



**Ανώτατο Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Κρήτης
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΘΕΡΜΟΚΗΠΙΑΚΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΚΑΙ
ΑΝΘΟΚΟΜΙΑΣ**

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

« Έλεγχος τριών νέων στελεχών του βακτηρίου Wolbachia με σκοπό την πιθανή χρήση τους στην καταπολέμηση βλαβερών εντόμων στη γεωργία. »



**ΚΑΡΑΤΖΗΣ ΣΤΕΦΑΝΟΣ
ΧΑΛΚΙΑΔΑΚΗ ΕΛΕΝΗ**

**Εισηγήτρια
ΖΑΜΠΑΛΟΥ ΣΟΦΙΑ**

Ηράκλειο, Ιούλιος 2005

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Κατ' αρχήν θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε την Εισηγήτρια Καθηγήτριά μας κα. Ζαμπάλου Σοφία για την ανάθεση της πτυχιακής εργασίας καθώς και για την καθοδήγησή της για την συγγραφή της, χωρίς την οποία δεν θα είχε πραγματοποιηθεί η εργασία αυτή. Επίσης, μας έμαθε να δουλεύουμε σε εργαστηριακό χώρο και με αντικείμενα που είχαν σχέση με την Μοριακή Γενετική και την Γενετική Μηχανική.

Ιδιαίτερώς θέλουμε να ευχαριστήσουμε τον κ. Χ. Σαββάκη, Καθηγητή Μοριακής Γενετικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης, για τις συμβουλές του κατά τη διάρκεια της πτυχιακής μας εργασίας, καθώς και για το ότι μας παρείχε απεριόριστη πρόσβαση στο χώρο του Εργαστηρίου Μοριακής Γενετικής Εντόμων του Ι.Τ.Ε., όπου και πραγματοποιήθηκε η εργασία αυτή.

Ακόμα, ένα μεγάλο ευχαριστώ στον κ. Κ. Μπούρτζη, Επίκουρο Καθηγητή του Τμήματος Διαχείρισης Περιβάλλοντος και Φυσικών Πόρων του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, για τις επιστημονικές συμβουλές του κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της πτυχιακής εργασίας.

Τέλος, δεν πρέπει να παραλείψουμε να ευχαριστήσουμε τους ανθρώπους του εργαστηρίου, τον Σάββα, τη Νίκη, τον Γιώργο και τον Jacques, που μας βοήθησαν να μάθουμε αρκετά πράγματα όλο αυτό τον καιρό που βρισκόμασταν εκεί.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	3
1.1 Γενικά.....	3
1.2 Μορφολογική περιγραφή.....	4
1.3 Επιπτώσεις της Wolbachia στους ξενιστές.....	5
1.4 Παράγοντες που επηρεάζουν την έκφραση του CI.....	8
1.5 Μηχανισμοί δράσης.....	9
1.6 Σκοπός της μελέτης του βακτηρίου Wolbachia.....	12
2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	16
2.1 Στελέχη εντόμων.....	16
2.2 Έλεγχος του επιπέδου μόλυνσης των εντόμων.....	17
2.3 Απομόνωση DNA από τα έντομα, αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης και ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.....	17
2.4 Μέτρηση της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας (CI).....	20
3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	21
3.1 Έλεγχος του επιπέδου μόλυνσης των εντόμων.....	21
3.2 Έλεγχος επαγωγής κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας.....	24
3.3 Έλεγχος διάσωσης της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας που προκαλεί το στέλεχος wNo.....	29
3.4 Έλεγχος διάσωσης της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας που προκαλεί το στέλεχος wCoffs.....	33
4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ	37
5 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	41

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Γενικά

Τα βακτήρια του γένους *Wolbachia* είναι υποχρεωτικά ενδοκυττάρια, μητρικά κληρονομούμενα βακτήρια, τα οποία μολύνουν ένα πλήθος ξενιστών όπως έντομα, ακάρεα, καρκινοειδή, αράχνες και νηματώδεις. Ανήκουν στην α-υποομάδα των πρωτεοβακτηρίων, στην οικογένεια *Rickettsiaceae*. Προκαλούν μία σειρά αναπαραγωγικών ανωμαλιών στους ξενιστές τους, όπως παρθενογένεση, θηλυκοποίηση, θανάτωση αρσενικών και κυτταροπλασματική ασυμβατότητα (cytoplasmic incompatibility, **CI**) (Bourtzis and Miller 2003).

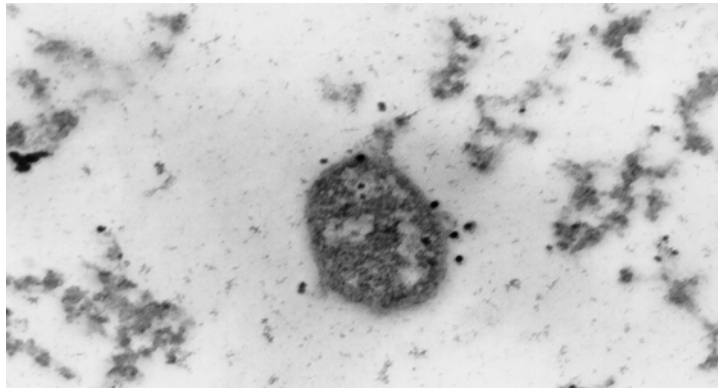
Τα τελευταία χρόνια το ενδιαφέρον των ερευνητών για αυτά έχει αυξηθεί μια και η *Wolbachia* είναι: i) ίσως το πιο κοινό μολυσματικό παράσιτο στη γη, ii) εκμεταλλεύεται τη σεξουαλική ζωή των ξενιστών της για δικό της όφελος, iii) μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως όπλο για την καταπολέμηση παρασίτων που βλάπτουν τη γεωργία και την υγεία (Knight 2001, Zimmer 2001).

Τα βακτήρια *Wolbachia* πρωτοαναφέρθηκαν στη βιβλιογραφία το 1924, από τους Hertig και Wolbach, ως βακτήρια που μοιάζουν με ρικέτσιες (*Rickettsiaceae*) στις ωθήκες του κουνουπιού *Culex pipiens*. Το είδος ονομάστηκε επίσημα *Wolbachia pipientis* το 1936 (Hertig 1936). Στη δεκαετία του 1950, οι Laven (1951) και Ghelelovitch (1952) ανακάλυψαν ότι ορισμένες διασταυρώσεις μεταξύ κουνουπιών *Culex pipiens* ήταν ασύμβατες, δηλαδή δεν άφηναν απογόνους. Ο Laven (1959) παρατήρησε ότι ο παράγοντας ασυμβατότητας κληρονομούνταν κυτταροπλασματικά, δηλαδή μέσω της μητέρας και ονόμασε αυτό το φαινόμενο κυτταροπλασματική ασυμβατότητα (CI). Οι δύο αυτές ανακαλύψεις δε συνδέθηκαν παρά μόνο τη δεκαετία του 1970, όταν οι Yen και Barr (1971) έδειξαν ότι η κυτταροπλασματική ασυμβατότητα σχετιζόταν με βακτήρια του γένους των ρικετσιών, αφού με παροχή αντιβιοτικών, εξαφανίζονταν τόσο τα βακτήρια, όσο και το φαινόμενο της ασυμβατότητας. Πιο συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι μολυσμένα αρσενικά ήταν ασύμβατα με θηλυκά, στα οποία είχαν χορηγηθεί αντιβιοτικά, ενώ η αντίστροφη διασταύρωση ήταν συμβατή. Τα επόμενα 25 χρόνια το φαινόμενο παρατηρήθηκε σε πληθώρα εντόμων, όπως σκαθάρια, σφήκες, ακρίδες, κουνούπια, μύγες κλπ., ως μείωση του αριθμού των απογόνων σε συγκεκριμένες διασταυρώσεις. Η σχέση των βακτηρίων με το φαινόμενο, υπονοούνταν άλλοτε μικροσκοπικά και άλλοτε με αντιβιοτικά ή θερμική θεραπεία. Παρόλα αυτά, η φυλογενετική σχέση των βακτηρίων, τα οποία βρίσκονταν στους αναπαραγωγικούς ιστούς των διαφόρων εντόμων, παρέμενε άγνωστη μέχρι τις αρχές της δεκαετίας του 1990.

Με τη χρήση μοριακών μεθόδων αναγνωρίστηκαν και επίσημα αυτοί οι μικροοργανισμοί. Κλωνοποιώντας γονίδια όπως το 16S rDNA, δείχθηκε ότι τα βακτήρια, τα οποία προκαλούσαν την κυτταροπλασματική ασυμβατότητα σχημάτιζαν μία μονοφυλετική ομάδα, τη *Wolbachia*.

1.2 Μορφολογική περιγραφή

Τα γενικά χαρακτηριστικά τους είναι αυτά των *Rickettsiaceae*. Είναι διμορφικά και φτιάχνουν μικρούς ραβδοειδείς (0.5-1.3 μm σε μήκος) και κοκκοειδείς (0.25-0.5 μm σε διάμετρο) σχηματισμούς. Η *Wolbachia* βρίσκεται μέσα σε κυστίδια που περιβάλλονται από τρεις μεμβράνες. Η εξωτερική μεμβράνη προέρχεται από το κύτταρο του ξενιστή, η ενδιάμεση είναι το βακτηριακό κυτταρικό τοίχωμα και τέλος η εσωτερική είναι η μεμβράνη του βακτηρίου (Louis and Nigro 1989) (Εικ. 1.1). Η *Wolbachia* εντοπίζεται κυρίως σε αναπαραγωγικούς ιστούς, όπως στις ωθήκες και στους όρχεις, αλλά και αλλού όπως στον εγκέφαλο, σιελογόνους αδένες, μυς, αιμολέμφο, φτερά, μαλπιγιανά σωληνάκια, έντερο και λιπαρό σώμα.



ΕΙΚΟΝΑ 1.1 Το βακτήριο μέσα σε αυγό *Drosophila* (άνοσο-ιστοχημεία χρυσού με αντί-WSP αντίσωμα, φωτογραφία από Δρ. Βασίλη Γαλανόπουλο).

1.3 Επιπτώσεις της *Wolbachia* στους ξενιστές

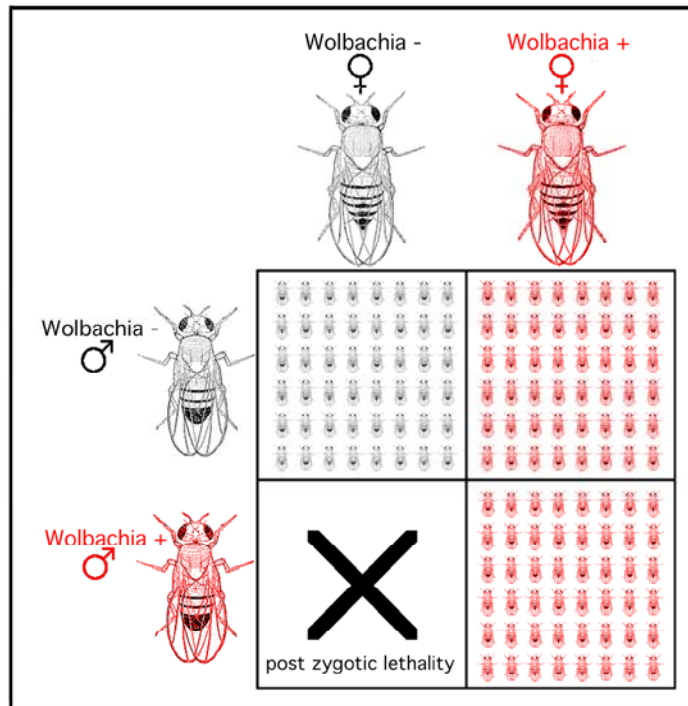
Τα βακτήρια του γένους *Wolbachia* προκαλούν πολλές ανωμαλίες στην αναπαραγωγή των ξενιστών τους όπως παρθενογένεση (Stouthamer *et al.* 1993), θηλυκοποίηση (Bouchon *et al.* 1998), θανάτωση αρσενικών (Hurst *et al.* 1996) και κυτταροπλασματική ασυμβατότητα (Charlat *et al.* 2002, Bourtzis *et al.* 2003).

Α) Η *Wolbachia* προκαλεί **παρθενογένεση** σε διάφορα είδη υμενοπτέρων, σε ένα γένος φυτοφάγων ακάρεων και σε ένα είδος θυσανόπτερων. Τα είδη αυτά έχουν ένα ιδιαίτερο σύστημα φυλοκαθορισμού (αρρενοτοκία), κατά το οποίο τα αρσενικά προέρχονται από απλοειδή αυγά (μη γονιμοποιημένα), ενώ τα θηλυκά από διπλοειδή (γονιμοποιημένα). Είναι αυτονόητο ότι αυτή η τροποποίηση ευνοεί την κάθετη μετάδοση του βακτηρίου, μια και αυτό μεταδίδεται μόνο από τα θηλυκά, ενώ τα αρσενικά αποτελούν αδιέξοδο για αυτό.

Β) Η *Wolbachia* προκαλεί **θηλυκοποίηση** σε διάφορα είδη χερσαίων ισόποδων (καρκινοειδή) και σε ένα είδος λεπιδοπτέρου. Τα ισόποδα αναπτύσσονται σε θηλυκά εκτός και αν ο ανδρογενετικός αδένας εκφράσει μία ορμόνη, η οποία επάγει αρσενική διαφοροποίηση. Τα βακτήρια στα είδη αυτά εμποδίζουν την ανάπτυξη του αδένα, με αποτέλεσμα άτομα γενετικά καθορισμένα ως αρσενικά να συμπεριφέρονται ως θηλυκά, ευνοώντας την μετάδοση των βακτηρίων, όπως και παραπάνω.

