



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
Σχολή Επιστημών Υγείας
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας
Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής

**«Λειτουργική ανάλυση διαφορικά εκφραζόμενων
γονιδίων μεταξύ ελληνικών και γερμανικών στελεχών
του *Tenebrio molitor* L. μέσω σίγησης με RNAi»**



Πελκούδη Παναγιώτα,
Κωνσταντίνος
ΛΑΡΙΣΑ 2025

Τίτλος Διπλωματικής Εργασίας

Λειτουργική ανάλυση διαφορικά εκφραζόμενων γονιδίων μεταξύ ελληνικών και γερμανικών στελεχών του *Tenebrio molitor* L. μέσω σίγησης με RNAi

Thesis title

Functional analysis of differentially expressed genes in Greek and German strains of *Tenebrio molitor* L. through RNAi silencing

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο πλαίσιο των προπτυχιακών σπουδών μου στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, υπό την επίβλεψη του καθηγητή Μοριακής Βιολογίας κ. Ματθιόπουλου Κωνσταντίνου.

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

Ματθιόπουλος Κωνσταντίνος (Επιβλέπων): Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Βασιλειάδης Σωτήριος: Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Μικροβιακής Οικολογίας και Γονιδιωματικής του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Παπαδοπούλου Καλλιόπη: Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Ευχαριστίες

Ολοκληρώνοντας την πτυχιακή μου εργασία, θα ήθελα αρχικά να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στον επιβλέποντα Καθηγητή κ. Ματθιόπουλο Κωνσταντίνο για την ευκαιρία που μου έδωσε να εκπονήσω την εργασία αυτή υπό την επίβλεψή του. Η εμπιστοσύνη που μου έδειξε, καθώς και η καθοδήγησή του, υπήρξαν για εμένα πολύτιμα στοιχεία στη διάρκεια αυτής της πορείας. Η παρουσία του στο ακαδημαϊκό περιβάλλον αποτέλεσε πηγή έμπνευσης ήδη από τα πρώτα μου φοιτητικά βήματα, γεγονός που εκτιμώ βαθιά. Επίσης, οφείλω να ευχαριστήσω και τα υπόλοιπα μέλη της εξεταστικής μου επιτροπής, τους καθηγητές κ. Βασιλειάδη Σωτήριο και την κα. Παπαδοπούλου Καλλιόπη, για τον χρόνο που αφιέρωσαν στην αξιολόγηση της διπλωματικής εργασίας μου.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στην Υποψήφια Διδάκτορα Μαρία Ξανθού, η οποία με καθοδήγησε καθ' όλη τη διάρκεια της εργασίας. Η αμέριστη υποστήριξη, η υπομονή και η αφοσίωσή της υπήρξαν καθοριστικές για την επιτυχή ολοκλήρωση αυτής της διαδρομής. Η συμβολή της ήταν καθοριστική για να φτάσω ως το τέλος αυτής της προσπάθειας. Ευχαριστώ επίσης θερμά τη Λευκή Κατσιαμάνη, που αποτέλεσε την πρώτη μου επαφή με το εργαστήριο και με βοήθησε να αποκτήσω τις απαραίτητες βάσεις για να συνεχίσω. Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου, διδακτορικούς και προπτυχιακούς φοιτητές, για τη συνεργασία, τη βοήθεια και το υποστηρικτικό κλίμα. Μέσα από την κοινή μας παρουσία έμαθα όχι μόνο τεχνικές δεξιότητες, αλλά και τι σημαίνει να συνυπάρχεις και να εργάζεσαι σε ένα ερευνητικό περιβάλλον. Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω την πιο βαθιά μου ευγνωμοσύνη στους δικούς μου ανθρώπους – την οικογένειά μου και τους φίλους μου – για την αγάπη τους, τη συνεχή στήριξη και την πίστη τους σε εμένα, καθώς μου δίνουν τη δύναμη και το κίνητρο να εξελίσσομαι διαρκώς.

Περίληψη

Η συνεχώς αυξανόμενη ζήτηση για παραγωγή πρωτεΐνης μέσω βιώσιμων και φιλικών προς το περιβάλλον πηγών, έχει στρέψει το επιστημονικό και βιομηχανικό ενδιαφέρον στα έντομα ως μια εναλλακτική λύση. Μεταξύ αυτών, το *Tenebrio molitor* L., γνωστό και ως κίτρινος αλευροσκώληκας, έχει αναδειχθεί σε οργανισμό με υψηλή βιοτεχνολογική αξία. Η έγκρισή του από την Ευρωπαϊκή Ένωση ως «novel food» επέτρεψε τη χρήση του ως εναλλακτική πηγή πρωτεΐνης για ανθρώπινη και ζωική κατανάλωση, ενώ ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει και η αξιοποίηση των παραπροϊόντων του, όπως η χιτίνη και το frass. Παράλληλα, χρησιμοποιείται και ως οργανισμός μοντέλο για τη μελέτη βιολογικών διεργασιών, με στόχο τη βελτιστοποίηση της μαζικής εκτροφής του και την αξιοποίησή του στη γεωργία και στη βιομηχανία. Στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η διερεύνηση του ρόλου γονιδίων που σχετίζονται με την αναπαραγωγική διαδικασία.

Πιο συγκεκριμένα, η μελέτη επικεντρώθηκε στο γονίδιο *15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase (15-PGDH)*, υπεύθυνο για την αποικοδόμηση των προσταγλανδινών. Η επιλογή του βασίστηκε σε προηγούμενη συγκριτική μεταγραφομική ανάλυση (RNA-seq) σε ωθήκες και επικουρικούς αδένες ενήλικων θηλυκών εντόμων, μεταξύ ελληνικών και γερμανικών στελεχών του εντόμου. Δεδομένου ότι το ελληνικό στέλεχος παρουσιάζει υψηλότερη αναπαραγωγική ικανότητα, θεωρήθηκε ότι η υπερέκφραση του *15-PGDH* πιθανά σχετίζεται με αυτή την ικανότητα του ελληνικού στελέχους. Για τον λειτουργικό χαρακτηρισμό του γονιδίου πραγματοποιήθηκε σίγηση μέσω του μηχανισμού RNAi, με χορήγηση δίκλωνων μορίων RNA (dsRNA) σε ενήλικα θηλυκά έντομα. Η σίγηση του *15-PGDH* ήταν επιτυχής, μειώνοντας την έκφρασή του έως και 88%. Όσον αφορά τις φαινοτυπικές παρατηρήσεις, υπήρξε μείωση της ωτοκίας κατά 14–27%, χωρίς ωστόσο να παρατηρηθεί αντίστοιχη μεταβολή στην εκκολαψιμότητα των αβγών. Τα ευρήματα της παρούσας μελέτης υποδεικνύουν ότι το *15-PGDH* φαίνεται να συμμετέχει στη ρύθμιση της αναπαραγωγικής ικανότητας του *T. molitor*, παρέχοντας νέα δεδομένα για το μοριακό υπόβαθρο της ωτοκίας και συμβάλλοντας στην κατανόηση των μηχανισμών που διέπουν την αναπαραγωγική απόδοση των θηλυκών εντόμων.

Abstract

The increased demand for sustainable and environmentally friendly sources of protein production has drawn both scientific and industrial interest toward insects as an alternative solution. Among them, *Tenebrio molitor* L., commonly known as the yellow mealworm, has emerged as an organism of high biotechnological value. Its approval by the European Union as "novel food" has enabled its use as an alternative protein source for both human and animal consumption. Additionally, by-products such as chitin and frass have also gained interest for their potential applications.

More specifically, this thesis focused on the gene *15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase (15-PGDH)*, which is responsible for the degradation of prostaglandins. The selection of this gene was based on a previous comparative transcriptomic analysis (RNA-seq) conducted on the ovaries and accessory glands of adult female insects, comparing Greek and German strains of the species. Since the Greek strain exhibits higher reproductive capacity, we considered that the observed overexpression of *15-PGDH* maybe related to the higher reproductive capacity of the Greek strain. To functionally characterize the gene, gene silencing was performed through RNAi by injection with double-stranded RNA (dsRNA) to adult female insects. The silencing of *15-PGDH* was successful, reducing its expression by up to 88%. Phenotypic observations revealed a reduction in oviposition, ranging from 14% to 27%, although no corresponding change was observed in egg hatchability. The findings of this study suggest that *15-PGDH* is likely involved in the regulation of reproductive capacity of *T. molitor*, providing new insights into the molecular basis of oviposition and contributing to a better understanding of the mechanisms governing female insect reproductive performance.

Περιεχόμενα

Περίληψη	4
Abstract.....	5
Εισαγωγή.....	7
Η φυλετική αναπαραγωγή στα θηλυκά έντομα	8
Οογένεση και Βιτελλογένεση.....	11
Οορρηξία, ωοτοκία και εμβρυογένεση	16
Οι Προσταγλανδίνες στα έντομα	18
Ο ρόλος των PG στην αναπαραγωγή των εντόμων	20
Ο ρόλος των PG στην ανοσολογική απόκριση των εντόμων.....	21
Σχέση αναπαραγωγικού και ανοσοποιητικού συστήματος στα έντομα	21
Ο ρόλος του γονιδίου <i>15-PGDH</i> στα έντομα	23
Η σημασία και οι εφαρμογές του <i>Tenebrio molitor</i>	26
Η μέθοδος RNAi στα έντομα και στα Κολεόπτερα.....	30
Σκοπός	33
Υλικά και Μέθοδοι.....	34
Αποτελέσματα	37
Συζήτηση	41
Συμπεράσματα.....	44
Παράρτημα.....	45
Βιβλιογραφία.....	48

Εισαγωγή

Η αυξανόμενη παγκόσμια ζήτηση για βιώσιμες πηγές πρωτεϊνών, σε συνδυασμό με τις ανησυχίες για την υπερεκμετάλλευση των φυσικών πόρων, έχει αναδείξει τη μαζική εκτροφή εντόμων ως μια εναλλακτική λύση στο πλαίσιο της κυκλικής οικονομίας (Lisboa et al., 2024). Αυτό βασίζεται στο γεγονός ότι τα βρώσιμα έντομα αποτελούν εξαιρετική πηγή πρωτεϊνών, ενώ παράλληλα έχουν την ικανότητα να μετατρέπουν οργανικά απόβλητα σε βιομάζα υψηλής ποιότητας, συμβάλλοντας στη μείωση των αποβλήτων (Churchward-Venne et al., 2017). Επίσης, η μαζική εκτροφή εντόμων απαιτεί σημαντικά λιγότερο νερό και τροφή σε σχέση με τη συμβατική κτηνοτροφία, με αποτέλεσμα να έχει χαμηλότερες εκπομπές αερίων του θερμοκηπίου και καλύτερη προσαρμογή στις σύγχρονες προκλήσεις της διατροφικής ασφάλειας και βιωσιμότητας (Mohamad et al., 2025). Στο πλαίσιο αυτό, η μαζική εκτροφή εντόμων έχει ενταχθεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση στις στρατηγικές για τη βιο-οικονομία και την πράσινη ανάπτυξη, καθώς αναγνωρίζεται ο ρόλος της στη μείωση της κατανάλωσης πρωτεϊνών ζωικής προέλευσης υψηλού περιβαλλοντικού κόστους (European Commission, 2018).

Ανάμεσα στα είδη που έχουν προσελκύσει το επιστημονικό ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια συγκαταλέγεται το σκαθάρι *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae), γνωστό και ως κίτρινος αλευροσκώληκας (yellow mealworm). Πρόκειται για ένα έντομο που μπορεί να αξιοποιηθεί ως μια εναλλακτική πηγή πρωτεΐνης, τόσο στη διατροφή του ανθρώπου όσο και στην παραγωγή ζωοτροφών, καθώς έχει εγκριθεί ως «novel food» από την Ευρωπαϊκή Ένωση, λόγω της υψηλής του διατροφικής αξίας (European Commission, 2015), (Regulation 2015/2283). Η αξιοποίηση του *T. molitor* δεν περιορίζεται αποκλειστικά στο ίδιο το έντομο, καθώς και τα παραπροϊόντα του παρουσιάζουν βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον. Η χιτοζάνη, ως παράγωγο της χιτίνης, βρίσκει εφαρμογές στη βιομηχανία αλλά και το frass του *T. molitor* έχει αναγνωριστεί ως αποτελεσματικό βιολίπασμα, ενισχύοντας την εφαρμογή του στον γεωργικό τομέα (Moruzzo et al., 2021a).

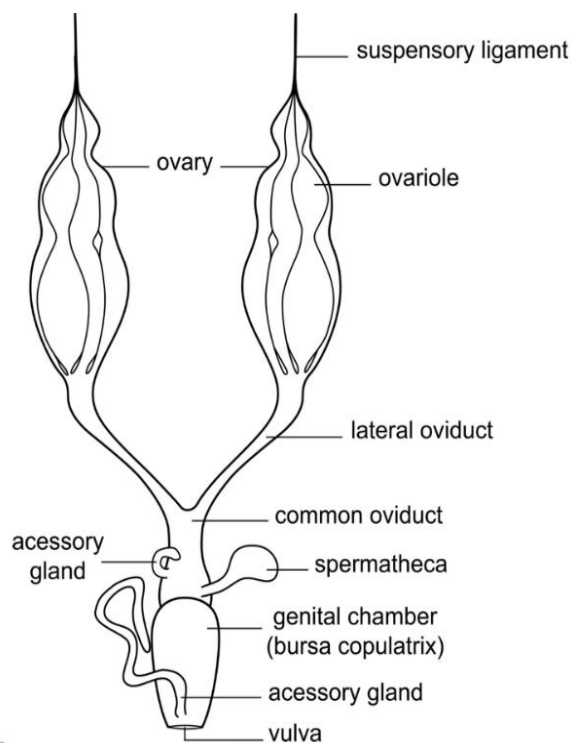
Παρά τη σημασία του *T. molitor*, οι μοριακοί μηχανισμοί που ρυθμίζουν την ανάπτυξη και την αναπαραγωγή του δεν έχουν ερευνηθεί πλήρως. Μελέτες πάνω σε στελέχη του εντόμου διαφορετικής γεωγραφικής προέλευσης, έχουν δείξει σημαντικές διαφορές στην ανάπτυξη και την αναπαραγωγική ικανότητα γεγονός που υποδηλώνει την ύπαρξη γενετικής ποικιλότητας (Adamaki-Sotiraki et al., 2022). Ωστόσο, σε αντίθεση με άλλες τάξεις εντόμων, όπως τα Δίπτερα, όπου οι μοριακοί μηχανισμοί αναπαραγωγής έχουν μελετηθεί εκτενώς, οι μελέτες πάνω στα Κολεόπτερα παραμένουν ελλιπείς. Συνεπώς, η μελέτη του αναπαραγωγικού συστήματος των θηλυκών εντόμων, σε συνδυασμό με τη μελέτη της γονιδιακής έκφρασης, καθώς και με την αξιοποίηση μοριακών εργαλείων όπως το RNAi, αποτελεί βασικό βήμα για την κατανόηση των μηχανισμών που διέπουν την αναπαραγωγή.

Η φυλετική αναπαραγωγή στα θηλυκά έντομα

Τα έντομα αποτελούν την πολυπληθέστερη ομάδα του ζωικού βασιλείου, παρουσιάζοντας ευρεία προσαρμοστικότητα σε ποικίλες περιβαλλοντικές συνθήκες, γεγονός που οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στην υψηλή αναπαραγωγική τους ικανότητα. Συγκεκριμένα, η αναπαραγωγή των εντόμων διακρίνεται από ποικίλους μηχανισμούς που επιτρέπουν την επιβίωση και εξάπλωση των πληθυσμών όπως, η παρθενογένεση, η παιδογένεση, η πολυεμβρυονία, η ζωοτοκία, η γυνογένεση και ο λειτουργικός ερμαφροδιτισμός. Κύρια μορφή αναπαραγωγής στα έντομα είναι η φυλετική κατά την οποία, ο σχηματισμός του ζυγωτού προκύπτει από την ένωση δύο απλοειδών γαμετών, ενός αρσενικού και ενός θηλυκού, που έχουν παραχθεί μέσω μειωτικής διαίρεσης διπλοειδών πρόδρομων γαμετικών κυττάρων. Η διαδικασία αυτή επιτρέπει την ανάμειξη διαφορετικών γονιδιωμάτων και κατά συνέπεια, την αύξηση της γενετικής ποικιλότητας (Charman et al., 2013).

Βασική προϋπόθεση της φυλετικής αναπαραγωγής είναι η παρουσία δύο διακριτών φύλων και συνεπώς η ύπαρξη ξεχωριστών αναπαραγωγικών οργάνων για την παραγωγή διαφορετικού τύπου γαμετών. Παρά τις διαφορές στη μορφολογία, τη φυσιολογία και τη συμπεριφορά μεταξύ αρσενικών και θηλυκών ατόμων, τα δύο φύλα έχουν ορισμένες βασικές ομοιότητες ως προς την οργάνωση των αναπαραγωγικών τους συστημάτων. Και στα δύο φύλα, τα γαμετικά κύτταρα προέρχονται από πολικά κύτταρα, που διαφοροποιούνται στα πρώτα στάδια της εμβρυογένεσης και σε συνεργασία με τον μεσοδερμικό ιστό συμβάλλουν στη διαμόρφωση των αναπαραγωγικών οργάνων. Επίσης, οι γονάδες (όρχεις και ωοθήκες) βρίσκονται σε ζεύγη και συνδέονται με επιμέρους αγωγούς που εκβάλλουν σε έναν κοινό αγωγό που εκβάλλει στο οπίσθιο τμήμα τους σώματός τους (οπισθογωνικά). Τόσο στα θηλυκά όσο και στα αρσενικά, η λειτουργία αυτών των συστημάτων ελέγχεται από πολύπλοκα ορμονικά και μοριακά μονοπάτια, τα οποία με τη σειρά τους ρυθμίζονται από ενδογενείς και εξωγενείς παράγοντες (Charman et al., 2013; Klowden, 2010).

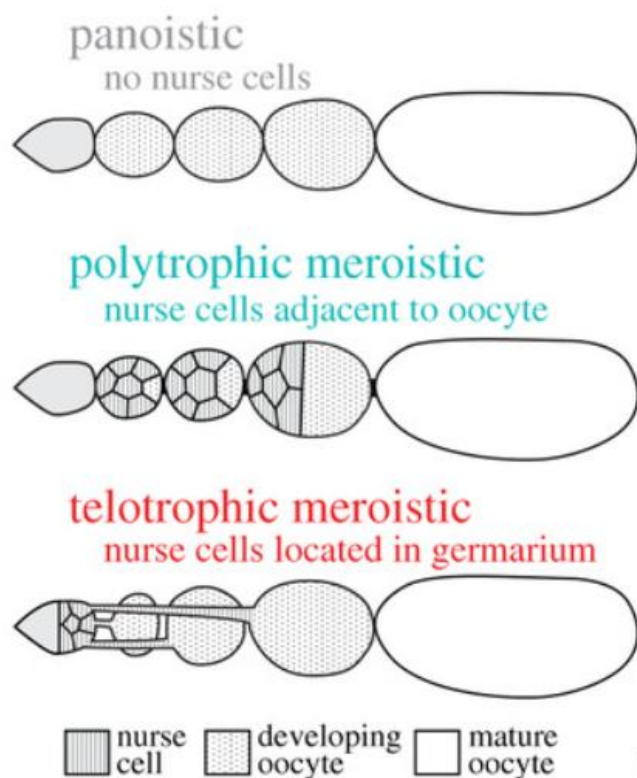
Αν και οι βασικές αρχές οργάνωσης των δύο συστημάτων είναι κοινές, το κάθε φύλο διαθέτει εξειδικευμένες δομές που εξυπηρετούν τις ιδιαίτερες λειτουργίες του στο πλαίσιο της αναπαραγωγικής διαδικασίας. Ειδικότερα, η αναπαραγωγή των θηλυκών εντόμων περιλαμβάνει την



Εικόνα 1. Σχηματική αναπαράσταση θηλυκού αναπαραγωγικού συστήματος εντόμου (Rocha et al., 2022).

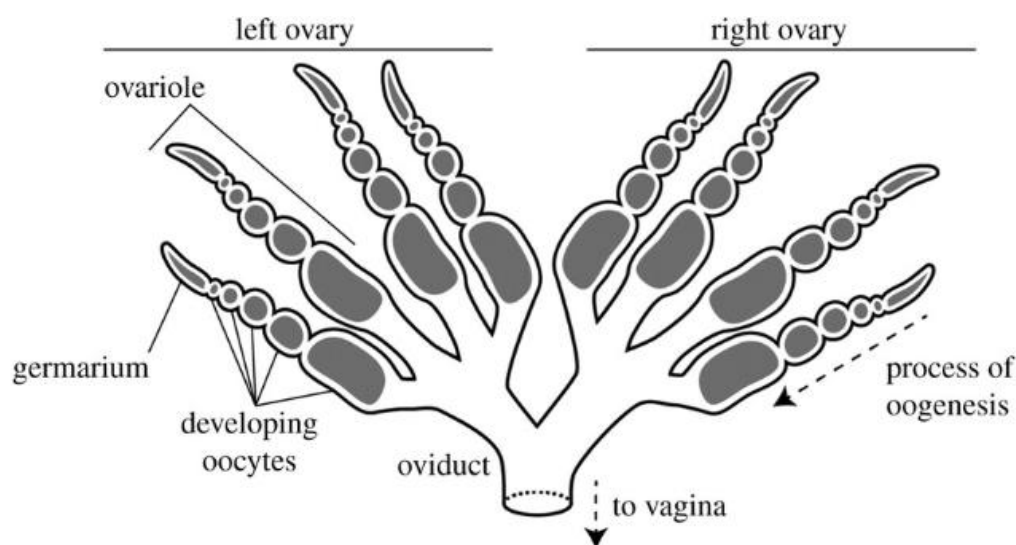
παραγωγή ωαρίων πλούσια σε λέκιθο, τη σύζευξη των γαμετών και την εναπόθεση γονιμοποιημένων αβγών στο περιβάλλον. Συνεπώς, για να επιτευχθεί η σωστή λειτουργία του αναπαραγωγικού συστήματος είναι απαραίτητες ορισμένες βασικές μορφολογικές και φυσιολογικές δομές, οι οποίες συνεργάζονται για την παραγωγή, την αποθήκευση και τη γονιμοποίηση των ωαρίων (Charman et al., 2013). Οι δομές αυτές περιλαμβάνουν τις ωοθήκες (ovaries), τους ωοφόρους σωλήνες (ovarioroles), τους πλευρικούς ωαγωγούς και τον κοινό ωαγωγό (lateral and common oviduct), τη σπερματοθήκη (spermatheca), τον γεννητικό θάλαμο και τον θύλακα οχείας (genetal chamber and bursa copulatrix), τους επικουρικούς αδένες (accessory glands) και τον γονοπόρο (vulva) (Εικόνα 1) . Κάθε ωοθήκη αποτελείται από μια σειρά κωνικών μονάδων που ονομάζονται ωοφόροι σωλήνες και ο αριθμός τους είναι χαρακτηριστικός και σταθερός για κάθε είδος (Rocha et al., 2022). Για παράδειγμα, το *T. molitor* φέρει 13-18 και ο μέσος όρος ανά θηλυκό κυμαίνεται στους 27-35, καθώς οι δύο ωοθήκες δεν περιέχουν τον ίδιο αριθμό ωοφόρων σωλήνων (Gerber, 1973).

Υπάρχουν δύο κύριοι τύποι ωοφόρων σωλήνων, οι οποίοι διαφοροποιούνται ως προς τον τρόπο μεταφοράς θρεπτικών συστατικών και RNA στο ωάριο. Αυτοί είναι, ο πανοϊστικός (panoistic) κατά τον οποίο το ωάριο τροφοδοτείται αποκλειστικά από το θυλακοειδές επιθήλιο (follicular epithelium) και ο μεροϊστικός τύπος όπου εξειδικευμένα κύτταρα, τα τροφοκύτταρα (trophocytes) παρέχουν στο ωάριο RNA, πρωτεΐνες και ριβοσώματα κατά τη διάρκεια της ανάπτυξής του. Οι μεροϊστικοί ωοφόροι σωλήνες διακρίνονται σε πολυτροφικούς και τελοτροφικούς με τη διαφορά ότι στους τελευταίους τα τροφοκύτταρα παραμένουν στο germarium και τροφοδοτούν το ωοκύτταρο μέσω μίας λεπτής δομής υπεύθυνη για την θρέψη (Klowden, 2010) (Εικόνα 2). Χαρακτηριστικό παράδειγμα τελοτροφικών μεροϊστικών ωοφόρων σωλήνων αποτελεί το *T. molitor*. Γενικότερα, κάθε ωοφόρος σωλήνας αποτελείται από τρία μέρη, το ακραίο νημάτιο (terminal filament), το βλαστικό τμήμα (germarium) όπου εντοπίζονται τα ωογόνια και το βιτελλογενές τμήμα (vitellarium) που καταλαμβάνει το μεγαλύτερο μέρος και περιέχει τα αναπτυσσόμενα ωοκύτταρα και τα τροφοκύτταρα (Εικόνα 2). Κάθε ακραίο νημάτιο, ενώνεται με τα



Εικόνα 2. Τύποι ωοφόρων σωλήνων (Church et al., 2021)

υπόλοιπα της ίδιας ωοθήκης σχηματίζοντας τον προσαρτημένο αδένα (suspensory ligament) που συνδέει την ωοθήκη στο τοίχωμα του σώματος του εντόμου και τη διατηρεί αιωρούμενη στην αιμόκοιλο. Στη βάση τους τα τμήματα αυτά καταλήγουν, μέσω των ποδίσκων (pedicels), στον κάλυκα (calyx) που συνδέει κάθε ωοθήκη με τους πλευρικούς αγωγούς (Chapman et al., 2013). Αυτοί σχηματίζουν οπίσθια μέσω της ένωσής τους με τον κοινό αγωγό (common oviduct), ένα χαρακτηριστικό σχήμα «Υ» και μέσω αυτών μεταφέρονται τα ώριμα ωάρια από τους ωοφόρους σωλήνες, τα οποία καταλήγουν στον γεννητικό θάλαμο (Klowden, 2010) (Εικόνα 3).



