

**Α.Τ.Ε.Ι. ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΘΕΡΜΟΚΗΠΙΑΚΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΚΑΙ ΑΝΘΟΚΟΜΙΑΣ**

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Μεταφορά του [male-killing] στελέχους του βακτηρίου
Wolbachia στη *Drosophila simulans* με σκοπό την πιθανή
χρήση του στην βιολογική καταπολέμηση επιβλαβών
εντόμων.**

Σπουδαστής: ΕΜΜΑΝΟΥΗΛ ΤΡΙΓΩΝΗΣ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2006

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την καθηγήτρια μου, κ. Ζαμπάλου Σοφία για την ανάθεση του θέματος της πτυχιακής εργασίας μου, καθώς επίσης για την καθοδήγηση και βοήθεια που μου παρείχε σε όλη την διάρκεια της.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Χ. Σαββάκη, καθηγητή Μοριακής Γενετικής του τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Κρήτης για την απεριόριστη πρόσβαση στο χώρο και στον εξοπλισμό του εργαστηρίου Μοριακής Γενετικής Εντόμων του Ι.Τ.Ε..

Ακόμα θα ήθελα να ευχαριστήσω το εκπαιδευτικό προσωπικό και τους σπουδαστές του εργαστηρίου που με δέχτηκαν τόσο φιλικά.

Δεν πρέπει να ξεχάσω τους φίλους και τους γονείς μου για την βοήθεια που απλόχερα μου έδωσαν σε κάθε δύσκολη στιγμή της φοιτητικής μου σταδιοδρομίας.

Τέλος ευχαριστώ το Θεό, που μου έδωσε δύναμη και πίστη να ξεπεράσω κάθε δυσκολία και ολοκληρώσω τις προσπάθειες μου.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Γενικά

Τα βακτήρια του γένους *Wolbachia* είναι υποχρεωτικά ενδοκυτάρια, μητρικά κληρονομούμενα βακτήρια, τα οποία μολύνουν ένα πλήθος ξενιστών όπως έντομα, ακάρεα, καρκινοειδή (O'Neill 1997, Werren 1997, Bourtzis and O'Neill 1998, Bourtzis and Braig 1999, Stouthamer *et al.* 1999, Stevens *et al.* 2001, Bourtzis and Miller 2003), αράχνες (Oh *et al.* 2000) και νηματώδεις (Taylor and Hoerauf 1999). Ανήκουν στην α-υποομάδα των πρωτεοβακτηρίων (O'Neill *et al.* 1992), στην οικογένεια *Rickettsiaceae*. Προκαλούν πληθώρα ανωμαλιών στους ξενιστές τους που προέρχονται από την αναπαραγωγική διαδικασία, όπως παρθενογένεση, θηλυκοποίηση, θανάτωση αρσενικών και κυτταροπλασματική ασυμβατότητα (cytoplasmic incompatibility, **CI**), (Bourtzis and Miller 2003).

Το ενδιαφέρον των ερευνητών για την *Wolbachia* έχει μεγαλώσει γιατί πλέον ότι είναι ίσως το πιο κοινό μολυσματικό παράσιτο στη γη, έχει την ιδιότητα να εκμεταλλεύεται τη σεξουαλική ζωή των ξενιστών της για δικό της όφελος. Έχει αποδειχτεί ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως όπλο για την καταπολέμηση παρασίτων που βλάπτουν τη γεωργία και την υγεία (Knight 2001, Zimmer 2001).

1.2 Ιστορική ανασκόπηση

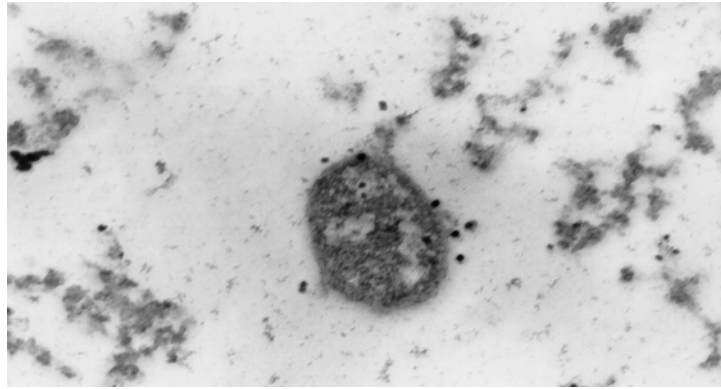
Τα βακτήρια *Wolbachia* πρωτοαναφέρθηκαν στη βιβλιογραφία το 1924, από τους Hertig και Wolbach (Hertig and Wolbach 1924), ως βακτήρια που μοιάζουν με ρικέτσιες (*Rickettsiaceae*), στις ωοθήκες του κουνουπιού *Culex pipiens*. Επίσημη ονομασία τους δόθηκε το 1936, *Wolbachia pipientis* (Hertig 1936). Διάφοροι ερευνητές όπως οι Laven (1951), Ghelelovitch (1952), Yen και Barr (1971) πειραματίστηκαν με το κουνούπι *Culex pipiens* και ανακάλυψαν ότι προέκυπταν ασύμβατες διασταυρώσεις, δηλαδή δεν άφηναν απογόνους. Αυτές οι διασταυρώσεις γινόταν συμβατές με την παροχή αντιβιοτικών. 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 (O'Neill 1997, Werren 1997, Bourtzis and O'Neill 1998, Bourtzis and Braig 1999, Stouthamer *et al.* 1999, Stevens *et al.* 2001, Bourtzis and Miller 2003). 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 μια μονοφυλετική ομάδα την *Wolbachia*.

1.3 Μορφολογική περιγραφή

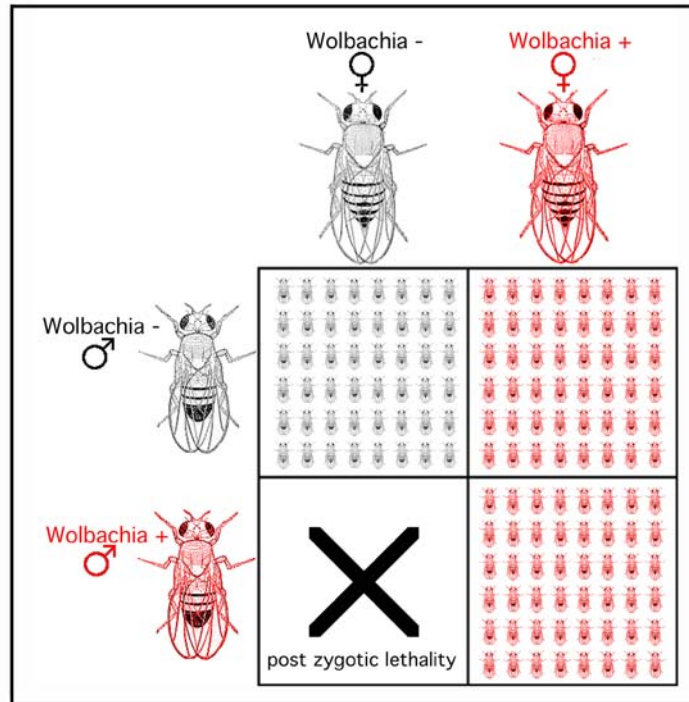
Τα γενικά χαρακτηριστικά τους είναι αυτά των *Rickettsiaceae*. Είναι διμορφικά και φτιάχνουν μικρούς ραβδοειδείς (0.5-1.3 μm σε μήκος) και κοκκοειδείς (0.25-0.5 μm σε διάμετρο) σχηματισμούς. Η *Wolbachia* βρίσκεται μέσα σε κυστίδια που περιβάλλονται από τρεις μεμβράνες. Η εξωτερική μεμβράνη προέρχεται 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 ωοθήκες και στους όρχεις, αλλά και αλλού όπως στον εγκέφαλο, σιελογόνους αδένες, μυς, αιμολέμφο, φτερά, μαλπιγγιανά σωληνάρια, έντερο και λιπαρό σώμα.