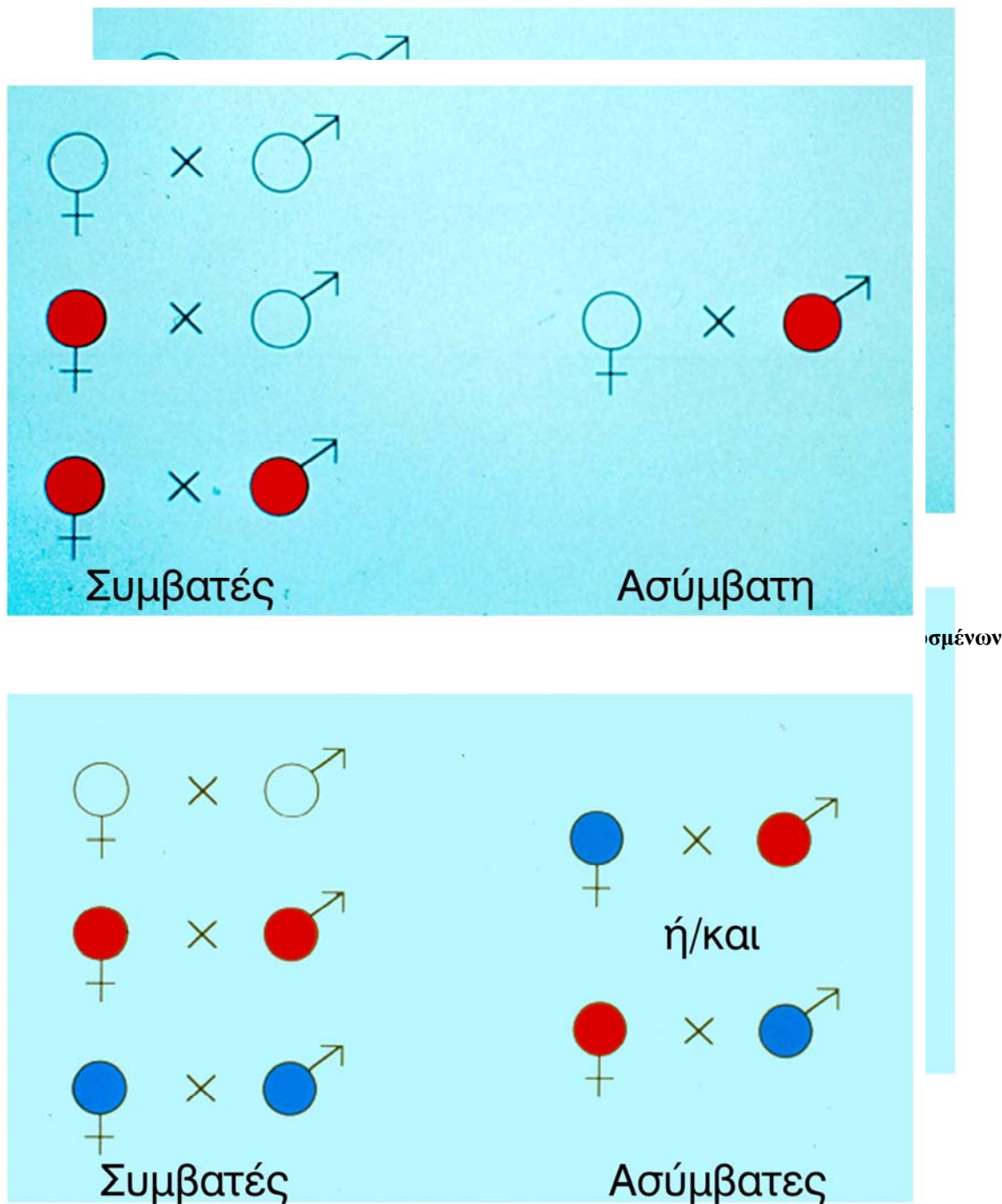
Γ) Η *Wolbachia* προκαλεί **θάνατο αρσενικών** εμβρύων σε λεπιδοπτέρα, κολεόπτρα και σε ένα είδος *Drosophila*. Το βακτήριο στα έντομα αυτά σκοτώνει τα αρσενικά έμβρυα, με άγνωστο μέχρι στιγμής τρόπο.

Δ) Η *Wolbachia* προκαλεί **κυτταροπλασματική ασυμβατότητα (CI)** σε μια πληθώρα εντόμων, σε μερικά ισόποδα και ακάρεα. Η CI είναι μία μορφή εμβρυϊκής θνησιμότητας σε διασταυρώσεις μεταξύ μολυσμένων αρσενικών με μη μολυσμένα θηλυκά (Εικ. 1.2).



ΕΙΚΟΝΑ 1.2 Κυτταροπλασματική ασυμβατότητα. Από τους τέσσερις πιθανούς συνδυασμούς διασταυρώσεων μεταξύ μολυσμένων μυγών με *Wolbachia* (κόκκινες) και μη μολυσμένων (μαύρες), ο ένας (μολυσμένη αρσενική X μη μολυσμένη θηλυκή), έχει ως αποτέλεσμα τη χαμηλή ή τη μη βιωσιμότητα των απογόνων. Συνέπεια αυτού, είναι η ραγδαία αύξηση της συχνότητας των μολυσμένων ατόμων, όταν αυτά εισβάλλουν σε ένα μη μολυσμένο πληθυσμό.

Η πιο απλή μορφή του CI είναι μονόδρομη (Εικ. 1.3). Οι διασταυρώσεις ανάμεσα σε μη μολυσμένα θηλυκά και μολυσμένα αρσενικά είναι ασύμβατες, ενώ οι διασταυρώσεις ανάμεσα σε μολυσμένα θηλυκά και μη μολυσμένα αρσενικά είναι συμβατές. Συμβατές είναι επίσης και οι διασταυρώσεις μεταξύ μολυσμένων ατόμων. Μια πιο πολύπλοκη έκφραση του φαινοτύπου είναι η αμφίδρομη ασυμβατότητα (Εικ. 1.4). Η αμφίδρομη ασυμβατότητα προκύπτει, τις περισσότερες φορές, σε διασταυρώσεις ανάμεσα σε άτομα που είναι μολυσμένα με διαφορετικά στελέχη *Wolbachia* τα οποία είναι αμοιβαίως ασύμβατα. Αμφίδρομη κυτταροπλασματική ασυμβατότητα έχει αναφερθεί για διάφορα είδη κουνουπιών, για τη *D. simulans* (O'Neill and Karr 1990) και κάποια είδη από το γένος *Nasonia* (Breeuwer and Werren 1990). Συγκεκριμένα στα έντομα εκτός από τα δίπτερα έχει περιγραφεί σε κολεόπτερα, υμενόπτερα, ομόπτερα, ισόπτερα, λεπιδόπτερα, ορθόπτερα και ίσως αποτελεί τον πιο κοινό φαινότυπο που επάγεται από τη *Wolbachia*.



ΕΙΚΟΝΑ 1.4 Αμφίδρομη κυτταροπλασματική ασυμβατότητα μεταξύ μολυσμένων με διαφορετικό βακτηριακό στέλεχος εντόμων. Το κάθε χρώμα αντιστοιχεί σε διαφορετικό είδος *Wolbachia*.

1.4 Παράγοντες που επηρεάζουν την έκφραση του CI

Μια πληθώρα παραγόντων φαίνεται να επηρεάζουν την έκφραση του φαινοτύπου της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας. Καταρχήν υπάρχουν αρκετοί περιβαλλοντικοί παράγοντες που επηρεάζουν την έκφραση του φαινοτύπου. Η έκθεση των ζενιστών σε υψηλές θερμοκρασίες, η έκθεσή τους σε αντιβιοτικά, η «φτωχή» διατροφή τους και ο υπερπληθυσμός των προνυμφών ελαττώνουν σημαντικά τα επίπεδα του CI. Έχει δείχθει ότι η ηλικία των αρσενικών γονέων μιας διασταύρωσης επηρεάζει τα επίπεδα του CI. Πιο ηλικιωμένα αρσενικά άτομα επάγουν χαμηλότερα επίπεδα ασυμβατότητας, σε σχέση με νεότερα αρσενικά (Bressac and Rousset 1993). Επίσης φαίνεται ότι οι πολλαπλές συζεύξεις των αρσενικών οδηγούν σε ελάττωση των επιπέδων. Με άλλα λόγια όσο περισσότερες φορές διασταυρώνεται το αρσενικό τόσο μικρότερα επίπεδα ασυμβατότητας επάγει (Karr *et al.* 1998).

1.5 Μηχανισμοί δράσης

Το μοντέλο που παρέχει ένα γενικό πλαίσιο για τη διερεύνηση της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας είναι αυτό της τροποποίησης /διάσωσης (**mod/resc**: modification, rescue), το οποίο υποθέτει δύο βακτηριακές λειτουργίες: i) τη λειτουργία mod, το «δηλητήριο», το οποίο εκφράζεται κατά τη διάρκεια της σπερματογένεσης και ii) τη λειτουργία resc, το «αντίδοτο», το οποίο εκφράζεται στο αυγό. Δηλαδή αν το σπέρμα έχει επηρεαστεί από το «δηλητήριο» ενός βακτηριακού στελέχους, το αντίστοιχο βακτηριακό «αντίδοτο» πρέπει να εκφραστεί στο αυγό, για να προχωρήσει κανονικά η ανάπτυξη. Παρόλο, που ο μοριακός μηχανισμός παραμένει άγνωστος, οι λειτουργίες αυτές έχουν αρχίσει να χαρακτηρίζονται από διάφορες ιδιότητες (Werren *et al.* 1995). Αναλυτικότερα, η ένταση της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας ποικίλει και πιο συγκεκριμένα το ποσοστό των αυγών που δεν εκκολάπτονται από μία ασύμβατη διασταύρωση κυμαίνεται από 0 - 100% (επίπεδα CI). Κατ' επέκταση το μόριο ή τα μόρια, που εμπλέκονται σε αυτή ποικίλουν είτε ποσοτικά είτε ποιοτικά. Σε μερικές περιπτώσεις οι διακυμάνσεις αυτές οφείλονται σε ιδιότητες του βακτηρίου (Giordano *et al.* 1995, Hoffmann *et al.* 1996). Από την άλλη πλευρά οι Boyle *et al.* (1993) και Poinsot *et al.* (1998) έδειξαν τη σημαντική συμβολή του ξενιστή στη ρύθμιση των επιπέδων, με πειράματα διαμόλυνσης στελεχών *Wolbachia* από *D. simulans* (υψηλά επίπεδα) σε *D. melanogaster* (χαμηλά επίπεδα) και το αντίθετο.

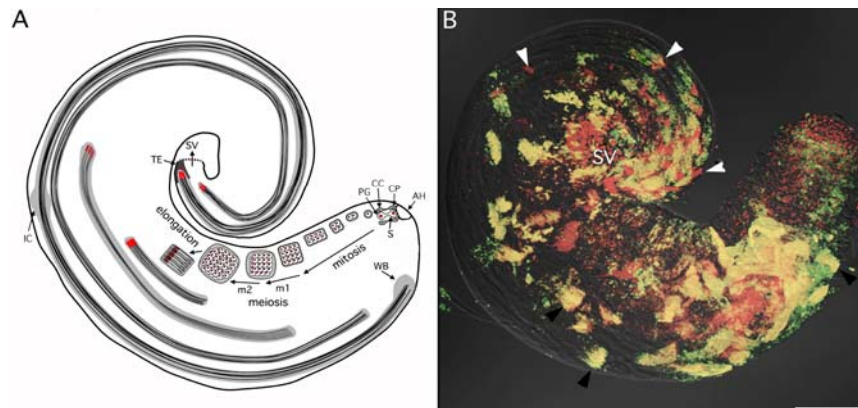
Ο παραπάνω μηχανισμός περιγράφηκε από τον Werren (1997) σε γενετική βάση. Τα βακτήρια που επάγουν CI χαρακτηρίζονται ως $mod^+ resc^+$, υποδηλώνοντας έτσι τις ιδιότητες να εκφράζουν τον παράγοντα που τροποποιεί το σπέρμα (*mod*), αλλά και εκείνον που σώζει την τροποποίηση αυτή όταν βρίσκεται και στο αυγό (*resc*). Τα βακτήρια που δεν επάγουν ασυμβατότητα χαρακτηρίζονται ως $mod^- resc^-$. Ένα τρίτο «είδος» βακτηρίων, που υπήρχαν υποψίες ότι υπάρχει, βρέθηκε στη *Drosophila*. Τα βακτήρια αυτά, που χαρακτηρίζονται $mod^- resc^+$, φαίνεται να έχουν χάσει την ικανότητα να επάγουν CI, αλλά έχουν την ικανότητα να σώζουν τον φαινότυπο που επάγεται από κοντινά στελέχη (Bourtzis *et al.* 1998). Σπέρμα από αρσενικά μολυσμένα με αυτού του τύπου *Wolbachia* είναι συμβατά με μη μολυσμένα αυγά. Η παρουσία όμως των βακτηρίων αυτών στο αυγό σώζει το φαινότυπο που επάγεται από κάποια $mod^+ resc^+$ στελέχη. Η ανακάλυψη αυτή οδήγησε στην υπόθεση ότι τα στελέχη που μέχρι πρόσφατα θεωρούνταν $mod^- resc^-$, μπορεί στην πραγματικότητα να είναι $mod^- resc^+$ και να έχουν την ικανότητα να σώζουν το φαινότυπο που επάγεται από συγγενικά στελέχη. Θεωρητικά υπάρχει και ένας τέταρτος γονότυπος ο $mod^+ resc^-$ ο οποίος είναι εξελικτικά αδιέξοδος, εκτός αν τα στελέχη αυτά χρησιμοποιούν τον παράγοντα *resc* από συγγενικά στελέχη για να σώζουν τον φαινότυπο που επάγουν. Ο μηχανισμός αυτός εξηγεί αυτονόητα την περίπτωση της μονόδρομης ασυμβατότητας. Επίσης, αν δεχτούμε ότι τα διάφορα στελέχη του βακτηρίου παρουσιάζουν διαφορές στα στοιχεία του *mod* και *resc* μηχανισμού, αν δηλαδή υπάρχουν διαφορετικά αλληλόμορφα για κάθε γενετικό τόπο ή σύνολο τόπων, το μοντέλο εξηγεί και τις περιπτώσεις αμφίδρομης ασυμβατότητας.