Εικόνα 3. Σχηματική αναπαράσταση θηλυκού αναπαραγωγικού συστήματος εντόμου, όπου κάθε ωοθήκη αποτελείται από 4 ωοφόρους σωλήνες (Church et al., 2021)

Ο γεννητικός θάλαμος αποτελεί τροποποιημένο τμήμα του κοινού αγωγού, στο οποίο μπορούν να αποθηκευτούν προσωρινά τα ωάρια πριν την ωοτοκία. Στο εσωτερικό του απαντάται συχνά η θήκη οχείας, στην οποία εναποτίθεται αρχικά το σπέρμα μετά τη σύζευξη (Rocha et al., 2022). Στα Κολεόπτερα, όπως και στο *T. molitor*, η μεταφορά και αποθήκευση του σπέρματος ακολουθεί παρόμοια πορεία, με το σπέρμα να συγκεντρώνεται τελικά στη σπερματοθήκη όπου και μπορεί να διατηρηθεί για μεγάλα χρονικά διαστήματα (Gerber, 1973). Η σπερματοθήκη είναι μια δομή εκτοδερμικής προέλευσης που συνοδεύεται συνήθως από έναν σπερματικό αδένα, του οποίου οι εκκρίσεις συμβάλλουν στη συντήρηση και ενεργοποίηση του σπέρματος. Η γονιμοποίηση εξασφαλίζεται μέσω αυτής και η απελευθέρωση του σπέρματος γίνεται μέσω των σπερματικών πόρων, οι οποίοι καταλήγουν είτε στον κοινό αγωγό είτε απευθείας στον γεννητικό θάλαμο. Στις κατώτερες τάξεις εντόμων, η σπερματοθήκη συνδέεται συνήθως άμεσα με τον γεννητικό θάλαμο. Αντίθετα, σε περιπτώσεις όπου ο γεννητικός θάλαμος έχει διαμορφωθεί σε κόλπο (vagina), ο εκφορητικός πόρος της σπερματοθήκης εντοπίζεται μέσα στον αγωγό, καθιστώντας τη διαδικασία της γονιμοποίησης περισσότερο ελεγχόμενη (Chapman et al., 2013; Rocha et al., 2022). Η ύπαρξη εξειδικευμένων δομών αποθήκευσης σπέρματος θεωρείται σημαντικό εξελικτικό πλεονέκτημα, επιτρέποντας στα θηλυκά

να ελέγχουν τον χρόνο χρήσης του σπέρματος, να εξασφαλίζουν συνεχή γονιμοποιητική ικανότητα και να αυξάνουν την αναπαραγωγική τους επιτυχία (Klowden, 2010). Επιπλέον, σημαντικό ρόλο στην γονιμοποίηση έχουν οι επικουρικοί αδένες οι οποίοι συνήθως “εκφύονται” από τον γεννητικό θάλαμο και οι εκφορητικοί τους πόροι εκβάλλουν στη θήκη οχείας ή, σε ορισμένα είδη, στους πλευρικούς αγωγούς. Πρόκειται για ένα ζεύγος αδένων οι οποίοι, παράγουν απαραίτητες ουσίες για τη διατήρηση, τη μεταφορά και τη γονιμοποίηση του σπέρματος, καθώς και για την προστασία των ωαρίων (Rocha et al., 2022). Επιπρόσθετα, οι επικουρικοί αδένες παίζουν ρόλο και στην προσκόλληση των αβγών στο υπόστρωμα κατά την ωοτοκία, μέσω παραγωγής διάφορων ουσιών προσκόλλησης (Chapman et al., 2013).

Ειδικότερα, στο *T. molitor* η σπερματοθήκη σχηματίζεται από προέκταση του τοιχώματος του κόλπου και λειτουργεί αποκλειστικά ως αποθηκευτικός χώρος χωρίς εκκριτική δραστηριότητα (Gadzama et al., 1977). Αντίθετα, μέσω παρατηρήσεων με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, έγινε αντιληπτό ότι οι επικουρικοί αδένες φέρουν εκκριτικά επιθηλιακά κύτταρα (secretory epithelial cells) και κύτταρα σχηματισμού πόρων (duct forming cells), οργανωμένα σε στρώσεις και εξοπλισμένα με end apparatus (KIM & MOON, 2003). Τα εκκριτικά κύτταρα του επικουρικού αδένος παρουσιάζουν έντονη μεταβολική δραστηριότητα, καθώς φέρουν ανεπτυγμένο αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο (rER), εκτεταμένο σύμπλεγμα Golgi, πολυάριθμα μιτοχόνδρια και εκκριτικά κυστίδια. Οι εκκρίσεις που πραγματοποιούνται διοχετεύονται στον αυλό του αδένος μέσω των end apparatuses, που λειτουργούν ως δίοδοι μεταφοράς, επιτρέποντας τη συλλογή και διοχέτευση του εκκριτικού υλικού από το εσωτερικό του κυττάρου σε μικρούς πόρους που διαπερνούν την επιδερμική στιβάδα του αδένος. Με αυτόν τον τρόπο, η εκκριτική ουσία φτάνει στον αυλό χωρίς να διαταράσσεται η δομή του κυττάρου. Η συνεργασία αυτή, σπερματοθήκης και επικουρικών αδένων, διασφαλίζει τόσο την αποθήκευση και διατήρηση του σπέρματος όσο και την κατάλληλη προετοιμασία των ωαρίων για επιτυχή μεταφορά και γονιμοποίηση.

Ωογένεση και Βιτελλογένεση

Η υψηλή αναπαραγωγική ικανότητα των εντόμων στηρίζεται σε μεγάλο βαθμό στη διαδικασία της ωογένεσης, κατά την οποία παράγονται λειτουργικά ωάρια με εξειδικευμένες δομές που υποστηρίζουν την επιτυχή εμβρυογένεση. Η ωογένεση λαμβάνει χώρα στους ωοφόρους σωλήνες, οι οποίοι διακρίνονται στο πρόσθιο τμήμα, germarium, και στο οπίσθιο τμήμα, vitellarium. Στο germarium πραγματοποιείται ο σχηματισμός και η διαφοροποίηση των ωοκυττάρων από τα ωογόνια, ενώ στο vitellarium συνεχίζεται η ανάπτυξη των ωοκυττάρων καθώς και η εναπόθεση της λεκίθου (βιτελλογένεση). Στο germarium, τα ωογόνια υφίστανται μειωτικές διαιρέσεις και προκύπτει μια σειρά θυγατρικών κυττάρων, όπου ορισμένα διατηρούν τις βλαστικές του ιδιότητες, ενώ άλλα διαφοροποιούνται σε ωοκύτταρα. Τα αναπτυσσόμενα ωοκύτταρα περιβάλλονται από το προθυλακικό επιθήλιο (prefollicular epithelium), το οποίο διαφοροποιείται σε θυλακικό επιθήλιο (follicular epithelium) και σχηματίζεται το πλήρες θυλακικό κάλυμμα. Σε συγκεκριμένους

τύπους ωοφόρων σωλήνων, όπως στους πολυτροφικούς και στους τελοτροφικούς, το ωοκύτταρο συνοδεύεται από τροφοκύτταρα (nurse cells), τα οποία συμβάλλουν στην ανάπτυξη του ωοκυττάρου. Έπειτα, το ωοκύτταρο μετακινείται στο vitellarium, όπου εισέρχεται στην αυξητική φάση και στη συνέχεια στη βιτελλογένεση. Κατά τη διάρκεια της προ-βιτελλογενετικής ανάπτυξης, τα θυλακικά κύτταρα πολλαπλασιάζονται ραγδαία μέσω μιτωτικών διαιρέσεων. Όταν το ωοκύτταρο αναπτυχθεί πλήρως, σταματούν οι διαιρέσεις των θυλακικών κυττάρων και αποκτά πλακοειδή μορφή. Συνεπώς, σε κάθε ωοφόρο σωλήνα, τα ωοκύτταρα είναι διατεταγμένα σε διαδοχικά στάδια ανάπτυξης, με τα πιο ώριμα κοντά στην έξοδο του σωλήνα. Η διαδοχική οργάνωση αυτή επιτρέπει την προοδευτική ανάπτυξη των ωοκυττάρων και τα προετοιμάζει να φτάσουν στο επόμενο στάδιο, τη βιτελλογένεση (Chapman et al., 2013).

Για να ολοκληρωθεί η διαδικασία της ωογένεσης στα έντομα, καθοριστική διεργασία είναι αυτή της βιτελλογένεσης, κατά την οποία εναποτίθεται η λεκίθος στο ωοκύτταρο. Η κύρια πρόδρομη πρωτεΐνη της λεκίθου, η βιτελλογενίνη (vitellogenin, Vg), συντίθεται στο λιπώδες σώμα (fat body), απελευθερώνεται στην αιμολέμφο (hemolymph) και προσλαμβάνεται επιλεκτικά από το ωοκύτταρο μέσω υποδοχέων ενδοκυττάρωσης (Vitellogenin Receptors, VgR). Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της διαδικασίας που ονομάζεται *patency*, δηλαδή της απότομης διεύρυνσης (*enlargement*) των διαθυλακικών καναλιών των ωοκυττάρων, επιτρέποντας τη μεταφορά μορίων όπως η Vg από την αιμολέμφο στο εσωτερικό του ωοκυττάρου. Μέσα στο ωοκύτταρο, η βιτελλογενίνη υποβάλλεται σε επεξεργασία και μετατρέπεται σε βιτελλίνη (vitellin, Vn), την τελική μορφή της πρωτεΐνης, η οποία αποθηκεύεται στα σφαιρίδια λεκίθου (yolk spheres). Παράλληλα, στο ωοκύτταρο προσλαμβάνονται λιπίδια και, σε πολλά είδη, γλυκογόνο, τα οποία παρέχουν ενέργεια και δομικά στοιχεία για την ανάπτυξη του εμβρύου. Η συνολική σύνθεση της λεκίθου είναι αποτέλεσμα συνεργασίας μεταξύ του ωοκυττάρου και των θυλακικών κυττάρων που το περιβάλλουν, καθώς πολλά από αυτά, εκκρίνουν ουσίες που ρυθμίζουν και διευκολύνουν την πρόσληψη των αποθεμάτων. Επιπλέον, τα θυλακικά κύτταρα συμμετέχουν στο σχηματισμό του εξωτερικού περιβλήματος του ωαρίου (vitelline membrane). Ο συντονισμός αυτών των μηχανισμών, εφοδιάζει το ωοκύτταρο με τα απαραίτητα στοιχεία για την επιτυχή γονιμοποίηση και την έναρξη της εμβρυογένεσης (Chapman et al., 2013)

Η σύνθεση των θρεπτικών ουσιών στα ωάρια των θηλυκών εντόμων δεν πραγματοποιείται αυτόνομα, αλλά εξαρτάται από πολύπλοκα ορμονικά και μοριακά μονοπάτια. Συγκεκριμένα, κεντρικό ρόλο στη βιτελλογένεση κατέχουν δύο ορμόνες, η νεανική ορμόνη (juvenile hormone, JH) και η υδροξυεκυδυσόνη (20-hydroxyecdysone, 20E) (Z. Wu et al., 2021a). Η JH είναι μια σεσκιτερπενοειδής ορμόνη και ο ρόλος της είναι η ρύθμιση της διαδικασίας της αναπαραγωγής και της μεταμόρφωσης στα αρθρόποδα. Η JH συντίθεται στο *corpora allata*, και μεταφέρεται μέσω της αιμολέμφου. Η λιπόφιλη φύση της επιτρέπει τη διάχυση διαμέσου των κυτταρικών μεμβρανών, διευκολύνοντας την πρόσδεσή της σε υποδοχείς των κυττάρων-στόχων (Roy et al., 2025). Ο κύριος υποδοχέας της νεανικής ορμόνης (JH)

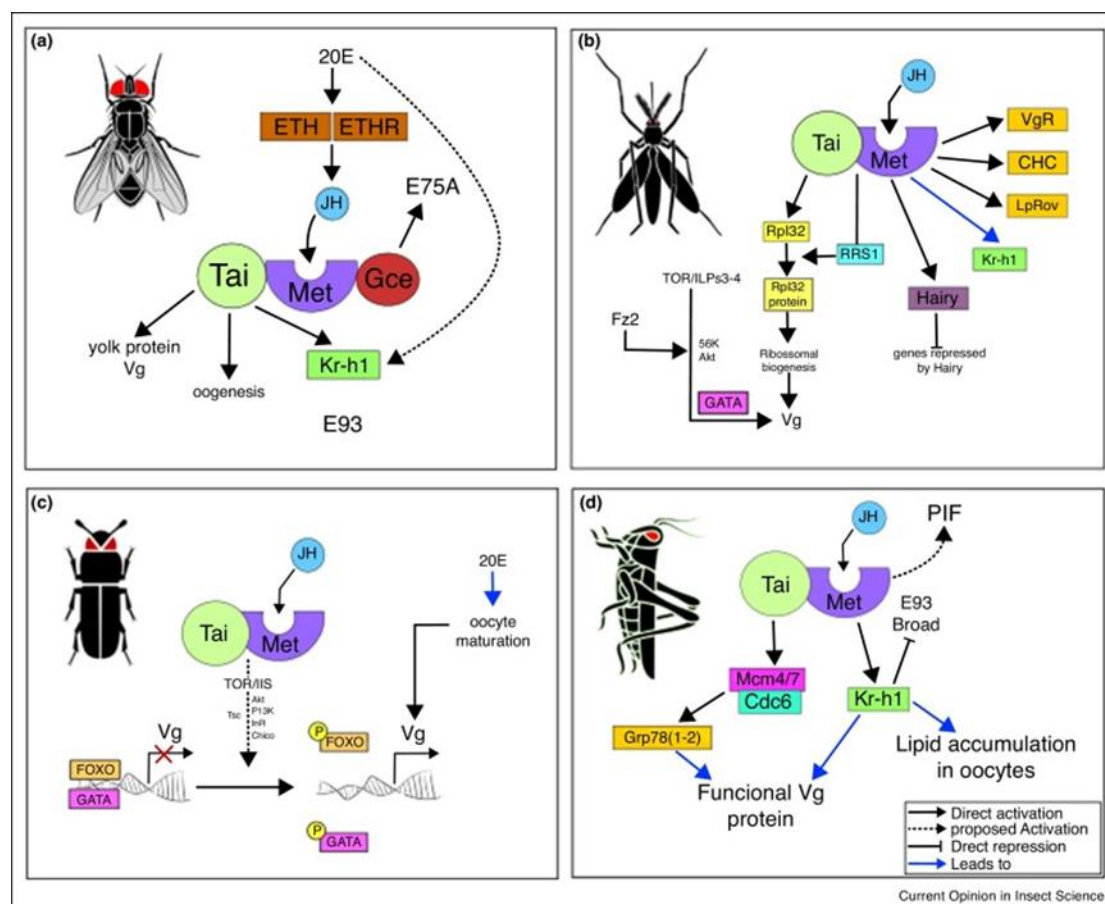
είναι η πρωτεΐνη Methoprene-tolerant (Met), η οποία ανήκει στην οικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων bHLH-PAS (basic helix-loop-helix Per/Arnt/Sim) (Z. Wu et al., 2021b). Το μόριο της Met διαθέτει ένα PAS-B domain που επιτρέπει την δέσμευση της ορμόνης, λόγω υψηλής ευαισθησίας (Jindra et al., 2013).

Για να είναι λειτουργική, η Met χρειάζεται να σχηματίσει ετεροδιμερές με έναν δεύτερο bHLH-PAS παράγοντα. Στην περίπτωση αυτή, η συνεργαζόμενη πρωτεΐνη είναι η Taiman (Tai) (Miura et al., 2005). Το σύμπλοκο Met/Tai με την είσοδό του στον πυρήνα, αναγνωρίζει ειδικές αλληλουχίες DNA στους υποκινητές γονιδίων-στόχων. Οι αλληλουχίες αυτές είναι γνωστές ως JH response elements, (JHREs) και έχουν εντοπιστεί στον υποκινητή της βιτελλογενίνης, ενεργοποιώντας τη μεταγραφή της. Μέσω αυτής της οδού, ενεργοποιούνται και πρώιμα γονίδια όπως το *Krüppel-homolog 1* (*Kr-h1*) (Cui et al., 2014; Jindra et al., 2013). Το *Kr-h1* λειτουργεί κυρίως ως βασικός μεταγραφικός αναστολέας της πρόωρης μεταμόρφωσης στα προνυμφικά στάδια, καθώς εμπλέκεται και στην έναρξη της βιτελλογένεσης. Αν και οι ακριβείς μοριακοί μηχανισμοί δεν έχουν αποσαφηνιστεί πλήρως υπάρχουν ενδείξεις ότι εμπλέκεται μέσω διασταυρούμενης ρύθμισης με τα σηματοδοτικά μονοπάτια IIS (insulin/insulin-like signaling) και TOR (Target of Rapamycin, TOR) (Konopova & Jindra, 2007; Parthasarathy et al., 2010).

Αντίστοιχα, στα Κολεόπτερα και ειδικότερα στο *Tribolium castaneum*, έχουν ταυτοποιηθεί ομόλογα γονίδια που συμμετέχουν στην ίδια οδό. Πιο συγκεκριμένα, μελέτες έδειξαν ότι οι δύο πρωτεΐνες TcMet και TcSRC (steroid receptor coactivator) είναι απαραίτητες στο σηματοδοτικό μονοπάτι της JH. Η TcMet ρυθμίζει την είσοδο των προνυμφών στη μεταμόρφωση και ταυτόχρονα εμποδίζει την πρόωρη εμφάνιση ενήλικων δομών κατά το νυμφικό στάδιο. Αντίστοιχα, η πρωτεΐνη TcSRC, ομόλογη της Tai στη *D. melanogaster*, συνεργάζεται με τη TcMet για τον σχηματισμό λειτουργικού ετεροδιμερούς, το οποίο είναι απαραίτητο για την ενεργοποίηση γονιδίων-στόχων που αποκρίνονται στη JH (Zhang et al., 2011). Η ύπαρξη ομόλογων γονιδίων όπως η Met, η Tai/TcSRC και το Kr-h1 σε διαφορετικά είδη αποδεικνύει την εξελικτική συντήρηση των βασικών μηχανισμών σηματοδότησης μεταξύ των εντόμων (Wilson & Ashok, 1998; Zhang et al., 2011).

Εκτός από την ενεργοποίηση της σύνθεσης της Vg, η νεανική ορμόνη ελέγχει και τη διαδικασία πρόσληψής της από τα ωκύτταρα. Ο μηχανισμός αυτός επιτυγχάνεται μέσω του φαινομένου patency που προαναφέρθηκε, δηλαδή την απότομη διεύρυνση των διαθυλακικών καναλιών των ωκυττάρων, επιτρέποντας τη μεταφορά μορίων, όπως η Vg, από την αιμόλεμφο στο εσωτερικό του ωκυττάρου. Ένας κρίσιμος παράγοντας στη ρύθμιση αυτής της διαδικασίας είναι η ενεργοποίηση της αντλίας Na^+/K^+ -ATPase, η οποία ρυθμίζει την ώσμωση των κυττάρων μέσω μεταβολής της ιοντικής ισορροπίας, αυξάνοντας τη διαπερατότητα των μεμβρανών (Raikhel & Dhadialla, 1992). Πέρα από τον κλασικό μηχανισμό, έχει αποδειχθεί ότι η JH δρα και μέσω διαμεμβρανικών υποδοχέων συζευγμένων με G-πρωτεΐνες (GPCRs). Στο *T. castaneum*, μέσω πειραμάτων με RNAi, εξετάστηκαν 112 GPCRs, από τους οποίους οι 41 λόγω καταστολής, είχαν ως αποτέλεσμα μείωση της γονιμότητας. Μεταξύ αυτών, υπήρξαν δύο υποδοχείς που προκάλεσαν σημαντική μείωση στην

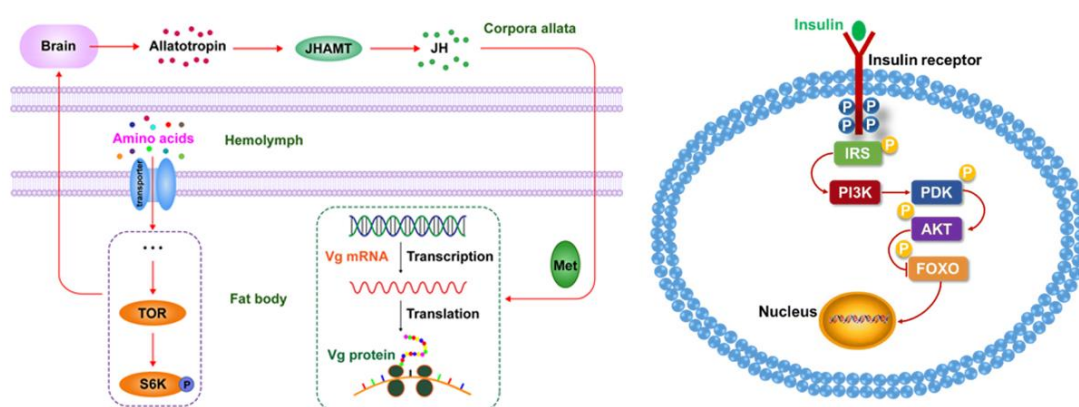
ικανότητα συσσώρευσης της Vg σε αναπτυσσόμενα ωκύτταρα. Οι συγκεκριμένοι υποδοχείς είναι ο TcD2R (Dopamine D2-like receptor) και ο TcRh2 (Rhodopsin-like receptor). Ιδιαίτερα, ο TcD2R, που εκφράζεται σε θυλακικά κύτταρα, ενεργοποιεί Gi πρωτεΐνες, οδηγώντας σε μείωση του cAMP, γεγονός που συνδέεται άμεσα με τη ρύθμιση της Na⁺/K⁺-ATPase και την εγκαθίδρυση του patency (Bai & Palli, 2016). Συνεπώς, η JH ρυθμίζει την πρόσληψη της Vg μέσω συνδυασμού ορμονικής και μεμβρανικής σηματοδότησης, διασφαλίζοντας την ομαλή ανάπτυξη των ωκυττάρων.



Εικόνα 4. Απεικόνιση του σηματοδοτικού μονοπατιού της JH στη βιτελλογένεση στην (α) *Drosophila melanogaster*, το (b) *Aedes aegypti*, το (c) *Tribolium castaneum* και την (d) *Locusta migratoria* (Santos et al., 2019).

Επιπλέον, η διατροφή παίζει καθοριστικό ρόλο στη ρύθμιση της σύνθεσης της βιτελλογενίνης Vg, καθώς τα διαθέσιμα θρεπτικά συστατικά λειτουργούν ως μεταβολικά σήματα για την ενεργοποίηση της αναπαραγωγής στα έντομα. Σε μοριακό επίπεδο, η παρουσία αμινοξέων, ενεργοποιεί σηματοδοτικά μονοπάτια όπως το AA/TOR. Όταν τα επίπεδα αμινοξέων είναι επαρκή, ενεργοποιείται το σύμπλοκο TORC1 το οποίο, καταστέλλει τον αρνητικό ρυθμιστή Tsc (Tuberous sclerosis complex). Αυτή η καταστολή οδηγεί στη φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση των κινάσων S6K1, S6K2, οι οποίες προάγουν και ενισχύουν την έκφραση της Vg (Lu et al., 2016). Η σημασία του μονοπατιού TOR αποδείχθηκε και στο *T. castaneum* μέσω πειραμάτων σίγησης με RNAi. Η καταστολή των *SK6K1* και *SK6K2* προκάλεσε μερική

μείωση στην έκφραση του *Vg2*, ενώ η ενεργοποίηση του Tsc οδήγησε στην καταστολή της σύνθεσης της *Vg* (Parthasarathy & Palli, 2011). Άλλο μονοπάτι που ρυθμίζει τη βιτελλογένεση και αφορά τη διατροφή είναι το IIS/FoxO (Insulin/Insulin-like Signaling). Συγκεκριμένα, στο *T. castaneum* η JH ενεργοποιεί τα ILP2 και ILP3, τα οποία δεσμεύονται στον υποδοχέα της ινσουλίνης (InR) που, μέσω της αυτοφωσφορυλίωσής του, ενεργοποιεί άλλες ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες. Μία από αυτές είναι η Chico, που με τη σειρά της ενεργοποιεί την οδό PI3K/Akt. Η φωσφορυλίωση της κινάσης Akt ενεργοποιεί τον μεταγραφικό παράγοντα FoxO με αποτέλεσμα την εξαγωγή του από τον πυρήνα. Αντίθετα, όταν ο FoxO παραμένει αποφωσφορυλιωμένος στον πυρήνα, προσδένεται στον υποκινητή του *Vg* και εμποδίζει τη μεταγραφή της. Συνεπώς, το σηματοδοτικό μονοπάτι IIS/FoxO συνδέει τα αποθέματα του οργανισμού με την ενεργοποίηση της *Vg*, εξασφαλίζοντας ότι η διαδικασία ξεκινά μόνο όταν υπάρχουν επαρκή εφόδια για την ανάπτυξη του εντόμου (Parthasarathy et al., 2010; Parthasarathy & Palli, 2011).



Εικόνα 5. Σχηματικές απεικονίσεις σηματοδοτικών μονοπατιών ρύθμισης της βιτελλογένεσης μέσω διατροφής, στα αριστερά είναι το μονοπάτι AA/TOR, ενώ από τα δεξιά το μονοπάτι IIS/FoxO (Chang et al., 2019; Lu et al., 2016)

Εκτός από τη νεανική ορμόνη, σημαντικός ρυθμιστής της βιτελλογένεσης στα έντομα όπως και στο *T. castaneum* είναι και η 20-υδροξυεκδυσόνη (20E). Η 20E δρα μέσω του ετεροδιμερούς EcR/USP (Ecdysone receptor/Ultraspiracle) και ενεργοποιεί την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται κυρίως με την ωρίμανση των ωοκυττάρων. Στο *T. castaneum* έχει αποδειχθεί ότι η σηματοδότηση της 20E είναι απαραίτητη για τη σωστή εναπόθεση της λέκιθου και τη διαφοροποίηση των θυλακικών κυττάρων. Πειραματικές μελέτες που στόχευσαν μέσω RNAi τα γονίδια *EcR* και *USP*, έδειξαν έντονη μείωση στην έκφραση του γονιδίου *Vg*, γεγονός που υποδηλώνει ότι η 20E λειτουργεί συνεργιστικά με τη JH. Έτσι, διασφαλίζεται η ολοκλήρωση της ανάπτυξης των ωοκυττάρων και η εναπόθεση των αβγών (Parthasarathy et al., 2010; Xu et al., 2010).

Ωορρηξία, ωοτοκία και εμβρυογένεση

Η διαδικασία απελευθέρωσης ενός ώριμου ωαρίου από τον ωοφόρο σωλήνα στον ωαγωγό είναι γνωστή ως ωορρηξία. Από τη στιγμή που πραγματοποιηθεί το ζευγάρωμα μεταξύ των εντόμων, ορμονικά σήματα προκαλούν συντονισμένη μυϊκή σύσπαση των τοιχωμάτων του ωαγωγού, διευκολύνοντας τη μετακίνηση των ωαρίων. Παράλληλα, παρατηρείται συστολή της σπερματοθήκης, ωθώντας τα σπερματοζωάρια προς τον σπερματοθηκικό πόρο (spermathecal duct), όπου και παραμένουν έως ότου δοθούν τα κατάλληλα σήματα που υποδεικνύουν ότι το ωάριο βρίσκεται στον κοινό ωαγωγό. Η γονιμοποίηση πραγματοποιείται στη θήκη οχείας ή στον κόλπο, ανάλογα το είδος. Η επίτευξη της γονιμοποίησης γίνεται με την είσοδο του σπερματοζωαρίου μέσω ενός ή περισσότερων μικροπυλών, που αποτελούν μια τροποποιημένη δομή του χορίου η οποία είναι προσανατολισμένη προς τον άνοιγμα της σπερματοθήκης, επιτρέποντας την επιλεκτική είσοδο του σπέρματος (Chapman et al., 2013; Rocha et al., 2022).

