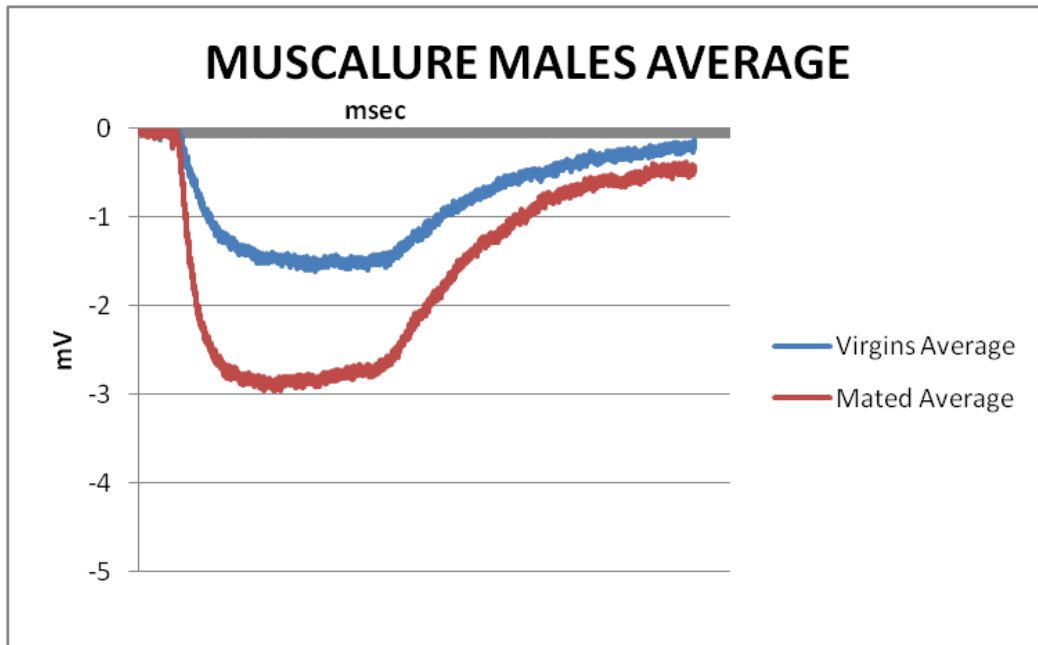


Διάγραμμα 21. Σύγκριση πλάτους αποκρίσεων παρθένων ζεγαρωμένων θηλυκών σε *muscalure*

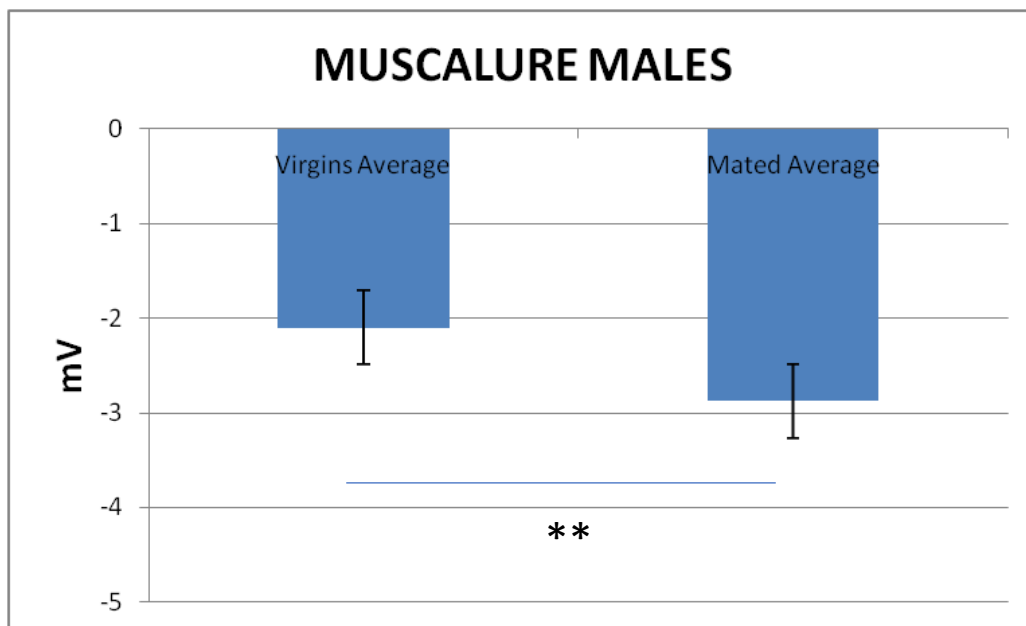
Η ενότητα αυτή ολοκληρώνεται με τα πειράματα σε παρθένα και ζευγαρωμένα αρσενικά έντομα μετά από έκθεση σε muscalure. Εδώ, παρατηρούμε στατιστικά σημαντική διαφορά στην απόκρισή μεταξύ των δυο κατηγοριών, την οποία αναδεικνύει η δοκιμασία ttest με τιμή 0.0032, δηλαδή $p \text{ value} < 0.05$. Αυτό σημαίνει ότι, τα ζευγαρωμένα αρσενικά έντομα έχουν σημαντικά μεγαλύτερη απόκριση στη muscalure από ότι τα παρθένα. Αυτά τα πειράματα βασίζονται σε δεδομένα για 44 έντομα.