Η *Wolbachia* βρίσκεται άφθονη στους όρχεις των αρσενικών που παρουσιάζουν υψηλά επίπεδα CI (Veneti Z., 2003). Κατά την ωρίμανση του σπέρματος το κυτταρόπλασμα απομακρύνεται και αδειάζει μέσα στον κάδο απορριμμάτων (waste bag). Κατά τη διαδικασία αυτή φαίνεται ότι απομακρύνονται και τα βακτηριακά κύτταρα (Binnington and Hoffmann 1989, Bressac and Rousset 1993). Έτσι το ώριμο σπέρμα δεν είναι σε επαφή με τα βακτηριακά κύτταρα (Εικ. 1.5). Συνεπώς η δράση της *Wolbachia* δεν είναι άμεση, αλλά επιτυγχάνεται μέσω κάποιας τροποποίησης του σπέρματος. Στόχος της τροποποίησης είναι είτε τα ίδια τα χρωμοσώματα, είτε κάποιος παράγοντας απαραίτητος για τη φυσιολογική δημιουργία του πατρικού προπυρήνα.

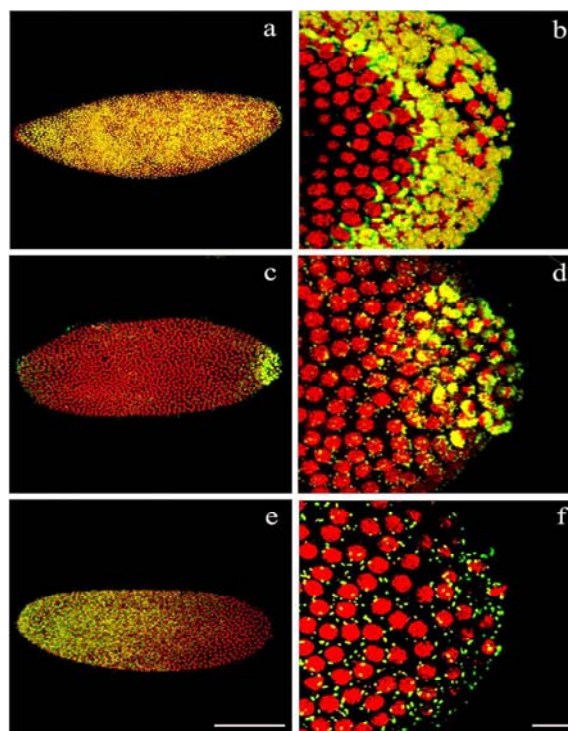
Πολλές μελέτες είχαν εστιαστεί στο παρελθόν στη συσχέτιση της βακτηριακής πυκνότητας και των επιπέδων ασυμβατότητας, με περίπλοκα αποτελέσματα. Σύμφωνα με το «μοντέλο δόσης» (dosage model) (Breeuwer and Werren 1993), τα επίπεδα ασυμβατότητας είναι ανάλογα με τον αριθμό των βακτηρίων μεταξύ αρσενικών και θηλυκών. Αναλυτικότερα, παρατηρήθηκε ότι αρσενικά με υψηλούς αριθμούς βακτηρίων ήταν ασύμβατα με θηλυκά, μολυσμένα με λιγότερα βακτήρια.

Κυτταρολογικές μελέτες έδειξαν ότι η γονιμοποίηση λαμβάνει χώρα κανονικά στις ασύμβατες διασταυρώσεις (Kose and Karr 1995). Επιπρόσθετα, το ώριμο σπέρμα δε φέρει βακτήρια, μια και αυτά απομακρύνονται μαζί με άλλα κυτταροπλασματικά συστατικά, κατά το τελευταίο στάδιο της ωρίμανσής του. Στη *Drosophila*, γίνεται σύντηξη των προπυρήνων, αλλά τα πατρικά χρωμοσώματα καθυστερούν να συμπυκνωθούν, ενώ τα μητρικά αρχίζουν τη μίτωση (Callaini *et al.* 1996, Callaini *et al.* 1997, Lassy and Karr 1996). Η ανάπτυξη σταματά στις πρώτες μιτωτικές διαιρέσεις και τα έμβρυα πεθαίνουν.

Κυτταρολογικές μελέτες στη *Drosophila* έδειξαν επίσης ότι η *Wolbachia* συγκεντρώνεται στους πόλους της μιτωτικής ατράκτου, στο στάδιο του συγκυτιακού βλαστοδέρματος και συνεντοπίζεται με τους αστρικούς μικροσωληνίσκους (Callaini *et al.* 1994, Kose and Karr 1995, Lassy and Karr 1996, O'Neill and Karr 1990). Στη *D. melanogaster* τα βακτήρια συγκεντρώνονται στον οπίσθιο πόλο του αυγού (Hadfield and Axton 1999), ενώ στη *Drosophila simulans* παρατηρήθηκε ομοιόμορφη κατανομή γύρω από το φλοιό του αυγού (Εικ. 1.6) (O'Neill and Karr 1990).



ΕΙΚΟΝΑ 1.5 Σχηματικό διάγραμμα της σπερματογένεσης της *Drosophila* (A) και κατανομή της *Wolbachia* (κίτρινο-πράσινο) σε ένα νεαρό DSR αρσενικό άτομο (*D. simulans riverside*). Το DNA δείχνεται με κόκκινο, ενώ με άσπρα βέλη σημειώνονται ενδεικτικά πυρήνες του σπέρματος από τρεις κύστες διαφορετικών αναπτυξιακών σταδίων. Με μαύρα βέλη σημειώνονται βακτήρια, που βρίσκονται στην αντίθετη πλευρά, από αυτή των πυρήνων. Μπάρα, 100μm. (Veneti Z., Ph D thesis)



ΕΙΚΟΝΑ 1.6 Η κατανομή της *Wolbachia* σε έμβρυα *Drosophila*, στο στάδιο του συγκυτιακού βλαστοδέρματος (μιτωτικοί κύκλοι 10-13). Διακρίνονται τα βακτήρια (πράσινο και κίτρινο χρώμα) καθώς και οι πυρήνες των κυττάρων του εμβρύου (κόκκινο χρώμα). (Veneti Z., Ph D thesis)

1.6 Σκοπός της μελέτης του βακτηρίου *Wolbachia*

Σήμερα στον κλάδο της γεωργίας υπάρχει έντονο ενδιαφέρον για μεθόδους βιολογικής καταπολέμησης εντόμων βλαβερών για τη γεωργική παραγωγή. Οι μέθοδοι αυτές θα πρέπει να είναι οικονομικές και να μην επιβαρύνουν επιπλέον το περιβάλλον. Ειδικότερα, υπάρχει ένα αυξανόμενο

ενδιαφέρον για τη χρησιμοποίηση της *Wolbachia* στην ανάπτυξη εναλλακτικών μεθόδων βιολογικού ελέγχου επιβλαβών εντόμων, όπως η μύγα της Μεσογείου (*Ceratitis capitata*), ο δάκος (*Bactrocera oleae*) και άλλα έντομα.

Πιθανή εφαρμογή στη βιολογική καταπολέμηση επιβλαβών εντόμων στη γεωργία είναι η μείωση και καταστολή των φυσικών πληθυσμών μέσω της *Wolbachia* επαγόμενης κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας (CI). Η κυτταροπλασματική ασυμβατότητα χρησιμοποιήθηκε στο παρελθόν με τρόπο ανάλογο της τεχνικής στειρώσης εντόμων (Sterile Insect Technique- S.I.T.), ως μέθοδος βιολογικού ελέγχου πληθυσμών κουνουπιών και λεπιδοπτέρων με μεγάλη επιτυχία, τόσο στο εργαστήριο όσο και στη φύση. Μέσω της *Wolbachia*-επαγόμενης κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας μπορούμε να μειώσουμε σε σημαντικό βαθμό τους πληθυσμούς των εντόμων που είναι βλαβερά για τη γεωργία χωρίς να χρησιμοποιήσουμε εντομοκτόνα ή ακτινοβολίες, που επιβαρύνουν το περιβάλλον και εν τέλει και τον ίδιο τον άνθρωπο που καταναλώνει τα προϊόντα.

Για τους παραπάνω λόγους η καλή γνώση της βιολογίας του βακτηρίου και της σχέσης του με τους ξενιστές του πιστεύουμε θα οδηγήσει σε σωστότερη χρήση του στο άμεσο μέλλον.

Χρησιμοποιούμε σήμερα τη *Drosophila* για τα πειράματά μας, ένα μοντέλο οργανισμό για γενετικά πειράματα και αφού φτάσουμε σε ένα υψηλό στάδιο κατανόησης του μηχανισμού δράσης του βακτηρίου σε αυτή, που να μας επιτρέπει την ασφαλή μεταφορά του σε άλλα είδη γεωργικού ενδιαφέροντος, μπορούμε να προσπαθήσουμε να το μεταφέρουμε σε αυτά.

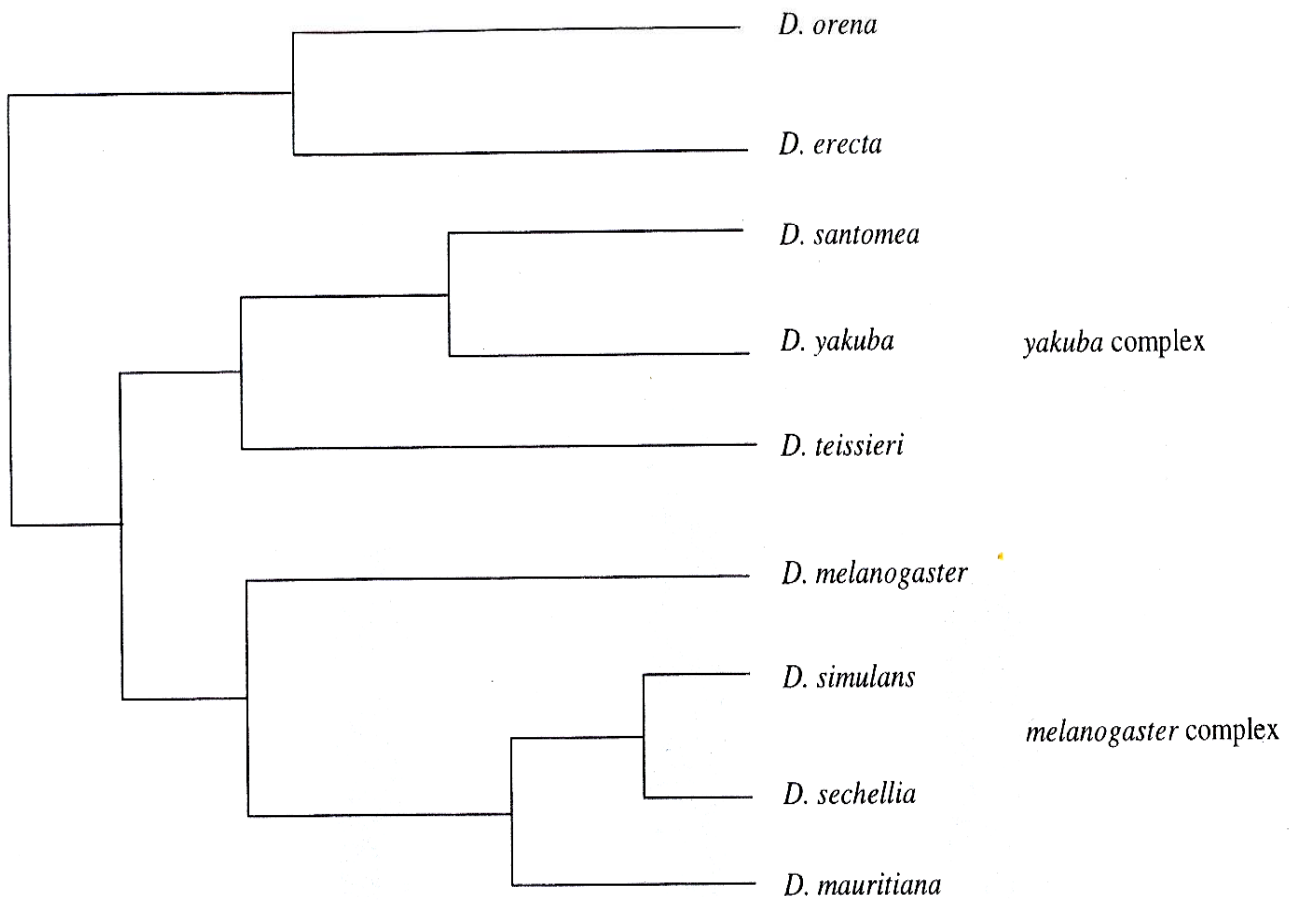
Τις δύο τελευταίες δεκαετίες οι μολύνσεις με *Wolbachia* και το φαινόμενο της «*Wolbachia*-επαγόμενης κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας» έχουν αναφερθεί σε πολλά είδη του εντόμου *Drosophila*. Εστιάζοντας σε είδη της υποομάδας της *Drosophila melanogaster* βλέπουμε ότι αυτή περιλαμβάνει εννέα είδη (Εικ. 1.7) : *D. simulans*, *D. sechellia*, *D. mauritiana*, και *D. melanogaster* (σχηματίζουν το σύμπλεγμα της *melanogaster*), *D. orena* και *D. erecta* (δεν έχει καθοριστεί σύμπλεγμα), και τέλος *D. teissieri*, *D. santomea* και *D. yakuba*, που σχηματίζουν το σύμπλεγμα της *yakuba* (Lachaise *et al.* 2003).