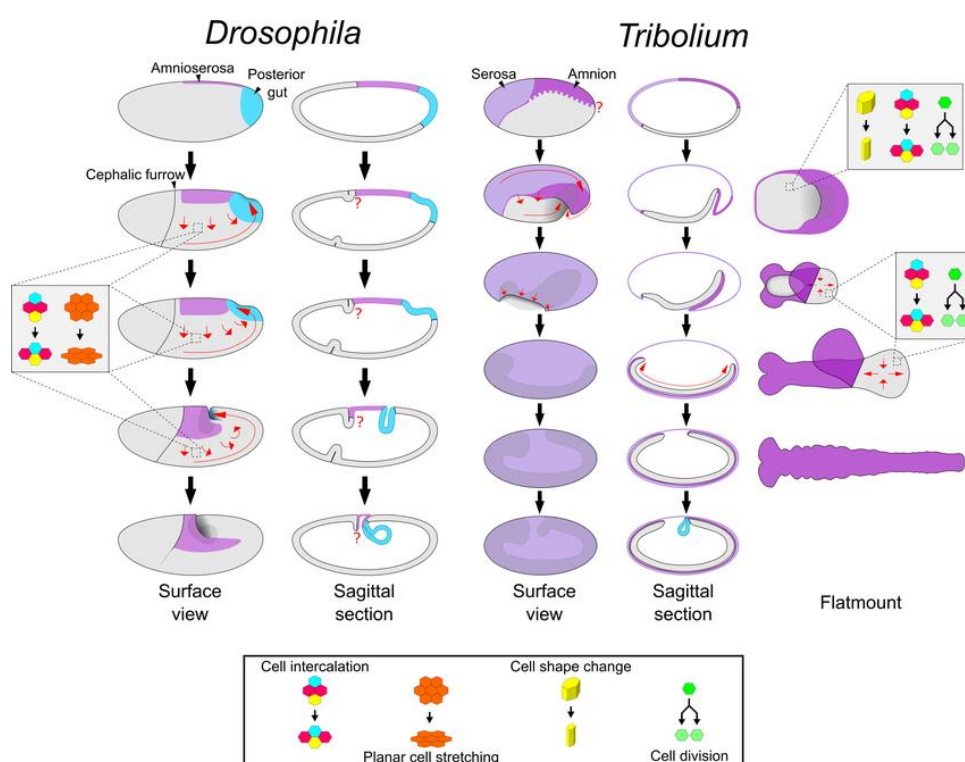
Μετά την γονιμοποίηση του ωαρίου, το αβγό μέσω του ωοθέτη (ovipositor) περνά από τον γονοπόρο (genital opening or vulva) και καταλήγει στο εξωτερικό περιβάλλον. Η διαδικασία της ωοτοκίας παρουσιάζει ποικιλομορφία μεταξύ των ειδών, καθώς προσαρμόζεται στις περιβαλλοντικές απαιτήσεις κάθε είδους. Σε πολλά έντομα, ο ωοθέτης αποτελεί μία εξειδικευμένη δομή που επιτρέπει την εναπόθεση αβγών σε συγκεκριμένες θέσεις, οι οποίες διευκολύνουν την επιβίωσή τους. Για τον λόγο αυτό, η ωοτοκία συχνά συσχετίζεται με συγκεκριμένες χαρακτηριστικές συμπεριφορές όπως το σκάψιμο, η εναπόθεση σε προστατευμένα σημεία, αλλά και με ορμονική ρύθμιση, καθοδηγώντας το έντομο σε κατάλληλες θέσεις ωοτοκίας (Chapman et al., 2013; Rocha et al., 2022). Αντίστοιχα, στα Κολεόπτερα όπως το *T. molitor*, τα θηλυκά προτιμούν να εναποθέτουν αβγά σε υποστρώματα πλούσια σε θρεπτικά συστατικά, παρέχοντας στις προνύμφες ευνοϊκές συνθήκες για την ανάπτυξη τους (Muñoz-Seijas et al., 2024)

Κατά την εμβρυογένεση, αναπτυξιακά γεγονότα οδηγούν στην μετατροπή του γονιμοποιημένου ωαρίου σε προνύμφη. Αρχικά, η είσοδος του σπερματοζωαρίου ενεργοποιεί το ωάριο, το οποίο υφίστανται μια σειρά πυρηνικών διαιρέσεων, χωρίς ταυτόχρονη κυτταροπλασματική διαίρεση οδηγώντας στον σχηματισμό του συγκύτιου (syncytium). Στη συνέχεια τα energids (πυρήνες) μετακινούνται στο περιφέρεια-περίπλασμα (periplasm), σχηματίζοντας το συγκυτιακό βλαστόδερμα (syncytial blastoderm), το οποίο στη συνέχεια διαφοροποιείται σε κυτταρικό βλαστόδερμα. Τα κύτταρα της κοιλιακής περιοχής του βλαστοδέρματος διαφοροποιούνται σε germ anlage, μια συμπαγή κυτταρική δομή από την οποία θα προκύψει το έμβρυο. Με τη γαστριδίωση γίνεται ο σχηματισμός των τριών βλαστικών στιβάδων (εκτόδερμα, μεσόδερμα, ενδόδερμα), αρχίζει η επιμήκυνση και τμηματοποίηση του εμβρύου, ακολουθούμενη από την οργανογένεση.

Το εκτόδερμα σχηματίζει το σωματικό περίβλημα (body wall), το τραχειακό σύστημα, το νευρικό σύστημα και τα αισθητήρια όργανα. Το μεσόδερμα σχηματίζει αρχικά coelomic sacs, οι οποίοι σχηματίζουν τους μυς, κυκλοφορικό και αναπαραγωγικό σύστημα, ενώ το ενδόδερμα συμβάλλει στη δημιουργία του

μεσεντέρου (Rocha et al., 2022). Η εμβρυϊκή ανάπτυξη ελέγχεται αρχικά από μηχανισμούς που επηρεάζουν ολόκληρο το έμβρυο ενώ στη συνέχεια, η ρύθμιση γίνεται πιο εξειδικευμένη, καθώς τοπικές αλληλεπιδράσεις και μηχανισμοί καθοδηγούν των σχηματισμό ιστών και οργάνων. Στα τελευταία στάδια, συμβάλλουν και ορμονικά σήματα για την ολοκλήρωση της ανάπτυξης του εμβρύου, προετοιμάζοντάς το για την εκκόλαψη (Charman et al., 2013).

Στα Κολεόπτερα, όπως το *T. castaneum*, ακολουθείται το παραπάνω γενικό πρότυπο, ωστόσο εμφανίζει ιδιαιτερότητες. Στα έντομα, ο τύπος ανάπτυξης διαφέρει ως προς την τμηματοποίηση του σώματος, καθώς σε είδη με long germ band (π.χ. *Drosophila*) καθορίζονται σχεδόν όλα τα τμήματα από νωρίς, ενώ σε είδη με short ή intermediate germ band τα πρόσθια τμήματα καθορίζονται αρχικά και τα οπίσθια σχηματίζονται σταδιακά (Εικόνα 7). Το *T. castaneum* ανήκει στη δεύτερη κατηγορία, και σε αντίθεση με τη *Drosophila*, η διαδικασία βασίζεται λιγότερο σε μητρικά ερεθίσματα και περισσότερο σε αυτορυθμιστικούς μηχανισμούς, γεγονός που αναδεικνύει τη διαδοχική φύση της τμηματοποίησης και την ανάγκη για επαναλαμβανόμενο σχηματισμό προτύπων (Lynch et al., 2012).



Εικόνα 6. Σχηματική αναπαράσταση της εμβρυϊκής ανάπτυξης στη *Drosophila* και στο *Tribolium*. Οι αριστερές στήλες απεικονίζουν έμβρυα *Drosophila* από το στάδιο του βλαστοδέρματος έως το στάδιο του εκτεταμένου germ band, ενώ τα δεξιά πλαίσια απεικονίζουν συγκρίσιμα στάδια στο *Tribolium*. Τα κόκκινα βέλη υποδεικνύουν κινήσεις κυττάρων/ιστών (Benton, 2018)

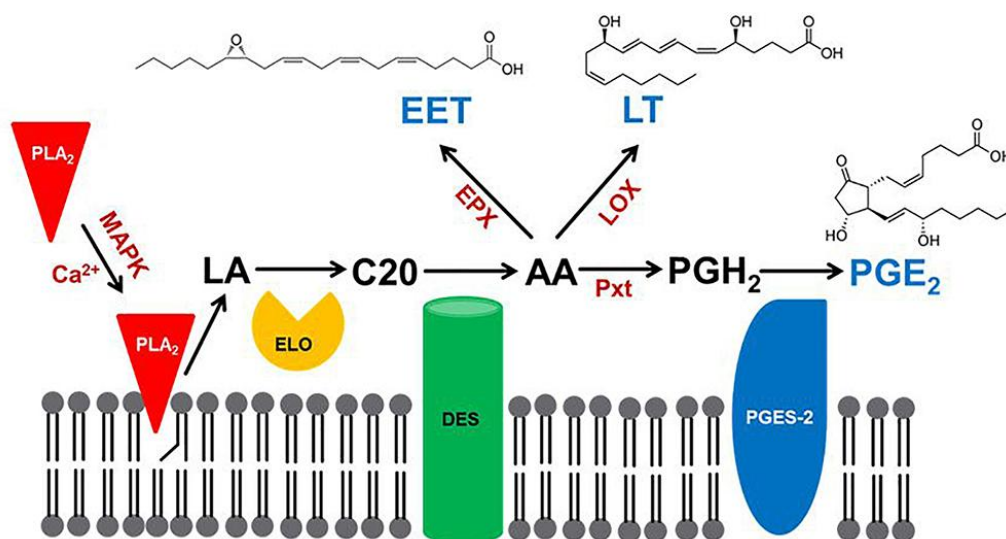
Οι Προσταγλανδίνες στα έντομα

Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFAs) δεν αποτελούν μόνο δομικά συστατικά των κυτταρικών μεμβρανών αλλά συμμετέχουν ως πρόδρομες ενώσεις σε σηματοδοτικά και μοριακά μονοπάτια (Dyall et al., 2022). Μετά την οξυγόνωσή τους προκύπτουν μόρια που μεσολαβούν και ρυθμίζουν κρίσιμες διεργασίες. Τα μόρια αυτά είναι τα εικοσανοειδή, τα οποία προκύπτουν κυρίως από το αραχιδονικό οξύ (AA, 20:4n-6) καθώς και από άλλα PUFAs, όπως το εικοσαπεντανοϊκό οξύ (EPA, 20:5n-3) και το διχομο-γ-λινολενικό οξύ (DGLA, 20:3n-6) (Bergström et al., 1964). Από αυτά, η πιο μελετημένη οδός είναι η μετατροπή του AA προσταγλανδίνες (PG), επινοβοξυτριενικά οξέα (eicosatetraenoic acids) και λευκοτριένια (Stanley & Kim, 2019a). Στα έντομα, και τα τρία αυτά προϊόντα έχουν ταυτοποιηθεί, ωστόσο οι PG έχουν αναδειχθεί ως οι βασικοί ρυθμιστές φυσιολογικών και ανοσολογικών διεργασιών (Ahmed & Kim, 2020). Πιο συγκεκριμένα, οι PG λειτουργούν ως αυτοκρινή και παρακρινή σηματοδοτικά μόρια, επηρεάζοντας κρίσιμες λειτουργίες όπως η αναπαραγωγή, η ανοσολογική απόκριση, ο μεταβολισμός καθώς και η ομοιόσταση (Stanley, 2006). Ειδικότερα στα έντομα, έχει παρατηρηθεί ότι συμμετέχουν στην ανάπτυξη των ωοκυττάρων, στη συμπεριφορά ωοτοκίας και σε κυτταρικές ανοσολογικές διεργασίες όπως η μελανοποίηση (Stanley & Kim, 2019a).

Η σηματοδότηση μέσω PG στα έντομα βασίζεται σε μοριακούς μηχανισμούς που σε γενικές γραμμές θυμίζουν αυτούς των σπονδυλωτών, όμως υπάρχουν σημαντικές διαφοροποιήσεις. Ενδεικτικά, επειδή τα περισσότερα χερσαία έντομα διαθέτουν μικρή ποσότητα AA στα φωσφολιπίδιά τους, χρησιμοποιούν το λινολεϊκό οξύ (LA) ως πρόδρομο, το οποίο μετατρέπεται σε AA (Hasan et al., 2019; Stanley & Kim, 2019a). Μία ακόμη διαφορά στη βιοσύνθεση των PG αφορά το ένζυμο της κυκλοοξυγενάσης (COX), καθώς στα γονιδιώματα των εντόμων δεν υπάρχουν ορθόλογά της. Αντιθέτως, η μετατροπή του AA καταλύεται από την περοξινέκτινη (Pxt), μια περοξειδάση λειτουργικά ανάλογη του COX (Park et al., 2014a; Tootle & Spradling, 2008a; Varvas et al., 2009). Στη συνέχεια, συντίθενται βιοδραστικές PGs, όπως PGE2 και PGD2, οι οποίες συμμετέχουν τόσο στην αναπαραγωγή όσο και στην ανοσία (Ahmed et al., 2018; Sajjadian et al., 2020). Οι ιδιαιτερότητες αυτές υποδεικνύουν ότι η βιοσυνθετική οδός των PGs στα έντομα φέρει σημαντικές διαφοροποιήσεις, γεγονός που καθιστά απαραίτητη την διερεύνηση των μηχανισμών που τη διέπουν.

Η βιοσύνθεση των PG ξεκινά με την υδρόλυση των φωσφολιπιδίων της κυτταρικής μεμβράνης από τις φωσφολιπάσες A2 (PLA2) και την απελευθέρωση πρόδρομων λιπαρών οξέων. Το κύριο υπόστρωμα για τη σύνθεση PGs είναι το αραχιδονικό οξύ (AA), το οποίο στα έντομα βρίσκεται σε μικρές ποσότητες και μπορεί να παραχθεί από το λινελαϊκό οξύ (linoleic acid, LA) (Εικόνα 8) (Stanley & Kim, 2019a). Όσον αφορά τις PLA (Phospholipase A), στα έντομα έχουν μελετηθεί τρεις κύριοι τύποι, οι γραμμικές secretory PLA2 (sPLA2), οι ασβεστοανεξάρτητες calcium-independent intracellular PLA2 (iPLA2) και συγγενικές μορφές των calcium-dependent

intracellular PLA2 (cPLA2) κυτοσολικές, αν και το χαρακτηριστικό C2 domain των σπονδυλωτών δεν εντοπίζεται στα (Dennis, 1994; Schaloske & Dennis, 2006).



Εικόνα 7. Απεικόνιση της βιοσυνθετικής πορείας προσταγλανδινών στα έντομα (Stanley & Kim, 2019b).

Μελέτες και αναλύσεις σχετικά με τις PLA2 έχουν δείξει ότι διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στην ανοσολογική απόκριση των εντόμων. Για παράδειγμα, σε έντομα όπως ο σκώληκας των τεύτλων (*Spodoptera exigua*), η καταστολή αυτών των ενζύμων, μέσω RNAi ή αναστολέων, οδήγησε σε ανοσοκαταστολή και καθυστερημένη ανάπτυξη, η οποία αποκαταστάθηκε μετά από εξωγενή χορήγηση AA (Park et al., 2014). Στο μεταξοσκώληκα *Bombyx mori*, βρέθηκε μία iPLA2 που εκφράζεται έντονα στο λιπώδη ιστό και όταν καταστέλλεται μέσω RNAi, προκαλεί θνησιμότητα (Orville Singh et al., 2016). Παράλληλα, σε Κολεόπτερα όπως το σκαθάρι *Cicindela circumpicta* ανιχνεύθηκε cPLA2 στο μεσέντερο, ενώ το σκαθάρι *Nicrophorus marginatus* εκκρίνει σιελογόνο PLA2 που προστατεύει την τροφή των προνυμφών από την αποσύνθεση (Rana et al., 1997; Uscian et al., 1995). Στο *T. castaneum* έχουν ταυτοποιηθεί πέντε γονίδια sPLA2, τέσσερα των οποίων εμπλέκονται στην κυτταρική ανοσία (Shrestha et al., 2010).

Το δεύτερο βήμα του βιοσυνθετικού μονοπατιού είναι η μετατροπή του αραχιδονικού οξέος, η οποία πραγματοποιείται από μια συγκεκριμένη περοξειδάση, τη peroxinectin (Pxt). Η Pxt είναι ένα ένζυμο λειτουργικά ανάλογο του COX, που καταλύει την οξείδωση του AA σε PGH₂. Το PGH₂ είναι το πρόδρομο μόριο όλων των προσταγλανδινών. Συνεπώς, η τελική διαφοροποίηση των PGs γίνεται μέσω εξειδικευμένων συνθασών, οι οποίες παράγουν τις ενεργές PGs (PGE₂, PGD₂, PGF_{2a}) (Stanley & Kim, 2019; Tootle & Spradling, 2008). Στο *S. exigua*, έχουν ταυτοποιηθεί η συνθάση mPGES2 (Se-mPGES2), που είναι υπεύθυνη για τη βιοσύνθεση PGE₂ και η PGD₂ συνθάση (SePGDS), που καταλύει τη βιοσύνθεση της PGD₂. Η σίγηση αυτών των γονιδίων έδειξε ότι επηρέαζαν όχι μόνο την ανοσία του εντόμου αλλά και την αναπαραγωγή του (Park et al., 2014).

Σε αντίθεση με τα σπονδυλωτά, στα έντομα δεν έχουν βρεθεί ομόλογα κυκλοοξυγενασών (COX). Αντ' αυτών τη λειτουργία τους στη σύνθεση των προσταγλαδινών επιτελεί το ένζυμο peroxinectin (Pxt). Αυτό, καταλύει την οξείδωση του AA σε PGH₂, που στη συνέχεια μετατρέπεται σε λειτουργικές προσταγλανδίνες όπως οι PGE₂, PGD₂, PGF_{2α} μέσω ειδικών συνθασών. (Stanley & Kim, 2019; Tootle & Spradling, 2008). Για παράδειγμα, έχει βρεθεί στο *S. exigua* μια συνθάση mPGES2 (Se-mPGES2), υπεύθυνη για τη βιοσύνθεση PGE₂ και μια PGD₂ συνθάση (SePGDS), που καταλύει τη βιοσύνθεση της PGD₂. Η σίγηση αυτών των γονιδίων έδειξε ότι επηρέαζαν όχι μόνο την ανοσία του εντόμου αλλά και την αναπαραγωγή του (Park et al., 2014).

Ο ρόλος των PG στην αναπαραγωγή των εντόμων

Η πρώτη μελέτη που πραγματοποιήθηκε και κατέγραψε τη συμβολή των PGs στην αναπαραγωγή των εντόμων ήταν στο τριζόνι (*Teleogryllus commodus*). Συγκεκριμένα, η έγχυση προσταγλανδίνης E2 (PGE2) σε θηλυκά άτομα προκαλούσε αύξηση στην ωοτοκία, ενώ μεταγενέστερες μελέτες έδειξαν ότι τα αρσενικά έχουν την ικανότητα μεταφοράς συνθάσης της PG στο θηλυκό μέσω του σπερματοφόρου. Το ένζυμο χρησιμοποιεί το AA που βρίσκεται στις σπερματοθήκες ώστε να φτιάξει PGE2, το οποίο απελευθερώνεται στην αιμόλεμφο (Loher, 1979). Το φαινόμενο αυτό, enzyme transfer model (μοντέλο μεταφοράς ενζύμου), επιβεβαιώθηκε και σε άλλα έντομα όπως το *Locusta migratoria* και στο *Triatoma infestans* (Brenner & Bernasconi, 1989; Lange, 1984). Ωστόσο, η επίδραση των PGs δεν είναι καθολική σε όλα τα είδη, όπως για παράδειγμα στον γρύλλο *Anurogryllus muticus* όπου δεν παρατηρήθηκε καμία αλλαγή στην ωοτοκία μετά από χορήγηση PGs (Lee & Loher, 1995).

Πέρα από τον ρόλο τους στην ωοτοκία, οι PG επηρεάζουν κρίσιμα στάδια της ωογένεσης. Στον μεταξοσκώληκα *B. mori*, η αναστολή της βιοσύνθεσης PG εμπόδισε τη μετάβαση των θυλακικών κυττάρων από το στάδιο της ανάπτυξης στη χοριογένεση, υποδεικνύοντας ότι οι PG είναι απαραίτητες για την ολοκλήρωση της ωρίμανσης των ωοκυττάρων (Machado et al., 2007). Στο *S. exigua*, η προσταγλανδίνη D2 (PGD2) ρυθμίζει την τελική φάση ωρίμανσης μέσω του μηχανισμού *nurse cell dumping*, δηλαδή η μεταφορά του κυτταροπλάσματος των τροφοκυττάρων nurse cells στο αναπτυσσόμενο ωοκύτταρο (Spracklen et al., 2014; Wheatley et al., 1995). Παράλληλα, μελέτες στη *D. melanogaster* έδειξαν ότι οι PG διευκολύνουν τη βιτελλογένεση και συντονίζουν την έκφραση γονιδίων του χορίου κατά τα τελευταία στάδια της ωογένεσης (Spracklen et al., 2014). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον είχε και η καταστολή του ενζύμου Se-mPGES2 στο *S. exigua* καθώς μειώθηκε η ωοτοκία των γονιμοποιημένων θηλυκών, γεγονός που υποδεικνύει ότι οι PG σχετίζονται και με λειτουργίες του αρσενικού αναπαραγωγικού συστήματος (Sajjadian et al., 2020). Αντίστοιχα, στη *D. melanogaster* η mPGES2 έχει συσχετιστεί με τη γονιμότητα των αρσενικών (Tootle et al., 2011). Τα παραδείγματα αυτά δείχνουν ότι οι PG είναι

θεμελιώδεις ρυθμιστές της επιτυχούς αναπαραγωγής των εντόμων, επηρεάζοντας τόσο το θηλυκό όσο και την αρσενικό αναπαραγωγικό σύστημα.

Ο ρόλος των PG στην ανοσολογική απόκριση των εντόμων

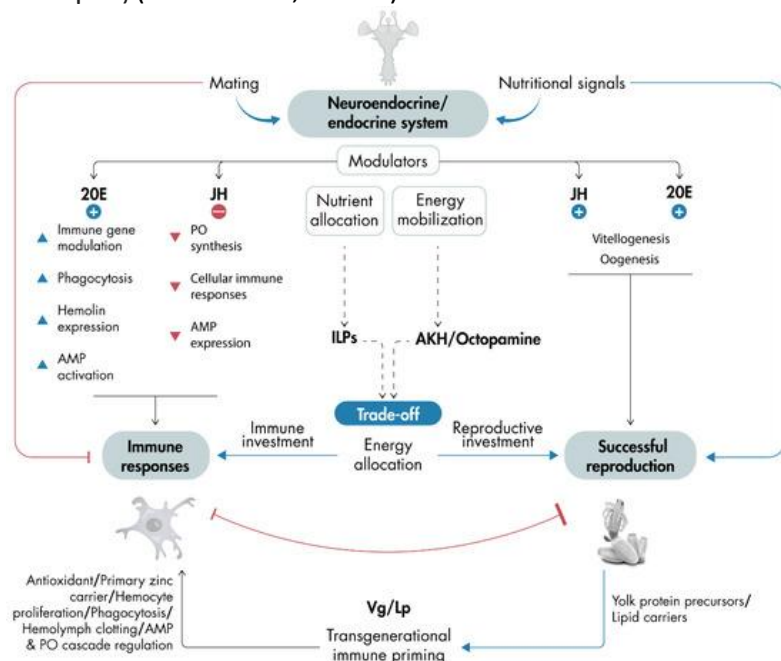
Οι προσταγλανδίνες είναι κρίσιμοι μεταβολίτες της ανοσολογικής απόκρισης, δρώντας σε πολλαπλά επίπεδα άμυνας. Ένα σημαντικό πρότυπο τέτοιας απόκρισης είναι στο *T. castaneum* όπου οι φωσφολιπάσες PLA2 διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στην κυτταρική ανοσία μέσω της δημιουργίας οξιδίων. Συγκεκριμένα, τέσσερα γονίδια sPLA2 συμμετέχουν στην ανοσολογική απόκριση. Μία πειραματική προσέγγιση που έγινε μέσω βακτηριακής προσβολής, έδειξε αύξηση της δραστηριότητας των ενζύμων, ενώ όταν πραγματοποιήθηκε σίγηση μέσω RNAi κάθε γονιδίου ξεχωριστά οδήγησε στη μείωση οξιδίων. Σημαντικό εύρημα ήταν και η μεταφορά του TcsPLA2B σε μεμβράνες αιμοκυττάρων μετά τη μόλυνση, συνδέοντας άμεσα την ενεργοποίηση του ενζύμου με την ανοσολογική σηματοδότηση (Shrestha et al., 2010). Άλλο χαρακτηριστικό παράδειγμα προέρχεται από το *S. exigua*, καθώς το ένζυμο Se-mPGES2, που είναι υπεύθυνο για την τελική μετατροπή του PGH2 σε PGE2, αποκάλυψε την εμπλοκή του στην άμυνα του εντόμου. Συγκεκριμένα, η σίγηση του *Se-mPGES2*, μέσω RNAi, προκάλεσε μείωση τριών ανοσολογικών λειτουργιών σε προνύμφες όπως μειωμένο σχηματισμό οξιδίων, μείωση της εξάπλωσης αιμοκυττάρων και χαμηλή έκφραση AMP (Antimicrobial Peptides) γονιδίων. Ωστόσο, αυτές οι καταστάσεις μπόρεσαν να αντιστραφούν με εξωγενή χορήγηση PGE2, αλλά όχι με χορήγηση AA, επιβεβαιώνοντας ότι το κύριο μόριο στην ανοσολογική απόκριση είναι η προσταγλανδίνη E2 (Ahmed et al., 2018; Park et al., 2014b). Όσον αφορά τη χημική ανοσία στο *S. exigua*, οι προσταγλανδίνες παίζουν καθοριστικό ρόλο στην ενεργοποίηση της προφαινολοξειδάσης (PPO) και στη μελανοποίηση. Η προσταγλανδίνη E2 προκαλεί λύση των οιοκυτοειδών κύτταρα (oenocytoid cells, OCL), οδηγώντας στην απελευθέρωση της PPO στην αιμολémie για την μετατροπή της σε φαινολοξειδάση (PO). Συνεπώς, η αναστολή της βιοσύνθεσης των PG κατέστειλε τόσο την OCL όσο και τη δραστηριότητα της PO (Bos et al., 2004; Shrestha et al., 2011; Shrestha & Kim, 2008). Παρόμοιοι μηχανισμοί έχουν επιβεβαιωθεί και σε άλλα έντομα μεταγενέστερα όπως η *D. melanogaster* και το *B. mori* (Stanley & Kim, 2019a).

Σχέση αναπαραγωγικού και ανοσοποιητικού συστήματος στα έντομα

Η ύπαρξη αντισταθμιστικών σχέσεων (trade-offs) στους οργανισμούς είναι ένας κρίσιμος βιολογικός μηχανισμός κατανομής πόρων. Η θεωρία του *life history trade-off* προβλέπει ότι οι διαθέσιμοι πόροι, όπως αμινοξέα και λιπίδια, κατανέμονται είτε στην άμυνα έναντι παθογόνων είτε στην παραγωγή απογόνων, δηλαδή η ενίσχυση της μίας λειτουργίας συνεπάγεται τη μείωση της άλλης (Brown & Sibly, 2006; Leyria et al., 2025a; Smykal & Raikhel, 2015). Στα έντομα έχει

μελετηθεί εκτενώς καθώς πολλά μοριακά και ορμονικά μονοπάτια ρυθμίζονται από κοινά σηματοδοτικά μονοπάτια. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν τα μονοπάτια Toll και Imd, που ενεργοποιούνται από βακτηριακά ή μυκητιακά PAMPs και οδηγούν στην παραγωγή αντιμικροβιακών πεπτιδίων (AMPs) όπως defensins, attacins και cecropins, με σημαντικό μεταβολικό κόστος (Dolezal et al., 2019). Αντίθετα, η νεανική ορμόνη (JH) προάγει την έκφραση της βιτελλογενίνης (Vg) και την ωογένεση, αλλά ταυτόχρονα καταστέλλει την παραγωγή AMPs, δείχνοντας τον κοινό ρυθμιστικό έλεγχο ανοσολογικής απόκρισης και αναπαραγωγής (Leyria, 2024; Leyria et al., 2025a). Πιθανολογείται ότι καθοριστικό ρόλο σε αυτή την ισορροπία έχει το λιπώδες σώμα, το οποίο αποτελεί τον κύριο ιστό παραγωγής βιτελλογενίνης για την ωογένεση, καθώς και βασικό όργανο συστηματικής ανοσίας παράγοντας AMPs (Schwenke et al., 2016). Ο διπλός ρόλος του λιπώδους σώματος ίσως εξηγεί τον ανταγωνισμό ανάμεσα στις δύο λειτουργίες (ISAAC & BOWNES, 1982; Schwenke et al., 2016).