Διάγραμμα 22. Μέσες αποκρίσεις ξεχωριστά για παρθένα και ζευγαρωμένα αρσενικά έντομα σε muscalure.



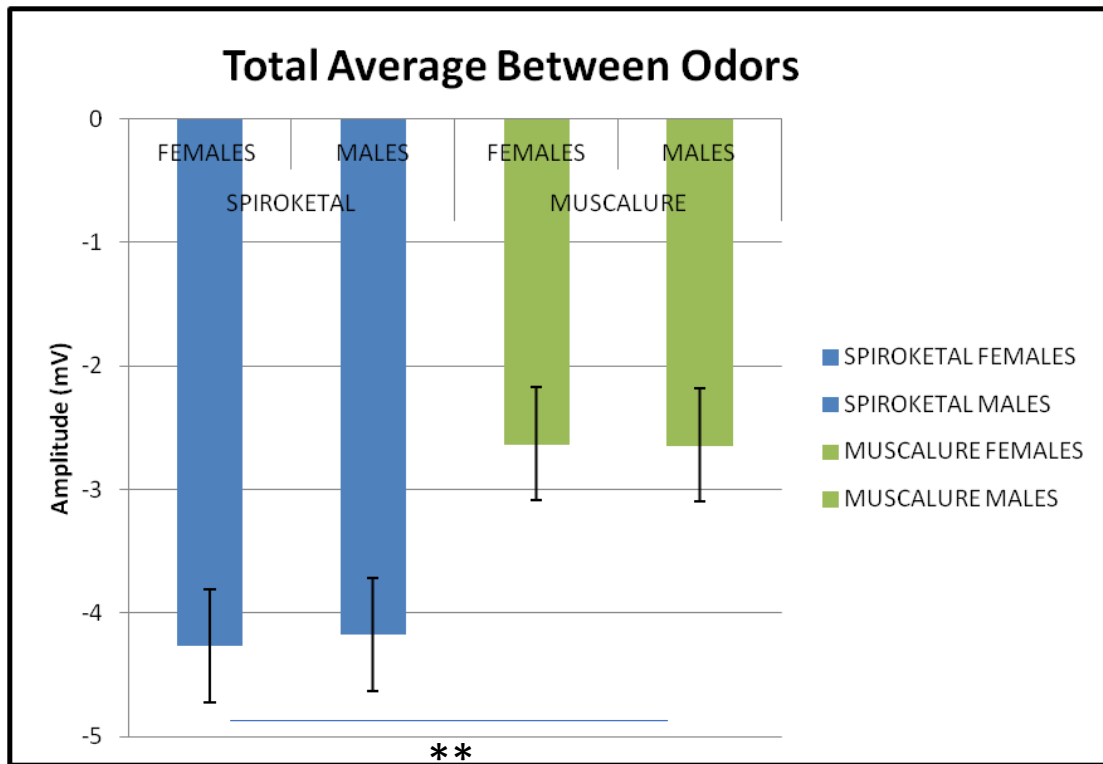
Διάγραμμα 23. Συγκριτικό διάγραμμα απόκρισης παρθένων-ζεγαρωμένων αρσενικών σε *muscalure*.



Διάγραμμα 24. Σύγκριση πλάτους αποκρίσεων παρθένων ζεγαρωμένων αρσενικών σε *muscalure*.

7.3. ΤΕΛΙΚΗ ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΩΝ ΔΥΟ ΦΕΡΟΜΟΝΩΝ

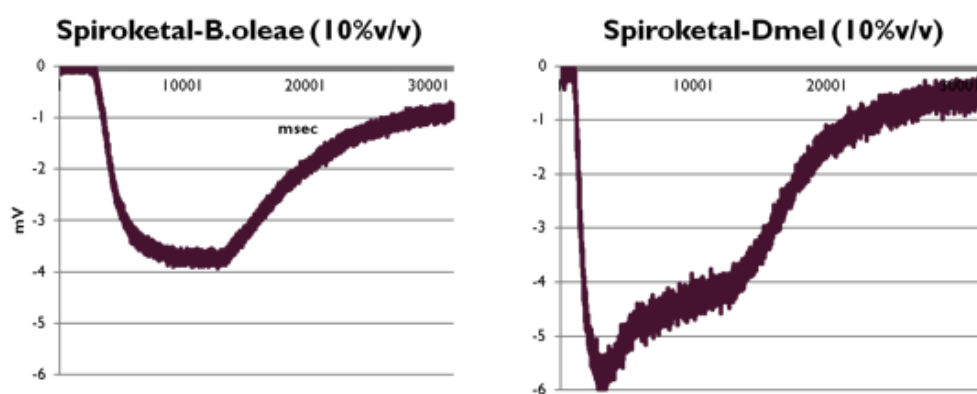
Όλα τα δεδομένα που συλλέχθηκαν, δείχνουν με στατιστικά σημαντική διαφορά τη μεγαλύτερη απόκριση και των δυο φύλων στη spiroketal (t-test=0.000872, $p << 0.05$).



Διάγραμμα 25. Ολική σύγκριση των μέσων πλατών απόκρισης στις δυο φερομονες και από τα δυο φύλα.