Μέχρι στιγμής οι περισσότερες μελέτες της *Wolbachia* έχουν εστιαστεί στην υποομάδα της *melanogaster*. Σ' αυτήν την υποομάδα η *D. simulans* φαίνεται να είναι ο ξενιστής με τις περισσότερες διαφορετικές μολύνσεις, φέροντας τουλάχιστον πέντε διαφορετικά φυλογενετικά και φαινοτυπικά ευδιάκριτα είδη *Wolbachia*. Τρία απ' αυτά το wRi (Hoffmann *et al.* 1986) το wHa (O'Neill and Karr 1990) και το wNo (Mercot *et al.* 1995) βρέθηκε ότι εκφράζουν και τη mod και τη resc λειτουργία στον φυσικό τους ξενιστή (mod⁺/resc⁺ φαινότυπος) και παρουσιάζουν όλα αμφίδρομη ασυμβατότητα. Το στέλεχος wMa (Charlat *et al.* 2003) δεν είναι ικανό να ασκήσει την τροποποίηση στο γονιδίωμα του αρσενικού. Εντούτοις, η μόλυνση αυτή μπορεί να διασώσει πλήρως την τροποποίηση του στελέχους wNo (Bourtzis *et al.* 1998), κατά συνέπεια εκφράζει έναν mod⁻ resc⁺ φαινότυπο. Το πέμπτο στέλεχος, το wcoffs δεν εμφανίζεται να προκαλεί (Charlat *et al.* 2003) ούτε να διασώζει τη CI (Poinsot *et al.* 1998), συνεπώς εκφράζει έναν mod⁻/resc⁻ φαινότυπο.

Στο σύμπλεγμα της *yakuba*, η *Wolbachia* ανιχνεύτηκε με PCR και στα τρία είδη (Lachaise *et al.* 2000). Επιπλέον η μόλυνση φαίνεται ότι είναι πανομοιότυπη με το στέλεχος wcoffs στη *D. simulans* κρίνοντας με βάση τις αλληλουχίες του wsp γονιδίου. Οι μολύνσεις στο σύμπλεγμα της *yacuba* χαρακτηρίστηκαν μέσω δοκιμών για την πρόκληση κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας (CI) και δεν εκφράζουν την τροποποίηση στους φυσικούς ξενιστές τους, συνεπώς είναι στενά συγγενικές με το wcoffs στέλεχος της *D. simulans*. Τα στελέχη αυτά του βακτηρίου ονομάστηκαν wSty (από τα *santomea*, *teissieri* και *yakuba*) (Zabalou *et al.* 2003).

Ο στόχος της παρούσας μελέτης είναι να εξεταστεί, αν το γεγονός ότι δεν εκφράζουν τροποποίηση στους φυσικούς τους ξενιστές (mod⁻) οφείλεται στα ίδια τα βακτήρια ή σε παράγοντες των φυσικών τους ξενιστών.

Για το λόγο αυτό μεταφέρθηκαν με μικροενέσεις στη *D. simulans*, τα στελέχη του βακτηρίου και από τα τρία είδη του συμπλέγματος *yacuba*. Η *D. simulans* αποτελεί ένα μοντέλο για τέτοιου είδους έρευνες καθώς είναι το πιο καλά μελετημένο είδος και όπως προαναφέραμε φέρει το μεγαλύτερο αριθμό στελεχών του βακτηρίου, δίνοντας τη δυνατότητα για μια πληρέστερη συγκριτική έρευνα. Η αλλαγή στην έκφραση του mod και resc φαινοτύπου στον νέο ξενιστή, μελετήθηκε και για τα τρία στελέχη wSty που προέρχονταν από σύμπλεγμα της *yacuba*.



ΕΙΚΟΝΑ 1.7 Σχηματικό διάγραμμα των ειδών της υποομάδας της *Drosophila melanogaster*.

2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Στελέχη εντόμων

Στο συγκεκριμένο πείραμα τα στελέχη των εντόμων που μελετήθηκαν είναι τα παρακάτω:

Στελέχη εντόμων	Ιδιότητες
<i>Drosophila simulans</i> STCP	Το στέλεχος αυτό δεν έχει Wolbachia
<i>Drosophila simulans</i> wCoffs	Το στέλεχος αυτό είναι φυσικά μολυσμένο με το στέλεχος wCoffs της Wolbachia
<i>Drosophila simulans</i> wNo	Το στέλεχος αυτό είναι φυσικά μολυσμένο με το στέλεχος wNo της Wolbachia
<i>Drosophila simulans</i> yaksim	Το στέλεχος αυτό προέρχεται από το στέλεχος <i>Drosophila simulans</i> STCP που μολύνθηκε τεχνητά στο εργαστήριο με το στέλεχος του βακτηρίου wSty που πάρθηκε από τη <i>Drosophila yakuba</i>
<i>Drosophila simulans</i> sansim	Το στέλεχος αυτό προέρχεται από το στέλεχος <i>Drosophila simulans</i> STCP που μολύνθηκε τεχνητά στο εργαστήριο με το στέλεχος του βακτηρίου wSty που πάρθηκε από τη <i>Drosophila santomea</i>
<i>Drosophila simulans</i> teisim	Το στέλεχος αυτό προέρχεται από το στέλεχος <i>Drosophila simulans</i> STCP που μολύνθηκε τεχνητά στο εργαστήριο με το στέλεχος του βακτηρίου wSty που πάρθηκε από τη <i>Drosophila teissieri</i>

Ο

ι
καλλιέ
ργειες
των
εντόμ
ων
έγιναν
στους
25⁰C
σε
θρεπτι
κό
υλικό
καλαμ
ποκάλε
υρου,
άγαρ,
ζάχαρη
ς και
μαγιάς
, (60g
καλαμ
ποκάλε
υρο,
10g
άγαρ,
20g

ζάχαρη, 50g μαγιά, 0,15g Niprogen και νερό μέχρι το 1Lt) κάτω από αραιές πληθυσμιακές συνθήκες (50 περίπου προνύμφες / φιαλίδιο).

2.2 Έλεγχος του επιπέδου μόλυνσης των εντόμων

Στην αρχή των γενετικών πειραμάτων βεβαιωθήκαμε για τα επίπεδα μόλυνσης των στελεχών των εντόμων που επρόκειτο να χρησιμοποιήσουμε. Από κάθε στέλεχος δημιουργήθηκαν ισομητρικές σειρές (isofemale lines), δηλαδή σειρές εντόμων που προέρχονταν από ένα μόνο θηλυκό. Το βακτήριο είναι μητρικά κληρονομούμενο, γι' αυτό κρατάμε τους απογόνους μόνο των μολυσμένων θηλυκών, επειδή σ' αυτούς έχει μεταβιβαστεί το βακτήριο. Επιλέγονται τυχαία 10-15 θηλυκά και 20-30 αρσενικά άτομα, κάθε θηλυκό τοποθετείται ξεχωριστά σε ένα μπουκαλάκι με θρεπτικό υλικό μαζί με δύο αρσενικά άτομα και αφήνεται να ζευγαρώσει και να γεννήσει. Όταν βγουν οι προνύμφες, οι θηλυκοί γονείς συλλέγονται και ελέγχονται για να εξακριβωθεί ποια έντομα

είναι μολυσμένα. Αν κάποιο έντομο δεν είναι μολυσμένο, τότε δεν χρησιμοποιούμε τους απογόνους του, ειδάλλως τα μπουκαλάκια φυλάγονται και οι απογόνοι αναμειγνύονται δημιουργώντας το νέο στέλεχος.

2.3 Απομόνωση DNA από τα έντομα, αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης και ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.

Για την απομόνωση του DNA χρησιμοποιήσαμε μικροσωληνάκια του τύπου eppendorf των 1,5ml που περιέχουν 50μl STE buffer 1x (100mM NaCl₂, 10mM Tris HCl pH 8.0, 1mM EDTA pH 8.0) και 1μl Proteinase K (20mg/L) και ομογενοποιήσαμε κάθε μύγα ξεχωριστά μέσα στο μίγμα (Εικ. 2.1). Αυτό έγινε για να σπάσουμε τα κύτταρα και τις μεμβράνες του κάθε ατόμου. Μεταφέραμε τα μικροσωληνάκια σε ένα ειδικό θάλαμο για 30 λεπτά σε θερμοκρασία 37°C για να επωαστεί το μίγμα και να δράσει η πρωτεϊνάση. Στη συνέχεια τα τοποθετήσαμε για 5 λεπτά στους 95°C για να απενεργοποιήσουμε την πρωτεϊνάση (proteinase K). Για τον διαχωρισμό των επιθυμητών μορίων από τα υπόλοιπα μόρια (μη ομογενοποιημένα κομμάτια του εντόμου), φυγοκεντρήσαμε τα μικροσωληνάκια για 6 λεπτά στις 12.000 στροφές ανά λεπτό.



ΕΙΚΟΝΑ 2.1 Ομογενοποίηση της μύγας (*Drosophila simulans*) σε ειδικό μίγμα μέσα σε μικροσωληνάκι του τύπου eppendorf των 1,5ml.

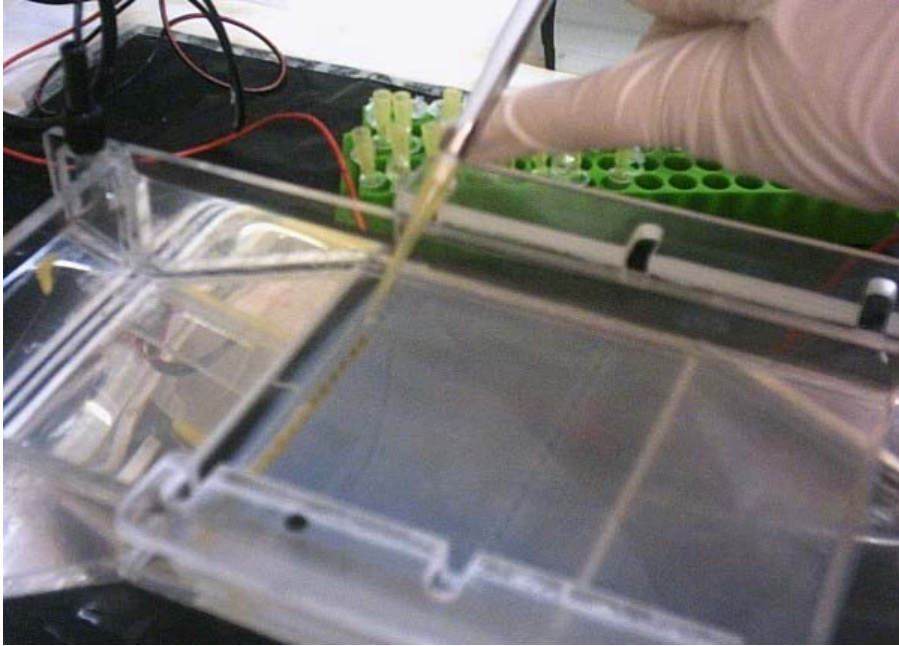
Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 25μl. Κάθε αντίδραση περιείχε : 16,2μl H₂O, 2,5μl buffer 10x (50mM KCl, 10 mM Tris HCl pH 9.0, 1,5μl MgCl₂ 1,5mM, 0.1% Triton), 2,5μl μίγμα dNTPs 0.2 mM (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 0,5μl από τον wsp εκκινητή 81F (20pmol), 0,5μl από τον wsp εκκινητή 691R (20pmol) και 1,5units Taq πολυμεράση. Αφού φτιάξαμε το μίγμα προσθέσαμε 1μl από το απομονωμένο DNA total (100 – 200ng). Η αλληλουχία των εκκινητών που χρησιμοποιήσαμε για το γονίδιο wsp είναι 81F (5'-TGGTCCAATAAGTGATGAAGAAAC-3') και 691R (5'-AAAAATTAACGCTACTCCA-3') οι οποίοι πολλαπλασιάζουν ένα κομμάτι DNA μεγέθους 600 βάσεων περίπου. Το ακριβές μέγεθος ποικίλλει ανάλογα με το βακτηριακό στέλεχος (Braig *et al.* 1998, Zhou *et al.* 1998).

Το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το παρακάτω :

1. 94°C για 2' (αποδιάταξη των αλυσίδων του DNA).
2. 94°C για 30'' (αποδιάταξη των αλυσίδων του DNA).
3. 55°C για 30'' (δέσμευση εκκινητών στις ειδικές θέσεις).
4. 72°C για 1' (σύνθεση του DNA με τη δράση της Taq πολυμεράσης).
5. Επανάληψη από το βήμα 2 ως 5 για 35 φορές.
6. 72°C για 10' για να ολοκληρωθούν τα τυχόν ατελή κομμάτια.

Στη συνέχεια φτιάξαμε ένα πήκτωμα αγαρόζης 1% σε 1x TAE (40mM Tris-acetate, 1mM EDTA). Τοποθετήσαμε εκεί τα δείγματά μας και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η

ηλεκτροφόρηση με ρεύμα σταθερής τάσης 100V από κατάλληλο τροφοδοτικό (Εικ. 2.2). Τέλος ακολούθησε φωτογράφιση του πηκτώματος με την Kodak DC120 Electrophoresis Documentation and Analysis Camera.



ΕΙΚΟΝΑ 2.2 Τοποθέτηση δειγμάτων DNA στα «πληγάδια» του πηκτώματος αгарόζης με την αυτόματη μικροπιπέττα.

2.4 Μέτρηση της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας (CI)

Οι διασταυρώσεις που πραγματοποιήσαμε ήταν μεταξύ ενός αγονιμοποίητου θηλυκού 2 – 4 ημερών και ενός αγονιμοποίητου αρσενικού 24 – 36 ωρών. Γίνονταν σε μπουκαλάκια που στον πάτο τους έχουν πιατάκια petri με πήκτωμα μηλόζουμου (94% φυσικός χυμός μήλου από συμπυκνωμένο χυμό, 3 % άγαρ, 3% Nitrogen). Παρατηρούσαμε τα έντομα για 6 ώρες και σημειώναμε σε ποια μπουκαλάκια είχε γίνει σύζευξη. Επιτυχής σύζευξη θεωρούνταν η σύζευξη που είχε διάρκεια το λιγότερο 10 λεπτά. Τα μπουκαλάκια στα οποία δεν είχε γίνει σύζευξη μέσα στις 6 ώρες απομακρύνονταν. Μετά τη γονιμοποίηση τα αρσενικά άτομα αφαιρούνταν από τα μπουκαλάκια ενώ τα θηλυκά παρέμεναν για να γεννήσουν τα αυγά τους. Ανά 24 ώρες τα πιατάκια αλλάζονταν και μετρούνταν τα έμβρυα που είχαν αφεθεί πάνω στο πήκτωμα. Κρατούσαμε τις διασταυρώσεις που είχαμε συλλέξει 50 έμβρυα μέσα σε 3 ημέρες. Τα έμβρυα φυλάσσονταν για άλλες 36 ώρες ώστε να εκκολαφθούν και στη συνέχεια μετρούνταν τα έμβρυα που δεν εκκολάφθηκαν. Για κάθε συνδυασμό στελεχών διασταυρώθηκαν 15 – 25 ζευγάρια εντόμων και οι διασταυρώσεις αυτές πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία 25°C. Από τα αποτελέσματα που πήραμε υπολογίσαμε το ποσοστό στειρότητας για κάθε διασταύρωση. Το ποσοστό στειρότητας είναι ο αριθμός των μη εκκολαπτόμενων εμβρύων προς το συνολικό αριθμό των εμβρύων που γεννήθηκαν.