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

1.4 Επιπτώσεις της *Wolbachia* στους ξενιστές

Η *Wolbachia* προκαλεί ένα πλήθος αναπαραγωγικών ανωμαλιών στους ξενιστές της, έτσι ώστε να ευνοείται η κάθετη μετάδοση και εξάπλωσή της. Η πρώτη αναφορά πάνω στις ανωμαλίες αυτές έγινε από τους Yen και Barr το 1971 (Yen and Barr 1973), οι οποίοι ανακάλυψαν ότι η ασυμβατότητα που είχε παρατηρηθεί στις διασταυρώσεις ανάμεσα στα κουνούπια *Culex pipiens* σχετίζεται άμεσα με τη μόλυνση με *Wolbachia*. Η ασυμβατότητα αυτή ονομάζεται κυτταροπλασματική ασυμβατότητα (cytoplasmic incompatibility, CI) και στην απλούστερη μορφή της είναι θάνατος των μη μολυσμένων εμβρύων που έχουν μολυνθεί από μολυσμένο σπέρμα. Στη συνέχεια διαπιστώθηκε ότι τα βακτήρια προκαλούν και άλλες ανωμαλίες στην αναπαραγωγή των ξενιστών τους όπως παρθενογένεση (Stouthamer *et al.* 1993), θηλυκοποίηση (Bouchon *et al.* 1998) και θανάτωση αρσενικών (Hurst *et al.* 1996). Παρακάτω παρουσιάζονται αναλυτικότερα οι επιπτώσεις της *Wolbachia* στους διάφορους ξενιστές της.



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 εισβάλουν σε ένα μη μολυσμένο πληθυσμό.

- ***Wolbachia* και κυτταροπλασματική ασυμβατότητα**

Η *Wolbachia* προκαλεί σε μια πληθώρα εντόμων κυτταροπλασματική ασυμβατότητα (CI) (Charlat *et al.* 2002, Bourtzis *et al.* 2003), σε μερικά ισόποδα (Moret *et al.* 2001) και ακάρεα (van Orijnen and Breeuwer 1999). Περιληπτικά, η CI είναι μία μορφή εμβρυϊκής θνησιμότητας σε διασταυρώσεις μεταξύ μολυσμένων αρσενικών με μη μολυσμένα θηλυκά (Εικ.1.2).

- ***Wolbachia* και παρθενογένεση**

Η *Wolbachia* προκαλεί παρθενογένεση σε διάφορα είδη υμενοπτέρων (Stouthamer 1997), σε ένα γένος φυτοφάγων ακάρεων (Weeks and Breeuwer 2001) και σε ένα είδος θυσανόπτερον (Arakaki *et al.* 2001).

- ***Wolbachia* και θηλυκοποίηση**

Η *Wolbachia* προκαλεί θηλυκοποίηση σε διάφορα είδη χερσαίων ισόποδων (καρκινοειδή) (Bouchon *et al.* 1998) και σε ένα είδος λεπιδοπτέρου

(Fujii *et al.* 2001). 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.

- ***Wolbachia* και θανάτωση αρσενικών**

Η *Wolbachia* προκαλεί θάνατο αρσενικών εμβρύων σε λεπιδόπτερα (Dyson *et al.* 2002), κολεόπτερα (Majerus *et al.* 2000) και σε ένα είδος Δροσόφιλας (Hurst *et al.* 2000). Το βακτήριο στα έντομα αυτά σκοτώνει τα αρσενικά έμβρυα, με άγνωστο μέχρι στιγμής τρόπο.

1.5 Θανάτωση αρσενικών

Έρευνες έχουν δείξει ότι τα βακτήρια που προκαλούν θανάτωση αρσενικών (male-killing) προέρχονται από πολλούς διαφορετικούς κλάδους. Η επιβεβαίωση της ύπαρξης αυτών των βακτηρίων προέρχεται από την μέθοδο PCR μεταξύ μολυσμένων και μη μολυσμένων σειρών εντομών. Βακτήρια "male-killing" έχουν βρεθεί στο γένος *Spiroplasma* (στην ομάδα των φλαβοβακτηρίων) και σε κάποιες ομάδες πρωτεοβακτηρίων.

Στο γένος *Spiroplasma* τα πιο πολλά είδη έχουν μόνο οριζόντια μεταφορά ή μια ανάμειξη οριζόντιας και κάθετης ανάμεσα σε ξενιστές και αρθρόποδα.

Στο γένος *Rickettsia* έχει και αυτό μίξη οριζόντιας και κάθετης μεταφοράς, με την οριζόντια να εμφανίζεται μετά από φάγωμα από σπονδυλωτό ξενιστή. Τέλος στα φλαβοβακτήρια όπου υπάρχει η *Wolbachia* μεταφέρεται κάθετα, αλλά διαφέρει κατά πολύ από τις παραπάνω μεταφορές και συνήθως επιβιώνει με διάφορους χειρισμούς πάνω στην αναπαραγωγική διαδικασία των ξενιστών.

Ο τρόπος με τον οποίο λαμβάνει χώρα η θανάτωση των αρσενικών δεν είναι τελείως γνωστός οι περισσότερες πληροφορίες προέρχονται από την μελέτη της επίδρασης του *Spiroplasma roussonii* στη *Drosophila*. Οι

πληροφορίες λένε ότι ο θάνατος προέρχεται είτε από ανωμαλίες της μιτωτικής διαίρεσης, πριν τη γαστριλλίωση, είτε από κατάρρευση των εσωτερικών δομών και πύκνωση του πυρήνα των εμβρύων, μετά την γαστριλλίωση.

Επίσης σχετίζεται με την απουσία ενός πεπτιδίου του Sxl που έχει σχέση με την ισοστάθμιση δόσης των γονιδίων στο X χρωμόσωμα στα έντομα (αναλογία για αρσενικά X:2N, ενώ για τα θηλυκά 2X:2N), αύξηση του όγκου του σώματος στα αρσενικά.

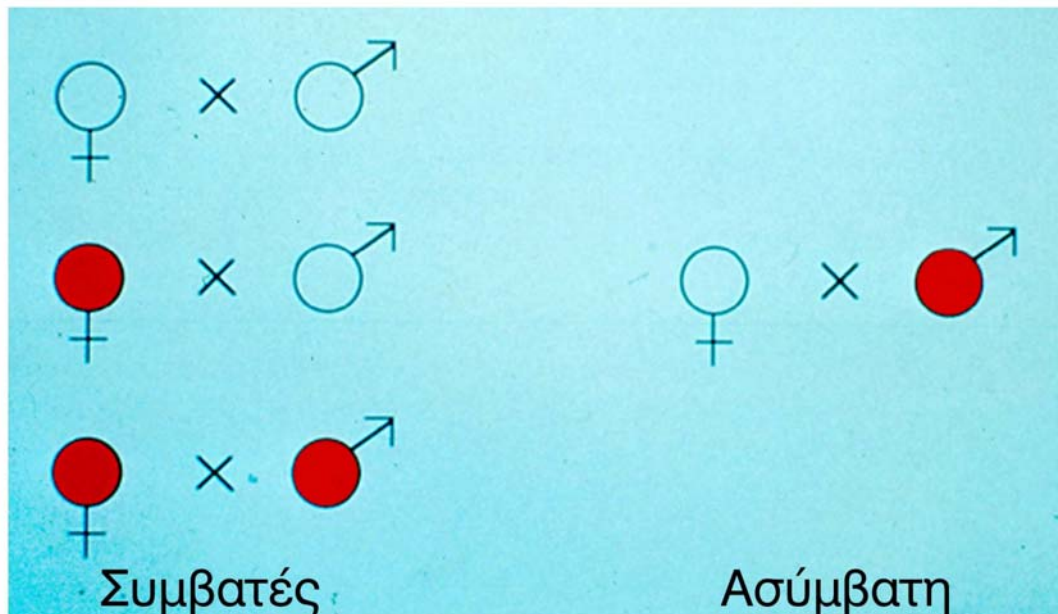
Η προσβολή των πληθυσμών των ξενιστών από βακτήρια του τύπου αυτού, επηρεάζει την δυναμική τους αλλά και το μέγεθος τους. Η αλλαγή τρόπου σύζευξης λόγω έλλειψης αρσενικών, ο αριθμός των αυγών, αλλά και η ανάπτυξη παράσιτων είναι σημαντικοί παράμετροι που θα αλλάξουν. Όμως επειδή δεν υπάρχει τέλεια κάθετη μεταφορά δεν κινδυνεύει να αφανιστεί ο πληθυσμός του ξενιστή. Ωστόσο μπορεί να μεταβάλει το ποσοστό των βακτηρίων από τόπο σε τόπο. Ενδεικτικό είναι το παράδειγμα στο σκαθάρι *Gastrolina depressa* στην Ιαπωνία όπου το ποσοστό ύπαρξης των βακτηρίων αυτών φτάνει το 80% στα κεντρικά τμήματα της χώρας ενώ στο νότιο και βόρειο τμήμα είναι 0%. Το φυσιολογικό ποσοστό είναι 5 έως 50 % (π.χ. 1-5% στην *Drosophila*), ενώ φτάνει το 90% στην πεταλούδα *Acraea encedana*.