7.4. ΣΥΓΚΡΙΣΗ *B. oleae* & *Drosophila melanogaster*

Άτομα αγρίου τύπου (wild type) του είδους *Drosophila melanogaster* ελέγχθηκαν σχετικά με το αν αποκρίνονται στη spiroketal. Παρατηρώντας, το Διάγραμμα 26, είναι ξεκάθαρο ότι και τα δυο είδη εντόμων αποκρίνονται στη φερομόνη του δάκου. Ωστόσο, η καμπύλη απόκρισης των εντόμων *D. melanogaster* εμφανίζει μεγαλύτερο πλάτος και αρκετά διαφορετικό μοτίβο.



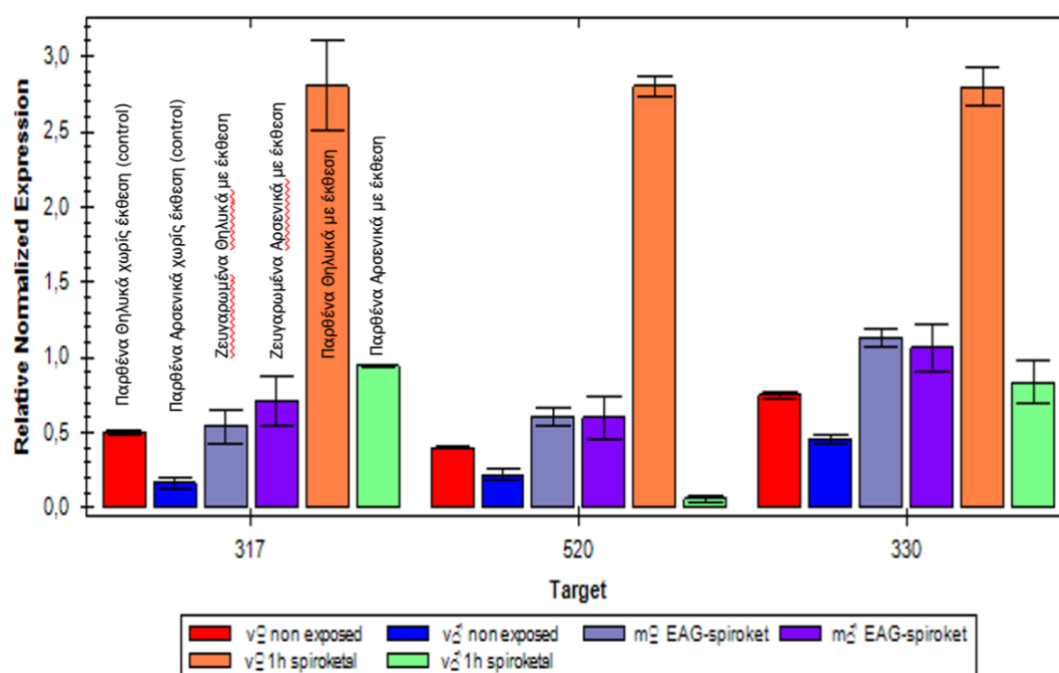
Διάγραμμα 26. Συγκριτικό διάγραμμα απόκρισης των δυο ειδών στη spiroketal.

8. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΟΣΦΡΗΤΙΚΟΥ ΠΡΟΦΙΛ ΜΕ REAL TIME PCR

8.1. ΕΚΦΡΑΣΗ ΟΣΦΡΗΤΙΚΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ 317, 330, 520 ΣΤΗ SPIROKETAL

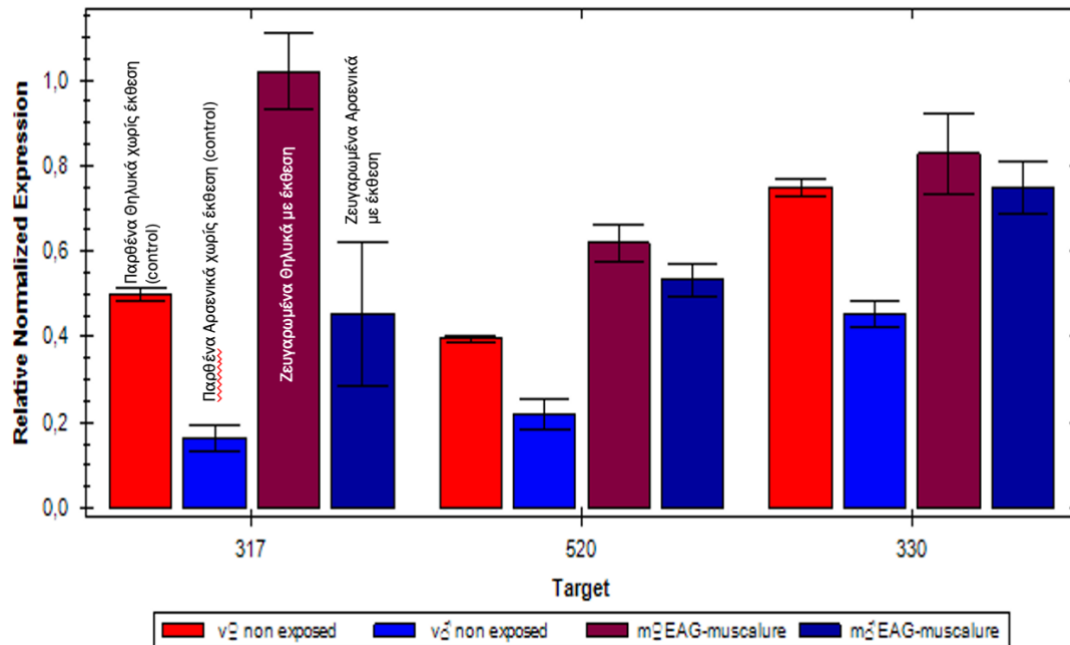
Τα αποτελέσματα της Real time PCR έδειξαν ότι το μοτίβο έκφρασης των διαφορετικών κατηγοριών είναι σχεδόν παρόμοιο και για τους τρεις υποδοχείς. Επιπλέον, αξιοσημείωτη είναι η αυξημένη έκφραση που δείχνουν τα παρθένα θηλυκά έντομα μετά από μία ώρα έκθεσης στη φερομόνη Spiroketal και για τους τρεις υποδοχείς.