Ο υπολογισμός των μέσων τιμών και των τυπικών σφαλμάτων έγινε με το πρόγραμμα Microsoft Excel.

3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Έλεγχος του επιπέδου μόλυνσης των εντόμων

Για κάθε στέλεχος εντόμων που χρησιμοποιήσαμε, κάναμε έλεγχο για την ύπαρξη ή όχι του βακτήριου (*Wolbachia*).

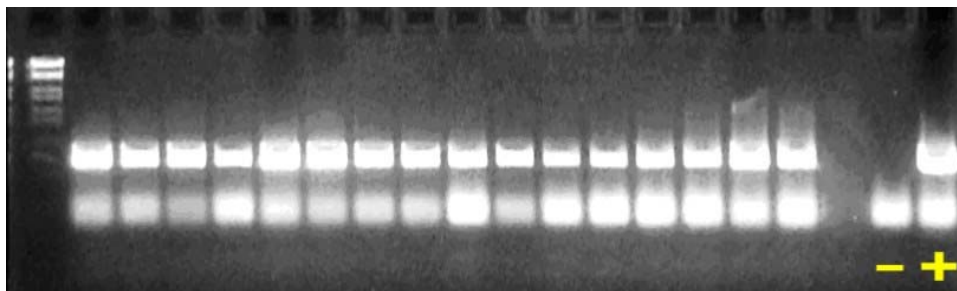
α) Έλεγχος του στελέχους *Drosophila simulans* STCP

Η σειρά αυτή ελέγχθηκε αφού επιλέχθηκαν τυχαία 10 θηλυκά και 20 αρσενικά άτομα. Κάθε θηλυκό τοποθετήθηκε ξεχωριστά με δύο αρσενικά άτομα μέσα σε ένα μπουκαλάκι με θρεπτικό υλικό. Παρέμειναν εκεί για τρεις ημέρες ώστε να γίνει σύζευξη και το θηλυκό να γεννήσει τα έμβρυα. Στη συνέχεια οι θηλυκοί γονείς συλλέχθηκαν και ελέγχθηκαν με την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης. Διαπιστώσαμε ότι τα έντομα δεν ήταν μολυσμένα και έτσι χρησιμοποιήσαμε τους απογόνους τους και δημιουργήσαμε μια νέα σειρά, η οποία ήταν 100% καθαρή.

β) Έλεγχος των στελεχών *Drosophila simulans* wCoffs, wNo, sansim1, teism4 και yaksim14

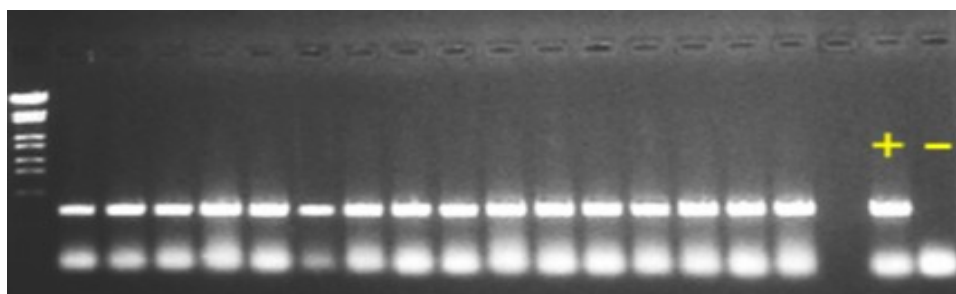
Η κάθε μία από τις παραπάνω σειρές ελέγχθηκε αφού πρώτα επιλέχθηκαν περίπου 15 θηλυκά και 30 αρσενικά άτομα. Κάθε θηλυκό τοποθετήθηκε ξεχωριστά με δύο αρσενικά άτομα μέσα σε ένα μπουκαλάκι με θρεπτικό υλικό. Παρέμειναν εκεί για τρεις ημέρες ώστε να γίνει σύζευξη και το θηλυκό να γεννήσει τα έμβρυα. Στη συνέχεια οι θηλυκοί γονείς συλλέχθηκαν και ελέγχθηκαν με την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης. Διαπιστώσαμε ότι τα περισσότερα έντομα ήταν μολυσμένα και έτσι χρησιμοποιήσαμε τους απογόνους τους και δημιουργήσαμε νέες σειρές εντόμων, οι οποίες ήταν 100% μολυσμένες (Εικ. 3.1, 3.2, 3.3, 3.4).

Στις εικόνες που ακολουθούν απεικονίζονται μερικοί έλεγχοι με PCR.



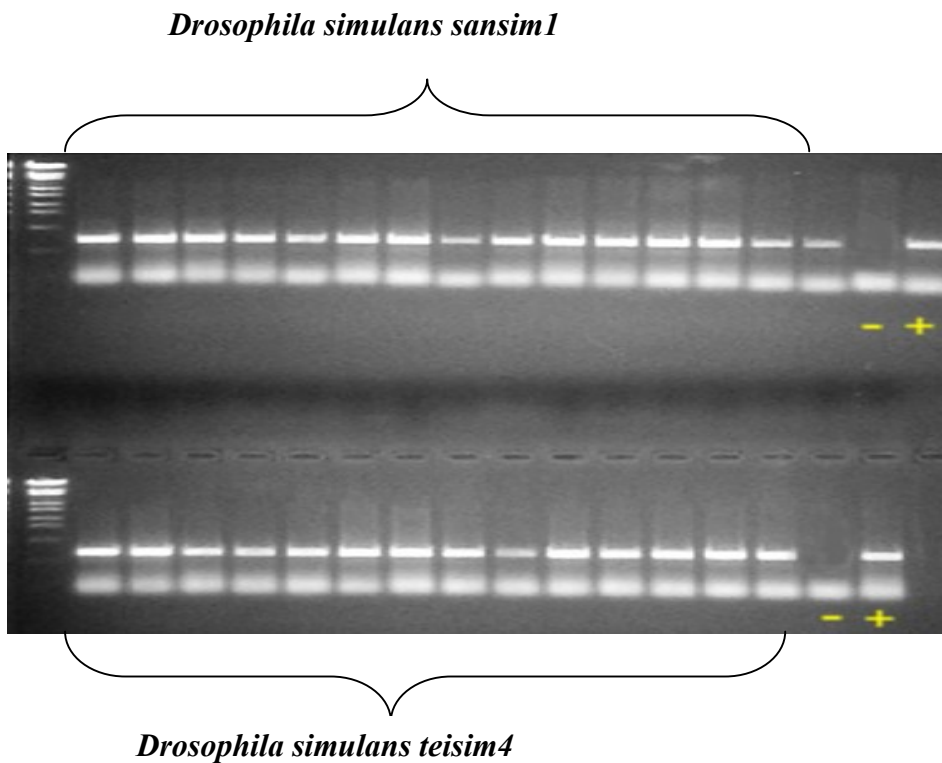
Drosophila simulans wCoffs

ΕΙΚΟΝΑ 3.1 Έλεγχος της σειράς wCoffs. Το “+” είναι ο θετικός μάρτυρας και το “-” ο αρνητικός.

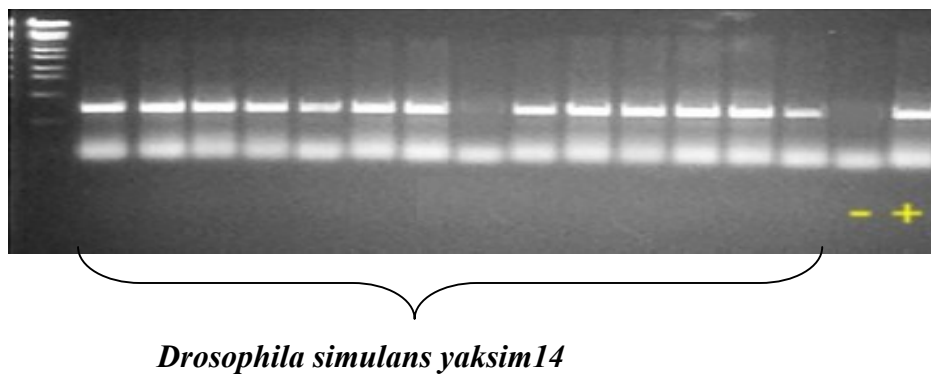


Drosophila simulans wNo

ΕΙΚΟΝΑ 3.2 Έλεγχος της σειράς wNo. Το “+” είναι ο θετικός μάρτυρας και το “-” ο αρνητικός.



ΕΙΚΟΝΑ 3.3 Έλεγχος των σειρών sansim1 και teism4. Το “+” είναι ο θετικός μάρτυρας και το “-” ο αρνητικός.



ΕΙΚΟΝΑ 3.4 Έλεγχος της σειράς yaksim14. Το “+” είναι ο θετικός μάρτυρας και το “-” ο αρνητικός.

3.2 Έλεγχος επαγωγής κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας

Στην παρούσα εργασία, για τα γενετικά πειράματα, χρησιμοποιήθηκαν τα στελέχη **sansim1**, **teism4** και **yaksim14** που προέρχονταν από την μόλυνση της *Drosophila simulans* με τα στελέχη του βακτηρίου wSty που προέρχονταν από τις *Drosophila santomea*, *Drosophila teissieri* και *Drosophila yakuba* αντίστοιχα. Ελέγξαμε την ικανότητά τους να προκαλούν κυτταροπλασματική ασυμβατότητα, σύμφωνα με το μοντέλο τροποποίησης-διάσωσης (mod/resc), μετά την προσθήκη των στελεχών του βακτηρίου στα έντομα αυτά.

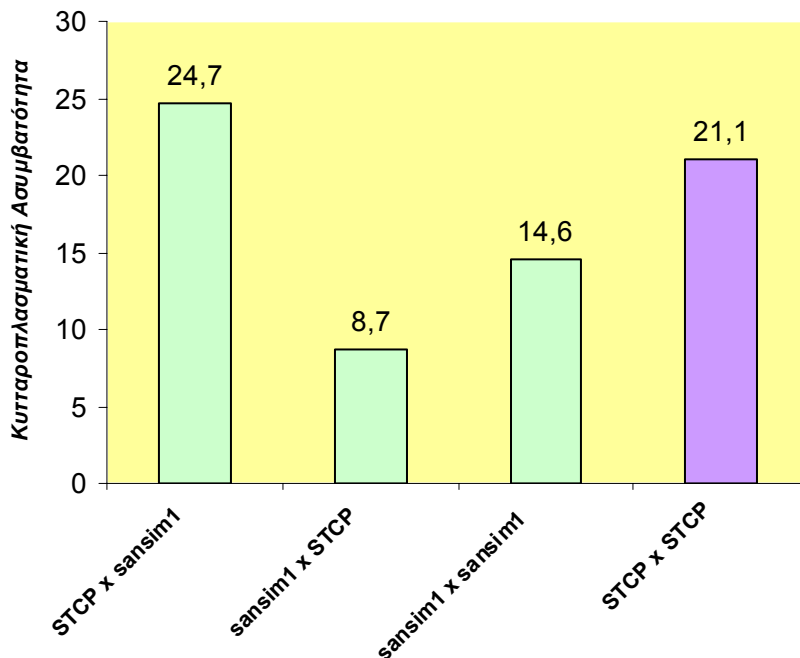
Με σκοπό να ελέγξουμε αν τα παραπάνω στελέχη εντόμων προκαλούν την έκφραση της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας ως προς τη λειτουργία της τροποποίησης (**mod function**), διασταυρώσαμε αρσενικά άτομα που είχαν μολυνθεί με το στέλεχος *wSty* της *Wolbachia* με θηλυκά άτομα που δεν ήταν μολυσμένα. Για την κάθε μία από τις δύο σειρές μολυσμένων εντόμων πραγματοποιήσαμε περίπου 10-25 διασταυρώσεις με σκοπό να έχουμε αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα για κάθε διασταύρωση. Κρατούσαμε τις διασταυρώσεις που είχαμε συλλέξει τουλάχιστον 50 έμβρυα μέσα σε τρεις μέρες. Πραγματοποιήσαμε επίσης την αντίστροφη (reciprocal) διασταύρωση, δηλαδή μη μολυσμένα αρσενικά με μολυσμένα θηλυκά για να δούμε τα φυσιολογικά ποσοστά της εμβρυϊκής θνησιμότητας.

Πιο αναλυτικά πραγματοποιήσαμε 18 διασταυρώσεις ανάμεσα στα στελέχη ♀*STCP x sansim1*♂ και από το σύνολο των εμβρύων (1335) αγονιμοποίητα ήταν τα 286, δηλαδή ποσοστό 24,7%. Συγχρόνως πραγματοποιήσαμε 11 διασταυρώσεις ανάμεσα στα στελέχη ♀*sansim1 x STCP*♂ και από το σύνολο των εμβρύων (841) αγονιμοποίητα ήταν τα 67, δηλαδή ποσοστό 8,7%.

Τέλος, ελέγξαμε την ενδογενή στειρότητα των στελεχών. Πραγματοποιήσαμε διασταυρώσεις μεταξύ των ατόμων κάθε στελέχους για όλα τα στελέχη που χρησιμοποιήσαμε σε αυτή την εργασία. Αναλυτικότερα, πραγματοποιήσαμε διασταυρώσεις μεταξύ των ατόμων *sansim1* (♀*sansim1 x sansim1*♂) καθώς και άτομα του στελέχους *STCP* (♀*STCP x STCP*♂). Στον πίνακα **3.1** και την εικόνα **3.5** φαίνονται τα αποτελέσματα των παραπάνω διασταυρώσεων.