1.6 Κυτταροπλασματική ασυμβατότητα

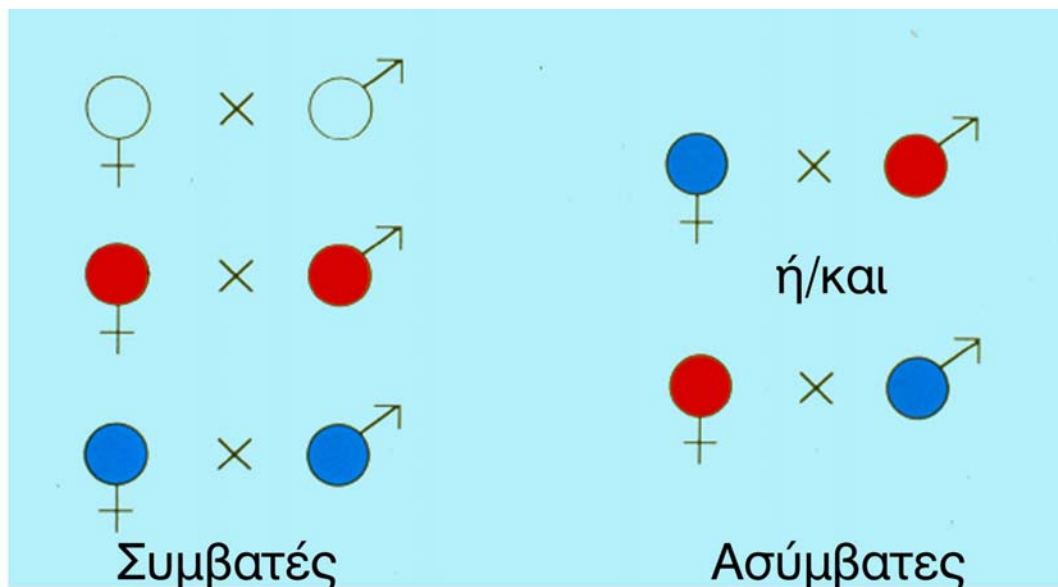
- **Περιγραφή**

Η *Wolbachia* αναγνωρίστηκε ως η αιτία που προκαλούσε CI σε κουνούπια το 1971 από τους Yen και Barr (1971). Η CI περιγράφεται ως η εμβρυϊκή θνησιμότητα, που προκύπτει από τη διασταύρωση μολυσμένων αρσενικών με μη μολυσμένα θηλυκά (μονόδρομη) (Εικ. 1.3) ή με θηλυκά μολυσμένα με διαφορετικό βακτηριακό στέλεχος (αμφίδρομη) (Εικ. 1.4). Συνεπώς τα μολυσμένα θηλυκά έχουν επιλεκτικό πλεονέκτημα, μια και μπορούν να διασταυρώνονται με όλα τα αρσενικά του πληθυσμού (μη μολυσμένα και μολυσμένα) και κατ' επέκταση βοηθούν το βακτήριο να εξαπλώνεται. Η CI είναι ευρέως εξαπλωμένη στα αρθρόποδα και μέχρι στιγμής έχει παρατηρηθεί σε έντομα, ακάρεα και ισόποδα. Συγκεκριμένα στα

έντομα εκτός από τα δίπτερα έχει περιγραφεί σε κολεόπτερα (Wade and Stevens 1985), υμενόπτερα (Reed and Werren 1995), ομόπτερα (Hoshizaki and Shimada 1995), ισόπτερα (Bandi *et al.* 1997), λεπιδόπτερα (Brower 1976), ορθόπτερα (Kamoda *et al.* 2000) και ίσως αποτελεί τον πιο κοινό φαινότυπο που επάγεται από τη *Wolbachia*.



ΕΙΚΟΝΑ 1.3: Μονόδρομη κυτταροπλασματική ασυμβατότητα μεταξύ μολυσμένων και μη μολυσμένων εντόμων. Τα κόκκινα σύμβολα αντιστοιχούν σε έντομα μολυσμένα με *Wolbachia*.



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

- **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 σώσουν 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.

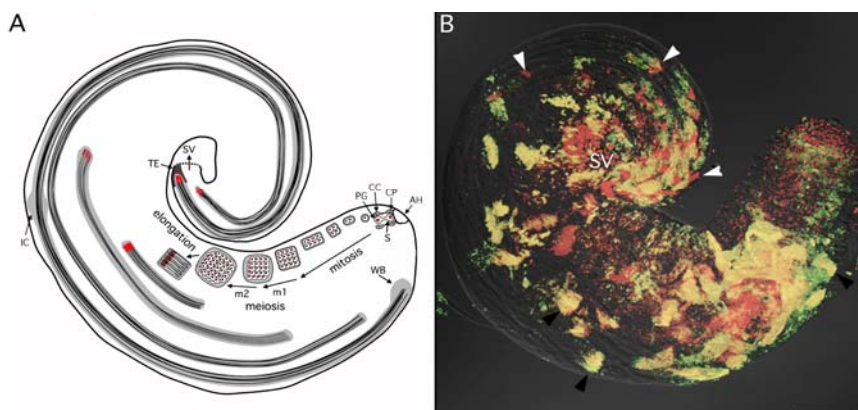
Η *Wolbachia* βρίσκεται άφθονη στους όρχεις των αρσενικών που παρουσιάζουν υψηλά επίπεδα CI (Veneti Z., 2003). Κατά την ωρίμανση του σπέρματος το κυτταρόπλασμα απομακρύνεται και αδειάζει μέσα στον κάδο απορριμμάτων (*waste bag*). Κατά τη διαδικασία αυτή φαίνεται ότι απομακρύνονται και τα βακτηριακά κύτταρα (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.

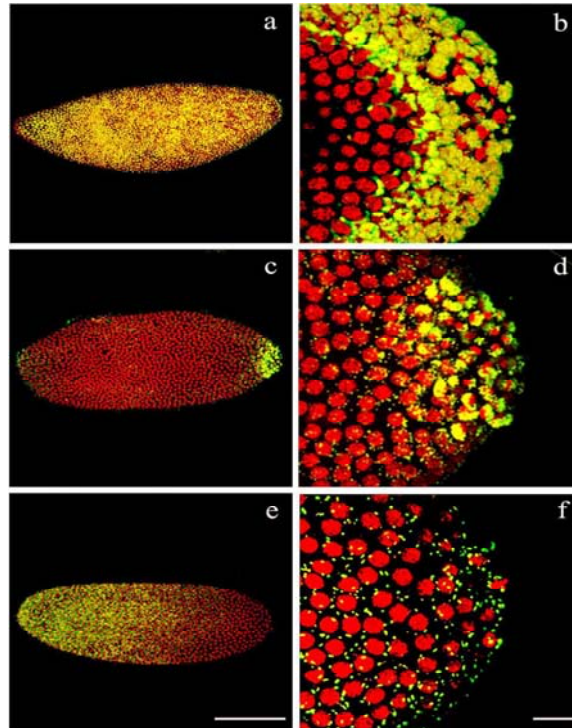
Κυτταρολογικές μελέτες έδειξαν ότι η γονιμοποίηση λαμβάνει χώρα κανονικά στις ασύμβατες διασταυρώσεις (Kose and Karr 1995). Επιπρόσθετα, το ώριμο σπέρμα δε φέρει βακτήρια, μια και αυτά απομακρύνονται μαζί με άλλα κυτταροπλασματικά συστατικά, κατά το τελευταίο στάδιο της ωρίμανσής του. Στη *Drosophila*, 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)

1.7 Σκοπός της μελέτης του βακτηρίου *Wolbachia*

Σήμερα στον κλάδο της γεωργίας υπάρχει έντονο ενδιαφέρον για μεθόδους βιολογικής καταπολέμησης εντόμων βλαβερών για τη γεωργία. 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.