Επομένως, συνάγεται το συμπέρασμα ότι η προέκθεση των εντόμων στη φερομόνη αυτή ενεργοποιεί υπέρμετρα και τους τρεις υποδοχείς και φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στην αναγνώριση φερομονών.



Διάγραμμα 27. Συγκριτικό γράφημα για τους υποδοχείς 317, 330 και 520 μετά από έκθεση στη spiroketal

8.2. ΕΚΦΡΑΣΗ ΟΣΦΡΗΤΙΚΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ 317, 330, 520 ΣΤΗ MUSCALURE



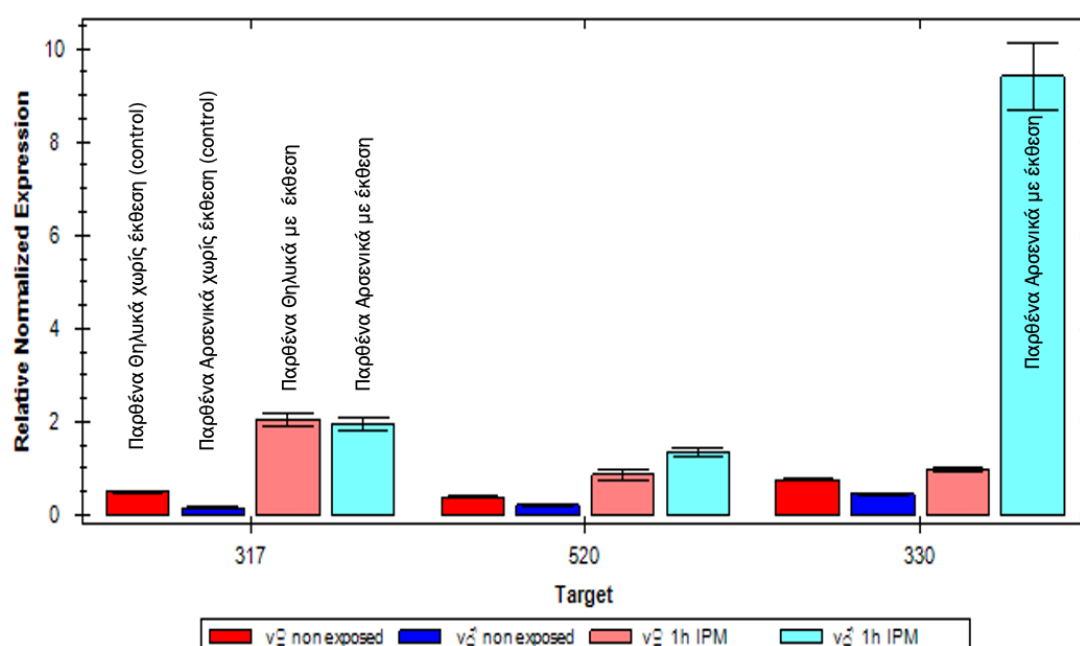
Διάγραμμα 28. Συγκριτικό γράφημα για τους υποδοχείς 317, 330 και 520 μετά από έκθεση στη Muscalure

Το μοτίβο της έκφρασης και για τους τρεις υποδοχείς μετά από έκθεση στη Muscalure είναι παρόμοιο με αυτό της Spiroketal με τα θηλυκά να έχουν μεγαλύτερη έκφραση. Συνεπώς, η προέκθεση των εντόμων στη Muscalure ενεργοποιεί και τους τρεις υποδοχείς και φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο. Ωστόσο εδώ, σε αντίθεση με τη Spiroketal μεγαλύτερη έκφραση φαίνεται να έχουν τα ζευγαρωμένα θηλυκά έντομα και στους τρεις υποδοχείς.