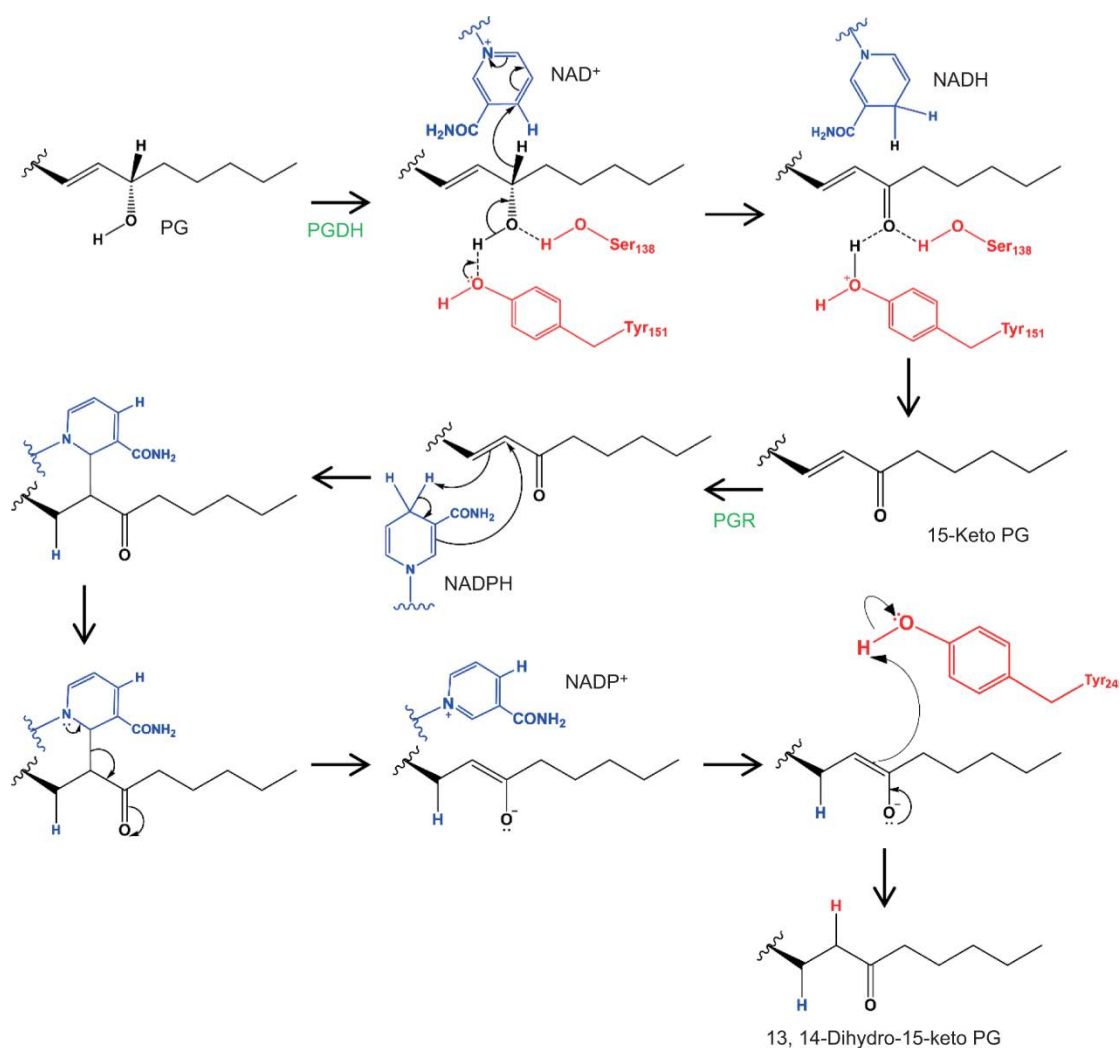
Σε μελέτες που έχουν γίνει στο *T. molitor* καταγράφηκαν σαφείς αλληλεπιδράσεις μεταξύ αναπαραγωγικής δραστηριότητας, ηλικίας και ανοσολογικής απόκρισης (Jehan et al., 2021). Τα έντομα που μελετήθηκαν ήταν θηλυκά με υψηλή ωοτοκία, τα οποία εμφάνισαν μειωμένη ικανότητα φαγοκυττάρωσης. Επίσης, σε μεγαλύτερη ηλικία εμφάνισαν χαμηλότερα επίπεδα AMPs (Jehan et al., 2022a). Ωστόσο, οι ανοσολογικές αποκρίσεις δεν επηρεάζονται στον ίδιο βαθμό από τη γήρανση, δηλαδή η κυτταρική ανοσία τείνει να μειώνεται με την αύξηση της ηλικίας, όμως οι αντιβακτηριακές άμυνες παραμένουν σχετικά σταθερές και ανθεκτικές στη γήρανση, αν και συσχετίζονται αρνητικά με τη γονιμότητα όταν ενεργοποιηθούν στα πρώτα στάδια της ζωής του εντόμου (Jehan et al., 2021, 2022b). Παράλληλα, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η στρατηγική που πιθανόν υιοθετούν τα θηλυκά του *T. molitor*, τα οποία μετά από ανοσολογική πρόκληση μπορεί να μην επενδύουν άμεσα στην αναπαραγωγή, όμως περιορίζουν προσωρινά την ωοτοκία πιθανόν για να διατηρήσουν μελλοντικές αναπαραγωγικές ευκαιρίες (Jehan et al., 2022b).



Εικόνα 8. Σχηματικό μοντέλο προσέγγισης της σχέσης αναπαραγωγής και ανοσολογικής απόκρισης (Leyria et al., 2025b)

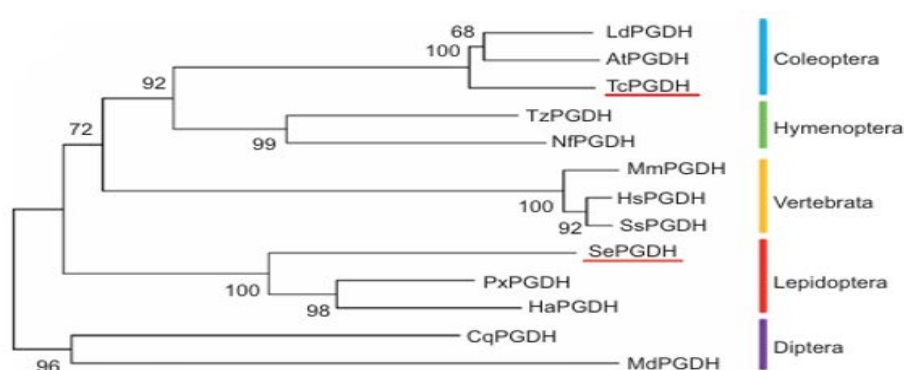
Ο ρόλος του γονιδίου *15-PGDH* στα έντομα

Σε όλα τα ζωικά συστήματα, είναι απαραίτητη η ρύθμιση και η διατήρηση της ομοιόστασης των οργανισμών. Οι προσταγλανδίνες είναι μόρια που πρέπει να ρυθμίζονται αυστηρά ώστε να μην παρουσιάσουν τοξικότητα ως απόρροια της υπερσυσσώρευσής τους. Στα θηλαστικά, η κύρια οδός αποικοδόμησης περιλαμβάνει δύο ένζυμα, την αφυδρογονάση της PG (PGDH) που καταλύει τη NAD^+ εξαρτώμενη οξείδωση της 15(S)-υδροξυομάδας των PG και τις μετατρέπει σε 15-κετο-PGs και την 15-oxoprostaglandin- Δ^{13} -reductase (PGR) που αποικοδομεί περαιτέρω τις 15-κετο-PGs σε 13,14-διυδρο-15-κετο παράγωγα (Tai et al., 2002). Γενικότερα στα έντομα δεν έχουν μελετηθεί ούτε οι μηχανισμοί αποικοδόμησης ούτε της βιοσύνθεσης των PG. Ωστόσο, πιο πρόσφατα δεδομένα από το *S. exigua* αναγνώρισαν ανάλογους μηχανισμούς και στα έντομα. Συγκεκριμένα, ταυτοποιήθηκαν τα ένζυμα SePGDH και SePGR, τα οποία δρουν με τρόπο παρόμοιο με αυτόν των θηλαστικών, αποδεικνύοντας ότι η αποικοδόμηση των PG είναι συντηρημένος μηχανισμός ρύθμισης (Ahmed & Kim, 2020).



Εικόνα 9. Διάγραμμα των σταδίων αποικοδόμησης του PG στο έντομο *S. Exigua*. Κύρια ένζυμα αποικοδόμησης των PG είναι τα PGDH και PGR (Ahmed & Kim, 2020)

Το ένζυμο 15-PGDH είναι υπεύθυνο για την κατάλυση του πρώτου και πιο καθοριστικού βήματος της αποικοδόμησης των PGs. Ωστόσο, μέχρι σήμερα έχει διερευνηθεί μόνο σε ελάχιστα έντομα, μεταξύ των οποίων και το *S. exigua*. Η πρωτεΐνη αποτελείται από 251 αμινοξέα και φέρει συντηρημένα κατάλοιπα (Gln148, Tyr151 και Asn95) στην καταλυτική θέση, τα οποία είναι απαραίτητα για τη δέσμευση και την οξείδωση του υποστρώματος. Επιπλέον, οι φυλογενετικές αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν δείχνουν ότι το *SePGDH* φέρει ομοιότητα αλληλουχίας 40-77% με άλλες PGDH Λεπιδοπτέρων, ενώ οι PGDH Υμενόπττερων και Κολεοπτέρων παρουσιάζουν μεγαλύτερη ομοιότητα με ένζυμα σπονδυλωτών (Εικόνα 11) (Ahmed & Kim, 2020). Το εύρημα αυτό υποδεικνύει τόσο την εξελικτική συντήρηση του ενζύμου όσο και διαφοροποιήσεις μεταξύ επιμέρους τάξεων εντόμων.



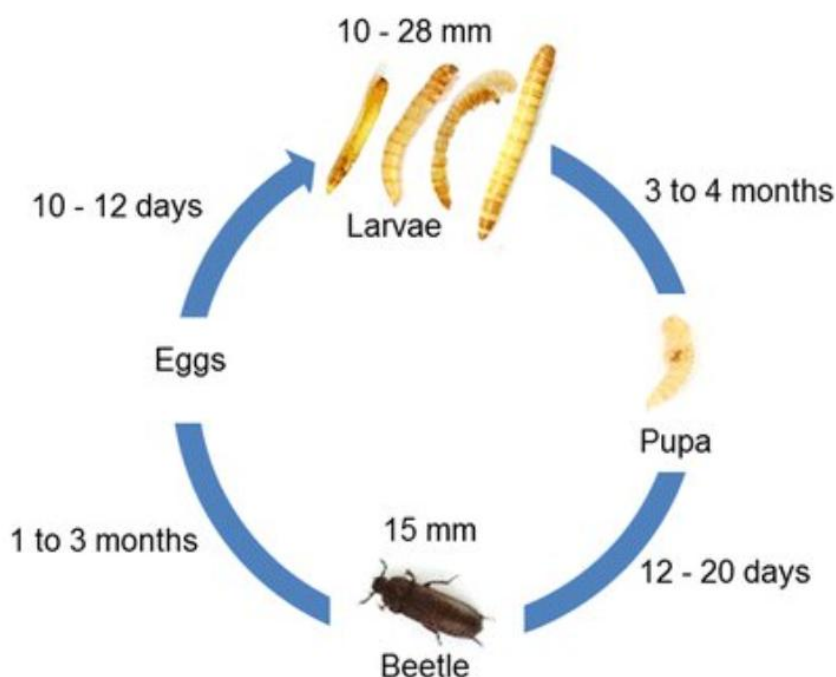
Εικόνα 10. Φυλογενετική ανάλυση των πρωτεϊνικών αλληλουχιών PGDH εντόμων και σπονδυλωτών. Το *SePGDH* φέρει ομοιότητα 40-77% με άλλα Λεπιδόπτερα, ενώ το *TcPGDH* (*Tribolium castaneum*) ομαδοποιείται με άλλα κολεόπτερα, υποδεικνύοντας την εξελικτική διαφοροποίηση μεταξύ τάξεων εντόμων (Ahmed & Kim, 2020).

Ειδικότερα, το γονίδιο του *SePGDH* εκφράζεται σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια του εντόμου, με κορύφωση στα ενήλικα έντομα. Ιδιαίτερα υψηλά επίπεδα παρατηρούνται στα αιματοκύτταρα, το λιπώδες σώμα, τις ωοθήκες, τους όρχεις και το κεφάλι, δηλαδή σε ιστούς που σχετίζονται με την ανοσολογική απόκριση και την αναπαραγωγή. Αυτό εξετάστηκε περαιτέρω μέσω βακτηριακής προσβολής (bacterial challenge), καθώς η έκφραση του *SePGDH* στα αιματοκύτταρα αυξάνεται καθυστερημένα σε σχέση με τα γονίδια της βιοσύνθεσης PG, υποδεικνύοντας τον ρυθμιστικό ρόλο του στην αποκατάσταση της ομοιόστασης. Επιπλέον, λειτουργικές αναλύσεις μέσω RNAi σίγησης επιβεβαίωσαν τον ρόλο αυτό. Πιο συγκεκριμένα, η καταστολή του *SePGDH* οδήγησε σε συσσώρευση των PGE2 και PGD2, προκαλώντας παρατεταμένη ενεργοποίηση της φαινολοξειδάσης (PO), ένα ένζυμο το οποίο ενεργοποιείται έπειτα από λοίμωξη. Η υπερβολική ενεργοποίηση προκάλεσε ανεξέλεγκτη μελανοποίηση και τελικά θνησιμότητα (Ahmed & Kim, 2020). Το εύρημα αυτό υπογραμμίζει ότι είναι ζωτικής σημασίας η ρύθμιση των επιπέδων των PG, καθώς τόσο η έλλειψη όσο και η υπερβολική αύξησή τους είναι επιβλαβής. Συνεπώς, η PGDH λειτουργεί ως κρίσιμο σημείο ελέγχου στη σηματοδότηση των PGs στα έντομα, καθώς παρά τις διαφορές μεταξύ ειδών, τα δεδομένα επιβεβαιώνουν ότι

είναι μια διαδικασία συντηρημένη εξελικτικά, ενισχύοντας την άποψη ότι η αποικοδόμηση των PG είναι τόσο σημαντική όσο και η βιοσύνθεσή τους.

Η σημασία και οι εφαρμογές του *Tenebrio molitor*

Το *Tenebrio molitor* L., γνωστό και ως κίτρινος αλευροσκώληκας (yellow mealworm) είναι ένα ολομετάβολο έντομο που ανήκει στην οικογένεια *Tenebrionidae* της τάξης των Κολεόπτερων. Η προέλευσή του πιθανολογείται ότι ξεκίνησε από τη Μεσόγειο, όμως τις τελευταίες δεκαετίες έχει εξαπλωθεί παγκοσμίως λόγω του εμπορίου (Panagiotakorulu, 2000). Πρόκειται για έντομο αποθηκών το οποίο προσβάλλει δημητριακά και άλευρα, όπου και από αυτό προέκυψε το όνομα του, καθώς *molitor* στα λατινικά σημαίνει «μυλωνάς» (Ramos-Elorduy et al., 2002). Είναι ένα ολομετάβολο έντομο και ο βιολογικός του κύκλος περιλαμβάνει τα τέσσερα διακριτά στάδια ανάπτυξης: αβγό, προνύμφη, νύμφη και ενήλικο. Αρχικά, τα θηλυκά έντομα εναποθέτουν περίπου 500 αβγά, τα οποία εκκολάπτονται σε διάστημα 10-12 ημερών. Ακολουθεί το προνυμφικό στάδιο, που κυμαίνεται από 3 έως και 8 μήνες, ανάλογα τις περιβαλλοντικές συνθήκες και τα έντομα σε αυτό το στάδιο έχουν το χαρακτηριστικό ανοιχτό κίτρινο-καφέ χρώμα. Έπειτα, το στάδιο της νύμφης, το οποίο διαρκεί 12-20 ημέρες, ενώ τα ενήλικα σκαθάρια ζουν κατά μέσο όρο 1-3 μήνες (Hong et al., 2020). Το μέγεθος των σκαθαριών κυμαίνεται στα ενήλικα σε μήκος περίπου 15 mm, ενώ αντίστοιχα το μέγεθος των προνυμφών φτάνει συνήθως τα 25-35 mm (Siemianowska et al., 2013).



Εικόνα 11. Απεικόνιση του βιολογικού κύκλου του σκαθαριού *Tenebrio molitor* (Ong et al., 2018)

Παρότι σε όλα τα στάδια υπάρχουν ιδιαίτερα χαρακτηριστικά, το προνυμφικό στάδιο είναι αυτό που συγκεντρώνει το μεγαλύτερο ενδιαφέρον, καθώς χαρακτηρίζεται από ένα πλούσιο θρεπτικό προφίλ σε πρωτεΐνη, περίπου 47-55% του ξηρού του βάρους, και λίπους, έως 30% του ξηρού του βάρους (Hong et al., 2020; van Broekhoven et al., 2015). Επίσης, υπάρχει ισορροπημένη σύνθεση αμινοξέων και ιχνοστοιχείων, καθώς και μονοακόρεστων και πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (Benzertih et al., 2020; Ghosh et al., 2017). Παράλληλα, οι προνύμφες είναι πλούσιες σε μέταλλα και βιταμίνες όπως σίδηρο, μαγνήσιο, κάλιο, ψευδάργυρο, φώσφορο και βιταμίνες E, B12, B2, B3, B5. Συγκεκριμένα, οι συγκεντρώσεις αυτών, και ειδικότερα των λιπιδίων, επηρεάζονται από το υπόστρωμα εκτροφής (Finke, 2013; Ghosh et al., 2017; Moruzzo et al., 2021a). Η διατροφή του εντόμου ως παμφάγο περιλαμβάνει τόσο φυτικά όσο και ζωικά προϊόντα, αν και για τη σωστή εκτροφή του το ποσοστό πρωτεΐνης πρέπει να κυμαίνεται περίπου στο 20% (Ramos-Elorduy et al., 2002). Σε συνθήκες μαζικής εκτροφής, η τροφή του αποτελείται κυρίως από πίτουρο ή αλεύρι δημητριακών, ενώ λαχανικά και φρούτα χρησιμοποιούνται για την παροχή υγρασίας. Αντίστοιχα, για την κάλυψη των αναγκών τους σε πρωτεΐνη χρησιμοποιούνται άλευρα σόγιας, μαγιά αλλά και άπαχο γάλα (Hong et al., 2020).

Τα τελευταία χρόνια, το *T. molitor* έχει κεντρίσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας και της βιομηχανίας τροφίμων ως εδώδιμο έντομο. Η αυξανόμενη ζήτηση για πρωτεΐνη και οι περιβαλλοντικές επιπτώσεις της εντατικής κτηνοτροφίας έχουν εντείνει την αναζήτηση εναλλακτικών και βιώσιμων πηγών (Εικόνα 11). Η εκτροφή του *T. molitor* έχει πολλά πλεονεκτήματα καθώς χαρακτηρίζονται από υψηλή θρεπτική αξία, χαμηλό περιβαλλοντικό αποτύπωμα, σε αντίθεση με την εντατική κτηνοτροφία, καθώς και δυνατότητα εκτροφής σε πολλά υποστρώματα όπως παραπροϊόντα που προκύπτουν από τη βιομηχανία τροφίμων (van Huis, 2013). Το *T. molitor* αποτέλεσε το πρώτο έντομο που εγκρίθηκε ως novel food από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Κανονισμός (ΕΕ) 2015/2283) (European Commission, 2015), επιτρέποντας την εμπορική αξιοποίηση αποξηραμένων προνυμφών, ολόκληρων ή σε σκόνη (Turck et al., 2021). Η χρήση mealworm powder έχει μελετηθεί σε εφαρμογές όπως εμπλουτισμένο ψωμί και μπισκότα, που παρουσίασαν βελτιωμένο διατροφικό προφίλ και ευεργετικές ιδιότητες (Roncolini et al., 2019) (Roczniki Państwowego Zakładu Higieny, 2020). Παρά τα οφέλη, περιοριστικοί παράγοντες όπως η αποδοχή των καταναλωτών και η πιθανότητα αλλεργικών αντιδράσεων αποτελούν προκλήσεις για την ευρεία χρήση του (Bordiean et al., 2020).

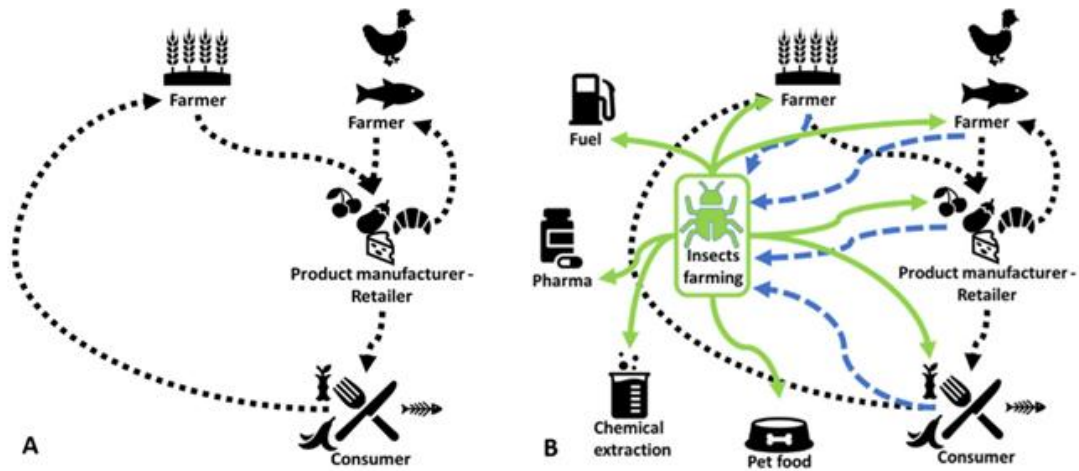
Εκτός από τη διατροφική του αξία, σημαντικό ενδιαφέρον παρουσιάζει και το frass του *T. molitor*, δηλαδή τα περιττώματά του σε συνδυασμό με το υπόστρωμα εκτροφής και εκδύματα του εξωσκελετού (Moruzzo et al., 2021b). Το frass αποτελεί ένα μείγμα πλούσιο σε θρεπτικά στοιχεία όπως άζωτο, φώσφορο και κάλιο, οργανική ουσία και πλούσιο μικροβίωμα (Cherkorir et al., 2024). Για τον λόγο αυτό, έχει κεντρίσει το ενδιαφέρον ως οργανικό λίπασμα καθώς επηρεάζει θετικά την ανάπτυξη και αντοχή φυτών όπως σε σέσκουλα (*Beta vulgaris* var. *Cicla*) και φασόλια (*Phaseolus vulgaris*) (Li et al., 2013; Poveda et al., 2019). Επιπλέον, η εφαρμογή του σε κριθάρι (*Hordeum vulgare*) επίδρασε θετικά στην πρόσληψη θρεπτικών, στη γονιμότητα και

τη μικροβιακή δραστηριότητα του εδάφους (Houben et al., 2020). Η εφαρμογή του frass δεν περιορίζεται αποκλειστικά ως λίπασμα καθώς μπορεί να αξιοποιηθεί και σε άλλους τομείς. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή biochar, ένα προϊόν πλούσιο σε άνθρακα, το οποίο εφαρμόζεται για την αποκατάσταση εδαφών και την απομάκρυνση βαρέων μετάλλων από απόβλητα. Επιπλέον, έδειξε υψηλότερη απόδοση σε σύγκριση με biochar που προέρχεται από φυτικά παραπροϊόντα, γεγονός που αναδεικνύει το *T. molitor* ως πηγή καινοτόμων εφαρμογών (Yang et al., 2019).

Ένα ακόμη προϊόν υψηλής αξίας που προέρχεται από το *T. molitor* είναι η χιτίνη, η οποία απομονώνεται από τις προνύμφες και μετατρέπεται σε χιτοζάνη. Η χιτοζάνη έχει προσελκύσει έντονο επιστημονικό και βιομηχανικό ενδιαφέρον λόγω των εφαρμογών της σε τομείς, όπως η γεωργία, η βιοτεχνολογία, φαρμακοβιομηχανία και η επεξεργασία αποβλήτων (Morin-Crini et al., 2019; Moruzzo et al., 2021b). Αυτό οφείλεται στη βιοαποικοδόμησή της, στις αντιμικροβιακές της ικανότητες καθώς και στην ικανότητα προσρόφησης (Broek et al., 2020). Η επιλογή του *T. molitor* προσφέρει πλεονεκτήματα έναντι παραδοσιακών πηγών, όπως τα καρκινοειδή (*Crustacean*), όπως εξοικονόμηση χρόνου, χρήση λιγότερων χημικών ουσιών και υψηλότερα ποσοστά εκχύλισης (Mohan et al., 2020). Επιπλέον, η χιτίνη που προέρχεται από προνύμφες *T. molitor* είναι πιο μαλακή και έχει καταγραφεί ότι παρουσιάζει περισσότερες αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες (Son et al., 2021).

Τέλος, ένα ακόμη πεδίο με σημαντικό ενδιαφέρον αφορά την ικανότητα του *T. molitor* να καταναλώνει και να βιοαποικοδομεί πλαστικά. Συγκεκριμένα, η παγκόσμια παραγωγή πλαστικού το 2023 ξεπέρασε τους 413 εκ. τόνους, ενώ αντίστοιχα ανακυκλωμένα και βιοδιασπώμενα πλαστικά αποτελούν μόνο το 9,6% της συνολικής παραγωγής. Το *T. molitor* είναι από τα λίγα έντομα που έχουν την ικανότητα βιοαποικοδόμησης πλαστικών όπως το πολυστυρένιο (PS), πολυαιθυλένιο (PE), πολυπροπυλένιο (PP) και πολυβινυλοχλωρίδιο (PVC) αλλά και λιγνοκυτταρινούχα υλικά όπως το χαρτόνι (Peng et al., 2019; Q. Wu et al., 2019a). Η αποδόμηση επιτυγχάνεται μέσω συνδυαστικού μηχανισμού κατανάλωσης και δράσης του μικροβιώματος του εντέρου, το οποίο εκκρίνει ένζυμα ικανά για την διάσπαση πολυμερών αλυσίδων σε μόρια χαμηλότερου μοριακού βάρους (Urbanek et al., 2020; Y. Yang et al., 2015). Μελέτες έχουν αποδείξει ότι βακτήρια όπως τα *Exiguobacterium sp.*, *Acinetobacter sp.* και *Bacillus sp.* διαθέτουν την ικανότητα διάσπασης πλαστικών πολυμερών (Y. Yang et al., 2015; Yin et al., 2020). Παράλληλα, σε αυτές τις μελέτες δοκιμάστηκε κι η προσθήκη τροφικών υπολειμμάτων (food loss and waste) (Food Loss and Waste – FLW) στη διατροφή του *T. molitor*, η οποία βελτίωσε σημαντικά τον ρυθμό αποικοδόμησης του πλαστικού. Αυτό οφείλεται στα θρεπτικά συστατικά και την υγρασία που προσφέρουν στο έντομο, καλύπτοντας τις ενεργειακές του ανάγκες (Brandon et al., 2020; Khan et al., 2021). Ωστόσο, είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι υπάρχουν και περιορισμοί, καθώς για μαζική χρήση απαιτείται τεράστιος αριθμός προνυμφών. Επιπλέον, η βιοαποικοδόμηση δεν είναι πάντα πλήρης, συχνά οδηγώντας στην παραγωγή μικροπλαστικών (Billen et al., 2020;

Q. Wu et al., 2019b). Τα ευρήματα αυτά καταδεικνύουν ότι το *T. molitor* είναι μια πολλά υποσχόμενη βιολογική λύση για τη διαχείριση των πλαστικών αποβλήτων.