ΠΙΝΑΚΑΣ 3.1 Κυτταροπλασματική ασυμβατότητα που προκαλεί το στέλεχος *sansim1*.

Διασταύρωση Θηλυκό x Αρσενικό	Αριθμός διασταυρώσεων	Αριθμός εμβρύων	Αριθμός μη εκκολαφθέντων εμβρύων	% Εμβρυϊκή θνησιμότητα ± SE
<i>STCP x sansim1</i>	18	1335	286	24,7 ± 6,46
<i>sansim1 x STCP</i>	11	841	67	8,7 ± 2,05
<i>sansim1 x sansim1</i>	11	827	117	14,6 ± 2,77
<i>STCP x STCP</i>	31	1939	425	21,1 ± 4,33

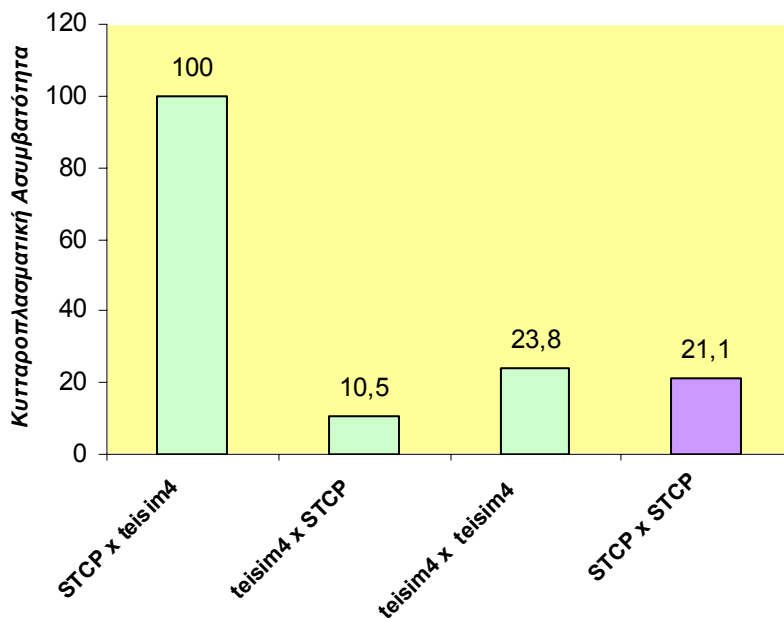


ΕΙΚΟΝΑ 3.5 Παρουσίαση της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας που προκαλεί το στέλεχος sansim1 (mod φαινότυπος).

Στη συνέχεια πραγματοποιήσαμε 10 διασταυρώσεις ανάμεσα στα στελέχη ♀*STCP x teism4*♂ και από το σύνολο των εμβρύων (505) ήταν όλα αγονιμοποίητα, δηλαδή ποσοστό 100%. Συγχρόνως πραγματοποιήσαμε 11 διασταυρώσεις ανάμεσα στα στελέχη ♀*teism4 x STCP*♂ και από το σύνολο των εμβρύων (598) αγονιμοποίητα ήταν τα 67, δηλαδή ποσοστό 10,5%. Επίσης διασταυρώσαμε άτομα του στελέχους *teism4* μεταξύ τους. Στον πίνακα 3.2 και την εικόνα 3.6 φαίνονται τα αποτελέσματα των παραπάνω διασταυρώσεων.

ΠΙΝΑΚΑΣ 3.2 Κυτταροπλασματική ασυμβατότητα που προκαλεί το στέλεχος teism4.

Διασταύρωση Θηλυκό x Αρσενικό	Αριθμός διασταυρώσεων	Αριθμός εμβρύων	Αριθμός μη εκκολαφθέντων εμβρύων	% Εμβρυική θνησιμότητα ± SE
<i>STCP x teism4</i>	10	505	505	100
<i>teism4 x STCP</i>	11	598	67	10,5 ± 3,20
<i>teism4 x teism4</i>	29	2029	766	23,8 ± 4,42
<i>STCP x STCP</i>	31	1939	425	21,1 ± 4,33

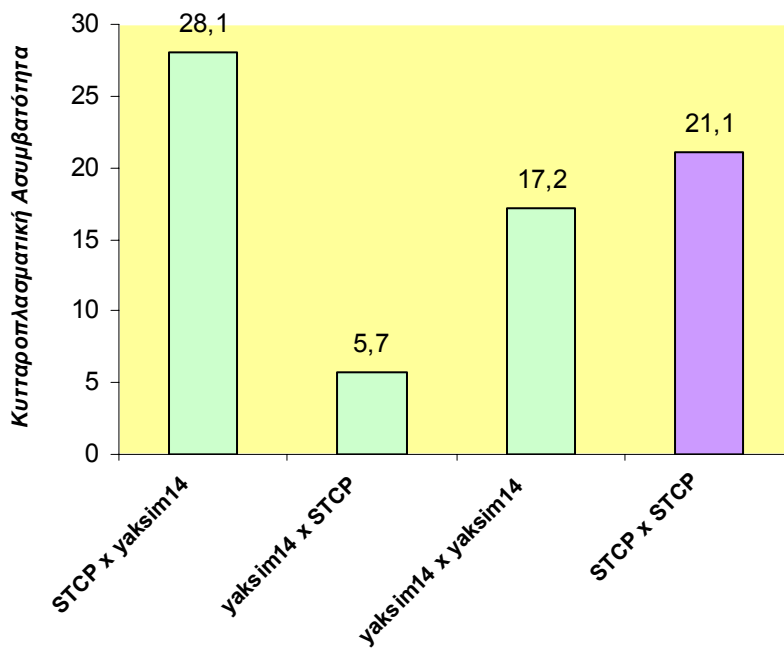


ΕΙΚΟΝΑ 3.6 Παρουσίαση της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας που προκαλεί το στέλεχος teisim4 (mod φαινότυπος).

Τέλος, πραγματοποιήσαμε 17 διασταυρώσεις ανάμεσα στα στελέχη ♀*STCP* x *yaksim14*♂ και από το σύνολο των εμβρύων (1318) αγονιμοποίητα ήταν τα 348, δηλαδή ποσοστό 28,1%. Από τις 12 διασταυρώσεις των σειρών ♀*yaksim14* x *STCP*♂ καταμετρήθηκαν 837 έμβρυα, εκ των οποίων τα 42 ήταν αγονιμοποίητα, δηλαδή ποσοστό 5,7%. Επίσης διασταυρώσαμε άτομα του στελέχους *yaksim14* μεταξύ τους. Στον πίνακα 3.3 και την εικόνα 3.7 φαίνονται τα αποτελέσματα των παραπάνω διασταυρώσεων.

ΠΙΝΑΚΑΣ 3.3 Κυτταροπλασματική ασυμβατότητα που προκαλεί το στέλεχος *yaksim14*.

Διασταύρωση Θηλυκό x Αρσενικό	Αριθμός διασταυρώσεων	Αριθμός εμβρύων	Αριθμός μη εκκολαφθέντων εμβρύων	% Εμβρυική θνησιμότητα ± SE
<i>STCP</i> x <i>yaksim14</i>	17	1318	348	28,1 ± 6,89
<i>yaksim14</i> x <i>STCP</i>	12	837	42	5,7 ± 1,44
<i>yaksim14</i> x <i>yaksim14</i>	9	633	103	17,2 ± 6,01
<i>STCP</i> x <i>STCP</i>	31	1939	425	21,1 ± 4,33



ΕΙΚΟΝΑ 3.7 Παρουσίαση της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας που προκαλεί το στέλεχος *yaksim14* (mod φαινότυπος).

3.3 Έλεγχος διάσωσης της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας που προκαλεί το στέλεχος wNo

Αρχικά καθορίσαμε τα επίπεδα κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας που προκαλεί το στέλεχος wNo. Αναλυτικά έγινε διασταύρωση με αρσενικά άτομα της *Drosophila simulans* που ήταν μολυσμένα με το στέλεχος wNo του βακτηρίου με θηλυκά άτομα του μη μολυσμένου στελέχους (STCP). Το ποσοστό της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας που προκαλεί το συγκεκριμένο στέλεχος ήταν της τάξης του 45,8%. Το ποσοστό αυτό προέκυψε από την καταμέτρηση των συνολικών εμβρύων (1395) σε σχέση με τα έμβρυα που δεν εκκολάφθηκαν (684).

Στην συνέχεια για να ελέγξουμε εάν τα στελέχη *sansim1*, *teisim4* και *yaksim14* των εντόμων διασώζουν την κυτταροπλασματική ασυμβατότητα που προκαλεί το στέλεχος wNo (resc function), διασταυρώσαμε αρσενικά άτομα της *Drosophila simulans* που ήταν μολυσμένα με το στέλεχος wNo του βακτηρίου, με θηλυκά άτομα από τις σειρές *sansim1*, *teisim4* και *yaksim14* αντίστοιχα. Συγχρόνως πραγματοποιήσαμε και τις αντίστροφες διασταυρώσεις, για να δούμε αν τα στελέχη είναι συμβατά.

Πραγματοποιήσαμε 28 διασταυρώσεις ανάμεσα στις σειρές ♀ *sansim1* x wNo♂ και σε σύνολο 1202 εμβρύων καταμετρήθηκαν 484 έμβρυα που δεν εκκολάφθηκαν, που αναλογεί στο 40,3% του συνόλου των εμβρύων. Ανάμεσα στις σειρές ♀ wNo x *sansim1*♂ πραγματοποιήσαμε 16 διασταυρώσεις. Καταμετρήθηκαν 1013 έμβρυα, από τα οποία δεν εκκολάφθηκαν τα 154, δηλαδή ποσοστό 16,1%. Στον πίνακα 3.4 και την εικόνα 3.8 φαίνονται τα αποτελέσματα των παραπάνω διασταυρώσεων.

ΠΙΝΑΚΑΣ 3.4 Διάσωση της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας του στελέχους wNo από το στέλεχος *sansim1*.

Διασταύρωση Θηλυκό x Αρσενικό	Αριθμός διασταυρώσεων	Αριθμός εμβρύων	Αριθμός μη εκκολαφθέντων εμβρύων	% Εμβρυική θνησιμότητα ± SE
wNo x <i>sansim1</i>	16	1013	154	16,1 ± 4,03
<i>sansim1</i> x wNo	28	1202	484	40,3 ± 5,05
STCP x wNo	17	1395	684	45,8 ± 7,32

Εμβρυα που δεν εκκολάφθηκαν (%)

ΕΙΚΟΝΑ 3.8 Παρουσίαση της διάσωσης της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας του στελέχους wNo από το στέλεχος *sansim1* (resc φαινότυπος).

Στη συνέχεια πραγματοποιήσαμε 18 διασταυρώσεις ανάμεσα στις σειρές ♀ *teisim4* x wNo♂ και σε σύνολο 1650 εμβρύων καταμετρήθηκαν 924 έμβρυα που δεν εκκολάφθηκαν, που αναλογεί στο 56,9% του συνόλου των εμβρύων. Ανάμεσα στις σειρές ♀ wNo x *teisim4*♂ πραγματοποιήσαμε 26 διασταυρώσεις. Καταμετρήθηκαν 1592 έμβρυα, από τα οποία δεν εκκολάφθηκαν τα 779, δηλαδή ένα ποσοστό της τάξης του 80,6%. Στον πίνακα 3.5 και την εικόνα 3.9 φαίνονται τα αποτελέσματα των παραπάνω διασταυρώσεων.

ΠΙΝΑΚΑΣ 3.5 Διάσωση της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας του στελέχους wNo από το στέλεχος teism4.

Διασταύρωση Θηλυκό x Άρσενικό	Αριθμός διασταυρώσεων	Αριθμός εμβρύων	Αριθμός μη εκκολαφθέντων εμβρύων	% Εμβρυική θνησιμότητα ± SE
wNo x teism4	26	1592	779	80,6 ± 4,79
teism4 x wNo	18	1650	924	56,9 ± 4,97
STCP x wNo	17	1395	684	45,8 ± 7,32

Έμβρυα που δεν εκκολάφθηκαν (%)
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0

ΕΙΚΟΝΑ 3.9 Παρουσίαση της διάσωσης της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας του στελέχους wNo από το στέλεχος teism4 (resc φαινότυπος).

Τέλος, πραγματοποιήσαμε 16 διασταυρώσεις ανάμεσα στις σειρές ♀*yaksim14* x *wNo*♂ και σε σύνολο 1164 εμβρύων καταμετρήθηκαν 512 έμβρυα που δεν εκκολάφθηκαν, που αναλογεί στο 45,8% του συνόλου των εμβρύων. Ανάμεσα στις σειρές ♀*wNo* x *yaksim14*♂ πραγματοποιήσαμε 17 διασταυρώσεις. Καταμετρήθηκαν 1127 έμβρυα, από τα οποία δεν εκκολάφθηκαν τα 177, δηλαδή ένα ποσοστό της τάξης του 17,1%. Στον πίνακα 3.6 και την εικόνα 3.10 φαίνονται τα αποτελέσματα των παραπάνω διασταυρώσεων.

ΠΙΝΑΚΑΣ 3.6 Διάσωση της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας του στελέχους wNo από το στέλεχος yaxsim14.

Διασταύρωση Θηλυκό x Άρσενικό	Αριθμός διασταυρώσεων	Αριθμός εμβρύων	Αριθμός μη εκκολαφθέντων εμβρύων	% Εμβρυική θνησιμότητα ± SE
wNo x yaxsim14	17	1127	177	17,1 ± 5,99
yaksim14 x wNo	16	1164	512	45,8 ± 7,28
STCP x wNo	17	1395	684	45,8 ± 7,32

Έμβρυα που δεν εκκολάφθηκαν (%)
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0

ΕΙΚΟΝΑ 3.10 Παρουσίαση της διάσωσης της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας του στελέχους wNo από το στέλεχος yaxsim14 (resc φαινότυπος).