Πιθανές εφαρμογές στη βιολογική καταπολέμηση επιβλαβών εντόμων στη γεωργία είναι:

1. Η *Wolbachia* επαγόμενη κυτταροπλασματική ασυμβατότητα μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μηχανισμός εξάπλωσης επιθυμητών γονιδίων σε φυσικούς πληθυσμούς εντόμων (π.χ. γονίδια που θα εμποδίζουν τη μετάδοση παθογενών μικροοργανισμών από βλαβερά έντομα σε φυτά, ζώα ή σε ανθρώπους. Κάθε παράγοντας (π.χ. συμβιωτικοί οργανισμοί ή

ιοί) που βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα των εντόμων και είναι μητρικά μεταδιδόμενος, θα εξαπλώνεται μαζί με τη *Wolbachia*, καθώς πλήρης μητρική μετάδοση οδηγεί σε κάθετα μεταδιδόμενες σειρές παραγόντων. Συνεπώς, αν κατάλληλα γονίδια εκφραστούν από τη *Wolbachia* από οποιοδήποτε άλλο μητρικά κληρονομούμενο οργανισμό, τότε τα γονίδια αυτά θα εξαπλωθούν στον πληθυσμό μαζί με τη *Wolbachia*..

2. Μείωση και καταστολή των φυσικών πληθυσμών βλαβερών εντόμων μέσω της από τη *Wolbachia* επαγόμενης κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας (CI). Η κυτταροπλασματική ασυμβατότητα χρησιμοποιήθηκε στο παρελθόν με τρόπο ανάλογο της τεχνικής στείρωσης 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 από τη *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.

1.8 Γιατί χρησιμοποιούμε τη *Drosophila* στα πειράματα;

Θα αναρωτηθεί κανείς γιατί στα πειράματα χρησιμοποιούμε τις δροσόφιλες και όχι κάποιο άλλο είδος εντόμου, που είναι και μεγάλης γεωργικής σημασίας. Η απάντηση δίνεται παρακάτω:

1. Είναι μικρές σε μέγεθος και μπορούμε να τις μεταχειριστούμε εύκολα.
2. Μπορούμε να τις αναισθητοποιήσουμε εύκολα και να χειριστούμε τα άτομα με πολύ απλό εξοπλισμό.
3. Οι δροσόφιλες είναι διμορφικές (αρσενικά και θηλυκά έντομα διαφέρουν μορφολογικά), διευκολύνοντας έτσι το διαχωρισμό των φύλων.
4. Είναι εύκολο να πάρουμε παρθένα αρσενικά και θηλυκά, καθώς τα παρθένα διακρίνονται από τα ώριμα ενήλικα.

5. Η δροσόφιλα έχει μικρό κύκλο ζωής (12 – 15 ημέρες) και έχει καλή προσαρμοστικότητα σε θερμοκρασία δωματίου.
6. Η φροντίδα και διατήρηση των πληθυσμών απαιτεί λίγο και φτηνό εξοπλισμό και καταλαμβάνουν λίγο χώρο στο εργαστήριο, ακόμα και αν πρόκειται για μεγάλους πληθυσμούς.
7. Σήμερα μας είναι γνωστό όλο το γονιδίωμα της δροσόφιλας, πράγμα που διευκολύνει τα γενετικά πειράματα.

Για τους παραπάνω λόγους λοιπόν χρησιμοποιούμε τη δροσόφιλα για τα πειράματά μας και αφού φτάσουμε σε ένα προχωρημένο στάδιο, μπορούμε να τα μεταφέρουμε στα είδη εντόμων που μας ενδιαφέρουν από γεωργική άποψη.

1.9 Κύκλος ζωής της *Drosophila*

Ο κύκλος ζωής της δροσόφιλας, από το στάδιο του εμβρύου ως το θάνατο του τέλειου εντόμου, είναι 12 – 15 ημέρες. Αναλυτικότερα, ο κύκλος έχει ως εξής: Μια ημέρα αφού το θηλυκό αποθέσει τα έμβρυα (αυγά) βγαίνουν οι προνύμφες, οι οποίες τρώνε και αναπτύσσονται συνεχώς για 4 ημέρες (έχουμε 3 στάδια προνύμφης σ' αυτό το διάστημα). Όταν αναπτυχθούν, την 7η ημέρα από το στάδιο του εμβρύου, οι προνύμφες σχηματίζουν ρυρα (κουκούλι) για να μεταμορφωθούν σε τέλεια έντομα. Το στάδιο της νύμφης διαρκεί 5 ημέρες. Κατόπιν βγαίνουν από την νύμφης ως τέλεια, φτερωτά έντομα πια όπου αναπαράγονται και πεθαίνουν. Τα θηλυκά γίνονται αναπαραγωγικά ώριμα 8 – 10 ώρες μετά την έξοδό τους από την νύμφη.

1.10 Σκοπός παρούσας εργασίας

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη του βακτηρίου που προκαλεί θανάτωση στα αρσενικά και προέρχεται από την *D. Innubila*. Θέλαμε να δούμε αν ο φαινότυπος που προκαλεί είναι καθαρά ιδιότητα του βακτηρίου ή σχετίζεται με τον ξενιστή στον οποίο βρίσκεται το βακτήριο. Για το λόγο αυτό μεταφέραμε με μικροενέσεις από την *D. Innubila*, στη *D. simulans*,

το στέλεχος “Male- killing”. Με τη μέθοδο PCR αποδείξαμε ότι πράγματι το έντομο είναι μολυσμένο και στη συνέχεια ελέγξαμε αν στον νέο ξενιστή, *D. simulans*, προκαλεί θανάτωση αρσενικών ή κάποιο άλλο φαινόμενο όπως η κυτταροπλασματική ασυμβατότητα.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Στέλεχη και καλλιέργειες εντόμων

1. *Drosophila simulans* STCP –Το στέλεχος αυτό δεν είναι μολυσμένο με *Wolbachia*.

2. *Drosophila simulans* σειρές 4, 24, 30, 45. Οι σειρές αυτές προήλθαν από την *Drosophila simulans* STCP μετά από μόλυνση τεχνητά στο εργαστήριο με το στέλεχος του βακτηρίου male-killing που πάρθηκε από την *Drosophila innubila*.

Όλα τα έντομα μεγάλωσαν στους 25⁰C σε θρεπτικό υλικό καλαμποκάλευρου, άγαρ, ζάχαρης και μαγιάς, (60g καλαμποκάλευρο, 10g άγαρ, 20g ζάχαρη, 50g μαγιά, 0,15g Nitrogen και νερό μέχρι το 1Lt) κάτω από αραιές πληθυσμιακές συνθήκες (50 περίπου προνύμφες / φιαλίδιο).

2.2 Έλεγχος της ύπαρξης του βακτηρίου

Το συνολικό DNA απομονώνεται από μεμονωμένες θηλυκές μύγες *Drosophila simulans* ακολουθώντας την STE μέθοδο (O' Neil *et al.* 1992). Η παρουσία της *Wolbachia* επιβεβαιώνεται χρησιμοποιώντας τους ειδικούς εκκινητές wsp 81F (5'-TGGTCCAATAAGTGATGAAGAAAC-3') και 691R (5'-AAAAATTAACGCTACTCCA-3') οι οποίοι πολλαπλασιάζουν ένα κομμάτι DNA μεγέθους περίπου 600 βάσεων (600bp). Το ακριβές μέγεθος ποικίλλει ανάλογα με το βακτηριακό στέλεχος (Braig *et al.* 1998, Zhou *et al.* 1998).