8.3. ΕΚΦΡΑΣΗ ΟΣΦΡΗΤΙΚΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ 317, 330, 520 ΣΤΟ ΜΑΡΤΥΡΑ

IPM

Ο μάρτυρας IPM έχει χρησιμοποιηθεί ως διαλύτης για τις οσμές, διότι τα έντομα φαίνεται να μην αποκρίνονται σε αυτόν. Το αναμενόμενο θα ήταν να μην υπάρχει σημαντική έκφραση των υποδοχέων για τα έντομα μετά από έκθεση σε IPM. Όμως, παρατηρούμε αξιοσημείωτη έκφραση του υποδοχέα 330 για παρθένα αρσενικά έντομα μετά από έκθεση σε IPM. Εφόσον, ο υποδοχέας 330 ενεργοποιείται από το διαλύτη των οσμών, μπορεί να είναι λιγότερο σημαντικός στην οσφρητική απόκριση σε φερομόνες από τους υποδοχείς 317 και 520.



Διάγραμμα 29. Συγκριτικό γράφημα για τους υποδοχείς 317, 330 και 520 μετά από έκθεση σε IPM.

9. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Συμπερασματικά, τα έντομα και των δυο φύλων είχαν μεγαλύτερη απόκριση για την Spiroketal (1,7-dioxaspiro[5.5]undecane) από ότι για τη Muscalure((Z)-9-Tricosene) με σημαντικά στατιστική διαφορά. Στη συνέχεια, η Spiroketal δίνει παρόμοια απόκριση σε όλες τις συγκεντρώσεις και στα δύο φύλα. Από την άλλη, η Muscalure δίνει ίδια απόκριση σε όλες τις συγκεντρώσεις στα θηλυκά έντομα ενώ έχει μεγαλύτερη απόκριση σε συγκέντρωση $[10^{-1}]$ στα αρσενικά έντομα. Επιπλέον, και στα δύο φύλα ζευγαρωμένα και παρθένα έντομα έχουν τις ίδιες αποκρίσεις στη φερομόνη Spiroketal. Τα θηλυκά ζευγαρωμένα και παρθένα έντομα έχουν την ίδια απόκριση στο Muscalure. Ωστόσο, τα αρσενικά ζευγαρωμένα έντομα έχουν μεγαλύτερη απόκριση στη Muscalure από τα παρθένα. Όσον αφορά, τη *Drosophila melanogaster*, και εκείνη αποκρίνεται στις φερομόνες του *B. oleae* αλλά με ακόμη μεγαλύτερα πλάτη στις αποκρίσεις και διαφορετικά μοτίβα καμπυλών.

Αναλυτικότερα, το γεγονός ότι τα έντομα και των δύο φύλων έχουν υψηλότερη ανταπόκριση στη Spiroketal θα μπορούσε να αναδεικνύει την ουσία αυτή ως την κύρια φερομόνη για το ζευγάρι των εντόμων. Επιπρόσθετα, τα υψηλά ποσοστά αποκρίσεων θα μπορούσαν να σχετίζονται με κάποιον κώδικα «επικοινωνίας» μεταξύ θηλυκών, όπως για παράδειγμα, ότι άλλο θηλυκό έχει εναποθέσει αυγά στον εκάστοτε καρπό.

Έπειτα, εφόσον τα αρσενικά ζευγαρωμένα έντομα έχουν μεγαλύτερη ανταπόκριση στη Muscalure από τα παρθένα, η μια σκέψη θα ήταν ότι η Muscalure αποτελεί φερομόνη συγκέντρωσης ή αγέλης και όχι τόσο ζευγαρώματος. Ακόμη, θα μπορούσε να προκαλεί ανταγωνισμό μεταξύ των αρσενικών για να προσελκύσουν τα θηλυκά και να επικρατήσουν των υπολοίπων στο ζευγάρι. Μια πιο ακραία σκέψη, θα ήταν ότι η Muscalure μπορεί να μην επιτελεί ρόλο φερομόνης και να σχετίζεται με απτικά ερεθίσματα. Αυτή η υπόθεση θα μπορούσε να υποστηριχθεί αν ανατρέξουμε στη δομή της ουσίας αυτής, που αποτελείται από πολλούς άνθρακες και ομοιάζει περισσότερο με «κερί» παρά με μικρή πτητική ένωση.

Στη συνέχεια, τα πειράματα σύγκρισης της *D.melanogaster* με τα έντομα *B. oleae* δείχνουν ότι αφού και η δροσόφιλα αποκρίνεται στις φερομόνες του δάκου και τα δύο είδη έχουν κοινούς οσφρητικούς υποδοχείς. Συμπεριλαμβανομένου και των μοριακών πειραμάτων έκφρασης για ομόλογους υποδοχείς ORs 317,330,520 θα ήταν λογικό να πούμε ότι οι φερομόνες ενεργοποιούν τους ίδιους υποδοχείς όσφρησης στα έντομα.

Βέβαια, οι διαφορετικές καμπύλες απόκρισης μεταξύ των δύο ειδών μπορεί να σημαίνει είτε ότι οι υποδοχείς δεν δρουν με τον ίδιο ακριβώς τρόπο είτε ότι η συνολική ενεργοποίηση όλων των υποδοχέων οδηγεί σε διαφορετικές καμπύλες απόκρισης.

Τέλος, η αυξημένη έκφραση ORs μετά από έκθεση σε φερομόνες, ή οσμές, φαίνεται να είναι γενικότερο φαινόμενο σε αυτά τα έντομα.