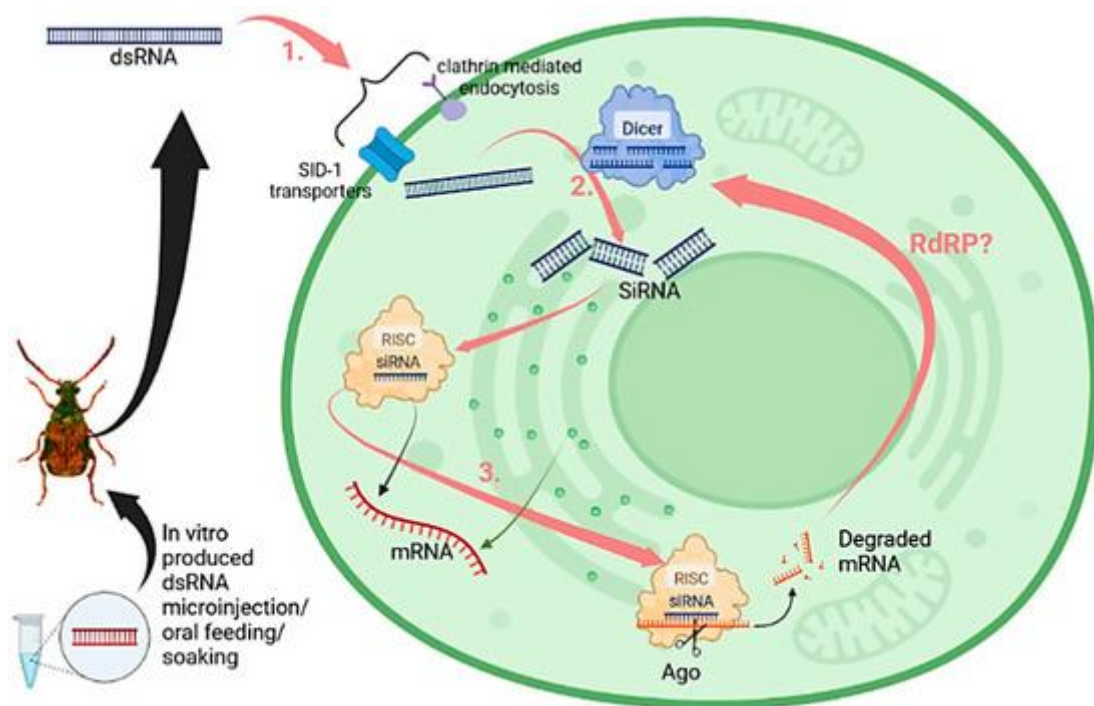
Εικόνα 12. Διάγραμμα ενίσχυσης της κυκλικής οικονομίας μέσω της χρήσης βρώσιμων εντόμων (Moruzzo et al., 2021b)

Η μέθοδος RNAi στα έντομα και στα Κολεόπτερα

Μία από τις μεγαλύτερες προκλήσεις στα έντομα παραμένει η λειτουργική ανάλυση των γονιδίων. Από την ανακάλυψή της, η παρεμβολή RNA (RNA interference, RNAi) έχει καθιερωθεί ως ισχυρό εργαλείο της μοριακής βιολογίας, καθώς επιτρέπει τη στοχευμένη και αναστρέψιμη σίγαση γονιδίων, γεγονός που έχει αξιοποιηθεί τόσο για βασική έρευνα όσο και για εφαρμογές όπως η ανάπτυξη RNAi εντομοκτόνων (Hannon, 2002; Huvenne & Smagghé, 2010). Γενικότερα, το RNAi αποτελεί έναν εξελικτικά συντηρημένο μηχανισμό ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης, ο οποίος ανακαλύφθηκε αρχικά στα φυτά και αργότερα μελετήθηκε στον *Caenorhabditis elegans* και σε άλλα είδη (Baulcombe, 2004; Fire et al., 1998). Ο μηχανισμός RNAi στηρίζεται στη δράση μικρών μη-κωδικών RNA που προέρχονται από μόρια δίκλωνου RNA (double-stranded RNA, dsRNA). Αυτά μέσω εξειδικευμένων ενζύμων και συμπλόκων οδηγούν στην καταστολή της έκφρασης γονιδίων με εξαιρετική ακρίβεια (Hannon, 2002).

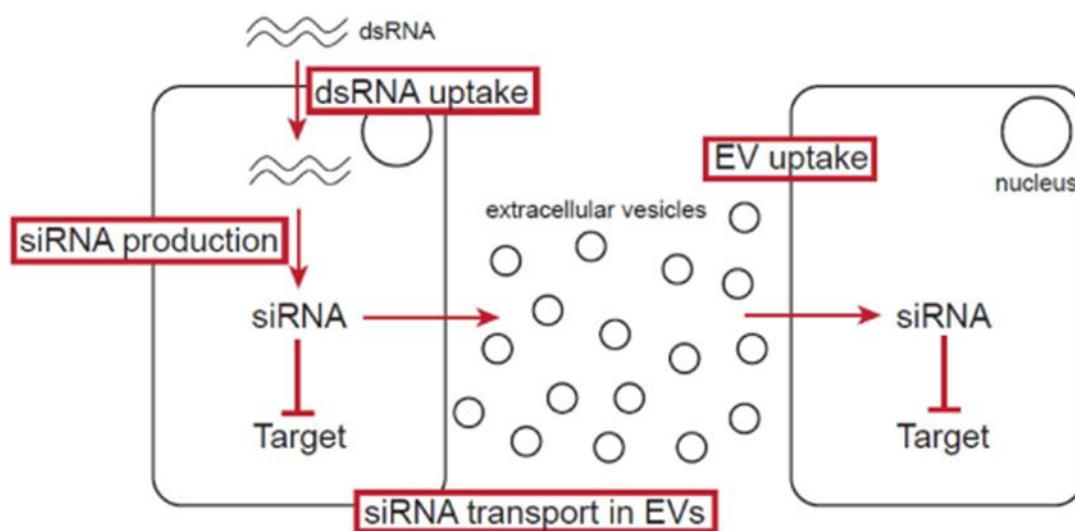
Η διαδικασία αυτή επιτυγχάνεται μέσω τριών διακριτών μονοπατιών. Η οδός των μικρών παρεμβαλλόμενων RNA (small interfering RNAs, siRNAs) ενεργοποιείται κυρίως από εξωγενές dsRNA, το οποίο υφίσταται επεξεργασία από την ενδονουκλεάση Dicer, ένα ένζυμο τύπου RNase III, ειδική για δίκλωνα RNA. Η Dicer επεξεργάζεται τα μακριά dsRNA και προκύπτουν μικρά θραύσματα RNA μήκους περίπου 21-25 νουκλεοτιδίων με προεξέχοντα 3' άκρα. Έπειτα, τα μόρια αυτά ενσωματώνονται στο σύμπλοκο RISC (RNA-induced silencing complex), όπου ο ένας κλώνος παραμένει στο σύμπλοκο ώστε να καθοδηγεί και να αλληλεπιδράσει συμπληρωματικά με το mRNA (guide strand) ενώ ο άλλος κλώνος αποικοδομείται (Εικόνα 15). Η βασική καταλυτική μονάδα του RISC είναι η πρωτεΐνη Argonaute, η οποία είναι υπεύθυνη για την αναγνώριση και αποικοδόμηση του mRNA-στόχου, οδηγώντας στην καταστολή της έκφρασης του γονιδίου (Dana et al., 2017; Meister & Tuschl, 2004; Nandety et al., 2015).

Αντίστοιχα, στο μονοπάτι των microRNA (miRNA), τα μόρια RNA δημιουργούν δομές φουρκέτας (hairpin) και επεξεργάζονται πρώτα στον πυρήνα από το ένζυμο Drosha σε πρόδρομα μόρια RNA (pre-miRNA) και στη συνέχεια από το ένζυμο Dicer στο κυτταρόπλασμα, όπου προκύπτουν τα ώριμα miRNA. Αυτά ενσωματώνονται επίσης στο σύμπλοκο RISC, όμως λόγω μερικής συμπληρωματικότητας με το mRNA-στόχο, επιτυγχάνεται αναστολή της μετάφρασης του γονιδίου και όχι πλήρης αποικοδόμηση (Carthew & Sontheimer, 2009; Nandety et al., 2015). Παράλληλα, στο μονοπάτι των piRNA (PIWI-interacting RNAs), τα μικρά RNA συνεργάζονται με τις πρωτεΐνες PIWI για να καταστείλουν τη δράση μεταθετών στοιχείων, προστατεύοντας με αυτόν τον τρόπο τη γονιδιωματική σταθερότητα. Σε αντίθεση με τα siRNA και miRNA, τα piRNA δεν παράγονται από Dicer αλλά μέσω διαφορετικών μηχανισμών (Nandety et al., 2015; Siomi et al., 2011). Η χρησιμότητα του μηχανισμού RNAi φέρει διπλή σημασία, αφενός ως κυτταρικός μηχανισμός άμυνας των οργανισμών έναντι ιών και μεταθετών στοιχείων και αφετέρου ως εργαλείο ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης.



Εικόνα 13. Απεικόνιση μηχανισμού RNAi ακολουθώντας το siRNA μονοπάτι σε κύτταρα εντόμου (Segers et al., 2023)

Σε ορισμένα έντομα, το RNAi δεν περιορίζεται τοπικά, στο σημείο πρόσληψης του dsRNA, αλλά παρατηρείται εξάπλωση σε απομακρυσμένους ιστούς. Συνεπώς, το συστημικό RNAi (systemic RNAi), δηλαδή η διακυτταρική εξάπλωση της σίγησης, επιτρέπει την αποτελεσματικότερη απόκριση στην παρεμβολή. Στο *C. elegans* έχει αποδειχθεί ότι η συστημικότητα επιτυγχάνεται μέσω των μεμβρανικών καναλιών SID (systemic RNA interference-deficient), καθώς διέπουν την παθητική μεταφορά του dsRNA (Koo & Palli, 2025; Shih & Hunter, 2011). Στα έντομα, και ιδιαίτερα στα Κολεόπτερα, όπως το *Tribolium castaneum*, η εικόνα είναι διαφορετική. Παρά την παρουσία *sid-1-like* (sil) γονιδίων στο γονιδίωμα του *Tribolium*, πειραματικά έχει αποδειχθεί ότι αυτά δεν παίζουν κεντρικό ρόλο στη συστημικότητα (Tomoyasu et al., 2008). Πρόσφατες μελέτες έχουν διερευνήσει διαφορετικούς μηχανισμούς και ένας από αυτούς είναι τα εξωκυτταρικά κυστίδια (Extracellular vesicles, EVs). Συγκεκριμένα, η συστημικότητα μέσω αυτού του μηχανισμού μελετήθηκε σε Κολεόπτερα, όπως στο *T. castaneum* και στον Δορυφόρο της πατατάτας, Colorado potato beetle (Mingels et al., 2020; Yoon et al., 2020). Τα κυστίδια αυτά μεταφέρουν τα siRNAs από κύτταρο σε κύτταρο, προστατεύοντάς τα ώστε να μην αποικοδομηθούν και διευκολύνουν την πρόσληψη από τα γειτονικά τους κύτταρα (Εικόνα 14).



Εικόνα 14. Υποθετικό μοντέλο συστημικής μετάδοσης RNAi στα κύτταρα του *T. castaneum* (Xiao et al., 2015)

Εκτός από τη διακυτταρική μεταφορά μέσω EVs, εξίσου σημαντικός είναι ο τρόπος με τον οποίο το dsRNA διακινείται ενδοκυτταρικά. Ένας μηχανισμός που έχει αναπτυχθεί στα Κολεόπτερα για την κυτταρική πρόσληψη του dsRNA είναι η κλαθρινο-εξαρτώμενη ενδοκυττάρωση εξαρτώμενη από κλαθρίνη (clathrin-dependent endocytosis). Στο *T. castaneum* βρέθηκε ότι η πρόσληψη του εξωγενούς dsRNA βασίζεται κυρίως σε αυτόν τον μηχανισμό. Η διαδικασία ξεκινά με τη δέσμευση των μορίων dsRNA σε εξειδικευμένους υποδοχείς, ενεργοποιείται η πρόσληψή τους και σχηματίζονται τα ενδοκυτταρικά κυστίδια, τα οποία συγχωνεύονται με πρώιμα ενδοσώματα. Σε άλλα έντομα, όπως στα Λεπιδόπτερα, το dsRNA παραμένει εγκλωβισμένο και οδηγείται στα λυσοσώματα για αποικοδόμηση, εξηγώντας έτσι την περιορισμένη τους ευαισθησία στο RNAi. Αντίθετα, στα Κολεόπτερα, σημαντικό ποσοστό του dsRNA κατευθύνεται προς το ενδοπλασματικό δίκτυο (ER) και το Golgi, όπου αναλαμβάνει δράση η πρωτεΐνη Staufenc (StauC), η οποία είναι ειδο-ειδική για τα Κολεόπτερα (Palli et al., 2018; Kim et al., 2021; Cui et al., 2022). Η StauC δεσμεύεται στο dsRNA και μέσω του μονοπατιού της αποικοδόμησης σχετιζόμενης με το ενδοπλασματικό δίκτυο (ERAD), μεταφέρει με ασφάλεια το δίκλωνο RNA από το ενδοπλασματικό δίκτυο στο κυτταρόπλασμα. Εκεί, το dsRNA υφίσταται επεξεργασία από την Dicer-2 και τα παραγόμενα siRNAs φορτώνονται στο RISC, ολοκληρώνοντας με αυτόν τον τρόπο τον κύκλο του RNAi με την στοχευμένη αποικοδόμηση των mRNA-στόχων (Kim et al., 2021; Xiao et al., 2015). Οι μηχανισμοί που έχουν εξελίξει τα Κολεόπτερα όπως το *T. castaneum* για να προστατέψουν και να διασφαλίσουν την εξάπλωση του dsRNA αποτελούν καθοριστικούς παράγοντες για υψηλή αποδοτικότητα και συστηματικότητα του RNAi.

Σκοπός

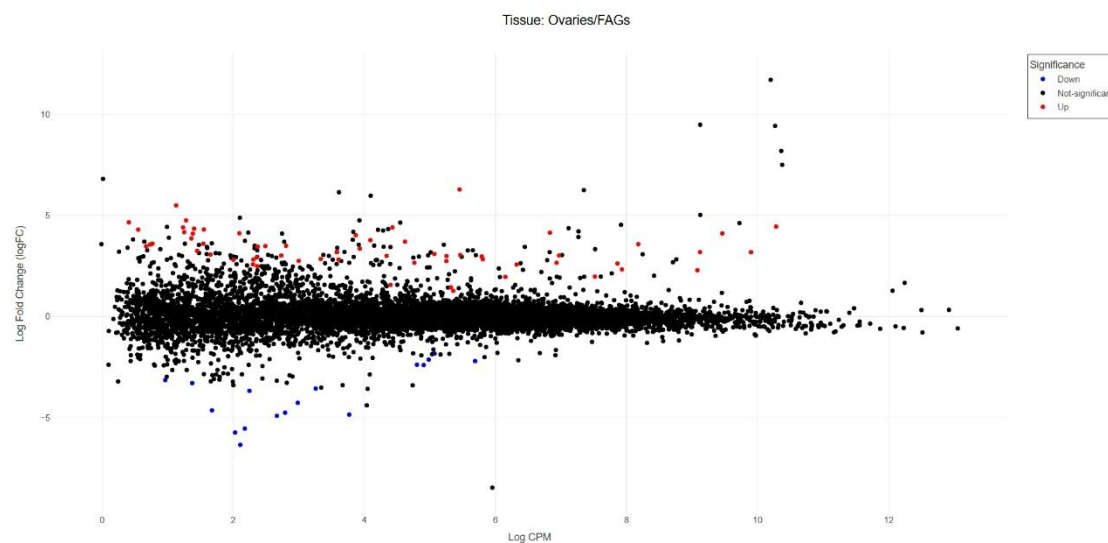
Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η μελέτη του γονιδίου *15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase* (15-PGDH) στο έντομο *Tenebrio molitor* L., με έμφαση στη διερεύνηση του ρόλου του στην αναπαραγωγική ικανότητα. Ειδικότερα, στόχος ήταν να εξεταστεί εάν και σε ποιο στάδιο του αναπαραγωγικού κύκλου το ένζυμο επηρεάζει κρίσιμες βιολογικές διεργασίες, καθώς και να αποσαφηνιστεί ο τρόπος με τον οποίο ενδεχομένως συμβάλλει στη ρύθμιση της γονιμότητας. Η προσέγγιση αυτή αποσκοπεί τόσο στην κατανόηση του μηχανισμού δράσης του 15-PGDH στα έντομα, όσο και στην αξιοποίηση της γνώσης αυτής για τη βελτίωση της αναπαραγωγικής απόδοσης, με στόχο την ενίσχυση της μαζικής εκτροφής εντόμων για βιομηχανικές και βιοτεχνολογικές εφαρμογές.

Συνθήκες Εκτροφής

Για τη διεκπεραίωση των πειραματικών διαδικασιών, η εκτροφή ελληνικών και γερμανικών στελεχών του *Tenebrio molitor* L. πραγματοποιήθηκε στις εγκαταστάσεις του Εργαστηρίου Εντομολογίας και Αγροτικής Ζωολογίας του Τμήματος Γεωπονίας, Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Τα έντομα αναπτύχθηκαν σε περιβάλλον σκότους, υπό ελεγχόμενες και σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας και σχετικής υγρασίας, $26 \pm 0,5$ °C και $50 \pm 5\%$ αντίστοιχα. Ως υπόστρωμα εκτροφής χρησιμοποιήθηκε πίτουρο σίτου και ξηρή μαγιά σε αναλογία 9:1, τα οποία ανανεώνεται τακτικά. Ακόμη, για την κάλυψη της υγρασίας παρέχονταν ανά τακτά χρονικά διαστήματα άγαρ.

Μεταγραφομική ανάλυση

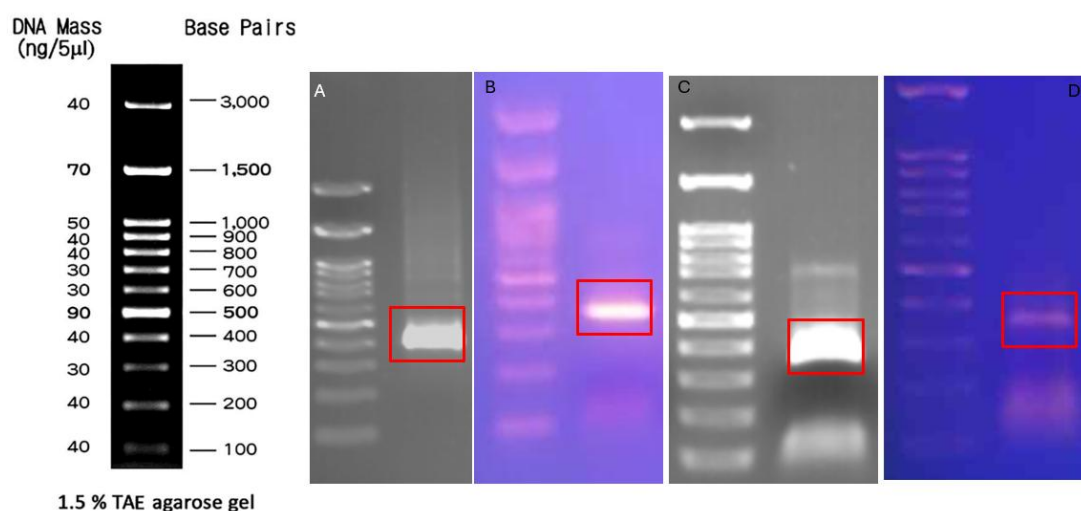
Το γονίδιο επιλέχθηκε βάσει προγενέστερων αποτελεσμάτων του Εργαστηρίου Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής, στο πλαίσιο συγκριτικής μεταγραφομικής ανάλυσης μεταξύ του ελληνικού και γερμανικού στελέχους του *T. molitor*. Η ανάλυση ανέδειξε διαφορικά εκφραζόμενα γονίδια σε αναπαραγωγικούς ιστούς (ωοθήκες και επικουρικούς αδένες) παρθένων, σεξουαλικά ώριμων ενηλίκων ατόμων (7–14 ημερών), οδηγώντας στην επιλογή υποψηφίων γονιδίων για περαιτέρω μελέτη. Μεταξύ αυτών, το γονίδιο *15PGDH* βρέθηκε να υπερεκφράζεται στο ελληνικό στέλεχος έναντι του γερμανικού με $\log_{2}FC \sim 2,66$ και adjusted p value 0,013 (Εικόνα 15). Αντίστοιχα έγινε ανάλυση και για σταθερά εκφραζόμενα γονίδια σύμφωνα με την οποία επιλέχθηκε το γονίδιο αναφοράς *elongation factor 1a – like*, το οποίο μάλιστα χρησιμοποιείται ευρέως για τα Κολεόπτερα.



Εικόνα 15. MA-plot διαφορικής γονιδιακής έκφρασης στους αναπαραγωγικούς ιστούς (ωοθήκες και επικουρικοί αδένες) του ελληνικού έναντι του γερμανικού στελέχους του *T. molitor*. Με κόκκινο απεικονίζονται τα γονίδια που υπερεκφράζονται (upregulated), με μπλε αυτά που υποεκφράζονται (downregulated), ενώ με μαύρο τα μη σημαντικά. Το γονίδιο *15PGDH* αναδείχθηκε υπερεκφραζόμενο στο ελληνικό στέλεχος ($\log_{2}FC \approx 2,66$, $p\text{-value} = 0,013$)

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) και Ηλεκτροφόρηση

Για την ενίσχυση του γονιδίου *15-PGDH*, χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα cDNA από αναπαραγωγικούς ιστούς (ωοθήκες και επικουρικοί αδένες). Η αλληλουχία στόχος ενισχύθηκε αρχικά μέσω PCR, χρησιμοποιώντας την πολυμεράση KapaTaq (Kapa Biosystems). Οι συνθήκες της αντίδρασης ορίστηκαν με βάση τα χαρακτηριστικά του κάθε ζεύγους εκκινητών. Το προϊόν της αντίδρασης χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα για επαναληπτική PCR (rePCR) με τα ίδια ζεύγη εκκινητών, προκειμένου να παραχθεί επαρκής ποσότητα DNA. Για τον έλεγχο των προϊόντων της PCR προστέθηκε loading dye 6x για να πραγματοποιηθεί ηλεκτροφόρηση σε πήκτη αγαρόζης 1% με μάρτυρα μοριακού βάρους 100bp (100bp DNA Ladder marker, Nippon Genetics). Η ανίχνευση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση βρωμιούχου αιθιδίου και η τάση του μηχανήματος ρυθμίστηκε στα 120V (Εικόνα 16).

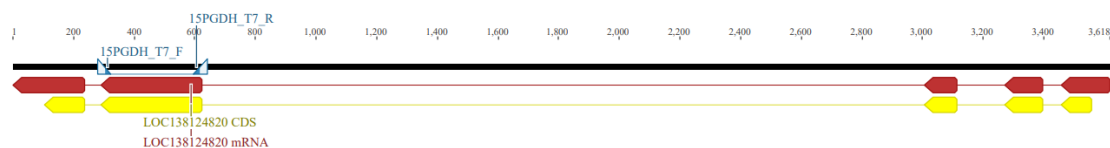


Εικόνα 16. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR και επιβεβαίωση σύνθεσης dsRNA σε πήκτη αγαρόζης 1% (TBE). Χρησιμοποιήθηκε DNA ladder 100 bp (Nippon Genetics). A. Επιβεβαίωση της *in vitro* σύνθεσης του ds GFP, B. Προϊόν PCR του γονιδίου GFP (436 bp) που απομονώθηκε, C. Επιβεβαίωση της *in vitro* σύνθεσης του ds 15-PGDH και D. Προϊόν PCR του γονιδίου 15-PGDH (361 bp) που απομονώθηκε.

Σύνθεση dsRNA

Για τη σύνθεση των 15-PGDH και GFP dsRNA πραγματοποιήθηκε *in vitro* μεταγραφή με το ένζυμο T7 RNA polymerase (Thermo Scientific). Προηγήθηκε η απομόνωση και ο καθαρισμός του DNA μέσω του το NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kit (Macherey-Nagel), ενώ η συγκέντρωσή του προσδιορίστηκε φασματοφωτομετρικά με το Quawell Q3000. Το προϊόν αυτό χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα για την *in vitro* μεταγραφή με T7 RNA polymerase (Thermo Scientific). Το παραγόμενο dsRNA καθαρίστηκε περαιτέρω με κατεργασία DNase I (2U per 1μg of DNA), ενώ το ένζυμο απομακρύνθηκε και απενεργοποιήθηκε με τη χρήση φαινόλης / χλωροφόρμιο και ακολούθησε κατακρήμνιση με αιθανόλη. Η προκύπτουσα πελλέτα διαλύθηκε σε 20μl ddH₂O και λήφθηκε 1μl ώστε να ακολουθήσει 1:4 αραιώση. Από την αραιώση, 2μl χρησιμοποιήθηκαν για ηλεκτροφόρηση (+3μl ddH₂O + 1μl loading dye 6x) προκειμένου να ελεγχθεί η καθαρότητα του προϊόντος και τα άλλα 2μl

χρησιμοποιήθηκαν για τον ποσοτικό προσδιορισμό της συγκέντρωσης dsRNA (Εικόνα 16).



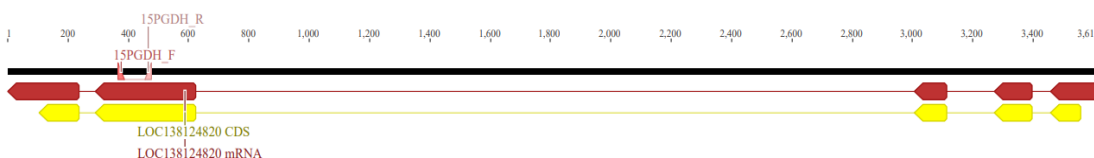
Εικόνα 17. Σχηματική απεικόνιση της θέσης των εκκινητών για την ενίσχυση μέσω PCR του 15-PGDH με LOC138124820. Οι εκκινητές (15PGDH_T7_F, 15PGDH_T7_R) φέρουν T7 άκρα για την *in vitro* σύνθεση του δίκλωνου RNA (dsRNA) που χρησιμοποιήθηκε για σίγαση μέσω RNAi.

Εφαρμογή dsRNA

Για την χορήγηση του dsRNA, παρασκευάστηκε injection buffer σύμφωνα με τους Philip et al. (2012). Το πυκνό διάλυμα dsRNA αραιώθηκε 1:1 με το 2x injection buffer πριν γίνουν οι μικροενέσεις. Η χορήγηση πραγματοποιήθηκε σε ενήλικα θηλυκά *T. molitor* μέσω μικροενέσεων με το σύστημα Nanoject II (Drummond Scientific). Ο όγκος έγχυσης είναι 69nl ανά έντομο (690 ng/μl), ενώ ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε dsRNA μη σχετιζόμενο με το είδος (GFP). Οι ενέσεις διενεργήθηκαν χρησιμοποιώντας γυάλινες βελόνες στη κοιλιακή χώρα, κάτω από τα έλυτρα των εντόμων. Μετά την έγχυση, τα έντομα διαχωρίστηκαν ανάλογα τη μεταχείριση (dsRNA 15-PGDH και GFP) και διατηρήθηκαν υπό ελεγχόμενες συνθήκες εκτροφής.