2.3 Εξαγωγή DNA από έντομα (STE μέθοδος)

Το κάθε άτομο ομογενοποιείται μέσα σε ένα μικροσωληνάκι (microtube) τύπου Eppendorf των 1.5ml που περιέχει 50μl STE buffer 1x (100mM NaCl₂, 10mM Tris HCl-pH 8.0, 1mM EDTA-pH 8.0) και 1μl proteinase K (20mg/L)].

Στη συνέχεια τα μικροσωληνάκια μεταφέρονται σε ένα θάλαμο με θερμοκρασία 37°C για 30 λεπτά, για να επωαστεί το μείγμα και να δράσει η πρωτεΐνάση. Μετά το πέρας των 30' τα μικροσωληνάκια τοποθετούνται για 5 λεπτά σε heat blocks στους 95°C για να επωαστεί το μείγμα και να απενεργοποιηθεί η πρωτεΐνάση (prot K). Τέλος φυγοκεντρούνται για 6 λεπτά στις 12000 στροφές ανά λεπτό, για να διαχωριστεί το DNA από τα μη ομογενοποιημένα κομμάτια του εντόμου.

2.4 PCR (Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης)

Μέσα σε μικροσωληνάκι (ένα για κάθε άτομο) εισάγονται τα εξής: 2,5μl buffer (10x), 2,5μl dNTPs (νουκλεοτίδια) 0,2 mM, 1,5μl MgCl₂ (1,5mM), 0,5μl από τον wsp υποκινητή 81F (20pmol), 0,5μl από τον wsp υποκινητή 691R (20pmol), 0.3μl Taq πολυμεράση (1,5u/reaction) και 16,2μl H₂O. Τέλος, προστίθεται 1μl από το DNA που πήραμε από την εξαγωγή του με την STE μέθοδο. Τα μικροσωληνάκια τοποθετούνται στη συσκευή της PCR για να πολλαπλασιαστεί το DNA. Το πρόγραμμα που χρησιμοποιείται είναι το παρακάτω:

1. 94°C για 2' έτσι ώστε να γίνει αποδιάταξη των αλυσίδων του DNA.
2. 94°C για 30" έτσι ώστε να γίνει αποδιάταξη των αλυσίδων του DNA.*
3. 55°C για 30" έτσι ώστε να κολλήσουν οι υποκινητές στις ειδικές θέσεις.*
4. 72°C για 1' έτσι ώστε να δουλέψει το ένζυμο (Taq polymerase) και να επανασχηματιστεί η διπλή έλικα του DNA.*
5. 72°C για 10' για να ολοκληρωθούν τα τυχόν ατελή κομμάτια.

* Τα βήματα 2-4 επαναλαμβάνονται 35 φορές προτού η διαδικασία προχωρήσει στο βήμα 5.

Αφού τελειώσει η όλη διαδικασία, προστίθενται σε κάθε μικροσωληνάκι 5μl χρωστικής "Orange C" και είναι έτοιμα για ηλεκτροφόρηση. Η ηλεκτροφόρηση έγινε σε διάλυμα 1% (100 ml TAE (1x), 1g Agarose).

2.5 Φωτογραφία

Οι λήψεις των φωτογραφιών του πηκτώματος έγιναν με την **Kodak DC120 Electrophoresis Documentation and Analysis Camera** και η επεξεργασία τους στον υπολογιστή με τη βοήθεια του προγράμματος φωτογραφίας **Kodak Digital Science1D**.

2.6 Έλεγχος μεταβίβασης των βακτηρίων στα έντομα μετά τη μεταφορά του βακτηρίου με μικροενέσεις

Η μεταφορά του βακτηρίου γίνεται στο στάδιο των εμβρύων. Από τους απογόνους των εμβρύων αυτών δημιουργούμε ισομητρικές σειρές (isofemale lines), δηλαδή σειρές εντόμων που προέρχονται 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. Οι απόγονοι ενός μολυσμένου θηλυκού αποτελούν μια νέα σειρά. Ο έλεγχος της μεταβίβασης του βακτηρίου συνεχίζεται για κάποιες γενιές έως ότου σταθεροποιηθεί η μόλυνση και έχουμε πλήρως μολυσμένα άτομα. Από κάθε σειρά επιλέγονται τυχαία 10 θηλυκά και 10-20 αρσενικά άτομα. Κάθε θηλυκό τοποθετείται ξεχωριστά σε ένα μπουκαλάκι με θρεπτικό υλικό μαζί με ένα ή δύο αρσενικά άτομα, της ίδιας σειράς, 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 απόγονοι αναμειγνύονται δημιουργώντας τη νέα σειρά.

2.7 Μέτρηση της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας (CI)

Έγιναν διασταυρώσεις μεταξύ ενός αγονιμοποίητου θηλυκού και ενός αγονιμοποίητου αρσενικού ηλικίας 2 ημερών και τα δύο, σε διάφανα πλαστικά

μπουκαλάκια που στο κάτω μέρος τους είχαν πιατάκια petri με πήκτωμα φρουτοχυμού (100% φυσικός χυμός φρούτων από συμπυκνωμένο χυμό του εμπορίου, 3% άγαρ 3% nirogen). Στο πιάτο αυτό γέννησαν τα αυγά τους οι μύγες. Οι διασταυρώσεις πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου γύρω στους 25 βαθμούς Κελσίου. Ανά μια μέρα τα πιατάκια αλλάζονταν και μετρούνταν τα αυγά που υπήρχαν στο πήκτωμα. Έπειτα τα πιατάκια φυλάσσονταν για άλλες 36 ώρες μέχρι να εκκολαφθούν τα αυγά. Στο τέλος μετρήθηκαν τα αυγά που δεν εκκολάφθηκαν. Η διαδικασία απαιτούσε να συλλέξουμε το λιγότερο 45-50 έμβρυα από κάθε διασταύρωση. Το ποσοστό στειρότητας είναι ο αριθμός των μη εκκολαπτόμενων εμβρύων προς το συνολικό αριθμό των εμβρύων που γεννήθηκαν.

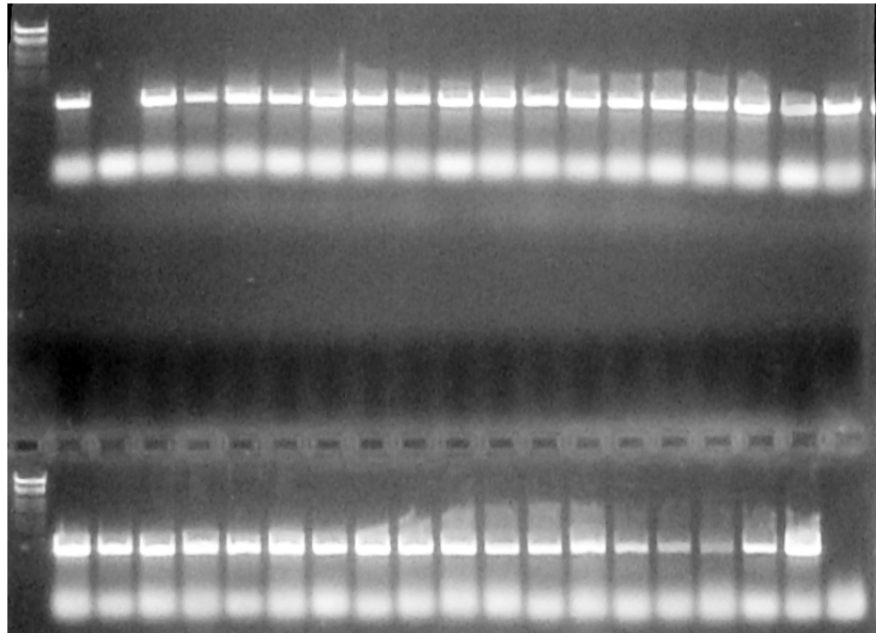
Οι μέσες τιμές και τα τυπικά σφάλματα υπολογίστηκαν με το πρόγραμμα MS Excel.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Επιβεβαίωση της μόλυνσης των εντόμων

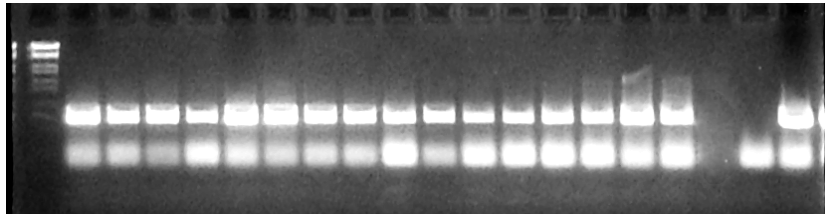
Πήραμε έντομα που ήταν ήδη μολυσμένα με το βακτήριο που προκαλεί θανάτωση και προέρχεται από την *D. Innubila*. Τα έντομα βρίσκονταν στην ενδέκατη γενιά μετά την μόλυνση τους. Για να επιβεβαιώσουμε ότι η μόλυνση συνεχίζει να υπάρχει πήραμε από κάθε σειρά 10 έως 20 έντομα τυχαία και κάναμε PCR. Μας έδωσαν 100% θετικά αποτελέσματα. Παρακάτω δίνονται οι φωτογραφίες από τα θετικά αποτελέσματα

Σειρά 24.