Μέχρι και σήμερα το τοπίο είναι ακόμη θολό και υπάρχουν πολλά κενά στη γνώση μας. Το κεφάλαιο της όσφρησης στο δάκο έχει αρχίσει να αναπτύσσεται πιο εντατικά τα τελευταία χρόνια με τη χρήση πειραμάτων μοριακής αλλά υπάρχει ακόμα πολύς δρόμος.

Ο απώτερος στόχος της παρούσας εργασίας, αφού εξετάσουμε την απόκριση των εντόμων στις φερομόνες ήταν να προμηθευτούμε έντομα στα οποία δε θα εκφράζεται ο υποδοχέας ORco (ORco- Rnai στελέχη). Με τον τρόπο αυτό θα ελέγχαμε αν στην έλλειψη του υποδοχέα οι δάκοι αποκρίνονται ή όχι στις οσμές, οπότε θα καταλαβαίναμε αν οι ORs είναι βασικοί υποδοχείς στην όσφρηση. Την ίδια διαδικασία θα ακολουθούσαμε και για τις άλλες κατηγορίες υποδοχέων.

Επιπλέον, θα μπορούσαμε να προχωρήσουμε τα πειράματα του μοριακού προφίλ όσφρησης σχετικά με τους ομόλογους υποδοχείς δάκου ως προς τη δροσόφιλα και τη μεσογειακή μύγα.

Έτσι, θα ήταν εφικτό να αποσαφηνισθεί έως ένα βαθμό και ο τρόπος πρόσδεσης των σημειοχημικών ενώσεων στους οσφρητικούς υποδοχείς και ο μηχανισμός που ενεργοποιεί τη ροή ιόντων σε κάθε περίπτωση.

Όμως λόγω της πανδημίας COVID-19 που δεν επιτρεπόταν η μετακίνηση και η παραμονή στο εργαστήριο, αλλά και της αυξημένης θερμοκρασίας και ξηρασίας, κυρίως τους καλοκαιρινούς μήνες, υπήρχε μεγάλη απώλεια γενεών. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα, να μην υπάρχουν ακμαίοι πληθυσμοί, ούτε σε εργαστηριακό επίπεδο ούτε στη φύση και έτσι, δεν μπορούσαμε να προμηθευτούμε έντομα προκειμένου να ολοκληρωθούν αυτά τα πειράματα.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

5TH BIOPESTICIDES STEERING GROUP SEMINAR ON APPLICATION TECHNIQUES FOR MICROBIAL PEST CONTROL PRODUCTS AND SEMIOCHEMICALS: USE SCENARIOS AND ASSOCIATED RISKS (ENV/JM/MONO(2015)38). (2014).

[https://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono\(2015\)38&doclanguage=en](https://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2015)38&doclanguage=en)

Abuin, L., Bargeton, B., Ulbrich, M. H., Isacoff, E. Y., Kellenberger, S., & Benton, R. (2011). Functional Architecture of Olfactory Ionotropic Glutamate Receptors. *Neuron*, 69(1), 44–60. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.11.042>

Agnihotri, A. R., Roy, A. A., & Joshi, R. S. (2016). Gustatory receptors in Lepidoptera: Chemosensation and beyond: Gustatory receptors in Lepidoptera. *Insect Molecular Biology*, 25(5), 519–529. <https://doi.org/10.1111/imb.12246>

Andersson, M. N., LÅfstedt, C., & Newcomb, R. D. (2015). Insect olfaction and the evolution of receptor tuning. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 3. <https://doi.org/10.3389/fevo.2015.00053>

Bon, M.-C., Hoelmer, K. A., Pickett, C. H., Kirk, A. A., He, Y., Mahmood, R., & Daane, K. M. (2016). Populations of *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae) and Its Parasitoids in Himalayan Asia. *Annals of the Entomological Society of America*, 109(1), 81–91. <https://doi.org/10.1093/aesa/sav114>

Butterwick, J. A., del Marmol, J., Kim, K. H., Kahlson, M. A., Rogow, J. A., Walz, T., & Ruta, V. (2018). Cryo-EM structure of the insect olfactory receptor Orco. *Nature*, 560(7719), 447–452. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0420-8>

- Clark, J. T., & Chen, Y.-C. D. (2018). Phosphorylation Switch of Orco Shapes the Sense of Smell in Insects. *The Journal of Neuroscience*, 38(5), 1058–1060. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3157-17.2017>
- de Alfonso, I., Vacas, S., & Primo, J. (2014). Role of α -Copaene in the Susceptibility of Olive Fruits to *Bactrocera oleae* (Rossi). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(49), 11976–11979. <https://doi.org/10.1021/jf504821a>
- Der Pers, J. N. C. Y., Haniotakis, G. E., & King, B. M. (2017). Electroantennogram responses from olfactory receptors in *Dacus oleae*. *ENTOMOLOGIA HELLENICA*, 2, 47. <https://doi.org/10.12681/eh.13901>
- Economopoulos, A.P., (1977). Controlling *Dacus oleae* by fluorescent yellow traps. *Entomol. Exp. et Appl.* 22: 183-190.
- Economopoulos A.P., Avtzis N., Zervas G., Tsitsipis J., Haniotakis G., Tsiropoulos G. and Manoukas A. (1977). Experiments on the control of the olive fly, *Dacus oleae* (Gmel.), by the combined effect of insecticides and releases of gamma-ray sterilized insects. *Zeitschrift fur Angewandte Entomologie*. 83(2): 201-215
- Fabre, F., Ryckewaert, P., Duyck, P. F., Chiroleu, F., & Quilici, S. (2003). Comparison of the efficacy of different food attractants and their concentration for melon fly (Diptera: Tephritidae). *Journal of economic entomology*, 96(1), 231–238. <https://doi.org/10.1093/jee/96.1.231>
- Genç, H. (2014). Embryonic development of the olive fruit fly, *Bactrocera oleae* Rossi (Diptera: Tephritidae), in vivo. *Turkish Journal of Zoology*, 38, 598-602.
- Giunti, G., Campolo, O., Laudani, F., Algeri, G. M., & Palmeri, V. (2020). Olive fruit volatiles route intraspecific interactions and chemotaxis in *Bactrocera oleae* (Rossi) (Diptera: Tephritidae) females. *Scientific Reports*, 10(1), 1666. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58379-8>