Απομόνωση RNA, σύνθεση cDNA και qPCR

Από τα θηλυκά έντομα που υποβλήθηκαν σε μικροενέσεις συλλέχθηκαν συνολικά έξι βιολογικές επαναλήψεις για κάθε χρονικό σημείο, σε διάστημα έξι ημερών μετά τη χορήγηση dsRNA (1–6 ημέρες post injection). Η απομόνωση RNA έγινε με χρήση TripleXtractor (GRISP) και υποβλήθηκε σε κατεργασία με DNase I για την απομάκρυνση υπολειμματικού DNA. Η σύνθεση cDNA πραγματοποιήθηκε με αντίστροφη μεταγραφάση MMLV-RT (Invitrogen) και oligo-dT εκκινητές. Τα cDNAs που παράχθηκαν, χρησιμοποιήθηκαν στη συνέχεια ως μήτρα για qPCR ανάλυση στο σύστημα CFX Real-Time PCR (BioRad) με χρήση SYBR Green. Η σχετική έκφραση του γονιδίου-στόχου (15-PGDH) κανονικοποιήθηκε έναντι του γονιδίου αναφοράς (GFP) και η ποσοτική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

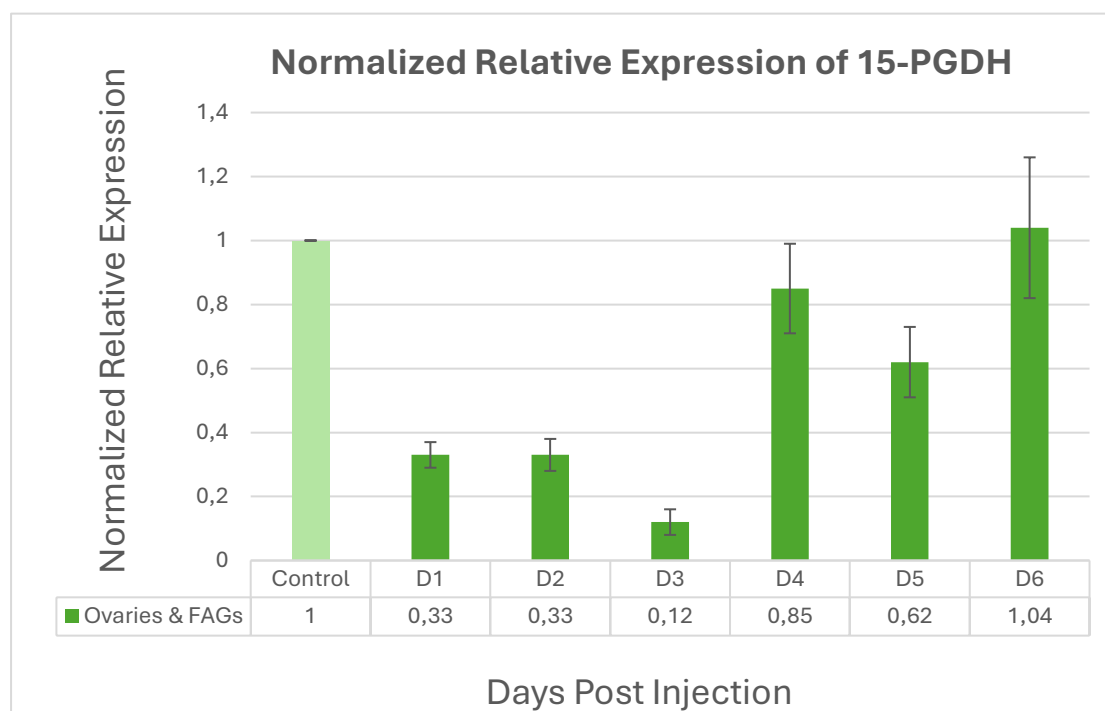


Εικόνα 18. Σχηματική απεικόνιση του γονιδίου 15-PGDH με LOC138124820 και των εκκινητών του 15PGDH_F και 15PGDH_R που σχεδιάστηκαν για την qPCR ενίσχυση του συγκεκριμένου τμήματος.

Αποτελέσματα

Λειτουργικός Προσδιορισμός του Γονιδίου

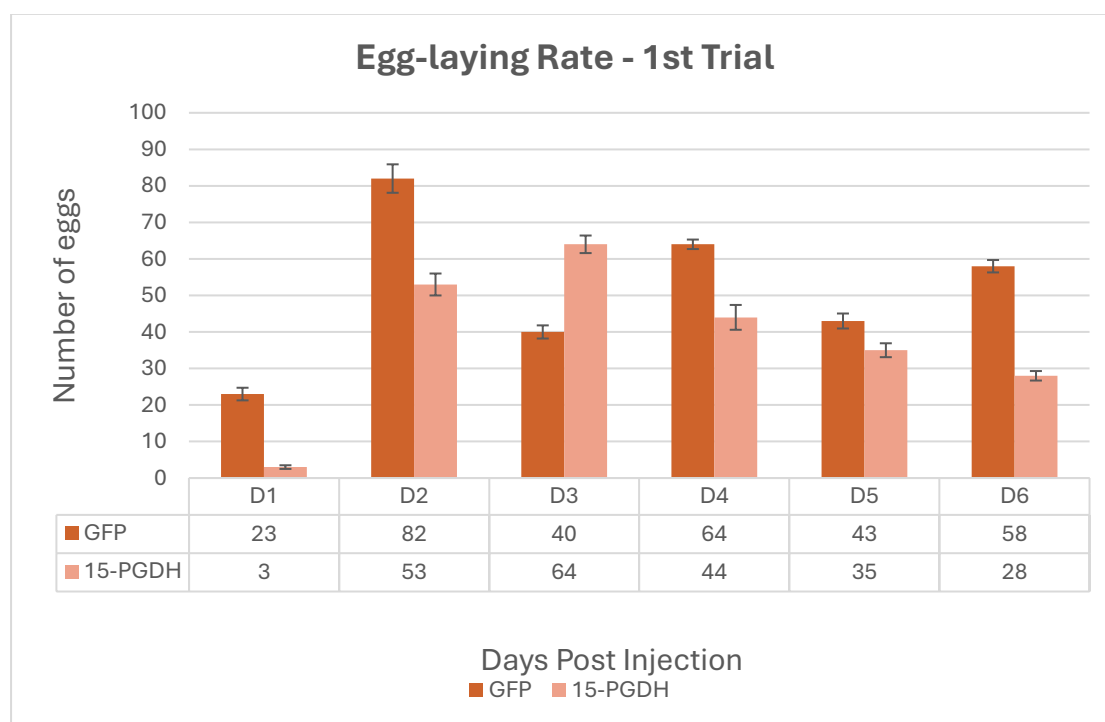
Για τον λειτουργικό χαρακτηρισμό του γονιδίου πραγματοποιήθηκαν ενέσεις με δίκλωνο RNA (dsRNA), με στόχο την αποσιώπηση της έκφρασής του μέσω του μηχανισμού RNAi και την παρατήρηση της επίδρασής της στον φαινότυπο. Στο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν παρθένα ενήλικα σεξουαλικά ώριμα θηλυκά άτομα του *Tenebrio molitor*, ηλικίας 7–9 ημερών. Συνολικά χρησιμοποιήθηκαν 72 έντομα εκ των οποίων τα 36 ενέθηκαν με dsRNA του γονιδίου *15-PGDH*, ενώ τα υπόλοιπα 36 ενέθηκαν με dsRNA του γονιδίου *GFP* και αποτέλεσαν τον μάρτυρα. Μετά τις ενέσεις συλλέχθηκαν δείγματα ανά ημέρα (σε επαναλήψεις των έξι ατόμων) για έξι συνεχόμενες ημέρες. Από αυτά τα δείγματα απομονώθηκε RNA και συντέθηκε cDNA, το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα για την ποσοτική PCR (qPCR). Η ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο $2^{-\Delta\Delta CT}$ Livak, κανονικοποιώντας τις τιμές Cq ως προς το γονίδιο αναφοράς, *elongation factor-1α* (EF-1α). Τα αποτελέσματα έδειξαν σημαντική σίγηση της έκφρασης του γονιδίου κατά το διάστημα από την 1η έως και την 3η ημέρα μετά την ένεση, με μέσο ποσοστό σίγησης 77,5%. Η μέγιστη σίγηση παρατηρήθηκε την 3η ημέρα, φτάνοντας το 88%. Μετά την 3η ημέρα η έκφραση του γονιδίου παρουσίασε σταδιακή επαναφορά του ποσοστού έκφρασης του γονιδίου.



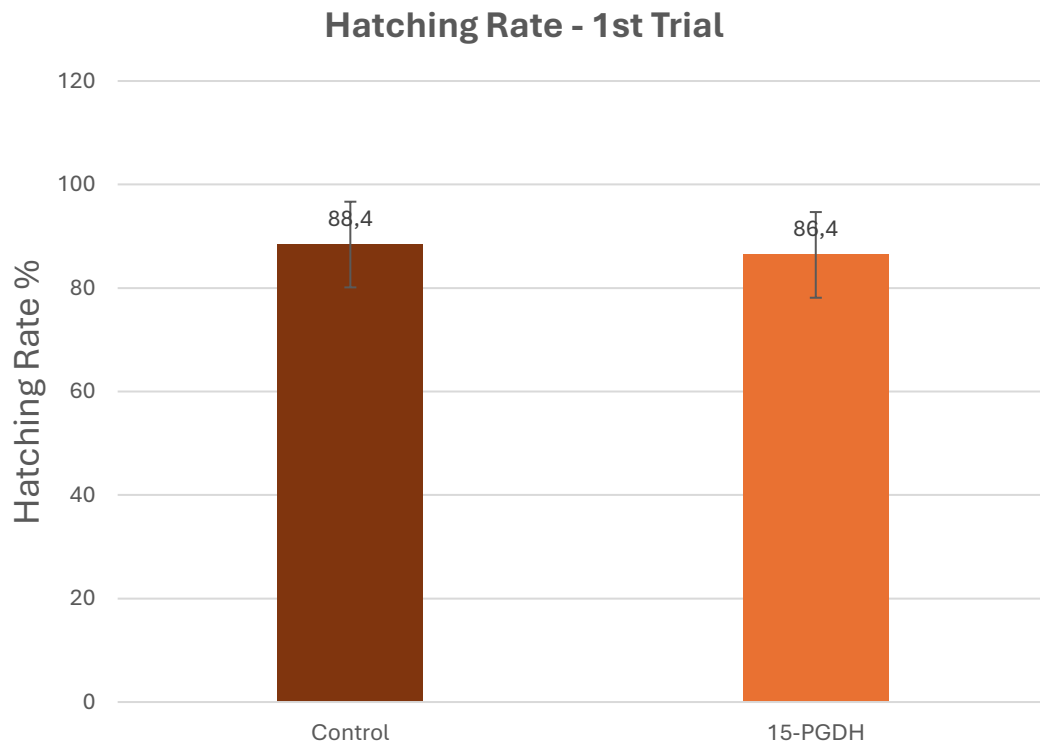
Γράφημα 1. Κανονικοποιημένη έκφραση του γονιδίου *15-PGDH* μετά τις ενέσεις με dsRNA. Οι γραμμές σφάλματος προκύπτουν από το τυπικό σφάλμα του μέσου (SEM).

Φαινοτυπικές παρατηρήσεις

Μετά την επιβεβαίωση της επιτυχούς σίγησης του γονιδίου *15-PGDH*, πραγματοποιήθηκαν φαινοτυπικές δοκιμασίες με σκοπό την αξιολόγηση της επίδρασης στην αναπαραγωγική ικανότητα των θηλυκών εντόμων *T. molitor*. Στην πρώτη δοκιμασία, έξι σεξουαλικά ώριμα θηλυκά (7–9 ημερών) ενέθηκαν με dsRNA *15-PGDH*, ενώ ισάριθμα θηλυκά ενέθηκαν με dsRNA *GFP* που χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρας. Κάθε θηλυκό τοποθετήθηκε ξεχωριστά σε φιαλίδιο (vial) μαζί με δύο αρσενικά χωρίς καμία μεταχείριση και συλλέχθηκαν τα αβγά ανά ημέρα για διάστημα έξι ημερών. Τα συνολικά αβγά που συλλέχθηκαν από τα treated έντομα με το *15-PGDH* ήταν στο σύνολο 227 ενώ από τα treated με το control (*GFP*) ήταν στο σύνολο 310. Συνεπώς, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η σίγηση του *15-PGDH* οδήγησε σε μείωση της ωτοκίας, η οποία συνολικά ανήλθε σε 26,8% συγκριτικά με τον μάρτυρα. Η μείωση αυτή ήταν πιο έντονη τις δύο πρώτες ημέρες, ενώ την τρίτη ημέρα παρατηρήθηκε παροδική αύξηση του αριθμού των αβγών, πριν ακολουθήσει εκ νέου μείωση κατά το διάστημα 4–6 ημερών (Γράφημα 2). Όσον αφορά την εκκολαψιμότητα, δεν καταγράφηκαν διαφορές μεταξύ των ομάδων, καθώς το ποσοστό εκκόλαψης κυμάνθηκε σε παρόμοια επίπεδα περίπου στο 87% (Γράφημα 3).



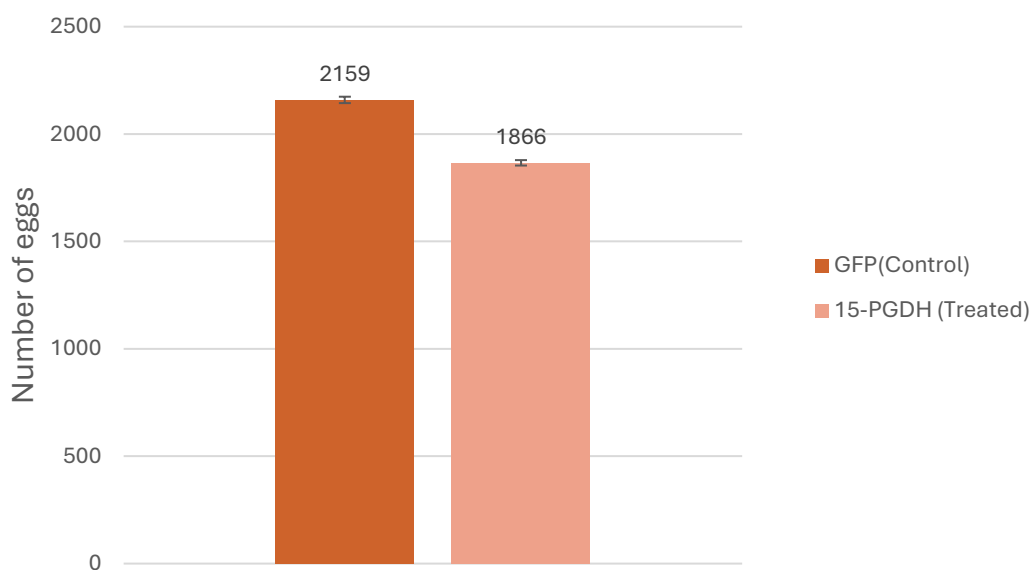
Γράφημα 2. Ρυθμός ωτοκίας εντόμων μετά από σίγηση του γονιδίου *15-PGDH* συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου (*GFP*) κατά τις ημέρες D1–D6 post injection (first trial).



Γράφημα 3. Απεικόνιση της συνολικής εκκολαψιμότητας (first trial). Από τα 310 αυγά των μαρτύρων εκκολάφθηκαν τα 274 και από τα 227 αυγά των εντόμων που έχουν υποστεί σίγηση εκκολάφθηκαν τα 196.

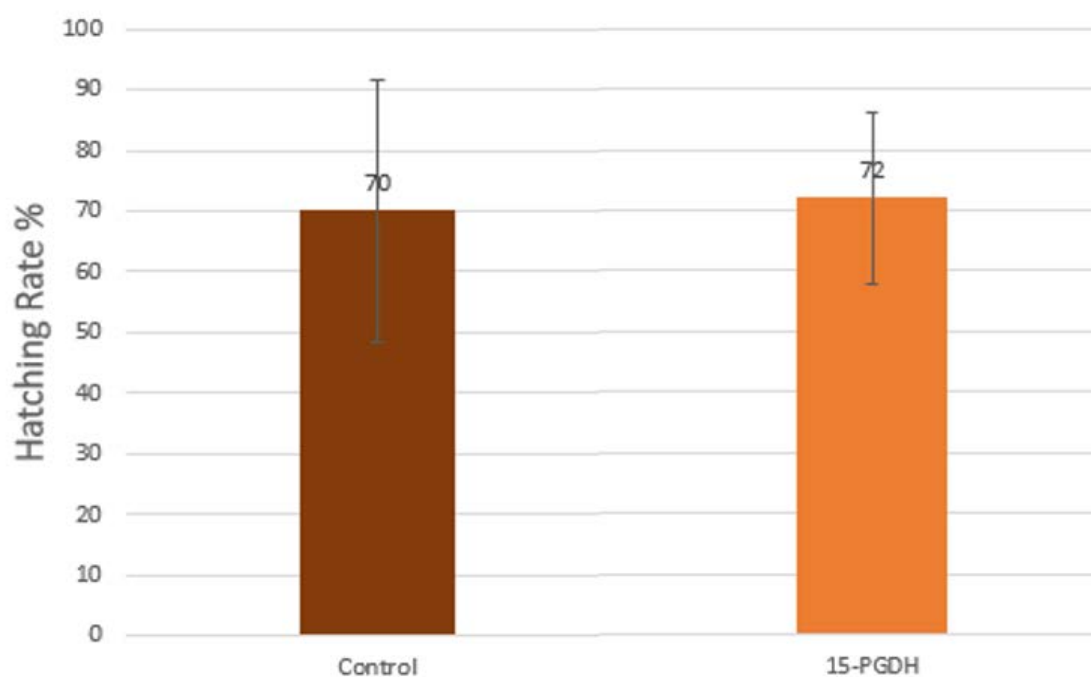
Στη δεύτερη δοκιμή, χρησιμοποιήθηκαν έξι επαναλήψεις των πέντε θηλυκών ανά γονίδιο (συνολικά 30 έντομα για κάθε ομάδα), οι οποίες τοποθετήθηκαν με αντίστοιχες πεντάδες αρσενικών χωρίς καμία μεταχείριση. Τα συνολικά αυγά που συλλέχθηκαν από τα treated έντομα με το 15-PGDH ήταν στο σύνολο 1866, ενώ από τα treated με το control (GFP) ήταν στο σύνολο 2159. Και σε αυτή την περίπτωση, η σίγηση του γονιδίου *15-PGDH* είχε ως αποτέλεσμα μείωση της ωοτοκίας, η οποία ανήλθε σε 13,6% σε σχέση με τον μάρτυρα (Γράφημα 4). Αντίθετα, η εκκολαψιμότητα παρέμεινε αμετάβλητη, με παρόμοιο ποσοστό περίπου στο 70% και στις δύο ομάδες (Γράφημα 5). Συνολικά, τα αποτελέσματα των δύο δοκιμασιών υποδεικνύουν ότι η σίγηση του γονιδίου *15-PGDH* σχετίζεται με μείωση της ωοτοκίας (14–27%) αλλά όχι της εκκολαψιμότητας των αυγών.

Oviposition Rate - 2nd Trial



Γράφημα 4. Απεικόνιση του συνολικού αριθμού των αυγών που συλλέχθηκαν (second trial)

Hatching Rate - 2nd Trial



Γράφημα 5. Απεικόνιση της συνολικής εκκολαψιμότητας (second trial). Από τα 2159 αυγά των μαρτύρων εκκολάφθηκαν τα 1513 και από τα 1866 αυγά των εντόμων που έχουν υποστεί σίγηση εκκολάφθηκαν τα 1347.

Συζήτηση

Τα τελευταία χρόνια, το σκαθάρι *T. molitor* έχει προσελκύσει το επιστημονικό, βιομηχανικό και διατροφικό ενδιαφέρον, καθώς έχει αναδειχθεί σε πολύτιμο οργανισμό για τη γεωργία, την κτηνοτροφία και τη βιομηχανία. Η χρήση του αφορά τη διατροφή ανθρώπων και ζώων ως πηγή πρωτεΐνης, συμβάλλει στη βιοαποικοδόμηση πλαστικών, ενώ παράλληλα αποτελεί αξιόπιστο πειραματικό μοντέλο για τη μελέτη βιολογικών διεργασιών (Moruzzo et al., 2021b). Επιπλέον, η μελέτη του μοριακού υποβάθρου του εντόμου έχει ιδιαίτερη σημασία καθώς, τα Κολεόπτερα αποτελούν την πολυπληθέστερη τάξη εντόμων, περιλαμβάνοντας περίπου το 40% των ειδών των αρθροπόδων και το 25% του ζωικού βασιλείου (Stork et al., 2015). Δεδομένης της σημασίας του, το *T. molitor*, κρίθηκε απαραίτητο να διερευνηθούν οι μηχανισμοί που διέπουν την αναπαραγωγική του ικανότητα, πεδίο που παραμένει ασαφές σε μοριακό επίπεδο. Έχουν ήδη πραγματοποιηθεί μελέτες που έδειξαν ότι τα ελληνικά στελέχη εμφανίζουν υψηλότερη αναπαραγωγική απόδοση σε σχέση με τα γερμανικά (Adamaki-Sotiraki et al., 2022). Για να διερευνηθούν τα αίτια των διαφορών αυτών, πραγματοποιήθηκε συγκριτική μεταγραφομική ανάλυση (RNA-seq) σε ωοθήκες και επικουρικούς αδένες θηλυκών, η οποία ανέδειξε μια σειρά διαφορικά εκφραζόμενων γονιδίων που πιθανόν συνδέονται με την αναπαραγωγική ικανότητα.

Μεταξύ αυτών, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσίασε το γονίδιο που κωδικοποιεί το ένζυμο 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase (*15-PGDH*), το οποίο βρέθηκε να υπερεκφράζεται στα ελληνικά στελέχη. Το *15-PGDH* αποτελεί ένζυμο αποικοδόμησης προσταγλανδινών (PG), μορίων που λειτουργούν ως αυτοκρινείς και παρακρινείς μεσολαβητές και ρυθμίζουν διεργασίες όπως η ανάπτυξη των ωοκυττάρων, η συμπεριφορά ωοτοκίας και η ανοσολογική απόκριση (Stanley & Kim, 2019b). Ενδείξεις από το *S. exigua* έδειξαν ότι η σίγηση του ομόλογου γονιδίου (*SePGDH*) οδήγησε σε παρατεταμένη ενεργοποίηση της φαινολοξειδάσης (PO), εκτεταμένη μελανοποίηση και υψηλή θνησιμότητα, γεγονός που αποδεικνύει τον ρυθμιστικό του ρόλο στον τερματισμό της φλεγμονώδους απόκρισης (Ahmed & Kim, 2020). Αυτό υποστηρίζει την υπόθεση ότι και στο *T. molitor* το ένζυμο συμβάλλει στη διατήρηση της ισορροπίας της σηματοδότησης των προσταγλανδινών.

Με βάση τα παραπάνω ευρήματα, στην παρούσα διπλωματική εργασία διερευνήθηκε ο ρόλος του *15-PGDH* στο *T. molitor*. Για τον λειτουργικό προσδιορισμό εφαρμόστηκε η μέθοδος της γονιδιακής σίγησης μέσω παρεμβολής RNA (RNAi). Η ανάλυση qPCR έδειξε σημαντική μείωση της έκφρασης του γονιδίου τις τρεις πρώτες ημέρες μετά τη χορήγηση dsRNA, με μέσο όρο 77,5%, ενώ το μέγιστο ποσοστό σίγησης ήταν την τρίτη ημέρα στο 88%. Παρά τις διακυμάνσεις, είναι γνωστό ότι τα Κολεόπτερα έχουν εξελίξει μηχανισμούς που διευκολύνουν την απορρόφηση και τη συστηματική διασπορά του dsRNA, γεγονός που εξηγεί την υψηλή αποδοτικότητα της μεθόδου σε αυτήν την τάξη εντόμων (Mingels et al., 2020; Tomoyasu et al., 2008; Xiao et al., 2015).

Όσον αφορά την επίδραση της μείωσης της έκφρασης του γονιδίου στον φαινότυπο, εφαρμόστηκαν δύο διαφορετικές δοκιμές. Στην πρώτη δοκιμή, χρησιμοποιήθηκαν 6 θηλυκά (για το γονίδιο και για τον μάρτυρα), όπου κάθε θηλυκό ήταν απομονωμένο με 2 αρσενικά χωρίς καμία μεταχείριση και η συλλογή αβγών πραγματοποιούνταν για 6 συνεχόμενες ημέρες. Η δοκιμή αυτή μας επέτρεψε να παρακολουθούμε τα αποτελέσματα σε ατομικό επίπεδο. Αντίστοιχα στη δεύτερη δοκιμή, ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο του Εργαστηρίου Εντομολογίας και Αγροτικής Ζωολογίας του Τμήματος Γεωπονίας, Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, χρησιμοποιήθηκαν 5 θηλυκά ανά ομάδα για 6 επαναλήψεις και κάθε επανάληψη είχε στο ίδιο vial 5 αρσενικά χωρίς μεταχείριση. Σε αυτήν, τα συνολικά αβγά συλλέχθηκαν μία φορά, μετά το πέρασμα μίας εβδομάδας. Η φαινοτυπική ανάλυση έδειξε ότι η σίγηση του *15-PGDH* προκάλεσε μείωση της ωοτοκίας και στις δύο περιπτώσεις. Η μείωση της ωοτοκίας κυμάνθηκε μεταξύ 14–27% σε σχέση με τους μάρτυρες. Ωστόσο, η σίγηση του *15-PGDH* δεν φάνηκε να επιδρά στην εκκόλαψη των αβγών. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η δυναμική του φαινοτύπου, καθώς τις δύο πρώτες ημέρες η διαφορά στην ωοτοκία μεταξύ του μάρτυρα και της μεταχείρισης, στα οποία έχει κατασταλεί η έκφραση του *15-PGDH*, ήταν ιδιαίτερα έντονη. Έπειτα, ακολούθησε μια μέρα ανάκαμψης της ωοτοκίας και στη συνέχεια ξανά σταθερά μειωμένη ωοτοκία μέχρι την έκτη ημέρα. Ενδεχομένως, το μοτίβο αυτό υποδηλώνει τη σύνθετη ρύθμιση της αναπαραγωγής από τις προσταγλανδίνες και την αλληλεπίδρασή τους με άλλους παράγοντες ή οφείλεται στο συστημικό RNAi.

Σε σύγκριση με το *S. exigua*, όπου η σίγηση του *SePGDH* είχε δραματικό φαινότυπο, τα αποτελέσματα ήταν διαφορετικά στο *T. molitor*. Συγκεκριμένα, στο *S. exigua* η σίγηση με RNAi μείωσε την έκφραση του *SePGDH* πάνω από 60% στα αιμοκύτταρα μέσα σε 24 ώρες, ενώ επηρέασε και την έκφραση του στο λιπώδες σώμα και στο μεσέντερο. Η καταστολή αυτή προκάλεσε παρατεταμένη ενεργοποίηση της φαινολοξειδάσης (*phenoloxidase, PO*), η οποία παρέμεινε αυξημένη ακόμη και 8 ώρες μετά τη βακτηριακή προβολή. Ως συνέπεια, παρατηρήθηκε εκτεταμένη μελανοποίηση και θνησιμότητα 20 ώρες μετά την ένεση. Στο *T. molitor* η σίγηση του *15-PGDH*, αν και ήταν ιδιαίτερα αποδοτική, καθώς έφτασε μέχρι και 88% σίγηση την 3^η ημέρα, δεν προκάλεσε θνησιμότητα αλλά επηρέασε κυρίως την αναπαραγωγική απόδοση, γεγονός που υποδηλώνει ότι ο ρόλος του ενζύμου μπορεί να διαφοροποιείται μεταξύ των δύο ειδών.