3.4 Έλεγχος διάσωσης της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας που προκαλεί το στέλεχος wCoffs

Αρχικά καθορίσαμε τα επίπεδα κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας που προκαλεί το στέλεχος wCoffs. Αναλυτικά έγινε διασταύρωση διασταύρωση με αρσενικά άτομα της *Drosophila simulans* που ήταν μολυσμένα με το στέλεχος wCoffs του βακτηρίου με θηλυκά άτομα μη μολυσμένου στελέχους (STCP). Το ποσοστό της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας που προκαλεί το συγκεκριμένο στέλεχος ήταν της τάξης του 15,6%. Το ποσοστό αυτό προέκυψε από την καταμέτρηση των συνολικών εμβρύων (1460) σε σχέση με τα έμβρυα που δεν εκκολάφθηκαν (220).

Στην συνέχεια για να ελέγξουμε εάν τα στελέχη *sansim1*, *teisim4* και *yaksim14* των εντόμων διασώζουν την κυτταροπλασματική ασυμβατότητα που προκαλεί το στέλεχος wCoffs (resc function), διασταυρώσαμε αρσενικά άτομα της *Drosophila simulans* που ήταν μολυσμένα με το στέλεχος wCoffs του βακτηρίου, με θηλυκά άτομα από τις σειρές *sansim1*, *teisim4* και *yaksim14* αντίστοιχα. Συγχρόνως πραγματοποιήσαμε και τις αντίστροφες διασταυρώσεις.

Πραγματοποιήσαμε 16 διασταυρώσεις ανάμεσα στις σειρές ♀ *sansim1* x wCoffs♂ και σε σύνολο 924 εμβρύων καταμετρήθηκαν 80 έμβρυα που δεν εκκολάφθηκαν, που αναλογεί στο 9,4% του συνόλου των εμβρύων. Ανάμεσα στις σειρές ♀ wCoffs x *sansim1*♂ πραγματοποιήσαμε 18 διασταυρώσεις. Καταμετρήθηκαν 1211 έμβρυα, από τα οποία δεν εκκολάφθηκαν τα 184, δηλαδή ποσοστό 16,8%. Στον πίνακα 3.7 και την εικόνα 3.11 φαίνονται τα αποτελέσματα των παραπάνω διασταυρώσεων.

ΠΙΝΑΚΑΣ 3.7 Διάσωση της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας του στελέχους wcoffs από το στέλεχος sansim1.

Διασταύρωση Θηλυκό x Αρσενικό	Αριθμός διασταυρώσεων	Αριθμός εμβρύων	Αριθμός μη εκκολαφθέντων εμβρύων	% Εμβρυική θνησιμότητα ± SE
wcoffs x sansim1	18	1211	184	16,3 ± 4,48
sansim1 x wcoffs	16	924	80	9,4 ± 4,33
STCP x wcoffs	16	1460	220	15,6 ± 2,93

18
16
14
12
10
8
6
4
2
0

Έμβρυα που δεν εκκολάφθηκαν (%)

ΕΙΚΟΝΑ 3.11 Παρουσίαση της διάσωσης της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας του στελέχους wcoffs από το στέλεχος sansim1 (resc φαινότυπος).

Στη συνέχεια πραγματοποιήσαμε 15 διασταυρώσεις ανάμεσα στις σειρές ♀ *teisim4* x wCoffs♂ και σε σύνολο 1045 εμβρύων καταμετρήθηκαν 161 έμβρυα που δεν εκκολάφθηκαν, που αναλογεί στο 15,0% του συνόλου των εμβρύων. Ανάμεσα στις σειρές ♀ wCoffs x *teisim4*♂ πραγματοποιήσαμε 11 διασταυρώσεις. Καταμετρήθηκαν 695 έμβρυα, από τα οποία δεν

εκκολάφθηκαν τα 672, δηλαδή ποσοστό 96,4%. Στον πίνακα 3.8 και την εικόνα 3.12 φαίνονται τα αποτελέσματα των παραπάνω διασταυρώσεων.

ΠΙΝΑΚΑΣ 3.8 Διάσωση της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας του στελέχους wcoffs από το στέλεχος teisim4.

Διασταύρωση Θηλυκό x Αρσενικό	Αριθμός διασταυρώσεων	Αριθμός εμβρύων	Αριθμός μη εκκολαφθέντων εμβρύων	% Εμβρυική θνησιμότητα ± SE
wcoffs x teisim4	11	695	672	96,4 ± 2,50
teisim4 x wcoffs	15	1045	161	15,0 ± 4,65
STCP x wcoffs	16	1460	220	15,6 ± 2,93

Εμβρυα που δεν εκκολάφθηκαν (%)
12
10
8
6
4
2

ΕΙΚΟΝΑ 3.12 Παρουσίαση της διάσωσης της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας του στελέχους wcoffs από το στέλεχος teisim4 (resc φαινότυπος).

Τέλος, πραγματοποιήσαμε 19 διασταυρώσεις ανάμεσα στις σειρές ♀ *yaksim14* x *wCoffs* ♂ και σε σύνολο 1567 εμβρύων καταμετρήθηκαν 354 έμβρυα που δεν εκκολάφθηκαν, που αναλογεί στο 21,2% του συνόλου των εμβρύων. Ανάμεσα στις σειρές ♀ *wCoffs* x *yaksim14* ♂ πραγματοποιήσαμε 16 διασταυρώσεις. Καταμετρήθηκαν 1092 έμβρυα, από τα οποία δεν εκκολάφθηκαν τα 154, δηλαδή ποσοστό 12,8%. Στον πίνακα 3.9 και την εικόνα 3.13 φαίνονται τα αποτελέσματα των παραπάνω διασταυρώσεων.

ΠΙΝΑΚΑΣ 3.9 Διάσωση της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας του στελέχους wcoffs από το στέλεχος yaksim14.

Διασταύρωση Θηλυκό x Αρσενικό	Αριθμός διασταυρώσεων	Αριθμός εμβρύων	Αριθμός μη εκκολαφθέντων εμβρύων	% Εμβρυική θνησιμότητα ± SE
wcoffs x yaksim14	16	1092	154	12,8 ± 2,85
yaksim14 x wcoffs	19	1567	356	21,2 ± 4,61
STCP x wcoffs	16	1460	220	15,6 ± 2,93

Εμβρυα που δεν εκκολάφθηκαν (%)
25
20
15
10
5
0

ΕΙΚΟΝΑ 3.13 Παρουσίαση της διάσωσης της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας του στελέχους wcoffs από το στέλεχος yaksim14 (resc φαινότυπος).

4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Χρησιμοποιήσαμε τρεις τεχνητά μολυσμένες σειρές εντόμων της *D. simulans* που έφεραν τρία στελέχη του βακτηριακού στέλεχος *Wolbachia* wSty. Τα στελέχη του βακτηρίου είχαν μεταφερθεί από τους φυσικούς του ξενιστές, *D. santomea*, *D. teissieri* και *D. yakuba*. Με τις κατάλληλες διασταυρώσεις ελέγξαμε τα τεχνητά μολυσμένα άτομα πρώτα για την ικανότητα τους να προκαλούν κυτταροπλασματική ασυμβατότητα και ακολούθως για την ικανότητά τους να διασώζουν την τροποποίηση των μολυσμένων στελεχών της *D. simulans* με τα βακτηριακά στελέχη wNo και wcoffs. Επιλέξαμε το στέλεχος wcoffs γιατί ως πρόσφατα θεωρούνταν το ίδιο στέλεχος με τα στελέχη wSty. Επιλέξαμε ακόμη το wNo στέλεχος επειδή προκαλεί αρκετά υψηλά επίπεδα κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας στο είδος *D. simulans*.

Τα αποτελέσματα, όσον αφορά την ικανότητα πρόκλησης κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας μεταξύ των τριών σειρών δεν ήταν ίδια. Η πρώτη σειρά μολυσμένων εντόμων (*sansim1*) που φέρει την μόλυνση της *D. santomea* φαίνεται να μην έχει την ικανότητα να προκαλεί κυτταροπλασματική ασυμβατότητα (Πιν. 3.1 *sansim1* 24.7 ± 6.46). Η δεύτερη σειρά μολυσμένων εντόμων (*teisim4*) που φέρει την μόλυνση της *D. teissieri* φαίνεται να προκαλεί υψηλού επιπέδου κυτταροπλασματική ασυμβατότητα (Πιν. 3.2 *teisim4* 100 ± 0). Τέλος η τρίτη σειρά μολυσμένων ατόμων (*yaksim14*) που φέρει την μόλυνση της *D. yakuba* φαίνεται να μην έχει την ικανότητα να προκαλεί κυτταροπλασματική ασυμβατότητα (Πιν. 3.3 *yaksim14* 28.1 ± 6.89). Τα αποτελέσματά μας, δείχνουν ότι η αντίληψη που υπήρχε έως τώρα ότι τρία στελέχη ήταν ίδια μεταξύ τους δεν ήταν σωστή, γιατί τουλάχιστον το ένα από αυτά, αυτό που προέρχεται από την *D. teissieri* συμπεριφέρεται διαφορετικά στο νέο του ξενιστή. Μπορούμε να χαρακτηρίσουμε το βακτηριακό αυτό στέλεχος, ως στέλεχος που έχει την ικανότητα της τροποποίησης (mod^+). Η ικανότητα έκφρασης της τροποποίησης φαίνεται να σχετίζεται με το γονιδίωμα του ξενιστή, γιατί στον φυσικό του ξενιστή δεν είχε την ικανότητα αυτή (Zabalou *et al.* 2003).

Τα αποτελέσματα που αφορούν τη διάσωση της τροποποίησης που προκαλεί το wNo στέλεχος δείχνουν ότι και οι τρεις σειρές εντόμων δεν έχουν την ικανότητα να διασώζουν αυτή την τροποποίηση. (Πιν. 3.4 *sansim1* $40,3 \pm 4,04$, Πιν. 3.5 *teisim4* $56,9 \pm 4,97$ και Πιν. 3.6 *yaksim14* $45,8 \pm 7,28$). Είναι γνωστό όμως ότι το βακτηριακό στέλεχος wSty διασώζει το ισχυρό στέλεχος wRi και έχει χαρακτηριστεί ως resc^+ (Zabalou *et al.* 2003). Ακόμη το στέλεχος wNo φαίνεται ότι δεν μπορεί να διασώσει την τροποποίηση που προκαλεί το στέλεχος *teisim4* (Πιν. 3.5 $80,6 \pm 4,79$). Συμπερασματικά μπορούμε να πούμε ότι τα αποτελέσματά μας, δείχνουν καθαρά ότι το βακτηριακό στέλεχος wSty και το στέλεχος wNo είναι ασύμβατα μεταξύ τους.

Τα wSty στελέχη του βακτηρίου *Wolbachia* βάσει της αλληλουχίας του γονιδίου wsp (*Wolbachia* surface protein) είναι ίδια με το στέλεχος wcoffs της *D. simulans*. Το στέλεχος wcoffs είναι ένα χαρακτηρισμένο γενετικά $\text{mod}^- \text{resc}^-$ στέλεχος, το οποίο δεν προκαλεί κυτταροπλασματική ασυμβατότητα (CI) ούτε διασώζει την τροποποίηση άλλων στελεχών. Τα αποτελέσματά μας επιβεβαιώνουν ότι δεν προκαλεί τροποποίηση (Πιν. 3.7 *STCP* $15,6 \pm 2,93$ *sansim1* $9,4 \pm 4,33$, Πιν. 3.8 *teisim4* $15,0 \pm 4,65$ και Πιν. 3.9 *yaksim14* $21,2 \pm 4,61$) και ότι δεν διασώζει την τροποποίηση που προκαλεί το στέλεχος *teisim4* (Πιν. 3.8 $96,4 \pm 2,50$). Δείχνουν επίσης ότι τα στελέχη wSty δεν είναι ίδια με το στέλεχος wcoffs αλλά ούτε και μεταξύ τους.

Συνολικά το στέλεχος wSty που προέρχεται από την *D. teissieri* μπορεί να χαρακτηριστεί ως $\text{mod}^+ \text{resc}^+$ ενώ τα στελέχη που προέρχονται από τις *D. santomea* και *D. yakuba* μπορούν να χαρακτηριστούν ως $\text{mod}^- \text{resc}^+$.

Τα τρία wSty στελέχη του βακτηρίου *Wolbachia* στους φυσικούς τους ξενιστές και το στέλεχος wcoffs της *D. simulans* συμπεριφέρονταν με τον ίδιο γενετικό τρόπο (mod^-). Το ερώτημα που υπήρχε ήταν εάν αυτό συμβαίνει επειδή το wSty δεν είναι ικανό να επάγει τη λειτουργία της τροποποίησης ή επειδή οι φυσικοί του ξενιστές έχουν την ικανότητα να το καταστέλλουν ειδικά.