- Gomez-Diaz, C., Martin, F., Garcia-Fernandez, J. M., & Alcorta, E. (2018). The Two Main Olfactory Receptor Families in *Drosophila*, ORs and IRs: A Comparative Approach. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 12, 253. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00253>
- Guo, H., Kunwar, K., & Smith, D. (2017). Odorant Receptor Sensitivity Modulation in *Drosophila*. *The Journal of Neuroscience*, 37(39), 9465–9473. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1573-17.2017>
- Hansson, B., & Wicher, D. (2016). Chemical Ecology in Insects. In *Chemosensory Transduction* (pp. 29–45). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801694-7.00002-0>
- Harborne, J. B. (2014). *Introduction to Ecological Biochemistry*.
- Hellmann, N. (2020). Stability of OBPs. In *Methods in Enzymology* (Vol. 642, pp. 193–228). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2020.05.011>
- Kaissling, K.-E. (2019). Responses of Insect Olfactory Neurons to Single Pheromone Molecules. In J.-F. Picimbon (Ed.), *Olfactory Concepts of Insect Control—Alternative to insecticides* (pp. 1–27). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-05165-5_1
- Kaupp, U. B. (2010). Olfactory signalling in vertebrates and insects: Differences and commonalities. *Nature Reviews Neuroscience*, 11(3), 188–200. <https://doi.org/10.1038/nrn2789>
- Ma, M. (2012). Odor and Pheromone Sensing Via Chemoreceptors. In C. López-Larrea (Ed.), *Sensing in Nature* (Vol. 739, pp. 93–106). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-1704-0_6
- Malheiro, R., Casal, S., Cunha, S. C., Baptista, P., & Pereira, J. A. (2016). Identification of leaf volatiles from olive (*Olea europaea*) and their possible role in the

- ovipositional preferences of olive fly, *Bactrocera oleae* (Rossi) (Diptera: Tephritidae). *Phytochemistry*, 121, 11–19. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2015.10.005>
- Mazomenos, B.E. and G.E. Haniotakis, (1981). A multi component female sex pheromone of *Dacus oleae* Gmel. Isolation and bioassay. *J. Chem. Ecol.* 7: 437- 443.
- Mazomenos, B.E. and G.E. Haniotakis. (1985) Male olive fruit fly attraction to synthetic sex pheromone components in laboratory and field tests. *J. Chem. Ecol.*, 11: 397-405.
- Mazomenos, B.E., G.E. Haniotakis, A. Ioannou, I.Spanakis and A. Kozirakis. (1983). Field evaluation of the olive fruit fly pheromone traps with various dispensers and concentrations. In: *Fruit Flies of Economic Importance*. R. Cavalloro (ed). Proc. of the CEC/IOBC, Intern. Sympos., Athens Greece, 16-19 Nov. 1982, pp 506-512.
- Missbach, C., Dweck, H. K., Vogel, H., Vilcinskis, A., Stensmyr, M. C., Hansson, B. S., & Grosse-Wilde, E. (2014). Evolution of insect olfactory receptors. *ELife*, 3, e02115. <https://doi.org/10.7554/eLife.02115>
- Mourikis PA and Fytizas E (1970) Review of the olive fly ecology in relation to the sterile -male technique. In: *Sterile-male technique for control of fruit flies*, p. 131-139. STI/PUB0276, Vienna, IAEA.
- Nagai, T. (1981). Electroantennogram response gradient on the antenna of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis*. *Journal of Insect Physiology*, 27(12), 889–894. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(81\)90090-1](https://doi.org/10.1016/0022-1910(81)90090-1)
- Nardi, F., Carapelli, A., Dallai, R., Roderick, G. K., & Frati, F. (2005). Population structure and colonization history of the olive fly, *Bactrocera oleae* (Diptera,