Για την πληρέστερη κατανόηση του ρόλου του *15-PGDH* στο *T. molitor*, απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση με στοχευμένα πειράματα. Μία κατεύθυνση θα μπορούσε να είναι η ποσοτική ανάλυση των επιπέδων προσταγλανδινών στα αναπαραγωγικά όργανα του θηλυκού εντόμου, μετά τη σίγηση του γονιδίου, ώστε να διαπιστωθεί ο βαθμός συσσώρευσης τους και η συσχέτισή τους με την αναπαραγωγή. Επιπλέον, η μελέτη της έκφρασης γονιδίων που εμπλέκονται με την αναπαραγωγική διαδικασία, όπως η βιτελλογενίνη, θα μπορούσε να δώσει περισσότερες πληροφορίες για τη σύνδεση του *15-PGDH* με την αναπαραγωγή. Παράλληλα, σημαντική θα ήταν και η αξιολόγηση της έκφρασης γονιδίων που εμπλέκονται με το ανοσοποιητικό σύστημα, όπως αυτό της φαινολοξειδάσης (*PO*), ή

αντιμικροβιακών πεπτιδίων (AMPs). Από μελέτες στο *T. molitor*, έχει φανεί ότι η ενεργοποίηση της αντιβακτηριακής απόκρισης σχετίζεται με μείωση της γονιμότητας, αναδεικνύοντας ένα σαφές trade-off ανάμεσα σε ανοσία και αναπαραγωγή (Jehan et al., 2022b). Η διερεύνηση αν το *15-PGDH* εμπλέκεται σ' αυτήν την ισορροπία θα συνέβαλε στην αποσαφήνιση του ερωτήματος αν και σε τι βαθμό το γονίδιο λειτουργεί ως ρυθμιστής της ισορροπίας ανάμεσα στην ανοσολογική απόκριση και την αναπαραγωγή.

Συνοψίζοντας, η παρούσα μελέτη ανέδειξε τον ρόλο του ενζύμου 15-PGDH στη ρύθμιση της αναπαραγωγικής ικανότητας του *T. molitor*. Η σίγηση του γονιδίου προκάλεσε σημαντική μείωση της ωοτοκίας, γεγονός που υποδεικνύει ότι το ένζυμο δεν συμμετέχει απλά σε έναν μηχανισμό αποικοδόμησης προσταγλανδινών, αλλά έχει επίδραση σε κρίσιμες διεργασίες του εντόμου. Η αυξημένη έκφρασή του στα ελληνικά στελέχη, τα οποία παρουσιάζουν υψηλότερη αναπαραγωγική ικανότητα, ενισχύει την υπόθεση ότι το γονίδιο συνδέεται με την αναπαραγωγική απόδοση. Ένας πιθανός μηχανισμός είναι ότι μέσω της αποικοδόμησης των προσταγλανδινών περιορίζεται η υπερβολική ανοσολογική ενεργοποίηση, επιτρέποντας τη διάθεση πόρων για τη βιτελλογένεση και την ωογένεση. Για αυτόν τον λόγο, η κατανόηση του ρόλου του *15-PGDH* αποκτά ιδιαίτερη σημασία όχι μόνο για την εντομολογία, αλλά και για εφαρμογές που σχετίζονται με την μαζική εκτροφή εντόμων σε βιομηχανική κλίμακα. Έχοντας τη δυνατότητα βελτίωσης της αναπαραγωγικής ικανότητας μέσω της κατανόησης και της ρύθμισης τέτοιων γονιδίων μπορεί να συμβάλει στη βιώσιμη παραγωγή εντόμων για διατροφή, ζωοτροφές και άλλες βιοτεχνολογικές χρήσεις.

Συμπεράσματα

Το σκαθάρι *Tenebrio molitor* L. έχει αναδειχθεί σε σημαντικό έντομο με πολλαπλές εφαρμογές στη διατροφή, στη γεωργία και στη βιομηχανία, ενώ παράλληλα χρησιμοποιείται ως πειραματικό μοντέλο για τη μελέτη βιολογικών διεργασιών. Η κατανόηση των μηχανισμών που διέπουν την αναπαραγωγική του ικανότητα είναι κρίσιμη, δεδομένης της αυξανόμενης ζήτησης του σε βιομηχανικό επίπεδο. Εξίσου σημαντική είναι η διερεύνηση και μελέτη των διαφορετικών μοριακών και σηματοδοτικών μονοπατιών των Κολεόπτερων, της πολυπληθέστερης τάξης των εντόμων. Στο πλαίσιο αυτό, επιλέχθηκε το γονίδιο *15-PGDH* μετά από ανάλυση διαφορικά εκφραζόμενων γονιδίων μεταξύ ελληνικών και γερμανικών στελεχών, τα οποία πιθανόν παίζουν ρόλο στη ρύθμιση της αναπαραγωγικής του ικανότητας. Το ένζυμο *15-PGDH*, γνωστό για τον ρόλο του στην αποικοδόμηση των προσταγλανδινών, βρέθηκε να υπερεκφράζεται στο ελληνικό στέλεχος. Η σίγηση μέσω RNAi προκάλεσε μείωση της έκφρασης του γονιδίου έως και 88% και οδήγησε σε σημαντική μείωση της ωοτοκίας κατά 14-27%, ωστόσο χωρίς να επηρεάζει την εκκολαψιμότητα. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει τη συμβολή του *15-PGDH* στη ρύθμιση της αναπαραγωγικής λειτουργίας.

Λαμβάνοντας υπόψιν τον ρόλο των προσταγλανδινών στην αναπαραγωγή και την ανοσολογική απόκριση, προκύπτει το ερώτημα πως ακριβώς λειτουργεί αυτό το ένζυμο και ποιες διεργασίες εξαρτώνται από τη δράση του. Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας δείχνουν ότι το *15-PGDH* επηρεάζει την αναπαραγωγή μέσω της ωοτοκίας, ενώ η υπερέκφρασή του πιθανόν δεν περιορίζεται στη διάσπαση προσταγλανδινών, αλλά λειτουργεί ως ρυθμιστής της ισορροπίας ανάμεσα στην αναπαραγωγή και την ανοσολογική απόκριση. Έτσι, περιορίζει την υπερβολική ενεργοποίηση της ανοσίας, εξασφαλίζοντας πιο ισορροπημένη κατανομή πόρων. Η ύπαρξη του trade-off ανοσίας και αναπαραγωγής που έχει μελετηθεί στο *T. molitor*, ενισχύει περισσότερο αυτήν την υπόθεση. Για να αποσαφηνιστεί ο μηχανισμός, απαιτείται περαιτέρω έρευνα, με έμφαση στην ποσοτικοποίηση προσταγλανδινών, στην μέτρηση δεικτών αναπαραγωγής, όπως η βιτελλογενίνη και στην αξιολόγηση παραμέτρων ανοσολογικής απόκρισης, όπως τα επίπεδα των AMPs.

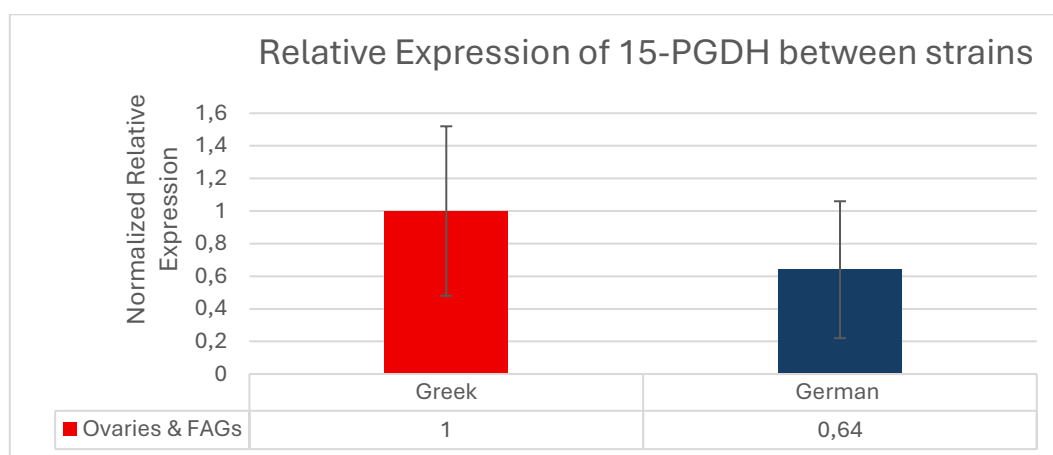
Παράρτημα

Εκκινητές

Πίνακας 1. Αλληλουχίες εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν.

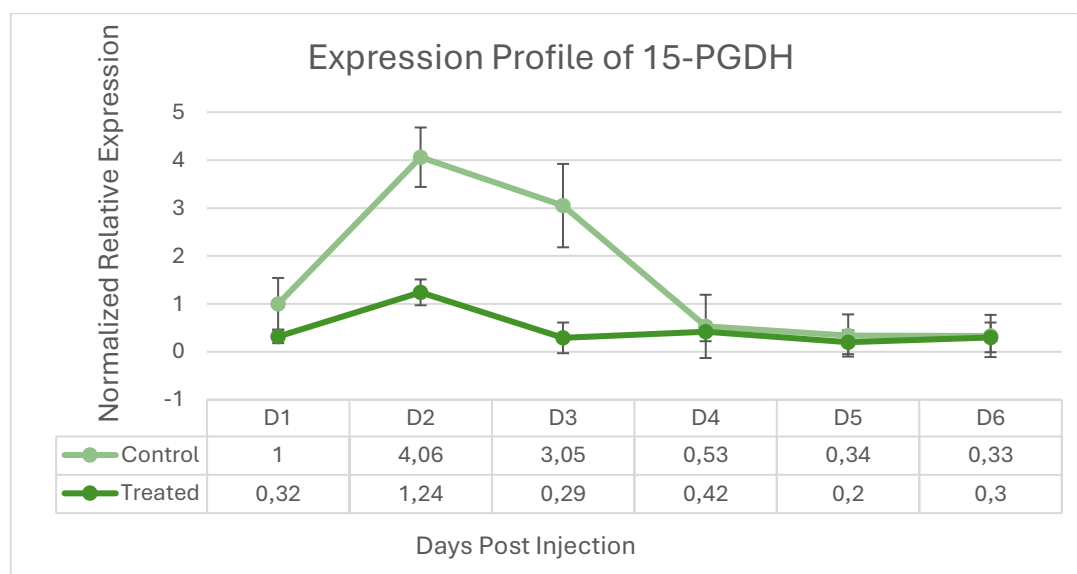
	Forward	Reverse
Primer Name	Primer sequence	Primer sequence
15PGDH	GGAGGAGTGTCCGAAGAAA	CGTAGGGTTGGATCGTTCGT
15PGDH_T7	TAATACGACTCACTATAGGGAGA TAGCTCCAAGCCCATCAACA	TAATACGACTCACTATAGGGAGA TCGTTTCGTGGAAGTCTCTTGG
Elf1a_like	GATCGTCGTACCGGCAAAAC	TCTTGAACGATTCGACGCA

Επικύρωση αποτελεσμάτων DEG ανάλυσης

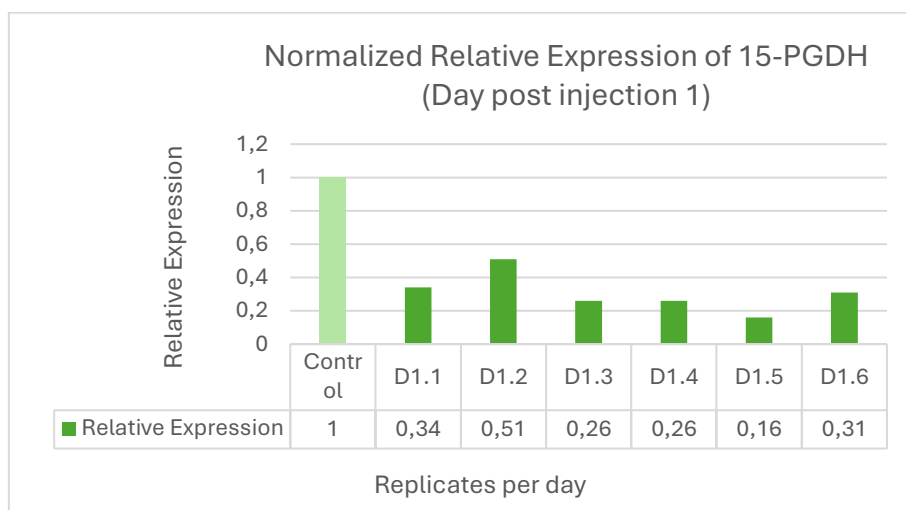


Γράφημα 6 Κανονικοποιημένη έκφραση του 15-PGDH σε ελληνικά και γερμανικά στελέχη

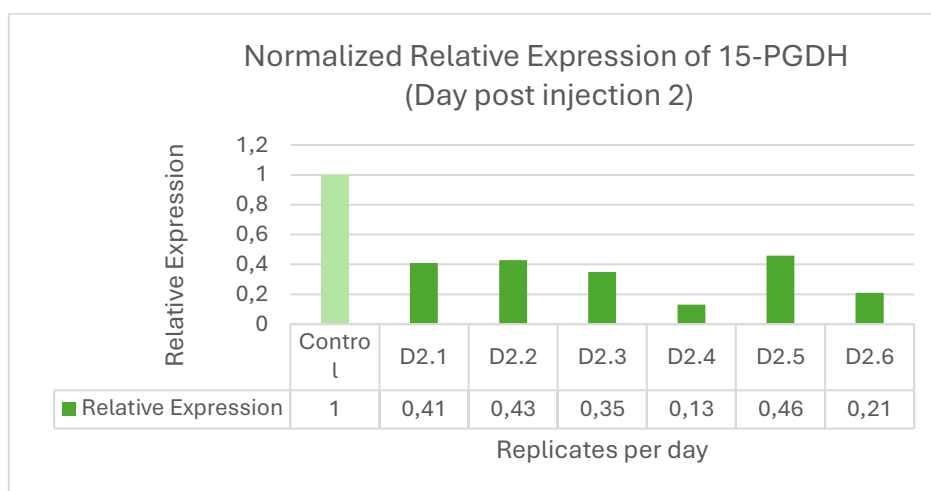
Αποτελέσματα σίγησης του 15PGDH



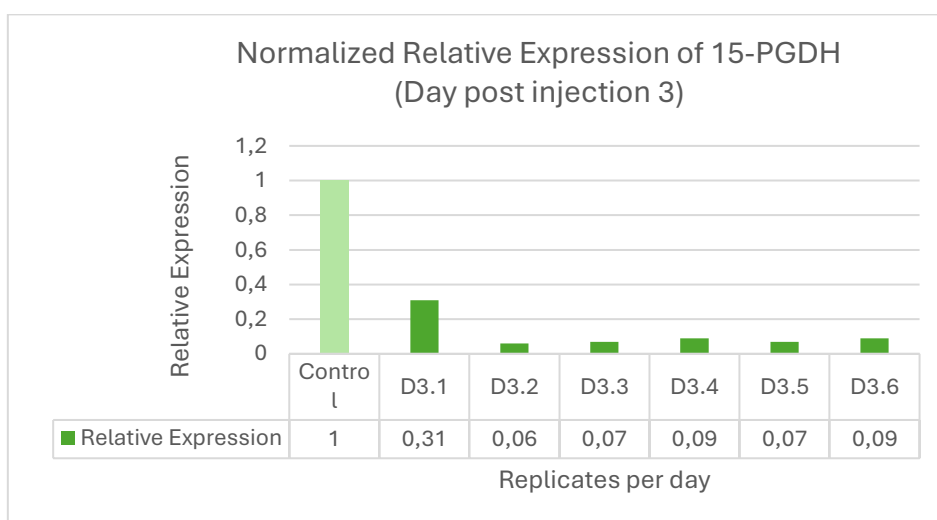
Γράφημα 7. Προφίλ έκφρασης του 15-PGDH σε ωθηκές και επικοιρικούς αδένες ενήλικων θηλυκών εντόμων. Οι γραμμές σφάλματος προκύπτουν από το τυπικό σφάλμα του μέσου (SEM).



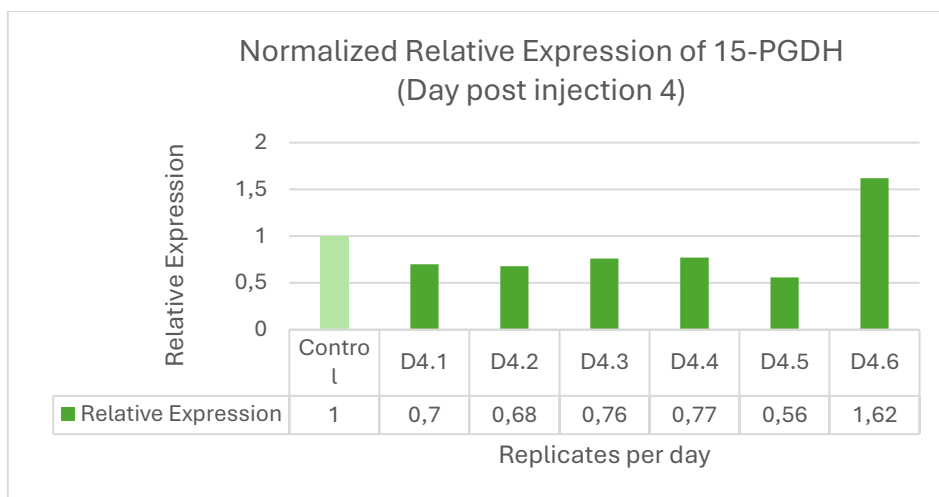
Γράφημα 8. Κανονικοποιημένη έκφραση του γονιδίου 15-PGDH την 1η ημέρα μετά από ένεση με dsRNA.



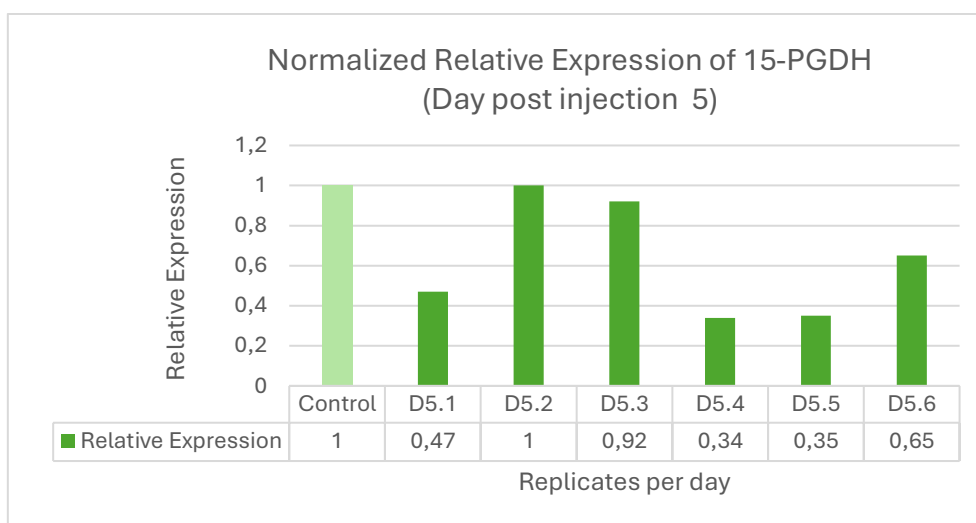
Γράφημα 9. Κανονικοποιημένη έκφραση του γονιδίου 15-PGDH τη 2η ημέρα μετά από ένεση με dsRNA.



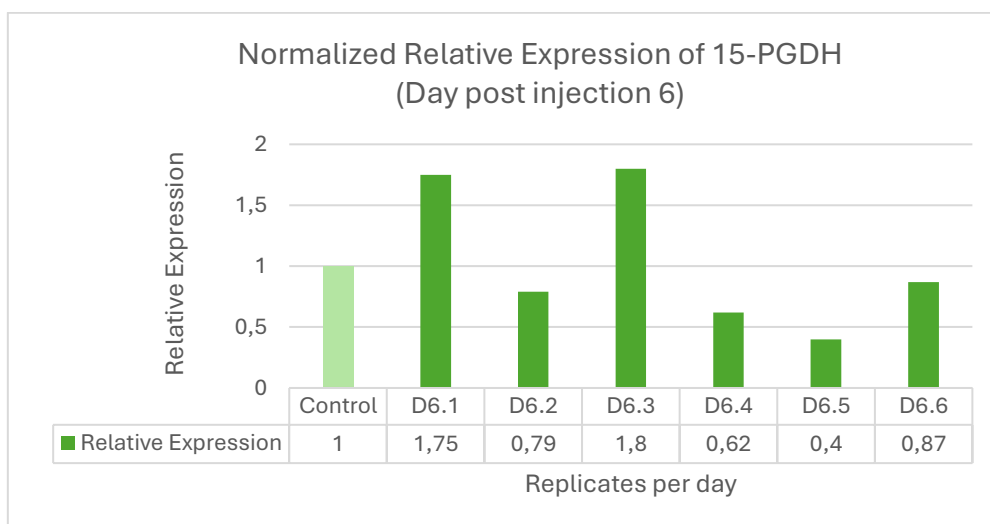
Γράφημα 10. Κανονικοποιημένη έκφραση του γονιδίου 15-PGDH την 3η ημέρα μετά από ένεση με dsRNA.



Γράφημα 11. Κανονικοποιημένη έκφραση του γονιδίου 15-PGDH την 4η ημέρα μετά από ένεση με dsRNA.



Γράφημα 12. Κανονικοποιημένη έκφραση του γονιδίου 15-PGDH την 5η ημέρα μετά από ένεση με dsRNA.



Γράφημα 13. Κανονικοποιημένη έκφραση του γονιδίου 15-PGDH την 6η μετά από ένεση με dsRNA

Βιβλιογραφία

- Adamaki-Sotiraki, C., Rumbos, C. I., & Athanassiou, C. G. (2022). Strain effect on the adult performance of the yellow mealworm, *Tenebrio molitor* L. *Journal of Insects as Food and Feed*, 8(12), 1401–1410. <https://doi.org/10.3920/JIFF2021.0207>
- Ahmed, S., & Kim, Y. (2020). Prostaglandin catabolism in *Spodoptera exigua*, a lepidopteran insect. *Journal of Experimental Biology*. <https://doi.org/10.1242/jeb.233221>
- Ahmed, S., Stanley, D., & Kim, Y. (2018). An Insect Prostaglandin E2 Synthase Acts in Immunity and Reproduction. *Frontiers in Physiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01231>
- Bai, H., & Palli, S. R. (2016). Identification of G protein-coupled receptors required for vitellogenin uptake into the oocytes of the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Scientific Reports*, 6(1), 27648. <https://doi.org/10.1038/srep27648>
- Baulcombe, D. (2004). RNA silencing in plants. *Nature*, 431(7006), 356–363. <https://doi.org/10.1038/nature02874>
- Benton, M. A. (2018). A revised understanding of *Tribolium* morphogenesis further reconciles short and long germ development. *PLOS Biology*, 16(7), e2005093. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2005093>
- Benzertiha, A., Kierończyk, B., Rawski, M., Mikołajczak, Z., Urbański, A., Nogowski, L., & Józefiak, D. (2020). Insect Fat in Animal Nutrition – A Review. *Annals of Animal Science*, 20(4), 1217–1240. <https://doi.org/10.2478/aoas-2020-0076>
- Bergström, S., Danielsson, H., Klenberg, D., & Samuelsson, B. (1964). The Enzymatic Conversion of Essential Fatty Acids into Prostaglandins. *Journal of Biological Chemistry*, 239(11), PC4006–PC4008. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)91234-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)91234-2)
- Billen, P., Khalifa, L., Van Gerven, F., Tavernier, S., & Spatari, S. (2020). Technological application potential of polyethylene and polystyrene biodegradation by macro-organisms such as mealworms and wax moth larvae. *Science of The Total Environment*, 735, 139521. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139521>
- Bordiean, A., Krzyżaniak, M., Stolarski, M. J., Czachorowski, S., & Peni, D. (2020). Will Yellow Mealworm Become a Source of Safe Proteins for Europe? *Agriculture*, 10(6), 233. <https://doi.org/10.3390/agriculture10060233>
- Bos, C. L., Richel, D. J., Ritsema, T., Peppelenbosch, M. P., & Versteeg, H. H. (2004). Prostanoids and prostanoid receptors in signal transduction. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 36(7), 1187–1205. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2003.08.006>
- Brandon, A. M., El Abbadi, S. H., Ibekwe, U. A., Cho, Y.-M., Wu, W.-M., & Criddle, C. S. (2020). Fate of Hexabromocyclododecane (HBCD), A Common Flame Retardant, In Polystyrene-Degrading Mealworms: Elevated HBCD Levels in Egested Polymer but No Bioaccumulation. *Environmental Science & Technology*, 54(1), 364–371. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b06501>
- Brenner, R. R., & Bernasconi, A. (1989). Prostaglandin biosynthesis in the gonads of the hematophagous insect *Triatoma infestans*. *Comparative Biochemistry and Physiology*

Part B: Comparative Biochemistry, 93(1), 1–4. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(89\)90207-1](https://doi.org/10.1016/0305-0491(89)90207-1)

- Broek, L. A. M. van den., Boeriu, C. G. ., & Stevens, C. V. . (2020). *Chitin and chitosan : properties and applications*. Wiley.
- Brown, J. H., & Sibly, R. M. (2006). Life-history evolution under a production constraint. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(47), 17595–17599. <https://doi.org/10.1073/pnas.0608522103>
- Carthew, R. W., & Sontheimer, E. J. (2009). Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*, 136(4), 642–655. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.035>
- Chang, B. H., Cui, B., Ullah, H., Li, S., Hao, K., Tu, X., Wang, G., Nong, X., McNeill, M. R., Huang, X., & Zhang, Z. (2019). Role of PTP/PTK trans activated insulin-like signalling pathway in regulation of grasshopper (*Oedaleus asiaticus*) development. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(8), 8312–8324. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-04212-3>
- Chapman, R. F. ., Simpson, S. J. ., & Douglas, A. E. . (2013). *The insects : structure and function*. Cambridge University Press.
- Chepkorir, A., Beesigamukama, D., Gitari, H. I., Chia, S. Y., Subramanian, S., Ekesi, S., Abucheli, B. E., Rubyogo, J. C., Zahariadis, T., Athanasiou, G., Zachariadi, A., Zachariadis, V., Tenkouano, A., & Tanga, C. M. (2024). Insect frass fertilizer as a regenerative input for improved biological nitrogen fixation and sustainable bush bean production. *Frontiers in Plant Science*, 15. <https://doi.org/10.3389/fpls.2024.1460599>
- Church, S. H., de Medeiros, B. A. S., Donoughe, S., Márquez Reyes, N. L., & Extavour, C. G. (2021). Repeated loss of variation in insect ovary morphology highlights the role of development in life-history evolution. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 288(1950), rspb.2021.0150. <https://doi.org/10.1098/rspb.2021.0150>
- Churchward-Venne, T. A., Pinckaers, P. J. M., van Loon, J. J. A., & van Loon, L. J. C. (2017). Consideration of insects as a source of dietary protein for human consumption. *Nutrition Reviews*, 75(12), 1035–1045. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nux057>
- Cui, Y., Sui, Y., Xu, J., Zhu, F., & Palli, S. R. (2014). Juvenile hormone regulates *Aedes aegypti* Krüppel homolog 1 through a conserved E box motif. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 52, 23–32. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2014.05.009>
- Dana, H., Chalbatani, G. M., Mahmoodzadeh, H., Karimloo, R., Rezaiean, O., Moradzadeh, A., Mehmandoost, N., Moazzen, F., Mazraeh, A., Marmari, V., Ebrahimi, M., Rashno, M. M., Abadi, S. J., & Gharagouzlo, E. (2017). Molecular Mechanisms and Biological Functions of siRNA. *International Journal of Biomedical Science : IJBS*, 13(2), 48–57.
- Dennis, E. A. (1994). Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A2. *Journal of Biological Chemistry*, 269(18), 13057–13060. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)36794-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)36794-7)
- Dolezal, T., Krejcova, G., Bajgar, A., Nedbalova, P., & Strasser, P. (2019). Molecular regulations of metabolism during immune response in insects. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 109, 31–42. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2019.04.005>
- Dyall, S. C., Balas, L., Bazan, N. G., Brenna, J. T., Chiang, N., da Costa Souza, F., Dalli, J., Durand, T., Galano, J.-M., Lein, P. J., Serhan, C. N., & Taha, A. Y. (2022). Polyunsaturated fatty acids and fatty acid-derived lipid mediators: Recent advances in