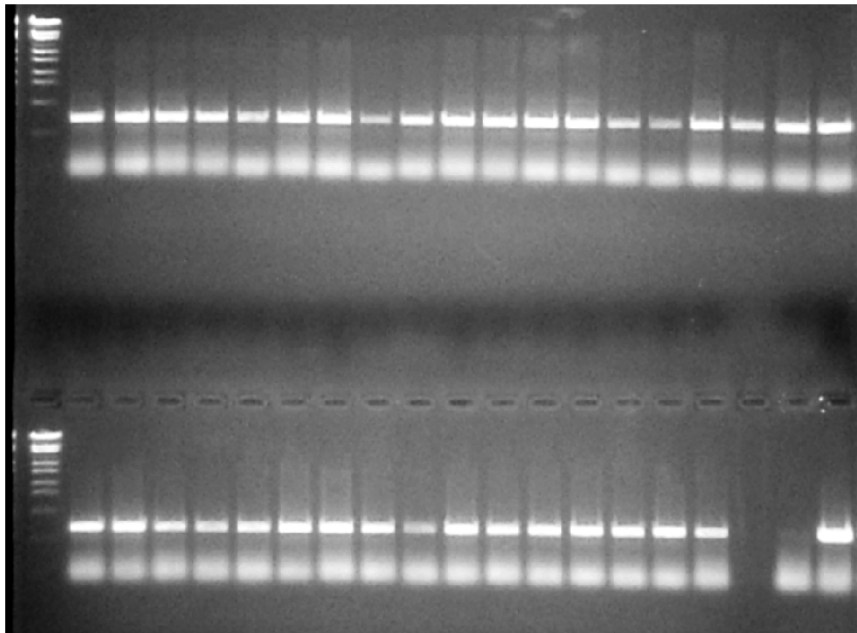
+ -

Σειρά 4.



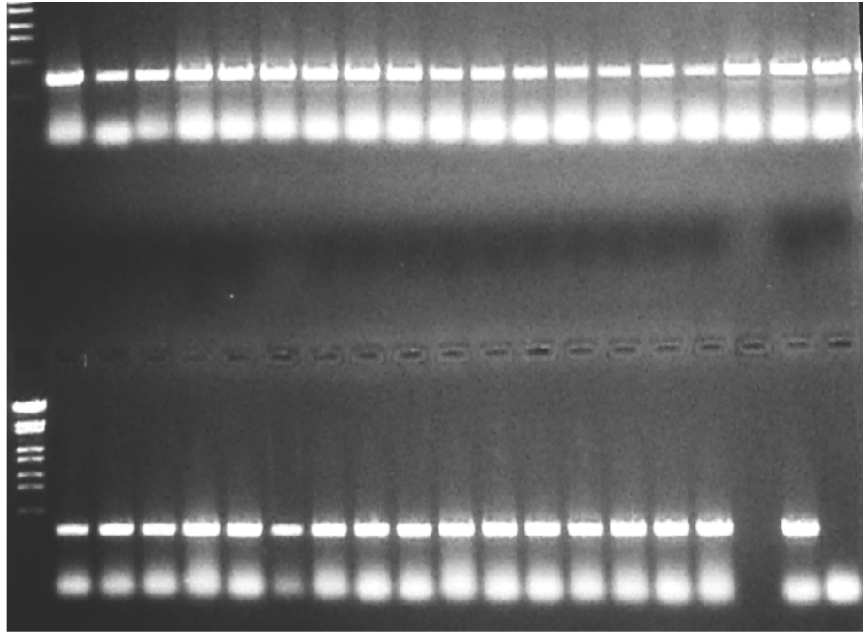
- +

Σειρά 30.



- +

Σειρά 45.



+ -

Αφού διαπιστώσαμε ότι όλα τα άτομα ήταν θετικά (όπως δείχνουν και οι φωτογραφίες παραπάνω) αρχίσαμε να τα καλλιεργούμε σε πλαστικούς σωλήνες με θρεπτικό υλικό δημιουργώντας ισομετρικές σειρές δηλαδή πήραμε ένα θηλυκό μολυσμένο και το διασταυρώσαμε με 1 ή 2 αρσενικά για προκύψουν οι απόγονοι ομοίως μολυσμένοι μεταφέροντας το βακτήριο σίγουρα σε αυτούς. Για να μπορούμε να πάρουμε έγκυρα αποτελέσματα.

3.2 Αναλογία φύλλου των εντόμων

Με σκοπό να ελέγξουμε αν το βακτήριο στον νέο του ξενιστή προκαλεί θανάτωση στα αρσενικά μετρήσαμε την αναλογία του φύλλου στα έντομα για τέσσερις γενιές. Καλλιεργήσαμε για τέσσερις γενιές έντομα σε ειδικούς πλαστικούς σωληνίσκους. Μετρήσαμε την αναλογία του φύλλου σε κάθε γενιά. Οι μετρήσεις γινόταν κάθε 15 μέρες (1 γενιά). Η διαδικασία αυτή κράτησε συνολικά 2 μήνες. Πήραμε τα παρακάτω αποτελέσματα που αναγράφονται στους πίνακες.

ΠΙΝΑΚΑΣ 1

ΓΕΝΙΑ F10

Σειρά	θηλυκά	αρσενικά
24	120	124
45	326	321
30	340	346
4	193	183
Σύνολο	979	974

ΠΙΝΑΚΑΣ 2

ΓΕΝΙΑ F11

Σειρά	θηλυκά	αρσενικά
24	103	105
45	80	106
30	74	78
4	66	68
Σύνολο	323	357

ΠΙΝΑΚΑΣ 3

ΓΕΝΙΑ F12

Σειρά	θηλυκά	αρσενικά
24	176	232
45	240	270
30	217	254
4	201	223
Σύνολο	834	779

ΠΙΝΑΚΑΣ 4

ΓΕΝΙΑ F13

Σειρά	θηλυκά	αρσενικά
24	220	209
45	162	153
30	189	174
4	161	187
Σύνολο	732	723

3.3 Μέτρηση της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας

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 στελέχη που είχαν μολυνθεί με το στέλεχος της *Wolbachia*, που προκαλούσε θανάτωση στα αρσενικά, με θηλυκά άτομα που δεν ήταν μολυσμένα. Για την κάθε μία από τις σειρές μολυσμένων εντόμων πραγματοποιήσαμε περίπου 20 διασταυρώσεις με σκοπό να έχουμε αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα για κάθε διασταύρωση. Οι διασταυρώσεις με αριθμό εμβρύων <50 αφαιρούνταν από το σύνολο.

Συγχρόνως, με όμοιο τρόπο πραγματοποιήσαμε την αντίστροφη (reciprocal) διασταύρωση, δηλαδή μη μολυσμένα αρσενικά με μολυσμένα θηλυκά για να δούμε τα φυσιολογικά ποσοστά της εμβρυικής θνησιμότητας και να πάρουμε έτσι αληθή τελικά αποτελέσματα.