Όπως φάνηκε όμως όταν το στέλεχος wRi (mod^+) μεταφέρθηκε στις *D. santomea*, *D. teissieri* και *D. yakuba* εξακολουθούσε να επάγει τη λειτουργία της τροποποίησης (mod^+), που σημαίνει πως οι φυσικοί του ξενιστές είναι επιδεκτικοί στην τροποποίηση άλλων στελεχών (Zabalou *et al.* 2003). Τα αποτελέσματα αυτά οδήγησαν στην υπόθεση ότι τα $wSty$ και $wcoffs$ ανήκουν στην ίδια κατηγορία στελεχών. Το $wSty$ όμως διασώζει πλήρως την τροποποίηση που προκαλεί το wRi (resc^+), ενώ το $wcoffs$ όχι (resc^-). Η συμπεριφορά των δύο βακτηρίων διέφερε ως προς αυτή την ικανότητα και η εξήγηση που μπορεί να δοθεί είναι ότι αυτό οφείλεται σε διαφορά ανάμεσα στα δύο αυτά βακτήρια ως προς τα γονίδια που αφορούν στη διάσωση, είτε σε επίδραση του ξενιστή στην έκφραση των γονιδίων. Το ερώτημα που μπήκε ήταν μήπως το $wSty$ είναι ένα mod^+ στέλεχος που καταστέλλεται επιλεκτικά στις *D. santomea*, *D. teissieri* και *D. yakuba*;

Υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός από αναφορές που δείχνουν πως υπάρχει ιδιαίτερη ποικιλία ανάμεσα στα επίπεδα της τροποποίησης που προκαλεί η *Wolbachia* σε διαφορετικούς ξενιστές. Πρόσφατα εξετάστηκε (Veneti *et al.* 2003) η σχέση μεταξύ του επιπέδου της τροποποίησης σε ένα πλήθος από φυσικά και τεχνητά μολυσμένους *Drosophila* ξενιστές, καθώς και η πυκνότητα της *Wolbachia* στους όρχεις των ξενιστών. Τα αποτελέσματά τους έδειξαν την παρουσία δύο κυρίων ομάδων *Drosophila-Wolbachia* σχέσεων: Την ομάδα **I**, η οποία δείχνει μια θετική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας (CI) και του ποσοστού των μολυσμένων σπερματοκύστων (mod^+ φαινότυπος), και την ομάδα **II**, η οποία δεν εξέφρασε CI (mod^- φαινότυπος) ανεξάρτητα από το επίπεδο της μόλυνσης στις σπερματοκύστες. Η ομάδα II θα μπορούσε περαιτέρω να διαιρεθεί σε δύο υποκατηγορίες: Στην πρώτη περιέχονταν τα στελέχη με μεγάλο αριθμό έντονα μολυσμένων με *Wolbachia* σπερματοκύστων, ενώ στη δεύτερη η *Wolbachia* ίσα που ανιχνευόταν στις σπερματοκύστες, ευρισκόμενη κυρίως στα σωματικά κύτταρα. Με βάση αυτήν την ταξινόμηση, η φυσικά μολυσμένες με $wSty$, *D. santomea*, *D. teissieri* και *D. yakuba* ανήκουν στα στελέχη της ομάδας II που δεν εκφράζουν CI (mod^- φαινότυπος) (Veneti *et al.* 2003).

Λαμβάνοντας υπόψη τη μελέτη της Veneti *et al.* (2003), για την έκφραση της CI σε ένα ξενιστή πρέπει να πληρούνται τρεις προϋποθέσεις: α) η *Wolbachia* θα πρέπει να είναι ικανή να τροποποιήσει το σπέρμα (mod^+ γονότυπος), β) η *Wolbachia* θα πρέπει να μολύνει τις σπερματοκύστες και γ) η *Wolbachia* θα πρέπει να βρίσκεται σε ένα επιτρεπτικό για την έκφρασή της ξενιστή.

Το ερώτημα που γεννήθηκε ήταν εάν ο mod^- φαινότυπος που παρατηρούνταν στις *D. santomea*, *D. teissieri* και *D. yakuba* οφείλεται στην καταστολή που δέχεται το βακτήριο από τους ξενιστές ή σε ιδιότητα του ίδιου του βακτηρίου. Για τον λόγο αυτό έγινε η μεταφορά της μόλυνσης σε έναν άλλο ξενιστή, την *D. simulans*, και μελετήσαμε τις ιδιότητες της σε αυτόν.

Στον φυσικό του ξενιστή το στέλεχος $wSty$ συμπεριφέρονταν και στις τρεις περιπτώσεις ως $\text{mod}^-/\text{resc}^+$ στέλεχος, ενώ στο νέο του ξενιστή το στέλεχος το προερχόμενο από την *D. teissieri* συμπεριφέρεται ως $\text{mod}^+/\text{resc}^+$. Η αλλαγή σχετίζεται με την επίδραση του ξενιστή. Το στέλεχος $wSty$ είναι ένα $\text{mod}^+/\text{resc}^+$ που καταστέλλεται ειδικά στον φυσικό του ξενιστή *D. teissieri*. Η *D. simulans* φαίνεται να είναι περισσότερο επιδεκτική ως προς την έκφραση της τροποποίησης του. Τα άλλα δύο βακτηριακά στελέχη συμπεριφέρονται με τον ίδιο τρόπο και στον νέο ξενιστή $\text{mod}^-/\text{resc}^+$.

Ακόμη τα $wSty$ δεν διαφέρουν μεταξύ τους ούτε με το $wcoffs$ ως προς την αλληλουχία του γονιδίου wsp , αλλά φαίνεται να διαφέρουν ως προς τα γονίδια που σχετίζονται με την ικανότητα τροποποίησης και διάσωσης της τροποποίησης.

Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στην μελέτη αυτή δείχνουν την μεγάλη επίδραση του ξενιστή στην έκφραση των ιδιοτήτων του βακτηρίου. Υποδεικνύουν την απαραίτητη μελέτη πολλών διαφορετικών στελεχών του βακτηρίου από διαφορετικούς ξενιστές πριν να βρεθεί η καλύτερη δυνατή σχέση βακτηρίου-εντόμου καθώς και την σοβαρότητα με την οποία πρέπει να αντιμετωπίζονται τέτοιες μεταφορές πριν τα έντομα απελευθερωθούν στην φύση. Είναι όμως ελπιδοφόρα για τη χρήση του βακτηρίου ως μέσο καταπολέμησης των φυσικών πληθυσμών εντόμων, που είναι επιβλαβή στην γεωργία.

5 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Binnington, K. C. and A. A. Hoffmann. 1989. Wolbachia-like organisms and cytoplasmic incompatibility in *Drosophila simulans*. *Journal of Invertebrate Pathology* 54: 344-352.
- Bouchon, D., T. Rigaud, and P. Juchault. 1998. Evidence for widespread Wolbachia infection in isopod crustaceans: molecular identification and host feminization. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 265: 1081-90.
- Bourtzis, K., S.L. Dobson, H.R. Braig and S.L. O'Neill. 1998. Rescuing Wolbachia have been overlooked. *Nature* 391: 852-853.
- K. Bourtzis and S.L. O'Neill 1998. Wolbachia infections and their influence on arthropod reproduction. *Bioscience* 48: 287-293.
- K. Bourtzis and T. Miller eds. (2003). *Insect Symbiosis*. CRC Press, Florida, USA, pp. 347 .
- Boyle, L., S. L. O'Neill, H. M. Robertson, and T. L. Karr. 1993. Interspecific and intraspecific horizontal transfer of Wolbachia in *Drosophila*. *Science* 260: 1796-9.
- Braig, H. R., W. Zhou, S. L. Dobson and S. L. O'Neill (1998). Cloning and characterization of a gene encoding the major surface protein of the bacterial endosymbiont Wolbachia pipientis. *J Bacteriol* 180(9): 2373-8.
- Breeuwer, J. A. J., and J.H. Werren. 1990. Microorganisms associated with chromosome destruction and reproductive isolation between two insect species. *Nature* 346: 558-560.
- Bressac, C. and F. Rousset. 1993. The reproductive incompatibility system in *Drosophila simulans*: Dapi-staining analysis of the Wolbachia symbionts in sperm cysts. *Journal of Invertebrate Pathology* 61: 226-230.
- Callaini, G., R. Dallai and M.G. Riparbelli. 1994. The distribution of cytoplasmic bacteria in the early *Drosophila* embryo is mediated by astral microtubules. *Journal of Cell Science* 107: 673-682.
- Callaini, G., M.G. Riparbelli, R. Giordano and R. Dallai. 1996. Mitotic defects associated with cytoplasmic incompatibility in *Drosophila simulans*. *Journal of Invertebrate Pathology* 67: 55-64.
- Callaini, G., R. Dallai and M.G. Riparbelli. 1997. Wolbachia-induced delay of paternal chromatin condensation does not prevent maternal chromosomes from entering anaphase in incompatible crosses of *Drosophila simulans*. *Journal of Cell Science* 110: 271-280.
- Charlat, S., K. Bourtzis, and H. Mercot. 2002. *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility. In *Symbiosis: mechanisms and model systems* (Seckbach, J. ed). *Kluwer Academic Publisher, Dordrecht*, pp621-644.
- Charlat, S., L. Le Chat and H. Mercot. 2003. Characterization of non-cytoplasmic incompatibility inducing *Wolbachia* in two continental African populations of *Drosophila simulans*. *Heredity* 90: 49-55.
- Ghelelovitch, S. 1952. Sur la determinisme genetique de la sterilité dans le croisement entre differentes souches de *Culex autogenicus* Roubaud. *C. R. Acad. Sci. Paris* 24: 2386-88.
- Giordano, R., S.L. O'Neill and H.M. Robertson. 1995. *Wolbachia* infections and the expression of cytoplasmic incompatibility in *Drosophila sechellia* and *D. mauritiana*. *Genetics* 140: 1307-1317.
- Hadfield, S. J. a. J. M. Axton. 1999. Germ cells colonized by endosymbiotic bacteria. *Nature* 402: 482.
- Hertig, M. 1936. The Rickettsia, *Wolbachia pipientis*(Gen. et sp. n.) and associated inclusions of the mosquito, *Culex pipiens*. *Parasitology* 28: 453-486.
- Hertig, M., and S. B. Wolbach. 1924. Studies on rickettsia-like microorganisms in insects. *J. Med. Res.* 44.

- Hoffmann, A. A., D. Clancy and J. Duncan. 1996. Naturally-occurring *Wolbachia* infection in *Drosophila simulans* that does not cause cytoplasmic incompatibility. *Heredity* 76: 1-8.
- Hoffmann, A. A., M. Turelli and G.M. Simmons. 1986. Unidirectional incompatibility between populations of *Drosophila simulans*. *Evolution* 40: 692-701.
- Hurst, G. D., T. C. Hammarton, J. J. Obrycki, T. M. Majerus, L. E. Walker, D. Bertrand and M. E. Majerus (1996). Male-killing bacterium in a fifth ladybird beetle, *Coleomegilla maculata* (Coleoptera:Coccinellidae). *Heredity* 77(Pt 2): 177-85.
- Karr, T. L., W. Yang and M.E. Feder. 1998. Overcoming cytoplasmic incompatibility in *Drosophila*. *Proceedings of Royal Society of London Biological Series* 265: 391-395.
- Knight, J. 2001. Meet the Herod bug. *Nature* 412: 12-4.
- Kose, H. and T. L. Karr (1995). Organization of *Wolbachia pipientis* in the *Drosophila* fertilized egg and embryo revealed by an anti-*Wolbachia* monoclonal antibody. *Mech Dev* 51(2-3): 275-88.
- Lachaise D., P. Capy M.-L. Cariou, D. Joly, F. Lemeunier, J. R. David. 2003. Nine relatives from one African ancestor: the population biology of the *Drosophila melanogaster* subgroup species. In *The evolution of population biology. Modern synthesis*, R. Singh, S. Jain, M. Uyenoyama, Eds., *Lewontin Festschrift Vol. 3, 2002. Cambridge University Press, Cambridge* (in press).
- Lachaise D., M. Harry, M. Solignac, F. Lemeunier, V. Benassi and M. L Cariou. 2000. Evolutionary novelties in islands: *Drosophila santomea*, a new *melanogaster* sister species from Sao Tome. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 267: 1487-95.
- Lassy, C. W. and T. L. Karr. 1996. Cytological analysis of fertilization and early embryonic development in incompatible crosses of *Drosophila simulans*. *Mechanisms of Development* 57: 47-58.
- Laven, H. 1951. Crossing experiments with *Culex* strains. *Evolution* 5.
- Laven, H. 1959. Speciation by cytoplasmic isolation in the *Culex pipiens* complex. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 24.
- Louis, C. and L. Nigro. 1989. Ultrastructural evidence of *Wolbachia Rickettsiales* in *Drosophila simulans* and their relationships with unidirectional cross-incompatibility. *Journal of Invertebrate Pathology* 54: 39-44.
- Mercot, H., B. Llorente, M. Jacques, A. Atlan, and C. Montchamp-Moreau. 1995. Variability within the Seychelles cytoplasmic incompatibility system in *Drosophila simulans*. *Genetics* 141: 1015-23.
- O'Neill, S. L. and T. L. Karr. 1990. Bidirectional incompatibility between conspecific populations of *Drosophila simulans*. *Nature* 348: 178-180.
- Poinsot, D., K. Bourtzis, G. Markakis, C. Savakis, and H. Mercot. 1998. *Wolbachia* transfer from *Drosophila melanogaster* into *D. simulans*: Host effect and cytoplasmic incompatibility relationships. *Genetics* 150: 227-37.
- Stouthamer, R., J.A.J. Breeuwer, R.F. Luck and J.H. Werren. 1993. Molecular identification of microorganisms associated with parthenogenesis. *Nature* 361: 66-68.
- Veneti, Z., M. E. Clark, S. Zabalou, T. L. Carr, C. Savvakis and K. Bourtzis. 2003. Cytoplasmic incompatibility and sperm cyst infection in different *Drosophila-Wolbachia* associations. *Genetics* 164:545-552.
- Veneti, Z. 2003. Cytoplasmic Incompatibility: a comparative study of *Wolbachia* strains in *Drosophila*. *Ph. D. Thesis*
- Werren, J. H. 1997. Biology of *Wolbachia*. *Annual Review of Entomology* 42: 587-609.
- Werren, J. H., W. Zhang, and L. R. Guo. 1995. Evolution and phylogeny of *Wolbachia*: reproductive parasites of arthropods. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 261: 55-63.
- Yen, J. H., and A. R. Barr. 1971. New hypothesis of the cause of cytoplasmic incompatibility in *Culex pippins*. *Nature* 232: 657-658.

- Zabalou, S., Charlat, S., Nirgianaki, A., Lachaise, D., Mercot, H., and Bourtzis, K. 2003. Natural *Wolbachia* infections in the *Drosophila yacuba* species complex do not induce cytoplasmic incompatibility but fully rescue the *w*Ri modification. *Genetics* 167:827-834.
- Zhou, W., F. Rousset, and S. O'Neil. 1998. Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strains using *wsp* gene sequences. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 265: 509-15.
- Zimmer, C. 2001. *Wolbachia*. A tale of sex and survival. *Science* 292: 1093-5.