- the understanding of their biosynthesis, structures, and functions. *Progress in Lipid Research*, 86, 101165. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2022.101165>
- European Commission. (2015). *Regulation (EU) 2015/2283 of the European Parliament and of the Council of 25 November 2015 on novel foods, amending Regulation (EU) No 1169/2011 of the European Parliament and of the Council and repealing Regulation (EC) No 258/97 of the European Parliament and of the Council and Commission Regulation (EC) No 1852/2001*. <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2015/2283/oj>
- European Commission. (2018). *COMMUNICATION FROM THE COMMISSION TO THE EUROPEAN PARLIAMENT, THE COUNCIL, THE EUROPEAN ECONOMIC AND SOCIAL COMMITTEE AND THE COMMITTEE OF THE REGIONS A sustainable Bioeconomy for Europe: Strengthening the connection between economy, society and the environment*. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A52018SC0431>
- Finke, M. D. (2013). Complete Nutrient Content of Four Species of Feeder Insects. *Zoo Biology*, 32(1), 27–36. <https://doi.org/10.1002/zoo.21012>
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., & Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391(6669), 806–811. <https://doi.org/10.1038/35888>
- Gadzama, N. M., Happ, C. M., & Happ, G. M. (1977). Cytodifferentiation in the accessory glands of *Tenebrio molitor*. I. Ultrastructure of the tubular gland in the post-ecdysial adult male. *Journal of Experimental Zoology*, 200(2), 211–221. <https://doi.org/10.1002/jez.1402000203>
- Gerber, G. H. (1973). *Reproductive behaviour and physiology of Tenebrio molitor (Coleoptera: Tenebrionidae)*. 111. Histogenetic changes in the internal genitalia, mesenteron, and cuticle during sexual maturation1. www.nrcresearchpress.com
- Ghosh, S., Lee, S.-M., Jung, C., & Meyer-Rochow, V. B. (2017). Nutritional composition of five commercial edible insects in South Korea. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 20(2), 686–694. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2017.04.003>
- Hannon, G. J. (2002). RNA interference. *Nature*, 418(6894), 244–251. <https://doi.org/10.1038/418244a>
- Hasan, M. A., Ahmed, S., & Kim, Y. (2019). Biosynthetic pathway of arachidonic acid in *Spodoptera exigua* in response to bacterial challenge. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 111, 103179. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2019.103179>
- Hong, J., Han, T., & Kim, Y. Y. (2020). Mealworm (*Tenebrio molitor* Larvae) as an Alternative Protein Source for Monogastric Animal: A Review. *Animals*, 10(11), 2068. <https://doi.org/10.3390/ani10112068>
- Houben, D., Daoulas, G., Faucon, M.-P., & Dulaurent, A.-M. (2020). Potential use of mealworm frass as a fertilizer: Impact on crop growth and soil properties. *Scientific Reports*, 10(1), 4659. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61765-x>
- Huvenne, H., & Smagghe, G. (2010). Mechanisms of dsRNA uptake in insects and potential of RNAi for pest control: A review. *Journal of Insect Physiology*, 56(3), 227–235. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2009.10.004>

- ISAAC, P. G., & BOWNES, M. (1982). Ovarian and Fat-Body Vitellogenin Synthesis in *Drosophila melanogaster*. *European Journal of Biochemistry*, 123(3), 527–534. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1982.tb06563.x>
- Jehan, C., Sabarly, C., Rigaud, T., & Moret, Y. (2021). Late-life reproduction in an insect: Terminal investment, reproductive restraint or senescence. *Journal of Animal Ecology*, 90(1), 282–297. <https://doi.org/10.1111/1365-2656.13367>
- Jehan, C., Sabarly, C., Rigaud, T., & Moret, Y. (2022a). Age-specific fecundity under pathogenic threat in an insect: Terminal investment versus reproductive restraint. *Journal of Animal Ecology*, 91(1), 101–111. <https://doi.org/10.1111/1365-2656.13604>
- Jehan, C., Sabarly, C., Rigaud, T., & Moret, Y. (2022b). Senescence of the immune defences and reproductive trade-offs in females of the mealworm beetle, *Tenebrio molitor*. *Scientific Reports*, 12(1), 19747. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-24334-y>
- Jindra, M., Palli, S. R., & Riddiford, L. M. (2013). The juvenile hormone signaling pathway in insect development. In *Annual Review of Entomology* (Vol. 58, pp. 181–204). <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120811-153700>
- Khan, S., Dong, Y., Nadir, S., Schaefer, D. A., Mortimer, P. E., Xu, J., Ye, L., Gui, H., Wanasinghe, D. N., Dossa, G. G. O., Yu, M., & Sheng, J. (2021). Valorizing plastic waste by insect consumption. *Circular Agricultural Systems*, 1(1), 1–9. <https://doi.org/10.48130/CAS-2021-0007>
- Kim, K., Koo, J., Yoon, J.-S., & Reddy Palli, S. (2021). Coleopteran-specific StaufenC functions like *Drosophila melanogaster* Loquacious-PD in dsRNA processing. *RNA Biology*, 18(sup1), 467–477. <https://doi.org/10.1080/15476286.2021.1960687>
- KIM, T., & MOON, M. (2003). Fine Structure of Female Accessory Reproductive Gland in the Mealworm Beetle, *Tenebrio molitor*. *Entomological Research*, 33(3), 165–172. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5967.2003.tb00066.x>
- Klowden, M. J. (2010). *Physiological Systems in Insects* (2). Academic Press.
- Konopova, B., & Jindra, M. (2007). Juvenile hormone resistance gene *Methoprene-tolerant* controls entry into metamorphosis in the beetle *Tribolium castaneum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(25), 10488–10493. <https://doi.org/10.1073/pnas.0703719104>
- Koo, J., & Palli, S. R. (2025). Recent advances in understanding of the mechanisms of RNA interference in insects. *Insect Molecular Biology*, 34(4), 491–504. <https://doi.org/10.1111/imb.12941>
- Lange, A. B. (1984). The transfer of prostaglandin-synthesizing activity during mating in *Locusta migratoria*. *Insect Biochemistry*, 14(5), 551–556. [https://doi.org/10.1016/0020-1790\(84\)90011-8](https://doi.org/10.1016/0020-1790(84)90011-8)
- Lee, H.-J., & Loher, W. (1995). Changes in the behavior of the female short-tailed cricket, *Anurogryllus muticus* (De Geer) (Orthoptera: Gryllidae) following mating. *Journal of Insect Behavior*, 8(4), 547–562. <https://doi.org/10.1007/BF01995326>
- Leyria, J. (2024). Endocrine factors modulating vitellogenesis and oogenesis in insects: An update. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 587, 112211. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2024.112211>

- Leyria, J., Fruttero, L. L., Paglione, P. A., & Canavoso, L. E. (2025a). How Insects Balance Reproductive Output and Immune Investment. *Insects*, 16(3), 311. <https://doi.org/10.3390/insects16030311>
- Leyria, J., Fruttero, L. L., Paglione, P. A., & Canavoso, L. E. (2025b). How Insects Balance Reproductive Output and Immune Investment. *Insects*, 16(3), 311. <https://doi.org/10.3390/insects16030311>
- Li, L., Zhao, Z., & Liu, H. (2013). Feasibility of feeding yellow mealworm (*Tenebrio molitor* L.) in bioregenerative life support systems as a source of animal protein for humans. *Acta Astronautica*, 92(1), 103–109. <https://doi.org/10.1016/j.actaastro.2012.03.012>
- Lisboa, H. M., Nascimento, A., Arruda, A., Sarinho, A., Lima, J., Batista, L., Dantas, M. F., & Andrade, R. (2024). Unlocking the Potential of Insect-Based Proteins: Sustainable Solutions for Global Food Security and Nutrition. In *Foods* (Vol. 13, Issue 12). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/foods13121846>
- Loher, W. (1979). The influence of Prostaglandin E2 on oviposition in *Teleogryllus commodus*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 25(1), 107–109. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.1979.tb02853.x>
- Lu, K., Chen, X., Liu, W.-T., & Zhou, Q. (2016). TOR Pathway-Mediated Juvenile Hormone Synthesis Regulates Nutrient-Dependent Female Reproduction in *Nilaparvata lugens* (Stål). *International Journal of Molecular Sciences*, 17(4), 438. <https://doi.org/10.3390/ijms17040438>
- Lynch, J. A., El-Sherif, E., & Brown, S. J. (2012). Comparisons of the embryonic development of *Drosophila*, *Nasonia*, and *Tribolium*. *WIREs Developmental Biology*, 1(1), 16–39. <https://doi.org/10.1002/wdev.3>
- Machado, E., Swevers, L., Sdralia, N., Medeiros, M. N., Mello, F. G., & Iatrou, K. (2007). Prostaglandin signaling and ovarian follicle development in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 37(8), 876–885. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2007.04.003>
- Meister, G., & Tuschl, T. (2004). Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature*, 431(7006), 343–349. <https://doi.org/10.1038/nature02873>
- Mingels, L., Wynant, N., Santos, D., Peeters, P., Gansemans, Y., Billen, J., Van Nieuwerburgh, F., & Vanden Broeck, J. (2020). Extracellular vesicles spread the RNA interference signal of *Tribolium castaneum* TcA cells. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 122, 103377. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2020.103377>
- Miura, K., Oda, M., Makita, S., & Chinzei, Y. (2005). Characterization of the *Drosophila* Methoprene-tolerant gene product. *The FEBS Journal*, 272(5), 1169–1178. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.04552.x>
- Mohamad, A., Tan, C. K., Shah, N. N. A. K., Nayan, N., Ibrahim, A., Abdi, G., & Aadil, R. M. (2025). Insect protein: A pathway to sustainable protein supply chains, challenges, and prospects. *Journal of Agriculture and Food Research*, 19, 101678. <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2025.101678>
- Mohan, K., Ganesan, A. R., Muralisankar, T., Jayakumar, R., Sathishkumar, P., Uthayakumar, V., Chandirasekar, R., & Revathi, N. (2020). Recent insights into the extraction,

- characterization, and bioactivities of chitin and chitosan from insects. *Trends in Food Science & Technology*, 105, 17–42. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.08.016>
- Morin-Crini, N., Lichtfouse, E., Torri, G., & Crini, G. (2019). Applications of chitosan in food, pharmaceuticals, medicine, cosmetics, agriculture, textiles, pulp and paper, biotechnology, and environmental chemistry. *Environmental Chemistry Letters*, 17(4), 1667–1692. <https://doi.org/10.1007/s10311-019-00904-x>
- Moruzzo, R., Riccioli, F., Espinosa Diaz, S., Secci, C., Poli, G., & Mancini, S. (2021a). Mealworm (*Tenebrio molitor*): Potential and Challenges to Promote Circular Economy. *Animals*, 11(9), 2568. <https://doi.org/10.3390/ani11092568>
- Moruzzo, R., Riccioli, F., Espinosa Diaz, S., Secci, C., Poli, G., & Mancini, S. (2021b). Mealworm (*Tenebrio molitor*): Potential and challenges to promote circular economy. In *Animals* (Vol. 11, Issue 9). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ani11092568>
- Muñoz-Seijas, N., Fernandes, H., López-Periago, J. E., Outeiriño, D., Morán-Aguilar, M. G., Domínguez, J. M., & Salgado, J. M. (2024). Characterization of all life stages of *Tenebrio molitor*: Envisioning innovative applications for this edible insect. *Future Foods*, 10. <https://doi.org/10.1016/j.fufo.2024.100404>
- Nandety, R. S., Kuo, Y.-W., Nouri, S., & Falk, B. W. (2015). Emerging strategies for RNA interference (RNAi) applications in insects. *Bioengineered*, 6(1), 8–19. <https://doi.org/10.4161/21655979.2014.979701>
- Ong, S. Y., Zainab-L, I., Pyary, S., & Sudesh, K. (2018). A novel biological recovery approach for PHA employing selective digestion of bacterial biomass in animals. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(5), 2117–2127. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8788-9>
- Orville Singh, C., Xin, H., Chen, R., Wang, M., Liang, S., Lu, Y., Cai, Z., & Miao, Y. (2016). Bm PLA2 containing conserved domain WD40 affects the metabolic functions of fat body tissue in silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Science*, 23(1), 28–36. <https://doi.org/10.1111/1744-7917.12189>
- Panagiotakopulu, Eva. (2000). *Archaeology and entomology in the Eastern Mediterranean : research into the history of insect synanthropy in Greece and Egypt*. J. and E. Hedges : Distributed by Hadrian Books.
- Park, J., Stanley, D., & Kim, Y. (2014a). Roles of Peroxinectin in PGE2-Mediated Cellular Immunity in *Spodoptera exigua*. *PLoS ONE*, 9(9), e105717. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105717>
- Park, J., Stanley, D., & Kim, Y. (2014b). Roles of Peroxinectin in PGE2-Mediated Cellular Immunity in *Spodoptera exigua*. *PLoS ONE*, 9(9), e105717. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105717>
- Parthasarathy, R., & Palli, S. R. (2011). Molecular analysis of nutritional and hormonal regulation of female reproduction in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 41(5), 294–305. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2011.01.006>
- Parthasarathy, R., Sun, Z., Bai, H., & Palli, S. R. (2010). Juvenile hormone regulation of vitellogenin synthesis in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 40(5), 405–414. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2010.03.006>

- Peng, B.-Y., Su, Y., Chen, Z., Chen, J., Zhou, X., Benbow, M. E., Criddle, C. S., Wu, W.-M., & Zhang, Y. (2019). Biodegradation of Polystyrene by Dark (*Tenebrio obscurus*) and Yellow (*Tenebrio molitor*) Mealworms (Coleoptera: Tenebrionidae). *Environmental Science & Technology*, 53(9), 5256–5265. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b06963>
- Philip, B. N., & Tomoyasu, Y. (2012). *Gene Knockdown Analysis by Double-Stranded RNA Injection* (pp. 471–497). https://doi.org/10.1007/978-1-61779-228-1_28
- Poveda, J., Jiménez-Gómez, A., Saati-Santamaría, Z., Usategui-Martín, R., Rivas, R., & García-Fraile, P. (2019). Mealworm frass as a potential biofertilizer and abiotic stress tolerance-inductor in plants. *Applied Soil Ecology*, 142, 110–122. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2019.04.016>
- Raikhel, A. S., & Dhadialla, T. S. (1992). Accumulation of Yolk Proteins in Insect Oocytes. *Annual Review of Entomology*, 37(1), 217–251. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.37.010192.001245>
- Ramos-Elorduy, J., González, E. A., Hernández, A. R., & Pino, J. M. (2002). Use of *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) to Recycle Organic Wastes and as Feed for Broiler Chickens. *Journal of Economic Entomology*, 95(1), 214–220. <https://doi.org/10.1603/0022-0493-95.1.214>
- Rana, R. L., Hoback, W. W., Rahim, N. A. A., Bedick, J., & Stanley, D. W. (1997). Pre-Oral Digestion: A Phospholipase A2 Associated with Oral Secretions in Adult Burying Beetles, *Nicrophorus marginatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 118(2), 375–380. [https://doi.org/10.1016/S0305-0491\(97\)00105-3](https://doi.org/10.1016/S0305-0491(97)00105-3)
- Rocha, I., Roza, A., Gonçalves, C., & Dumas, L. (2022). Insect Life History. In *Encyclopedia of Animal Cognition and Behavior* (pp. 3479–3490). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-55065-7_1127
- Roczniki Państwowego Zakładu Higieny. (2020). Attitude toward food in aspect of risks and benefits related to the consumption of edible insects by Polish consumers. *Roczniki Państwowego Zakładu Higieny*. <https://doi.org/10.32394/rpzh.2020.0107>
- Roncolini, A., Milanović, V., Cardinali, F., Osimani, A., Garofalo, C., Sabbatini, R., Clementi, F., Pasquini, M., Mozzon, M., Foligni, R., Raffaelli, N., Zamporini, F., Minazzato, G., Trombetta, M. F., Van Buitenen, A., Van Campenhout, L., & Aquilanti, L. (2019). Protein fortification with mealworm (*Tenebrio molitor* L.) powder: Effect on textural, microbiological, nutritional and sensory features of bread. *PLOS ONE*, 14(2), e0211747. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0211747>
- Roy, S., Saha, T. T., Zou, Z., & Raikhel, A. S. (2025). *Juvenile hormone coordinately regulates trehalose and methionine levels by activating trehalase 1 in insect ovarian development*. 17(13). <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-020117>
- Sajjadian, S. M., Ahmed, S., Al Baki, Md. A., & Kim, Y. (2020). Prostaglandin D2 synthase and its functional association with immune and reproductive processes in a lepidopteran insect, *Spodoptera exigua*. *General and Comparative Endocrinology*, 287, 113352. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2019.113352>
- Santos, C. G., Humann, F. C., & Hartfelder, K. (2019). Juvenile hormone signaling in insect oogenesis. *Current Opinion in Insect Science*, 31, 43–48. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2018.07.010>

- Schaloske, R. H., & Dennis, E. A. (2006). The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1761(11), 1246–1259. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2006.07.011>
- Schwenke, R. A., Lazzaro, B. P., & Wolfner, M. F. (2016). Reproduction–Immunity Trade-Offs in Insects. *Annual Review of Entomology*, 61(1), 239–256. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-010715-023924>
- Segers, A., Carpentier, J., Francis, F., & Caparros Megido, R. (2023). Gene Silencing of laccase 1 Induced by Double-Stranded RNA in *Callosobruchus maculatus* (Fabricius 1775) (Coleoptera: Chrysomelidae) Suggests RNAi as a Potential New Biotechnological Tool for Bruchid's Control. *Agriculture*, 13(2), 412. <https://doi.org/10.3390/agriculture13020412>
- Shih, J. D., & Hunter, C. P. (2011). SID-1 is a dsRNA-selective dsRNA-gated channel. *RNA*, 17(6), 1057–1065. <https://doi.org/10.1261/rna.2596511>
- Shrestha, S., & Kim, Y. (2008). Eicosanoids mediate prophenoloxidase release from oenocytoids in the beet armyworm *Spodoptera exigua*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 38(1), 99–112. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2007.09.013>
- Shrestha, S., Park, Y., Stanley, D., & Kim, Y. (2010). Genes encoding phospholipases A2 mediate insect nodulation reactions to bacterial challenge. *Journal of Insect Physiology*, 56(3), 324–332. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2009.11.008>
- Shrestha, S., Stanley, D., & Kim, Y. (2011). PGE2 induces oenocytoid cell lysis via a G protein-coupled receptor in the beet armyworm, *Spodoptera exigua*. *Journal of Insect Physiology*, 57(11), 1568–1576. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2011.08.010>
- Siemianowska, E., Kosewska, A., Aljewicz, M., Skibniewska, K. A., Polak-Juszczak, L., Jarocki, A., & Jędras, M. (2013). Larvae of mealworm (<i>Tenebrio molitor<i>) as European novel food. *Agricultural Sciences*, 04(06), 287–291. <https://doi.org/10.4236/as.2013.46041>
- Siomi, M. C., Sato, K., Pezic, D., & Aravin, A. A. (2011). PIWI-interacting small RNAs: the vanguard of genome defence. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 12(4), 246–258. <https://doi.org/10.1038/nrm3089>
- Smykal, V., & Raikhel, A. S. (2015). Nutritional control of insect reproduction. *Current Opinion in Insect Science*, 11, 31–38. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2015.08.003>
- Son, Y.-J., Hwang, I.-K., Nho, C. W., Kim, S. M., & Kim, S. H. (2021). Determination of Carbohydrate Composition in Mealworm (*Tenebrio molitor* L.) Larvae and Characterization of Mealworm Chitin and Chitosan. *Foods*, 10(3), 640. <https://doi.org/10.3390/foods10030640>
- Spracklen, A. J., Kelpsch, D. J., Chen, X., Spracklen, C. N., & Tootle, T. L. (2014). Prostaglandins temporally regulate cytoplasmic actin bundle formation during *Drosophila* oogenesis. *Molecular Biology of the Cell*, 25(3), 397–411. <https://doi.org/10.1091/mbc.e13-07-0366>
- Stanley, D. (2006). PROSTAGLANDINS AND OTHER EICOSANOIDS IN INSECTS: Biological Significance. *Annual Review of Entomology*, 51(1), 25–44. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.51.110104.151021>

- Stanley, D., & Kim, Y. (2019a). Prostaglandins and Other Eicosanoids in Insects: Biosynthesis and Biological Actions. *Frontiers in Physiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01927>
- Stanley, D., & Kim, Y. (2019b). Prostaglandins and Other Eicosanoids in Insects: Biosynthesis and Biological Actions. *Frontiers in Physiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01927>
- Stork, N. E., McBroom, J., Gely, C., & Hamilton, A. J. (2015). New approaches narrow global species estimates for beetles, insects, and terrestrial arthropods. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(24), 7519–7523. <https://doi.org/10.1073/pnas.1502408112>
- Tai, H.-H., Ensor, C. M., Tong, M., Zhou, H., & Yan, F. (2002). Prostaglandin catabolizing enzymes. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 68–69, 483–493. [https://doi.org/10.1016/S0090-6980\(02\)00050-3](https://doi.org/10.1016/S0090-6980(02)00050-3)
- Tomoyasu, Y., Miller, S. C., Tomita, S., Schoppmeier, M., Grossmann, D., & Bucher, G. (2008). Exploring systemic RNA interference in insects: a genome-wide survey for RNAi genes in *Tribolium*. *Genome Biology*, 9(1), R10. <https://doi.org/10.1186/gb-2008-9-1-r10>
- Tootle, T. L., & Spradling, A. C. (2008a). *Drosophila* Pxt: a cyclooxygenase-like facilitator of follicle maturation. *Development*, 135(5), 839–847. <https://doi.org/10.1242/dev.017590>
- Tootle, T. L., & Spradling, A. C. (2008b). *Drosophila* Pxt: a cyclooxygenase-like facilitator of follicle maturation. *Development*, 135(5), 839–847. <https://doi.org/10.1242/dev.017590>
- Tootle, T. L., Williams, D., Hubb, A., Frederick, R., & Spradling, A. (2011). *Drosophila* Eggshell Production: Identification of New Genes and Coordination by Pxt. *PLoS ONE*, 6(5), e19943. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019943>
- Turck, D., Castenmiller, J., De Henauw, S., Hirsch-Ernst, K. I., Kearney, J., Maciuk, A., Mangelsdorf, I., McArdle, H. J., Naska, A., Pelaez, C., Pentieva, K., Siani, A., Thies, F., Tsabouri, S., Vinceti, M., Cubadda, F., Frenzel, T., Heinonen, M., Marchelli, R., ... Knutsen, H. K. (2021). Safety of dried yellow mealworm (*Tenebrio molitor* larva) as a novel food pursuant to Regulation (EU) 2015/2283. *EFSA Journal*, 19(1). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6343>
- Urbanek, A. K., Rybak, J., Wróbel, M., Leluk, K., & Mirończuk, A. M. (2020). A comprehensive assessment of microbiome diversity in *Tenebrio molitor* fed with polystyrene waste. *Environmental Pollution*, 262, 114281. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114281>
- Uscian, J. M., Miller, J. S., Sarath, G., & Stanley-Samuelson, D. W. (1995). A digestive phospholipase A2 in the tiger beetle *Cicindella circumpicta*. *Journal of Insect Physiology*, 41(2), 135–141. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(94\)00094-W](https://doi.org/10.1016/0022-1910(94)00094-W)
- van Broekhoven, S., Oonincx, D. G. A. B., van Huis, A., & van Loon, J. J. A. (2015). Growth performance and feed conversion efficiency of three edible mealworm species (Coleoptera: Tenebrionidae) on diets composed of organic by-products. *Journal of Insect Physiology*, 73, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2014.12.005>

- van Huis, A. (2013). Potential of Insects as Food and Feed in Assuring Food Security. *Annual Review of Entomology*, 58(1), 563–583. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120811-153704>
- Varvas, K., Kurg, R., Hansen, K., Järving, R., Järving, I., Valmsen, K., Löhelaid, H., & Samel, N. (2009). Direct evidence of the cyclooxygenase pathway of prostaglandin synthesis in arthropods: Genetic and biochemical characterization of two crustacean cyclooxygenases. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 39(12), 851–860. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2009.10.002>
- Wheatley, S., Kulkarni, S., & Karess, R. (1995). Drosophila nonmuscle myosin II is required for rapid cytoplasmic transport during oogenesis and for axial nuclear migration in early embryos. *Development*, 121(6), 1937–1946. <https://doi.org/10.1242/dev.121.6.1937>
- Wilson, T. G., & Ashok, M. (1998). Insecticide resistance resulting from an absence of target-site gene product. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(24), 14040–14044. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.24.14040>
- Wu, Q., Tao, H., & Wong, M. H. (2019a). Feeding and metabolism effects of three common microplastics on *Tenebrio molitor* L. *Environmental Geochemistry and Health*, 41(1), 17–26. <https://doi.org/10.1007/s10653-018-0161-5>
- Wu, Q., Tao, H., & Wong, M. H. (2019b). Feeding and metabolism effects of three common microplastics on *Tenebrio molitor* L. *Environmental Geochemistry and Health*, 41(1), 17–26. <https://doi.org/10.1007/s10653-018-0161-5>
- Wu, Z., Yang, L., He, Q., & Zhou, S. (2021a). Regulatory Mechanisms of Vitellogenesis in Insects. In *Frontiers in Cell and Developmental Biology* (Vol. 8). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.593613>
- Wu, Z., Yang, L., He, Q., & Zhou, S. (2021b). Regulatory Mechanisms of Vitellogenesis in Insects. In *Frontiers in Cell and Developmental Biology* (Vol. 8). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.593613>
- Xiao, D., Gao, X., Xu, J., Liang, X., Li, Q., Yao, J., & Zhu, K. Y. (2015). Clathrin-dependent endocytosis plays a predominant role in cellular uptake of double-stranded RNA in the red flour beetle. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 60, 68–77. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2015.03.009>
- Xu, J., Tan, A., & Palli, S. R. (2010). The function of nuclear receptors in regulation of female reproduction and embryogenesis in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Journal of Insect Physiology*, 56(10), 1471–1480. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2010.04.004>
- Yang, S.-S., Chen, Y., Kang, J.-H., Xie, T.-R., He, L., Xing, D.-F., Ren, N.-Q., Ho, S.-H., & Wu, W.-M. (2019). Generation of high-efficient biochar for dye adsorption using frass of yellow mealworms (larvae of *Tenebrio molitor* Linnaeus) fed with wheat straw for insect biomass production. *Journal of Cleaner Production*, 227, 33–47. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.04.005>
- Yang, Y., Yang, J., Wu, W.-M., Zhao, J., Song, Y., Gao, L., Yang, R., & Jiang, L. (2015). Biodegradation and Mineralization of Polystyrene by Plastic-Eating Mealworms: Part 1. Chemical and Physical Characterization and Isotopic Tests. *Environmental Science & Technology*, 49(20), 12080–12086. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b02661>

- Yin, C.-F., Xu, Y., & Zhou, N.-Y. (2020). Biodegradation of polyethylene mulching films by a co-culture of *Acinetobacter* sp. strain NyZ450 and *Bacillus* sp. strain NyZ451 isolated from *Tenebrio molitor* larvae. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 155, 105089. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2020.105089>
- Yoon, J.-S., Kim, K., & Palli, S. R. (2020). Double-stranded RNA in exosomes: Potential systemic RNA interference pathway in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 23(4), 1160–1164. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2020.09.012>
- Zhang, Z., Xu, J., Sheng, Z., Sui, Y., & Palli, S. R. (2011). Steroid Receptor Co-activator Is Required for Juvenile Hormone Signal Transduction through a bHLH-PAS Transcription Factor, Methoprene Tolerant. *Journal of Biological Chemistry*, 286(10), 8437–8447. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.191684>