Οι διασταυρώσεις που έγιναν είναι οι εξής:

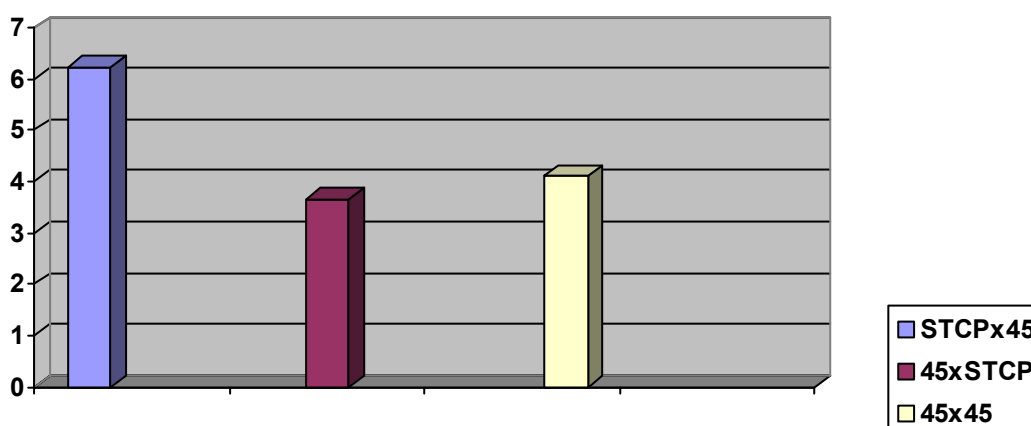
♀ STCP x 45 ♂ στην οποία έγιναν 17 διασταυρώσεις με συνολικά 1319 αυγά και 66 αγονιμοποίητα αυγά δηλαδή είχαμε ένα ποσοστό αγονιμοποίητων αυγών 6.22%. Ταυτόχρονα έγινε και η αντίθετη διασταύρωση δηλαδή ♀ 45 x STCP ♂ στην οποία έγιναν 18 διασταυρώσεις με συνολικό αριθμό αυγών 1173 και 43 αγονιμοποίητα δηλαδή ποσοστό 3.65%. Τέλος έγινε και η διασταύρωση ♀ 45 x 45 ♂ που μας έδωσε σε 17 διασταυρώσεις 1162 αυγά και 41 αγονιμοποίητα και ποσοστό 4.11% (Πίνακας 5).

ΠΙΝΑΚΑΣ 5 ΚΥΤΤΑΡΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΗ ΑΣΥΜΒΑΤΟΤΗΤΑ

ΔΙΑΣΤΑΥΡΩΣΗ ΘΗΛΥΚΟ Χ ΑΡΣΕΝΙΚΟ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΔΙΑΣΤΑΥΡΩΣΕΩΝ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΕΜΒΡΥΩΝ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΜΗ ΕΚΚΟΛΑΦΘΕΝΤΩΝ ΕΜΒΡΥΩΝ	%ΕΜΒΡΥΙΚΗ ΘΝΗΣΙΜΟΤΗΤΑ± SE
STCP x 45	17	1319	66	6.22±1.87
45 x STCP	18	1173	43	3.65±1.12
45 x 45	17	1162	41	4.11±0.77

ΕΙΚΟΝΑ 1

Παρουσίαση των αποτελεσμάτων της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας σε ραβδόγραμμα. Σειρά 45



Η ♀ STCP x 30 ♂ στην οποία έγιναν 18 διασταυρώσεις με συνολικά 1551 αυγά και 80 αγονιμοποίητα αυγά δηλαδή είχαμε ένα ποσοστό 5.25%. Ταυτόχρονα έγινε και η αντίθετη διασταύρωση δηλαδή ♀30 X STCP ♂ στην οποία έγιναν 13 διασταυρώσεις με συνολικό αριθμό αυγών 827 και 34 αγονιμοποίητα δηλαδή ποσοστό 4.00%. Τέλος έγινε και η διασταύρωση ♀30 x 30 ♂ που μας έδωσε σε 14 διασταυρώσεις 1234 αυγά και 23 αγονιμοποίητα και ποσοστό 1.86% (Πίνακας 6).

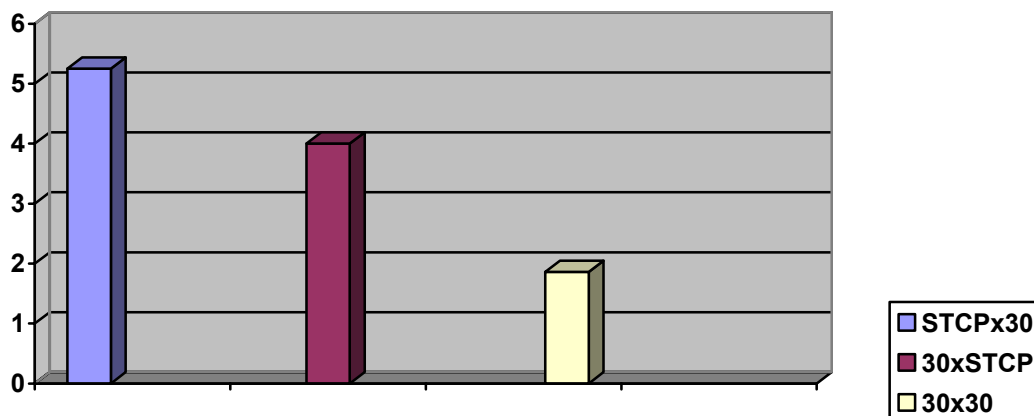
ΠΙΝΑΚΑΣ 6

ΚΥΤΤΑΡΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΗ ΑΣΥΜΒΑΤΟΤΗΤΑ

ΔΙΑΣΤΑΥΡΩΣΗ ΘΗΛΥΚΟ X ΑΡΣΕΝΙΚΟ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΔΙΑΣΤΑΥΡΩΣΕΩΝ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΕΜΒΡΥΩΝ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΜΗ ΕΚΚΟΛΑΦΘΕΝΤΩΝ ΕΜΒΡΥΩΝ	%ΕΜΒΡΥΙΚΗ ΘΝΗΣΙΜΟΤΗΤΑ± SE
STCP x 30	18	1551	80	5,25±1,24
30 x STCP	13	827	34	4,00±1,42
30 x 30	14	1234	23	1,86±0,48

ΕΙΚΟΝΑ 2

Παρουσίαση των αποτελεσμάτων της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας σε ραβδόγραμμα. Σειρά 30



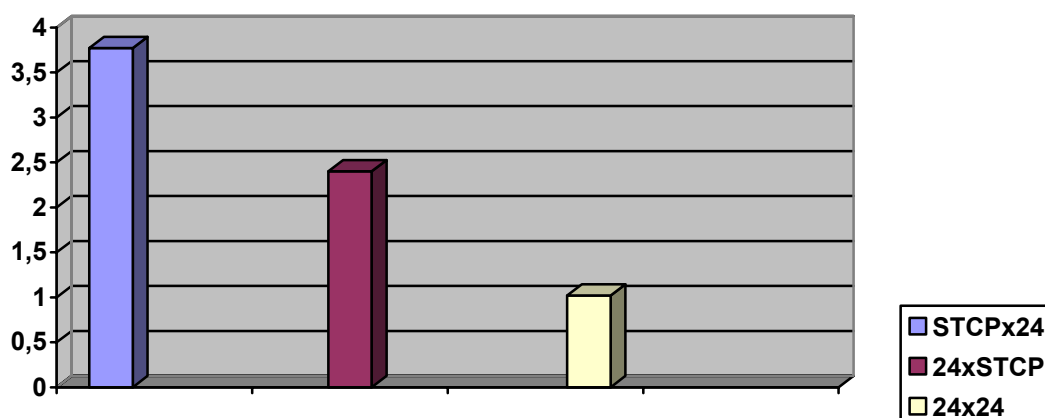
Η ♀STCP x 24 ♂ στην οποία έγιναν 16 διασταυρώσεις με συνολικά 881 αυγά και 31 αγονιμοποίητα αυγά δηλαδή είχαμε ένα ποσοστό 3.77%. Ταυτόχρονα έγινε και η αντίθετη διασταύρωση δηλαδή η ♀24 X STCP ♂ στην οποία έγιναν 21 διασταυρώσεις με συνολικό αριθμό αυγών 1349 και 30 αγονιμοποίητα δηλαδή ποσοστό 2.4%. Τέλος έγινε και η διασταύρωση ♀ 24 x 24 ♂ που μας έδωσε σε 15 διασταυρώσεις 1047 αυγά και 10 αγονιμοποίητα και ποσοστό 1,02% (Πίνακας 7).