- Tephritidae). *Molecular Ecology*, 14(9), 2729–2738.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02610.x>
- Ono, H., Hee, A. K.-W., & Jiang, H. (2021). Recent Advancements in Studies on Chemosensory Mechanisms Underlying Detection of Semiochemicals in Dacini Fruit Flies of Economic Importance (Diptera: Tephritidae). *Insects*, 12(2), 106.
<https://doi.org/10.3390/insects12020106>
- Pontikakos, C. M., Tsiligiridis, T. A., Yialouris, C. P., & Kontodimas, D. C. (2012). Pest management control of olive fruit fly (*Bactrocera oleae*) based on a location-aware agro-environmental system. *Computers and Electronics in Agriculture*, 87, 39–50. <https://doi.org/10.1016/j.compag.2012.05.001>
- Potamitis, I., Rigakis, I., & Fysarakis, K. (2015). Insect Biometrics: Optoacoustic Signal Processing and Its Applications to Remote Monitoring of McPhail Type Traps. *PloS one*, 10(11), e0140474.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140474>
- Registry-Migration.Gbif.Org. (2021). GBIF Backbone Taxonomy [Data set]. GBIF Secretariat. <https://doi.org/10.15468/39OMEI>
- Rossi, R., Carpita, A., Vita, G. (1978b). (Z)-6-nonen-1-ol and related compounds as attractants of the olive fruit fly, *Dacus oleae* (Gmelin). *Gazzetta Chimica Italiana*, 108, 709.
- Scalzo, R., Scarpati, M. L., Verzegnassi, B., & Vita, G. (1994). *Olea europaea* chemicals repellent to *Dacus oleae* females. *Journal of chemical ecology*, 20(8), 1813–1823. <https://doi.org/10.1007/BF02066224>
- Scarpati, M. L., Scalzo, R. L., Vita, G., & Gambacorta, A. (1996). Chemiotropic behavior of female olive fly (*Bactrocera oleae* GMEL.) on *Olea europaea* L.

Journal of Chemical Ecology, 22(5), 1027–1036.

<https://doi.org/10.1007/BF02029952>

Schneider D. (1962)“Electrophysiological investigation on the olfactory specificity of sexual attracting substances in different species of moths” *J. Insect Physiol.* , 8 : 15-30.

Thorne, N. (2005). Function and Expression of the *Drosophila* Gr Genes in the Perception of Sweet, Bitter and Pheromone Compounds. *Chemical Senses*, 30(Supplement 1), i270–i272. <https://doi.org/10.1093/chemse/bjh219>

Tirindelli, R., Dibattista, M., Pifferi, S., & Menini, A. (2009). From Pheromones to Behavior. *Physiological Reviews*, 89(3), 921–956. <https://doi.org/10.1152/physrev.00037.2008>

Tsoumani, K. T., Belavilas-Trovas, A., Gregoriou, M.-E., & Mathiopoulos, K. D. (2020). Anosmic flies: What Orco silencing does to olive fruit flies. *BMC Genetics*, 21(S2), 140. <https://doi.org/10.1186/s12863-020-00937-0>

Tzanakakēs, M. E. (2006). *Insects and mites feeding on olive: Distribution, importance, habits, seasonal development and dormancy*. Brill.

Venthur, H., & Zhou, J.-J. (2018). Odorant Receptors and Odorant-Binding Proteins as Insect Pest Control Targets: A Comparative Analysis. *Frontiers in Physiology*, 9, 1163. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01163>

White, I. M., & Hancock, D. L. (2004). *Cabikey: Dacini fruit flies (Diptera: Tephritidae) of Malesia* [English]. ETI, Expert Center for Taxonomic Identification, University of Amsterdam [etc.].

Wicher, D. (2018). Tuning Insect Odorant Receptors. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 12, 94. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00094>

- Wicher, D., & Miazzi, F. (2021a). Functional properties of insect olfactory receptors: Ionotropic receptors and odorant receptors. *Cell and Tissue Research*, 383(1), 7–19. <https://doi.org/10.1007/s00441-020-03363-x>
- Wicher, D., & Miazzi, F. (2021b). Functional properties of insect olfactory receptors: Ionotropic receptors and odorant receptors. *Cell and Tissue Research*, 383(1), 7–19. <https://doi.org/10.1007/s00441-020-03363-x>
- Wu, Z., Kang, C., Qu, M., Chen, J., Chen, M., Bin, S., & Lin, J. (2019). Candidates for chemosensory genes identified in the Chinese citrus fly, *Bactrocera minax*, through a transcriptomic analysis. *BMC Genomics*, 20(1), 646. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-6022-5>
- Wyatt, T. D. (2017). Pheromones. *Current Biology*, 27(15), R739–R743. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.06.039>
- Yao, R., Zhao, M., Zhong, L., Li, Y., Li, D., Deng, Z., & Ma, X. (2021). Characterization of the binding ability of the odorant binding protein BMINOBP9 of *Bactrocera minax* to citrus volatiles. *Pest Management Science*, 77(3), 1214–1225. <https://doi.org/10.1002/ps.6132>
- Zheng, W., Peng, W., Zhu, C., Zhang, Q., Saccone, G., & Zhang, H. (2013). Identification and Expression Profile Analysis of Odorant Binding Proteins in the Oriental Fruit Fly *Bactrocera dorsalis*. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(7), 14936–14949. <https://doi.org/10.3390/ijms140714936>
- Katsoyannos P. 1992. “Olive pests and their control in the Near East.” Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome.
- Τζανακάκης, Μ.Ε. & Κατσόγιαννος, Β.Ι. (2003). Έντομα Καρποφόρων Δέντρων και Αμπέλου. Εκδόσεις Αγρότυπος. Θεσσαλονίκη, σελ. 265.