ΠΙΝΑΚΑΣ 7 ΚΥΤΤΑΡΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΗ ΑΣΥΜΒΑΤΟΤΗΤΑ

ΔΙΑΣΤΑΥΡΩΣΗ ΘΗΛΥΚΟ Χ ΑΡΣΕΝΙΚΟ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΔΙΑΣΤΑΥΡΩΣΕΩΝ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΕΜΒΡΥΩΝ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΜΗ ΕΚΚΟΛΑΦΘΕΝΤΩΝ ΕΜΒΡΥΩΝ	%ΕΜΒΡΥΙΚΗ ΘΝΗΣΙΜΟΤΗΤΑ± SE
STCP x 24	16	881	31	3.77±0.86
24 x STCP	21	1349	30	2.4±0.56
24 x 24	15	147	10	1.02±0.24

ΕΙΚΟΝΑ 3

Παρουσίαση των αποτελεσμάτων της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας σε ραβδόγραμμα. Σειρά 24



Η ♀ STCP x 4♂ στην οποία έγιναν 16 διασταυρώσεις με συνολικά 875 αυγά και 10 αγονιμοποίητα αυγά δηλαδή είχαμε ένα ποσοστό 1,62%. Ταυτόχρονα έγινε και η αντίθετη διασταύρωση δηλαδή η ♀4 X STCP ♂ στην οποία έγιναν 16 διασταυρώσεις με συνολικό αριθμό αυγών 1000 και 19 αγονιμοποίητα δηλαδή ποσοστό 1,84%. Τέλος έγινε και η διασταύρωση ♀4 x 4♂ που μας έδωσε σε 18 διασταυρώσεις 1214 αυγά και 15 αγονιμοποίητα και ποσοστό 1,35%.

Τέλος έγινε και η διασταύρωση ♀ STCP x STCP ♂ η οποία μας έδωσε 14 διασταυρώσεις 1313 αυγά και 37 αγονιμοποίητα δηλαδή ποσοστό 2,77%. Την διασταύρωση αυτήν την κάναμε για να δούμε το ποσοστό θνησιμότητας. (Πίνακας 8)

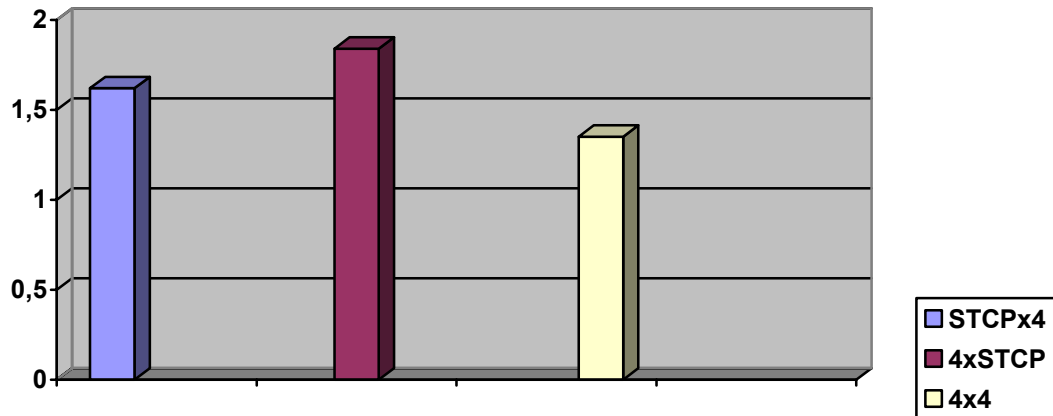
ΠΙΝΑΚΑΣ 8 ΚΥΤΤΑΡΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΗ ΑΣΥΜΒΑΤΟΤΗΤΑ

ΔΙΑΣΤΑΥΡΩΣΗ ΘΗΛΥΚΟ X ΑΡΣΕΝΙΚΟ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΔΙΑΣΤΑΥΡΩΣΕΩΝ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΕΜΒΡΥΩΝ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΜΗ ΕΚΚΟΛΑΦΘΕΝΤΩΝ ΕΜΒΡΥΩΝ	%ΕΜΒΡΥΙΚΗ ΘΝΗΣΙΜΟΤΗΤΑ± SE
STCP x 4	16	875	10	1,62±0,62
4 x STCP	16	1000	19	1,84±0,39
4 x 4	18	1214	15	1,35±0,27

STCP x STCP	14	1313	37	2.77±0.75
-------------	----	------	----	-----------

ΕΙΚΟΝΑ 4

Παρουσίαση των αποτελεσμάτων της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας σε ραβδόγραμμα. Σειρά 4



4.ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Πήραμε έντομα που περιείχαν ήδη το βακτήριο “male-killing” καθώς είχαν μολυνθεί εργαστηριακά με μικροενέσεις. Με συνεχείς επεκτάσεις των καλλιιεργειών δημιουργήσαμε έναν ικανοποιητικό αριθμό μολυσμένων εντομών για να μπορούμε να κάνουμε τον απαραίτητο αριθμό διασταυρώσεων. Είχαμε να ελέγξουμε αφενός αν εκφράζεται η ιδιότητα του βακτηρίου να προκαλεί θανάτωση στα αρσενικά στο νέο του ξενιστή τη *D.simulans* και αφετέρου αν προκαλεί κυτταροπλασματική ασυμβατότητα σε αυτήν.

Η αναλογία θηλυκών και αρσενικών εντόμων καταμετρήθηκε για τέσσερις γενιές και όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα δεν υπάρχει μείωση ή θανάτωση αρσενικών. Η φυσιολογική αναλογία του φύλου δείχνει ότι το βακτήριο δεν εκφράζει την ιδιότητα του, πιθανόν γιατί καταστέλλεται στον νέο του ξενιστή.

Ο έλεγχος της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας έγινε μέσω των κατάλληλων διασταυρώσεων. Σε αρκετές περιπτώσεις χρησιμοποιήσαμε μικρό αριθμό διασταυρώσεων αλλά παρόλα αυτά τα αποτελέσματα ήταν αντιπροσωπευτικά. Αυτό έγινε γιατί είχαμε κάποια προβλήματα κατά την διαδικασία αναπαραγωγής όπως θάνατος αρσενικού ή θηλυκού λόγο κακής μεταχείρισης ή νάρκωσης για αρκετή ώρα και χαμηλών θερμοκρασιών [η εργασία πραγματοποιήθηκε τέλη χειμώνα –αρχές άνοιξης] που μείωναν την θερμοκρασία δωματίου με αποτέλεσμα τη μείωση των συζεύξεων και την παραγωγή αυγών γενικότερα.

Τα αποτελέσματα από τον έλεγχο της ικανότητας του βακτηρίου να προκαλεί κυτταροπλασματική ασυμβατότητα μας έδειξαν ότι υπάρχει φυσιολογική θνησιμότητα εμβρύων με το ποσοστό να ποικίλει από διασταύρωση σε διασταύρωση αλλά γενικά να είναι σε πολύ χαμηλά επίπεδα. Με μεγαλύτερο το 6,22% στην διασταύρωση STCP X 45 και μικρότερο το 1,62% στην STCP X 4.

Συμπερασματικά θα λέγαμε ότι το βακτήριο καταστέλλεται στη *D.simulans* και δεν εκφράζει κανέναν φαινότυπο. Δεν εκφράζει την ιδιότητα της θανάτωσης των αρσενικών που έφερε στον φυσικό του ξενιστή αλλά ούτε το φαινότυπο

της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας που είναι ο πιο κοινός φαινότυπος στον νέο του ξενιστή. Βλέπουμε την σημασία της επίδρασης του ξενιστή στη δράση του βακτηρίου, γεγονός που μας δείχνει πόσο καλά πρέπει να μελετήσουμε αυτή την σχέση πριν την χρησιμοποιήσουμε για την καταπολέμηση επιβλαβών εντόμων. Γενικά τα αποτελέσματα μας όμως μας δίνουν ενθαρρυντικά μηνύματα για το μέλλον της έρευνας στο χώρο αυτό.

